コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.4 薬物動態試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 3
表目次 3
略語一覧 4
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 9
2.6.4.2.1 非臨床試験における生体試料中薬物濃度分析法－コンシズマブ ELISA 法 9
2.6.4.2.1.1 PK cyno アッセイ I 10
2.6.4.2.1.2 PK cyno アッセイII 10
2.6.4.2.2 非臨床の生体試料中薬物濃度分析法- rFVIIa 凝固アッセイ 11
2.6.4.2.3 非臨床薬力学的アッセイ 12
2.6.4.2.3.1 希釈 PT（dPT）アッセイ 13
2.6.4.2.3.2 Actichrome® TFPI アッセイ－残存 TFPI 機能活性 13
2.6.4.2.3.3 S2222－残存 TFPI 機能活性（残存 TFPI による FXa の生成阻害） 14
2.6.4.2.3.4 遊離 TFPI ELISA (Asserachrome®アッセイ） 14
2.6.4.2.3.5 総 TFPI ELISA 15
2.6.4.2.4 抗体アッセイ 16
2.6.4.2.4.1 カニクイザルにおける抗コンシズマブ抗体の検出 16
2.6.4.2.4.2 サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）及び免疫複合体 ELISA によるカニクイザルの ADA/コンシズマブ複合体の検出 17
2.6.4.2.4.3 サイズ排除クロマトグラフィー（SEC） 17
2.6.4.2.4.4 ADA/コンシズマブ免疫複合体（IC）検出試験 17
2.6.4.2.4.5 カニクイザルにおける循環性免疫複合体（CIC）の検出 17
2.6.4.3 吸収 18
2.6.4.3.1 単回投与時の薬物動態／トキシコキネティクス 18
2.6.4.3.2 反復投与時の薬物動態／トキシコキネティクス 20
2.6.4.3.2.1 DRF 試験（試験番号：208250） 21
2.6.4.3.2.2 4 週間投与試験（試験番号：210130） 21
2.6.4.3.2.3 13 週間投与試験（試験番号：209206） 22
2.6.4.3.2.4 26 週間投与試験（試験番号：211087） 22
2.6.4.3.2.5 52 週間投与試験（試験番号：213542） 23
2.6.4.4 分布 27
2.6.4.5 代謝 27
2.6.4.6 排泄 27
2.6.4.7 薬物動態学的相互作用 27
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 28

2.6.4.8.1　カニクイザル PK モデル（試験番号：322182）.....28
2.6.4.9　考察及び結論.....29
参考文献.....31

図目次

ページ

図 2.6.4-1　サルに静脈内投与時のコンシズマブの血漿中濃度曲線.....19
図 2.6.4-2　20 mg/kg のコンシズマブをサルに静脈内投与時のコンシズマブ、遊離 TFPI 及び総 TFPI 濃度（試験番号：208250）.....20
図 2.6.4-3　52 週間試験におけるコンシズマブの曝露量及び遊離 TFPI 濃度の個体別プロット（試験番号：213542）.....24
図 2.6.4-4　52 週間試験で 0.5 mg/kg/日（NOAEL）を投与したサルにおいて ADA 陰性及び陽性を示した血漿中コンシズマブ濃度.....26

表目次

ページ

表 2.6.4-1　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験におけるコンシズマブの TK データの概要.....8
表 2.6.4-2　非臨床試料の分析に用いたアッセイの概要.....9
表 2.6.4-3　PK cyno アッセイ I 及び II の差異.....10
表 2.6.4-4　PK cyno アッセイ I 及び PK cyno アッセイ II におけるバリデーションパラメーターの概要.....11
表 2.6.4-5　非臨床 PK 試験における血漿中コンシズマブ濃度測定.....11
表 2.6.4-6　rFVIIa 凝固アッセイのバリデーションパラメーター.....12
表 2.6.4-7　dPT アッセイにおけるヒト血漿のバリデーションパラメータ.....13
表 2.6.4-8　Actichrome® TFPI アッセイにおけるバリデーションパラメーター.....14
表 2.6.4-9　残存 TFPI 機能活性アッセイ（S2222）におけるバリデーションパラメーター.....14
表 2.6.4-10　遊離 TFPI アッセイ (Asserachrome® #00261）における適格性パラメーター.....15
表 2.6.4-11　総 TFPI ELISA アッセイにおける適格性パラメーター.....16
表 2.6.4-12　抗コンシズマブ結合抗体アッセイにおけるバリデーションパラメーター.....17
表 2.6.4-13　単回静脈内投与時のコンシズマブの薬物動態パラメーター（ノンコンパートメント解析）の概要.....18
表 2.6.4-14　単回皮下投与時のコンシズマブの PK パラメーター（ノンコンパートメント解析）の概要.....20
表 2.6.4-15　カニクイザルを用いた GLP 適用の反復投与毒性試験におけるコンシズマブの曝露量の概要.....21

略語一覧

本略語一覧は、非臨床の概要文を通して使用されている共通の略語一覧である。したがって、略語の中には本概要文に関連しないものも含まれる場合がある。

ADA	:	Anti-drug antibody（抗薬物抗体）
ADCC	:	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity（抗体依存性細胞傷害）
APC	:	Activated protein C（活性化プロテイン C）
aPCC	:	Activated prothrombin complex concentrates（活性型プロトロンビン複合体製剤）
APTT	:	Activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AT	:	Antithrombine（アンチトロンビン）
AUC	:	Area under the curve（濃度－時間推移曲線下面積）
AUC_{inf}	:	Area under the concentration–time curve from time zero to infinity（投与後 0～∞時間までの AUC）
BSA	:	Bovine serum albumin（ウシ血清アルブミン）
C3	:	Complement component 3（補体第 3 成分）
C_{max}	:	Maximum concentration（最高血中濃度）
CAS	:	Chemical Abstract Service
CE-SDS	:	Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate（キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human Use（欧州医薬品委員会）
CHO	:	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CIC	:	Circulating immune complex（循環性免疫複合体）
CNS	:	Central nervous system（中枢神経系）
CoA	:	Certificate of analysis（分析証明書）
CP	:	Choroid plexus（脈絡叢）
CV	:	Coefficient of variation（変動係数）
DIC	:	Disseminated intravascular coagulation（播種性血管内凝固症候群）
DNA	:	Deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DRF	:	Dose range finding（用量範囲設定）
dPT	:	Dilute prothrombin time（希釈プロトロンビン時間）
DP	:	Drug product（製剤）
DS	:	Drug substance（原薬）
EC_{50}	:	50% effective concentration（50%有効濃度）
ED_{50}	:	Half maximal effective dose（50%有効量）
ECG	:	Electrocardiogram（心電図）
ELISA	:	Enzyme-linked immuno-sorbent assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EOSL	:	End-of-shelf-life（有効期間内規格）
EU	:	European Union（欧州）
FcR	:	Fc receptor（Fc 受容体）
FcγR	:	Fcγ receptor（Fcγ 受容体）
FDA	:	US Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
FHD	:	First-Human dose（ヒト初回投与）
FV	:	Coagulation factor V（血液凝固第 V 因子）
FIX	:	Coagulation factor IX（血液凝固第 IX 因子）
FIXa	:	Activated coagulation factor IX（活性型血液凝固第 IX 因子）
FVII	:	Coagulation factor VII（血液凝固第 VII 因子）
FVIIa	:	Activated coagulation factor VII（活性型血液凝固第 VII 因子）

FVIII	:	Coagulation factor VIII（血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	Coagulation factor X（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	Activated coagulation factor X（活性型血液凝固第 X 因子）
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）
HA	:	Haemophilia A（血友病 A）
HB	:	Haemophilia B（血友病 B）
HCP	:	Host cell protein（宿主細胞由来タンパク質）
[redacted]	:	[redacted]
HRP	:	Horseradish peroxidase（西洋ワサビペルオキシダーゼ）
HSPG	:	Heparan sulfate proteoglycan（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）
hTFPI	:	Human tissue factor pathway inhibitor 1（ヒト組織因子経路インヒビター 1）
HUVEC	:	Human umbilical vein endothelial cells（ヒト臍帯静脈内皮細胞）
IC	:	Immune complex（免疫複合体）
ICAM-1	:	Intercellular adhesion molecule 1（細胞間接着分子 1）
ICH	:	International Committee for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
IgG	:	Immunoglobulin G（免疫グロブリン G）
IHC	:	Immunohistochemistry（免疫組織化学的検査）
IL	:	Interleukin（インターロイキン）
Incon	:	Inconclusive（決定的ではない）
INF	:	Interferon（インターフェロン）
INN	:	International Nonproprietary Name（国際一般名）
ISR	:	Incurred sample reanalysis
IU	:	International Units（国際単位）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
K1, K2, K3	:	Kunitz domain 1, 2, 3（Kunitz ドメイン 1、2、3）
kDa	:	Kilo Daltons（キロダルトン）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限）
LMWH	:	Low molecular weight heparin（低分子量ヘパリン）
LOD	:	Level of detection（検出限界）
LPS	:	Lipopolysaccharide（リポ多糖）
mAb	:	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MRD	:	Minimum required dilution
N/A	:	Not applicable（該当なし）
NA	:	Not analysed（分析なし）
NCA	:	Non-compartmental analysis（ノンコンパートメント解析）
NNC0172-2021 (NNC0172-0000-2021)	:	Concizumab（コンシズマブ）
NOAEL	:	No observed adverse effect level（無毒性量）
NOEL	:	No observed effect level（無影響量）
NR	:	Not reported（報告なし）
NZW	:	New Zealand white（ニュージーランド白色種）
OD	:	Optical density（光学密度）
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
OPD	:	O-phenylenediamine dihydrochloride（O-フェニレンジアミン二塩酸塩）
pAb	:	Polyclonal antibody（ポリクローナル抗体）
PBMC	:	Peripheral blood mononuclear cells（末梢血単核球）

PBS	:	Phosphate buffered saline（リン酸緩衝生理食塩水）
PD	:	Pharmacodynamic(s)（薬力学）
PK	:	Pharmacokinetic(s)（薬物動態）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）
Pos	:	Positive（陽性）
PT	:	Prothrombin time（プロトロンビン時間）
QC	:	Quality Control（品質管理）
q.s.	:	Quantum satis（適量）
r	:	recombinant（遺伝子組換え）
rcf	:	Relative centrifugal force（相対遠心力）
Rac	:	Ratio of accumulation（蓄積比）
RE	:	Relative error（相対誤差）
rFVIIa	:	Recombinant activated coagulation factor VII（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
rFVIII	:	Recombinant coagulation factor VIII（遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）
rsTF	:	Recombinant soluble tissue factor（遺伝子組換え可溶型組織因子）
s.c.	:	Subcutaneous（皮下）
SD	:	Standard deviation（標準偏差）
SDS-PAGE	:	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法）
SEC	:	Size exclusion chromatography（サイズ排除クロマトグラフィ）
SEM	:	Standard error of the mean（標準誤差）
SPR	:	Surface plasmon resonance（表面プラズモン共鳴）
$t_{1/2}$	:	Terminal half life（終末相半減期）
TAT	:	Thrombin-anti thrombin（トロンビンーアンチトロンビン）
TCR	:	Tissue cross-reactivity（組織交差反応性）
TEG	:	Thromboelastography（トロンボエラストグラフィー法）
TF	:	Tissue factor（組織因子）
TFPI	:	Tissue factor pathway inhibitor（組織因子経路インヒビター）
TM	:	Thrombomodulin（トロンボモジュリン）
t_{max}	:	Time to reach maximum concentration（最高血中濃度到達時間）
TMDD	:	Target-mediated drug disposition（標的介在性の薬物動態）
TNF	:	Tumour necrosis factor（腫瘍壊死因子）
ULOQ	:	Upper limit of quantification（定量上限）
USP	:	United States Pharmacopoeia（米国薬局方）
VCAM-1	:	Vascular cell adhesion molecule 1（血管細胞接着分子 1）
V_{max}	:	Maximum rate of elimination（最大消失速度）
w/v	:	Weight/volume（重量／容積）

2.6.4.1　まとめ

コンシズマブの薬物動態（PK）に関しては、ウサギ（薬理試験に使用）及びカニクイザル（毒性試験に使用）に 0.1～20 mg/kg の用量を単回静脈内及び単回皮下投与時の PK を評価した。さらに、用量範囲設定（DRF）試験の一部と、4、13、26 及び 52 週間反復投与毒性試験の 5 試験（いずれもカニクイザル）で、0.5～200 mg/kg のコンシズマブのトキシコキネティクス（TK）を評価した。

開発中、コンシズマブの血漿中濃度を酵素免疫吸着測定法（ELISA）で測定した。血漿中の組織因子経路インヒビター（TFPI）の有無を検討するため、2 種類の ELISA 法を用いた。1 つ目は遊離 TFPI（すなわち、コンシズマブに結合していない TFPI）を測定し、2 つ目はコンシズマブに結合している TFPI を含む総 TFPI を測定する分析法である。抗薬物抗体（ADA）の測定については、非臨床試験における抗コンシズマブ抗体の検出にブリッジング ELISA 法が用いられた。さらに、2 種類の探索的測定法を用いて、血漿中の免疫複合体（IC）の有無を評価した。1 つ目はサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）と IC ELISA の組み合わせを用いた分析法で、2 つ目は酵素免疫測定法（市販のアッセイキット）による循環性免疫複合体（CIC）の分析法である。

PK 試験から、コンシズマブはより低用量で標的介在性の薬物動態（TMDD）の影響を受けることが示された。TMDD はモノクローナル抗体（mAb）医薬品に共通した特性であり、抗体とその標的分子との相互作用により薬物－標的分子複合体が消失する場合に観察される。これは消失過程における飽和であり、TMDD による薬物消失の程度は生体に存在する標的分子の量によって決まる。このクリアランス経路は、抗体の全体的なクリアランスに寄与する。TMDD が生じると、抗体の体内動態は非線形となり、一般的に低濃度ではクリアランスが速く、抗体の用量が増加するとクリアランスが低下する[1]。高濃度のコンシズマブ（カニクイザルで 10,000～20,000 ng/mL 以上）では、TMDD による消失が飽和状態となり、クリアランスが緩徐で終末相半減期（$t_{1/2}$）が約 200 時間の平坦な血漿中濃度プロファイルを示すことから、サルにおける mAb の典型的な PK と類似する。ウサギ及びカニクイザルにおいて、コンシズマブのクリアランスは投与量に大きく依存した。コンシズマブの用量依存的なクリアランスにより、カニクイザルの反復投与毒性試験における曝露量は用量比を上回る増大を示した。

コンシズマブの単回皮下投与時のバイオアベイラビリティは、ウサギ及びカニクイザルで約 80%であった。

最長 52 週間のカニクイザルを用いた毒性試験において、静脈内投与（30 又は 200 mg/kg/週）及び皮下投与（0.5～50 mg/kg/日）により、高濃度の血漿中コンシズマブの曝露が確認された。毒性試験では、特に低用量での TMDD の影響を回避するため、コンシズマブを 1 日 1 回皮下投与した。この投与方法を用いることで、曝露の飽和が生じる血漿中濃度を維持することができた。1 日 1 回皮下反復投与後のコンシズマブの蓄積は大きく、特に低用量〔平均蓄積比（Rac）が最大で約 400〕で初回投与後の血漿中濃度が非常に低かったのは吸収が緩徐で、TMDD によるものであった。週 1 回の静脈内投与後には、蓄積はそれほど顕著ではなかった（Rac：2～6）。

52 週間投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）は 0.5 mg/kg/日（皮下投与）であった。

カニクイザルを用いた 4 週間薬物相互作用試験（215431 試験）において、コンシズマブを 1 日 1 回 28 日間投与し、定常状態の濃度が得られたが、コンシズマブは遺伝子組換え活性型第 VII 因子（rFVIIa）の PK には影響を及ぼさなかった。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では、コンシズマブに対する ADA の発生により曝露量への影響がみられた。この影響は 52 週間試験で顕著であった。この試験では、低用量群（0.5mg/kg/日の皮下投与；NOAEL）の 16/18 頭において、一部の測定時点で ADA によりコンシズマブの曝露量が低下した。

表 2.6.4-1　　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験におけるコンシズマブの TK データの概要

Study ID	Duration	Dose (mg/kg/day[a])	Route	C_{max}[b] (ng/mL)	AUC_{0-24h}[b] (h*ng/mL)
210130	4 weeks	3	s.c.	638,000	14,100,000
		9	s.c.	1,730,000	37,400,000
		30[a]	i.v.	1,290,000	154,000,000[b]
215431	4 weeks	9/1[c]	s.c.	210,000	4,590,000
209206	13 weeks	1	s.c.	282,000	5,930,000
		10	s.c.	4,200,000	83,600,000
		50	s.c.	14,700,000	323,000,000
		200[a]	i.v.	11,800,000	1,580,000,000[b]
211087	26 weeks	3	s.c.	992,000	21,400,000
		9	s.c.	3,310,000	76,500,000
		30[a]	i.v.	2,650,000	307,000,000[b]
213542	52 weeks	0.5[d]	s.c.	82,600	1,910,000
		1[d]	s.c.	309,000	6,890,000
		9	s.c.	5,070,000	99,300,000

Note: Mean of male and female animals.

[a]mg/kg/week for i.v. [b]During last week of dosing, AUC_{0-168h} for i.v. [c]The dose in this drug interaction study was 9 mg/kg/day for the first four days, and 1 mg/kg/day for the following 24 days. [d]Exposure in animals being ADA-negative (0.5 mg/kg/day), ADA inconclusive or having low-titre ADAs.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibodies; AUC = area under the concentration–time curve; C_{max} = maximum concentration.

カニクイザルを用いたコンシズマブの PK 及び毒性試験において、血漿中の残存 TFPI 機能活性を測定した結果、血漿中 TFPI 機能活性がコンシズマブ投与後に中和されたことが示された。回復期間中、あるいは ADA が発生した場合に血漿中コンシズマブ濃度が低下すると、TFPI 機能活性はベースライン値に戻った。

PK 及び毒性試験において、遊離 TFPI 及び総 TFPI（遊離 TFPI 及びコンシズマブ結合型 TFPI の両方を含む）の血漿中濃度を測定した。コンシズマブ投与により、遊離 TFPI 濃度は減少したが、総 TFPI は増加した。コンシズマブを低用量で単回皮下投与した場合、総 TFPI の増加はわずかであり、持続性は低かったが、反復投与後にはコンシズマブ結合型 TFPI が蓄積し、総 TFPI 値は定常状態レベルである 10～40 nmol/L（438～1750 ng/mL）となった。正常人の平均血漿中 TFPI 濃度は 1.6 nmol/L (70 ng/mL）である[2]が、52 週間反復投与毒性試験（213542 試験）では、基準値の平均総 TFPI 濃度は 0.74～0.94 nmol/L（32.4～41.1 ng/mL）であった（M 2.6.5.4.F）。

回復期間中、又は ADA が発生したことによりコンシズマブが血漿から消失した場合には、遊離 TFPI と総 TFPI の両方がベースライン値に戻ったことから、コンシズマブ結合型 TFPI のクリアランスはコンシズマブのクリアランスと平行していたことが示唆された。

2.6.4.2 分析法

非臨床試料の分析に用いた非臨床アッセイの概略を表 2.6.4-2 に示す。

表 2.6.4-2 非臨床試料の分析に用いたアッセイの概要

Assay	Used for pharmacology studies (rabbit)		Used for safety studies (cynomolgus monkey)	
	Yes / No	Assay-status	Yes / No	Assay-status
PK assays				
Concizumab ELISA	Yes	Non-GLP[a]	Yes	GLP[b;c]
rFVIIa (clot)	No	N/A	Yes	GLP[b;c]
PD assays				
Free TFPI ELISA	Yes	Non-GLP[a]	Yes	Non-GLP[a]/GLP[d]
Total TFPI ELISA	Yes	Non-GLP[a]	Yes	Non-GLP[a]
Actichrome®/TFPI functionality[e]	Yes	Non-GLP[a]	Yes	Non-GLP[a]/GLP[b]
S2222/TFPI functionality	No	N/A	Yes	GLP[b]
Dilute prothrombin time (dPT)[f]	Yes	Non-GLP[a]	Yes	Non-GLP[a]
Antibody assays				
Binding antibodies	No	N/A	Yes	GLP[b]
Detection of ADA/concizumab specific immune complexes by size exclusion chromatography and immune complex ELISA	Not needed	N/A	Yes	Non-GLP[a]
Circulating immune complexes	Not needed	N/A	Yes	Non-GLP[a]

[a]'Non-GLP' indicating that the assay was qualified for its intended use in a research environment. [b]'GLP' indicating that the assay validation study was carried out in a quality-assured environment of Novo Nordisk´s GLP test facility. [c]Validated in accordance with the Food and Drug Administration (FDA) Guidance for the Industry[3] and the pharmaceutical industry recommendations for bioanalytical methods[4,5]. [d]Assay validation performed at CRO as part of GLP studies. [e]Based on Actichrome® Tissue Factor Pathway Inhibitor Assay. [f]Used for species qualification.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; CRO = contract research organisation; dPT = dilute prothrombin time; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; GLP = Good Laboratory Practice; N/A = not applicable; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s); rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII; TFPI = tissue factor pathway inhibitor.

2.6.4.2.1 非臨床試験における生体試料中薬物濃度分析法－コンシズマブ ELISA 法

薬理試験では、間接サンドイッチ ELISA 法を用いてウサギ試料を分析した。この検討用のアッセイでは、組換えヒト TFPI を用いてコンシズマブを捕捉し、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）と結合した抗ヒト免疫グロブリン G（IgG）4 抗体を用いて検出した。

非臨床安全性試験では、クエン酸添加カニクイザル血漿中のコンシズマブの濃度測定に 2 種類の PK ELISA 法を用いた（「PK cyno アッセイ I」及び「PK cyno アッセイ II」）。PK cyno アッセイ I では、13 週間の回復期間を設けた 26 週間の毒性試験（211087 試験）において、試料の測定中に頑健性の欠如が示された。このアッセイを最適化し、その後、アッセイの頑健性を高めるために再検証した。この最

適化されたアッセイを PK cyno アッセイ II と命名した。新たにバリデートされた PK cyno アッセイ II〔アッセイバリデーション試験（試験番号：212429、M 4.2.2.1-2）〕を適用し、26 週間毒性試験の試料測定を再開した。

バリデーションが実施されている 2 種類の測定法（PK cyno アッセイ I 及び PK cyno アッセイ II）の相違については、以下の文節に記載するとともに、表 2.6.4-3 にも記載する。PK cyno アッセイ I 及び PK cyno アッセイ II のバリデーションパラメーターの概要を表 2.6.4-4 に示す。ウサギ及びカニクイザルを用いた非臨床試料測定時に用いた PK 測定法の概要を表 2.6.4-5 に示す。

2.6.4.2.1.1　PK cyno アッセイⅠ

本アッセイは、組換えヒト TFPI をアッセイプレート上に固定化し、捕捉試薬として使用するサンドイッチ ELISA 法である。クエン酸添加カニクイザル血漿で品質管理試料（QC 試料）並びにキャリブレーターを調製した。含まれる試料には Minimum Required Dilution（MRD）や追加の前処理はない。アッセイプレートの適切な洗浄及びブロック後、キャリブレーター、QC 試料及び試験試料をプレートに添加し、プレートに固定化された組換えヒト TFPI に各試料に存在するコンシズマブを結合させた。最終的に、HRP 標識抗ヒト IgG4 抗体をアッセイにおける検出抗体とした。本試験法は、企業用に策定された米国食品医薬品局（FDA）のガイダンス [3] 及び製薬団体が推奨する生体試料中薬物濃度分析法 [4,5] に準拠しバリデートされた。

2.6.4.2.1.2　PK cyno アッセイⅡ

本アッセイは、上記のアッセイ I と同一設定になる。また、HRP 標識抗ヒト IgG4 抗体が検出抗体として使用される他、組換えヒト TFPI が捕捉試薬として使用されるサンドイッチ ELISA 法である。PK cyno アッセイ I とは対照的に、本アッセイでは酸変性ステップと 100 倍の MRD が加わっており、潜在的な TFPI アッセイの干渉を軽減することによりアッセイの頑健性を向上させている。さらに、キャリブレーター試料を緩衝液中で調製した（PK cyno アッセイ I におけるクエン酸添加カニクイザル血漿と異なる）。本試験法は、企業用に策定された FDA のガイダンス [3] 及び製薬団体が推奨する生体試料中薬物濃度分析法 [4,5] に準拠しバリデートされた。

表 2.6.4-3　　PK cyno アッセイⅠ及びⅡの差異

	PK cyno assay I	**PK cyno assay II**
Validation study ID	Study 209308 (M 4.2.2.1-1)	Study 212429 (M 4.2.2.1-2)
Calibrator’s matrix	Cynomolgus citrated plasma	Buffer (PBS, Tween, BSA 1% (w/v), pH 7.2)
QC sample matrix	Cynomolgus citrated plasma	Cynomolgus citrated plasma followed by dilution in buffer (1:100)
Sample MRD	N/A	100
Sample pre-treatment	N/A	Acid denaturation (acetic acid, 666 mM)

Abbreviations: BSA = Bovine Serum Albumin; MRD = minimum required dilution; N/A = not applicable; PBS = phosphate buffered saline; QC = quality control.

表 2.6.4-4　PK cyno アッセイ I 及び PK cyno アッセイ II におけるバリデーションパラメーターの概要

	PK cyno assay I	**PK cyno assay II**
Validation study ID	Study 209308 (M 4.2.2.1-1)	Study 212429 (M 4.2.2.1-2)
Stability study ID	Study 209511 (M 4.2.2.1-3)	Study 213079 (M 4.2.2.1-4)
ISR study ID	Study 210125 (M 4.2.2.1-5), Study 210288 (M 4.2.2.1-6)	Study 213042 (M 4.2.2.1-7)
ULOQ	80.5 ng/mL	80.0 ng/mL
LLOQ	2.00 ng/mL	1.00 ng/mL[a]
Precision (%CV)	<20% CV	<20% CV
Accuracy (%RE)	±20% RE	±25% RE
Stability	12 months at <-20°C	22 months at <-20 and <-80°C

[a]Minimum required dilution: 100x. accordingly sample LLOQ: 100 ng/mL.

Abbreviations: CV = coefficient of variation; ISR = incurred sample reanalysis; LLOQ = lower limit of quantification; RE = relative error; ULOQ = upper limit of quantification.

表 2.6.4-5　非臨床 PK 試験における血漿中コンシズマブ濃度測定

Study ID	**Study type**	**Route of admini-stration**	**Species**	**PK assay rabbit**	**PK cyno Assay I**	**PK cyno Assay II**	**LLOQ (nmol/L)**
209176	PK SD[a]	i.v.	Rabbit	x	-	-	5.00
[redacted]081102	PK SD	i.v. and s.c.	Rabbit	x	-	-	1.37
209305	PK 6-week.	i.v. and s.c.	Rabbit	x	-	-	2.00
[redacted]081101	Single-dose study	i.v	Monkey	-	x	-	1.37
210156	Repeat single-dose PK/PD study	i.v.	Monkey	-	x	-	2.00
208250	Repeat single-dose toxicity study (DRF)	i.v. and s.c.	Monkey	-	x	-	5.00
210130	4-week toxicity study	i.v. and s.c.	Monkey	-	x	-	2.00
209206	13-week toxicity study with an 11-week recovery period	i.v. and s.c.	Monkey	-	x	-	2.00
211087[b]	26-week study with a 13-week recovery period	i.v. and s.c.	Monkey	-	-	x	1.00[c]
213542	52-week study with 13- and 26-week interim groups	s.c.	Monkey	-	-	x	1.00[c]
215431	4-week drug interaction study with rFVIIa	s.c.	Monkey	-	-	x	1.00[c]

[a]Dosed concizumab and a fully human TFPI antibody [redacted]. [b]Samples from study 211087 were re-analysed using assay II. Only sample results achieved using assay II were reported. [c]Minimum required dilution: 100x.

Abbreviations: DRF = Dose Range Finding; LLOQ = lower limit of quantification; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s); rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII; SD = single-dose.

2.6.4.2.2　非臨床の生体試料中薬物濃度分析法- rFVIIa 凝固アッセイ

カニクイザルを用いたコンシズマブの 4 週間薬物相互作用試験において、本アッセイを用いて rFVIIa を測定した（M2.6.5.15.A、試験番号：215431）。FVIIa はチモーゲン FVII の活性型である。

FVIIa 活性が完全に発現するには、その補因子である組織因子（TF）と FVIIa との結合に大きく依存する。本項で記載したアッセイは遺伝子組換え可溶型組織因子（rsTF）を用いており、FVIIa と特異的に結合し、FVII チモーゲンに対して非感受性にする。試料を FVII 欠損ヒト血漿、rsTF 及びリン脂質、カルシウムイオンと混合し、凝固が形成されるまでに要した時間（凝固時間）を記録した。混合物の凝固時間の対数は、試料中の FVIIa 活性の対数に比例した（キャリブレーション範囲内で測定した場合）。本アッセイでは、内因性 FVIIa と投与された rFVIIa の総計を測定した（表 2.6.4-6）。

本試験法は、企業用に策定された FDA のガイダンス [3] 及び製薬団体が推奨する生体試料中薬物濃度分析法 [4,5] に準拠し、カニクイザルの血漿でバリデートされた。クエン酸添加カニクイザル血漿を用いた試験では、コンシズマブと rFVIIa の両方を投与したサル由来のコンシズマブによりアッセイが干渉される可能性があるため、アッセイバリデーションを追加で実施した。1.99～8240 IU/mL の FVIIa 活性を有し、10,000 ng/m 以上のコンシズマブ値を有する試料は、コンシズマブを介したアッセイが干渉される可能性があるが、FVIIa 活性が非常に高い試料（8240 IU/mL）については、コンシズマブの測定に影響する干渉は認められなかった。

表 2.6.4-6　　rFVIIa 凝固アッセイのバリデーションパラメーター

Validation parameter	**Cynomolgus monkey**
LLOQ for samples	0.200 IU/mL
Precision	<20% CV
Accuracy	±20% RE
Stability at room temperature	24 hrs
Long-term stability	22 months at -80°C
Validation study ID	Study 215437 (M 4.2.2.1-8), Study 213138 (M 4.2.2.1-9), Study 204009 (M 4.2.2.1-10)
Stability study ID	Study 213249 (M 4.2.2.1-11)
Used for *in vivo* study ID	215431

Abbreviations: CV = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantification; RE = relative error.

2.6.4.2.3　　非臨床薬力学的アッセイ

コンシズマブによる TFPI 機能活性の抑制は新規の作用機序であることから、コンシズマブによる TFPI 機能活性の抑制を評価可能にするため、以下のアッセイが開発された。

TFPI の阻害活性を測定する 3 種類の探索的アッセイ

- 希釈 PT アッセイにより凝固時間を測定
- 2 種類の発色アッセイにより残留 TFPI 活性を測定〔市販の Actichrome® TFPI アッセイ及び自社で開発したアッセイを介して、S2222 基質の変換により活性型血液凝固第 X 因子（FXa）活性を測定〕

クエン酸添加血漿中の遊離 TFPI 又は総 TFPI のいずれかを測定する 2 種類の ELISA

- 遊離 TFPI、すなわちコンシズマブに結合しない TFPI を測定（Asserachrome®アッセイ）
- 総 TFPI、すなわち遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI の両方を測定

2.6.4.2.3.1　希釈 PT（dPT）アッセイ

希釈 PT（dPT）アッセイは、血餅形成までの時間（血餅時間）を測定する凝固アッセイである。本法では、血漿試料に希釈 TF と Ca^{2+}を添加し、凝固時間を測定した。コンシズマブを含む血漿試料では凝血時間の短縮が想定される。結果は、凝固時間（秒）として、又は投与前試料に対する割合（%）として示した。アッセイバリデーションパラメータを表 2.6.4-7 に示す。

本アッセイはヒト初回投与（FHD）試験（3813 試験）の第 1 コホートに含まれており、ヒト血漿中におけるコンシズマブの効果を確認するために使用された。さらに、ウサギ及びカニクイザル血漿に対する種交差反応性が示された。ヒト血漿中での本アッセイのバリデーションが確認され、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用の試験に関して、ウサギ及びサル試料の測定に使用するのに十分であると考えられた。

表 2.6.4-7　　dPT アッセイにおけるヒト血漿のバリデーションパラメータ

Validation parameter	**Human**
LLOQ for samples	0.200 IU/mL
Normal Range	138 sec (N=25), 109-171 sec
Precision	<10% CV
Stability at room temperature	2 hrs
Validation study ID	Study 210361 (M 5.3.1.4)

Abbreviations: CV = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantification.

FHD 試験において、dPT で得られた結果は一貫していなかった。dPT アッセイにおける反応は、0.5 µg/kg のコンシズマブを投与された健康被験者の曝露量とは相関しなかった。したがって、3 種類目の薬力学的アッセイである、S2222 残存 TFPI 機能活性アッセイを開発し、バリデートした。

2.6.4.2.3.2　Actichrome® TFPI アッセイ－残存 TFPI 機能活性

生体試料中の残存 TFPI 機能活性を測定する発色性アッセイを開発した。Actichrome® TFPI 活性アッセイは、TFPI が TF/FVIIa 複合体に対して阻害作用を示すヒト血漿中の TFPI の活性測定を目的とした発色性アッセイである（表 2.6.4-8）。したがって、Actichrome®アッセイでは、TF/FVIIa 複合体の阻害を定量することにより、試料中の残存 TFPI 機能活性を測定する。

試験試料を TF/FVIIa 及び第 X 因子（FX）とインキュベート後、特異性の高い FXa 発色基質である SPECTROZYME® FXa を添加し、TF/FVIIa 複合体の残存機能活性を測定した。試料中の残存 TFPI 機能活性は、既知の TFPI 標準物質を用いて作成された検量線に当てはめて算出した。

クエン酸を添加したカニクイザル血漿を用いて、本アッセイのバリデーションが確認された（表 2.6.4-8）。さらに、本アッセイはウサギ血漿で適格性が確認された。

表 2.6.4-8　　Actichrome® TFPI アッセイにおけるバリデーションパラメーター

Validation parameter	**Rabbit[a]**	**Cynomolgus monkey**
LLOQ	0.04 U/mL	0.04 U/mL
Precision	<20% CV	<20% CV
Stability at room temperature	-	24 hrs
Long-term stability	107 days at <-20°C[b]	107 days at <-20°C
Validation study ID	-	Study 209472 (M 4.2.2.1-15)
Stability study ID	-	Study 210181 (M 4.2.2.1-16)
ISR study ID	-	Study 210126 (M 4.2.2.1-17)
Used for *in vivo* study ID	209305	208250, 209206, 210156

[a]Qualification has been performed in rabbit plasma. [b]The long-term stability in rabbit is considered to be covered by the long-term stability in cynomolgus monkey plasma.
Abbreviations: CV = coefficient of variation; ISR = incurred sample reanalysis; LLOQ = lower limit of quantification.

2.6.4.2.3.3　S2222－残存 TFPI 機能活性（残存 TFPI による FXa の生成阻害）

本アッセイは、FXa 存在下で TF/FVIIa の触媒活性を阻害する試験試料中の TFPI の機能活性に基づく 2 段階発色性基質アッセイである。第 1 段階では、血漿を FVIIa、TF、FXa、Pefabloc®とインキュベートし、フィブリン架橋の生成を阻害する。残存 TFPI はいずれも FXa と結合し、TF/FVIIa と 4 次阻害複合体を形成する。第 2 段階では、残存 TF/FVIIa 触媒活性の基質として過剰な FX を添加し、発色性基質である S2222 により FXa の生成を測定し、正常ヒト血漿を用いて作成した検量線から得られた値と比較する（表 2.6.4-9）。

表 2.6.4-9　　残存 TFPI 機能活性アッセイ（S2222）におけるバリデーションパラメーター

Validation parameter	**Cynomolgus monkey**
LLOQ	0.0200 U/mL
Precision	<20% CV
Normal range	0.755-1.40 U/mL
Stability at room temperature	24 hrs (undiluted) 4 hrs (diluted)
Long-term stability	24 months at -80ºC, 18 months at -20ºC
Validation study ID	Study 212281 (M 4.2.2.1-13), Study 215478 (M 4.2.2.1-14)
	Study 212370 (M 4.2.2.1-12)
Used for *in vivo* study ID	211087, 213542, 215431

Abbreviations: CV = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantification.

2.6.4.2.3.4　遊離 TFPI ELISA (Asserachrome®アッセイ）

Asserachrome®（#00261）の TFPI キットにより、ヒト血漿試料中の総 TFPI が測定される。本アッセイでは、TFPI をモノクローナル抗 TFPI - Kunitz ドメイン 2（K2）抗体により捕捉し、HRP に結合したモノクローナル抗 TFPI - Kunitz ドメイン 1（K1）抗体により検出した。基質として *O*-フェニレンジアミン二塩酸塩（OPD）を用いた。コンシズマブ存在下では、本アッセイで用いるコート抗体（モノク

ローナル抗 TFPI-K2 抗体）とコンシズマブの結合が競合するため、反応が消失する。従って、本アッセイは、コンシズマブに結合していない TFPI、すなわち遊離 TFPI のみを検出することになる。

本アッセイは、ヒト血漿の使用がバリデートされており、カニクイザル血漿の使用が確認されている。アッセイの精度、真度及び希釈直線性に関する適格性を表 2.6.4-10 に示す。本アッセイは遺伝子組換えヒト TFPI（hTFPI）を用いて校正した。

表 2.6.4-10　　遊離 TFPI アッセイ (Asserachrome® #00261）における適格性パラメーター

Qualification parameter	**Cynomolgus monkey**
LLOQ	62.5 pmol/L (2.73 ng/mL)
Analytical range	3.1-200 pmol/L (0.136-8.75 ng/mL)
Minimal required dilution	20
Precision (day-to-day)	<20% CV
Accuracy	<20% RE
Dilution linearity	Acceptable
Used for *in vivo* study ID	208250, 211087, 213542[a], 215431[a]

[a]Performed at CRO as part of GLP study.
Abbreviations: CV = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantification; RE = relative error.

2.6.4.2.3.5　総 TFPI ELISA

総 TFPI の測定法として、反復単回投与毒性試験（M 2.6.5.3、試験番号：208250）及び 26 週間サル毒性試験（M 2.6.5.4.E、試験番号：211087）には version 1、52 週間サル毒性試験（M 2.6.5.4.F、試験番号：213542）には version 2 の 2 種類が適用された。2 種類の異なるアッセイを適用した理由は、両試験に必要な ELISA version 1 のアッセイ試薬の供給が不十分であったためであった。しかしながら、いずれの version のアッセイでも、遊離 TFPI 及びコンシズマブ結合型 TFPI を組合せた総 TFPI が測定される。ELISA 法は、ノボ ノルディスク社製の TFPI K1/K2 ドメインに対するポリクローナル抗体（ELISA version 1 ではヤギポリクローナル抗体、ELISA version 2 ではウサギポリクローナル抗体）に基づいており、コンシズマブ結合型 TFPI を含むすべての TFPI 型の測定が可能である。version 1 では、HRP に結合したポリクローナルヤギ抗体も検出に用いられているが、version 2 では HRP に結合したモノクローナル抗 K1 抗体が検出に用いられている。

本アッセイ（version 1 及び 2）は、コンシズマブによる潜在的干渉がないよう調整されており、高濃度のコンシズマブが存在する場合でも血漿中の総 TFPI 濃度の測定が可能である。本アッセイはキャリブレーターに 100 nmol/L (14,900 ng/mL）のコンシズマブを添加することで実施され、コンシズマブで測定した抗体エピトープを阻害した。

アッセイの精度、真度及び希釈直線性と試料の再現性に関して、本アッセイの適格性を表 2.6.4-11 に示す。アッセイは hTFPI を用いて校正した。

表 2.6.4-11　　総 TFPI ELISA アッセイにおける適格性パラメーター

Qualification parameter	Target	Version 1	Version 2
Precision (within runs)	<20% CV	N/A	<20%
Precision (between runs)	<20% CV	<20% CV	<20% CV
Accuracy	<20% (25% at LLOQ and ULOQ)	<20% RE	<20% RE
Linearity using a dilution factor 1:50, 1:150 and 1:500	<20% RE	<20% RE	<20% RE
LLOQ	500 pmol/L (21.9 ng/mL)	320 pmol/L (14 ng/mL)	250 pmol/L (10.9 ng/mL)
Total error at LLOQ	<40%	N/A	29%
ULOQ	N/A	N/A	20,000 pmol/L (875 ng/mL)
Total error at ULOQ	N/A	N/A	18%
Freeze/thaw	1-5 F/T cycles	No effect	No effect
Used for *in vivo* study ID	-	208250, 211087	213542

Abbreviations: CV = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantification; N/A = not applicable; RE = relative error.

2.6.4.2.4　　抗体アッセイ

2.6.4.2.4.1　　カニクイザルにおける抗コンシズマブ抗体の検出

カニクイザル血清中の ADA の検出は、ブリッジング ELISA 法〔試験番号：209362（M 4.2.2.1-18）〕を用いた。本アッセイには、コンシズマブに結合した ADA を解離させる酸処理段階（pH 約 2.5）が含まれていた。本アッセイは、国際的に認められた指針及び推奨[6,7]に準拠し、カニクイザルの血清試料を対象として開発され、バリデートされた。結合抗体アッセイスクリーニングの cut point は、バリデーション中に 5%の偽陽性に相当する 15 人の光学濃度（OD）の平均値の 95%予測区間として設定された。Floating cut point を用い、正規化因子を決定した。Cut point を超える OD 値を有する試料は、真の陽性試料を特定するため確認試験に供した。確認試験は、過剰な非標識コンシズマブの非存在下（A 試料）又は存在下（B 試料）で試料を再分析することにより実施した。特異的 cut point は、バリデーション中に偽陽性率 0.1%に相当する平均%シグナル阻害＋t (0.999; df=14）×SD として決定した。さらに、陽性が確認された試料の力価を測定した。Protein A 精製ポリクローナルウサギ抗体を用いて測定した抗コンシズマブ抗体検出アッセイの感受性は 30 ng/mL であった。最大 100 µg/mL のコンシズマブ存在下では、アッセイの感受性は 1000 ng/mL であった。バリデーションパラメーターの要約を表 2.6.4-12 に示す。

表 2.6.4-12　　抗コンシズマブ結合抗体アッセイにおけるバリデーションパラメーター

Parameter	Description	Results
Assay cut points	Screening cut point	Mean OD + t(0.95; df=∞)*SD
	Specificity cut point	21% signal inhibition, ((A-B)/A)*100
Inter-assay precision	QC Low	9% CV
	QC High	14% CV
Intra-assay precision	QC Low	4% CV
	QC High	9% CV
Sensitivity	No concizumab	30 ng/mL pAb
Interference	Drug conc.: 100 µg/ml concizumab	Sensitivity: 1000 ng/mL pAb

Abbreviations: CV = coefficient of variation; OD = optical density; pAb = polyclonal antibody; QC = quality control; SD = standard deviation.

2.6.4.2.4.2　サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）及び免疫複合体 ELISA によるカニクイザルの ADA/コンシズマブ複合体の検出

遊離型コンシズマブによる干渉を受けずに ADA/IC を検出できるよう最適化するため、26 週間毒性試験（M 2.6.7.7.C、試験番号：211087）及び 52 週間毒性試験（M 2.6.7.7.D、試験番号：213542）の動物から選択した血漿試料を、SEC を用いて分画し、得られた分画を以下に記載する免疫複合体 ELISA 法により分析した。

2.6.4.2.4.3　サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）

本アッセイは、20 µL の血漿を BioSuite SEC カラム（450Å、13 µm、7.5mm X 300mm）で分画することにより成立する。移動相にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）及び 4%イソプロパノール（pH 7）を用いる。カラムが閉塞しないよう、血漿試料を 20,800 rcf で 1 分間遠心分離し、試料中イソプロパノールが 4%濃度になるようイソプロパノールを添加した。クロマトグラフィーで 6～22 分間の全分画（2 分の window 分画）を採取し、直ちに-80℃で保存した。アルブミン及び遊離型コンシズマブは 18～20 分に溶出すると判定されている。オートサンプラー及びフラクションコレクターの両方を温度制御した。

2.6.4.2.4.4　ADA/コンシズマブ免疫複合体（IC）検出試験

IC アッセイは、コンシズマブを捕捉するためにヒト IgG4 に対して特異的に作製された mAb、及びカニクイザル ADA を検出するためにカニクイザル IgG に対して特異的に作製された mAb を用いた。本アッセイでは、コンシズマブに結合した ADA のみがシグナルを生成する。マイクロタイタープレートを抗ヒト IgG4 でコーティングした。プレートを洗浄、ブロック後に SEC 画分を添加した。インキュベーション後、HRP 標識抗カニクイザル IgG を添加し、標準 ELISA 試薬を用いるアッセイプレートが作製された。。コンシズマブと精製カニクイザル IgG を化学的に交差して陽性対照を調製した。本アッセイは、SEC 分画中の ADA/コンシズマブ IC の測定に対する適格性が確認されている。

2.6.4.2.4.5　カニクイザルにおける循環性免疫複合体（CIC）の検出

CIC は、酵素免疫測定キット(CIC-Raji EIA, Quidel cat. no. A002）を用い、取り扱い説明書に従って測定した。本アッセイでは CIC を測定し、そこで活性化された C3 断片が補体活性化免疫複合体に共有結

合している。アッセイは CIC の総量を測定するが、ADA/コンシズマブ CIC には特異的ではない。アッセイは取り扱い説明書に従って実施し、QC 試料が含まれた。

2.6.4.3 吸収

コンシズマブの PK は、単回静脈内及び皮下投与後にウサギ及びカニクイザルで評価されている。カニクイザルを用いて反復投与時の PK 及び TK が検討されている。

2.6.4.3.1 単回投与時の薬物動態／トキシコキネティクス

ウサギ及びカニクイザルにコンシズマブを単回静脈内投与時の PK パラメーターは表 2.6.4-13 の通りであった。

表 2.6.4-13 単回静脈内投与時のコンシズマブの薬物動態パラメーター（ノンコンパートメント解析）の概要

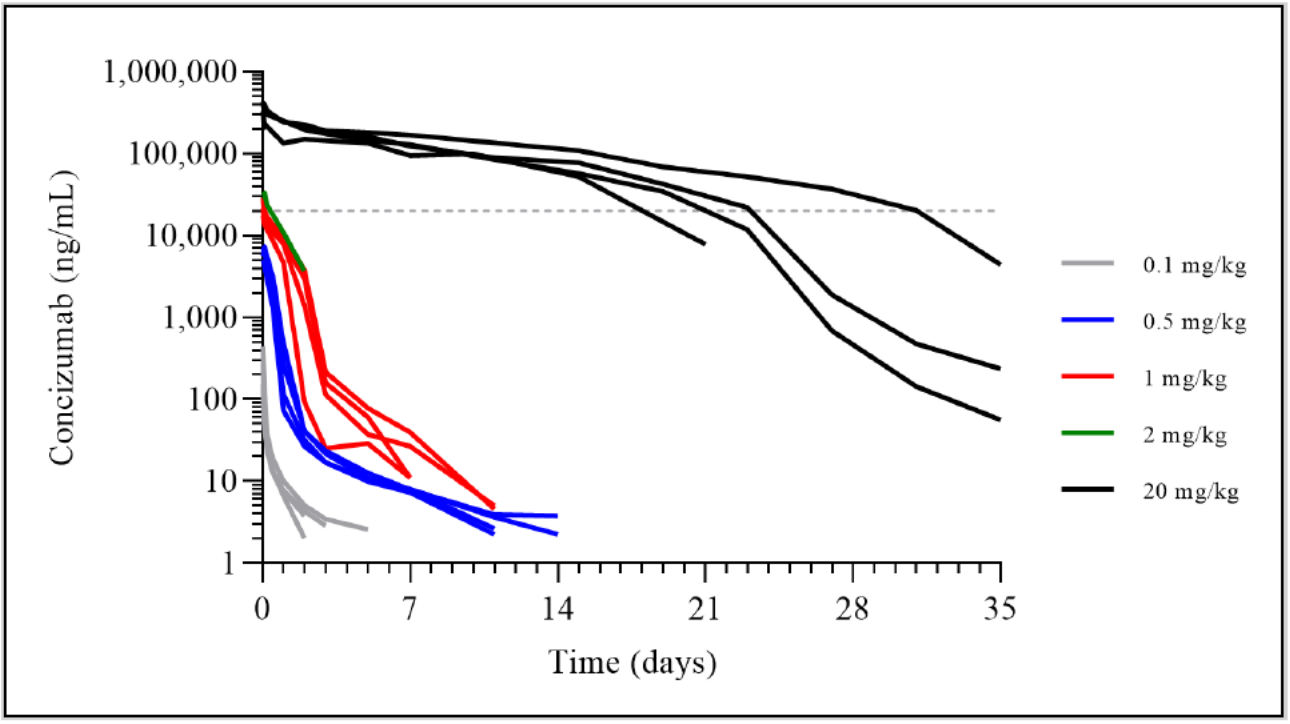
Species	Dose (mg/kg)	AUC_{inf} (h*ng/mL)	AUC/Dose[a]	Clearance (mL/kg/h)	Volume of distribution[b] (mL/kg)	$t_{½}$[c] (h)	Study
Rabbit	2	1,210,000	605,000	1.7	44.0	NR	M 2.6.5.3, 209176
	2 20	1,080,000 39,400,000	540,000 1,970,000	1.9 0.5	171 123	NR	M 2.6.5.3, [redacted]081102
	20	33,000,000	1,650,000	0.63	52.4	86.4	M 2.6.5.3, 209305
Monkey	2 20	747,000 46,600,000	374,000 2,330,000	2.7 0.4	61.0 130	NR 210	M 2.6.5.3, [redacted]081101
	0.1 0.5 1	1,080 69,700 418,000	10,800 139,400 418,000	102 7.7 2.5	3,610 1,110 205	NR NR NR	M 2.6.5.3, 210156
	20	66,000,000	3,300,000	0.31	NR	198	M 2.6.5.3, 208250

[a]Normalised to 1 mg/kg. [b]V_z. [c]Calculated at target saturation (plasma concentration above 20,000 ng/mL) (Study 322182 [M 4.2.2.2-7]).

Abbreviations: NCA = non-compartmental analysis; AUC_{inf} = area under the concentration–time curve from time zero to infinity; $t_{½}$ = terminal half-life; NR = not reported

いずれの動物種においても、コンシズマブのクリアランス及び分布容積は用量の増加に伴い減少し、非線形の PK が示唆された。このうち 1 試験（試験番号：210156）では、雌雄のサルが含まれており、全体として、PK に明らかな性差は認められなかった。非線形の PK は、低用量のコンシズマブが循環血中から速やかに消失したサルの血漿中濃度プロファイル（図 2.6.4-1）に反映されている。より高用量では、血漿中濃度プロファイルは 10,000～20,000 ng/mL の濃度まで平坦であり、その濃度では消失速度が増加する。このパターンは TMDD と一致するものであり、標的分子（一般的には細胞結合標的分子であり、この場合では TFPI プール）が内皮細胞の表面に結合すると、化合物が循環血中から消失する。高濃度のコンシズマブでは、TMDD の消失が飽和するため、サルではクリアランスが緩徐で $t_{1/2}$ が約 200 時間と平坦な血漿中濃度プロファイルが得られた（表 2.6.4-13 及び表 2.6.4-14）。このプロファイルは、mAb の典型的な PK、すなわち 11～19 日の $t_{1/2}$ に近い[8,9,10,11]。低濃度では、標的介在性のクリアランスが加速し、図 2.6.4-1 に示すように血漿中濃度は急速に低下する。

図 2.6.4-1　　サルに静脈内投与時のコンシズマブの血漿中濃度曲線



Note: Study ID 210156: 0.1, 0.5 and 1 mg/kg; Study ID [redacted]081101: 2 and 20 mg/kg; Study ID 208250: 20 mg/kg. The dotted horizontal line indicates the concentration (20,000 ng/mL) above which the TMDD appears to be saturated.
Abbreviations: TMDD = target-mediated drug disposition

ウサギ及びサルにコンシズマブを単回皮下投与時の PK パラメーターは表 2.6.4-14 の通りであった。コンシズマブを複数の用量でウサギに皮下投与したところ、用量で補正した AUC は用量の増加に伴い増大した。この観察結果から、コンシズマブの PK に対する TMDD の影響が確認された。また、t_{max} は 2 mg/kg 投与時の 36 時間から 20 mg/kg 投与時の 120 時間まで投与量の増加に伴い上昇した（表 2.6.4-14）。コンシズマブを 2 mg/kg（ウサギのみ）及び 20 mg/kg 投与時のバイオアベイラビリティが評価された。これらの試験におけるバイオアベイラビリティは、ウサギ及びサルともに約 80%であった。

サルにコンシズマブ 20 mg/kg を静脈内投与時（試験番号：208250）の個体別の血漿中濃度推移を図 2.6.4-2 の左図に示す。図 2.6.4-2 の中央図に動物における遊離 TFPI 濃度を示す。遊離 TFPI 濃度は投与後速やかに減少し、コンシズマブ濃度が減少し始めるまで低値を維持した。この 2 種類の曲線から、コンシズマブ濃度が最も早く減少した動物では、ベースライン値に向かって遊離 TFPI が最も早く増加したことが示される。図 2.6.4-2 の右図に示す総 TFPI（遊離 TFPI 及びコンシズマブ結合型 TFPI）は、コンシズマブ投与後にベースライン濃度の 0.5 nmol/L（21.9 ng/mL）から増加し、プラトー濃度である 10～30 nmol/L（438～1310 ng/mL）に達した。コンシズマブ濃度の低下に伴い総 TFPI 濃度も低下したが、この結果は、コンシズマブ濃度の低下に伴い TFPI と結合しうるコンシズマブが減少することを示している。

表 2.6.4-14　　単回皮下投与時のコンシズマブの PK パラメーター（ノンコンパートメント解析）の概要

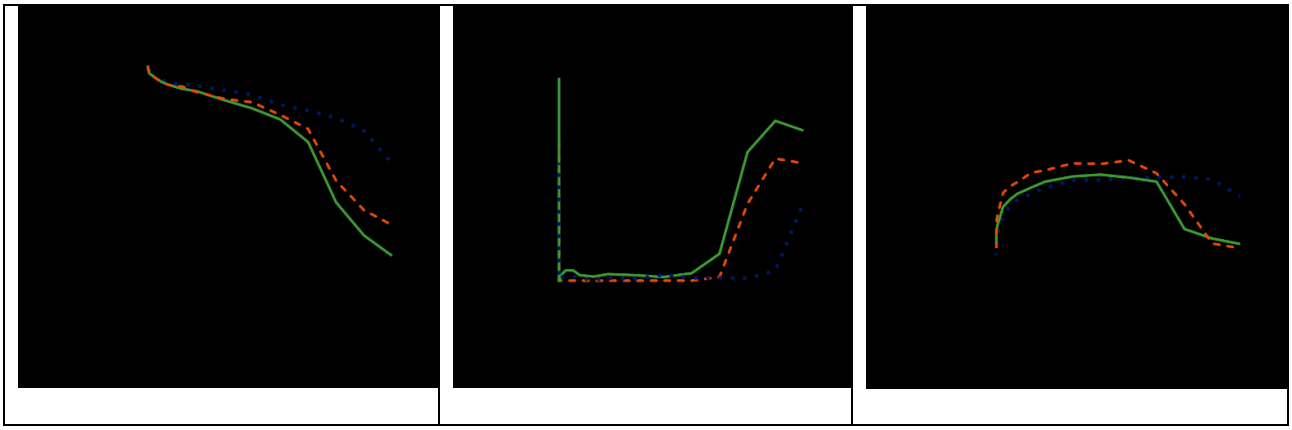
Species	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	AUC_{inf} (h*ng/mL)	AUC/Dose[a]	$t_{½}$[b] (h)	F (%)	Study ID
Rabbit	2	9,000	NR	868,000	432,000	NR	80	[redacted]081102
	2 5 10 20	2,960 19,500 63,300 175,000	36 48 60 120	144,000 1,450,000 7,490,000 27,400,000	72,100 289,000 749,000 1,370,000	NR NR NR NR	NR NR NR 83	209305
Monkey	20	145,000	168	50,700,000	2,540,000	183	77	208250

[a]Normalised to 1 mg/kg. [b]Only included if calculated at target saturation (plasma concentrations above 20,000 ng/mL) (Study 322182 [M 4.2.2.2-7]).

Abbreviations: NCA = non-compartmental analysis; AUC_{inf} = area under the concentration–time curve from time zero to infinity; C_{max} = maximum concentration; F = bioavailability; $t_{½}$ = terminal half-life; t_{max} = time to reach maximum concentration; NR = not reported

また、2.6.4.2.3.2 項に記載した Actichrome®法を用いて、コンシズマブ投与後のウサギ及びサル血漿中における TFPI 機能活性を測定した。これらの結果から、コンシズマブ投与後に TFPI 機能活性がベースライン値から低下することが示された。コンシズマブの血漿濃度が減少すると、TFPI 機能活性はベースライン値に戻った。

図 2.6.4-2　　20 mg/kg のコンシズマブをサルに静脈内投与時のコンシズマブ、遊離 TFPI 及び総 TFPI 濃度（試験番号：208250）



Note: The left panel shows the concizumab concentration (Study ID 208250), centre panel the free TFPI concentration and right panel the concentration of total TFPI (Study 210142 [M 4.2.2.2-6]). The results from three individual monkeys are shown (same symbol and colour code in all figures).

カニクイザルにおけるコンシズマブの TMDD は、単回投与及び反復投与試験のモデリングデータを用いて説明されている[12]。クリアランスの非線形部はミカエリス・メンテン式、すなわち、最大消失速度（V_{max}）及び非線形クリアランスが 50%低下した血漿中濃度（K_m）を用いて算出された。

2.6.4.3.2　　反復投与時の薬物動態／トキシコキネティクス

カニクイザルを用いた用量範囲設定（DRF）試験及び GLP 適用の 4、13、26 及び 52 週間毒性試験において、反復静脈内及び皮下投与時のコンシズマブの TK を検討した。DRF 試験では、2～200 mg/kg

まで増量し、2 週間隔で皮下投与した。GLP 試験の用量は 0.5～50 mg/kg/日（皮下）及び 30～200 mg/kg/週（静脈内）であった。毒性試験では、特に低用量での TMDD の影響を回避するために、コンシズマブを 1 日 1 回皮下投与した。この投与方法を用いることで、曝露の飽和が生じる血漿中濃度を維持することができた。反復投与時のコンシズマブの曝露量（C_{max} 及び AUC）を表 2.6.4-15 に示す（GLP 試験のみ）。これらの試験の一部では、遊離 TFPI 濃度、TFPI 機能活性及び総 TFPI 濃度（遊離 TFPI 及びコンシズマブ結合型 TFPI）も測定した。

表 2.6.4-15　　カニクイザルを用いた GLP 適用の反復投与毒性試験におけるコンシズマブの曝露量の概要

Study ID	Dose[a] (mg/kg/day)	Route	C_{max} (ng/mL)	AUC_{tau}[b] (h*ng/mL)	R_{ac}	Duration
210130	3 9 30	s.c. s.c. i.v.	638,000 1,730,000 1,290,000	14,100,000 37,400,000 154,000,000	162 73 2.7	4 weeks
209206	1 10 50 200	s.c. s.c. s.c. i.v.	282,000 4,200,000 14,700,000 11,800,000	5,930,000 83,600,000 326,000,000 1,580,000,000	385 108 58 2.8	13 weeks
211087	3 9 30	s.c. s.c. i.v.	992,000 3,310,000 2,650,000	21,400,000 76,500,000 307,000,000	130 58 3.8	26 weeks
213542	0.5 1 9	s.c. s.c. s.c.	82,600 309,000 5,070,000	1,910,000 6,890,000 99,300,000	-[c] 232 88	52 weeks

Note: The exposure values shown are the mean values of male and female animals.
[a]mg/kg/week in i.v. groups. [b]$AUC_{0\text{-}24h}$ for s.c. and $AUC_{0\text{-}168h}$ for i.v. [c]R_{ac} could not be calculated due to very low exposure after the first dose in most animals.
Abbreviations: AUC = area under the concentration–time curve; C_{max} = maximum concentration; R_{ac} = ratio of accumulation.

2.6.4.3.2.1　DRF 試験（試験番号：208250）

コンシズマブを 2 週間隔で 2～200 mg/kg まで皮下投与した結果、全用量群（雌雄各 1 匹からなる各群 3 用量群）で全身曝露が確認された（M 2.6.5.4.B、試験番号：208250）。2 mg/kg を皮下投与後 1 週間まで、TFPI 機能活性と遊離 TFPI 濃度は低下した。この結果とは別に、概して TFPI 機能活性及び遊離 TFPI 濃度は試験期間を通して阻害された。総 TFPI 濃度は全用量で増加した。2 mg/kg では増加の程度は小さく、総 TFPI は 1 週間後に再びベースライン値に戻った。高用量群では、総 TFPI 濃度は定常状態の 15～30 nmol/L（657～1,314 ng/mL）で安定していた。

2.6.4.3.2.2　4 週間投与試験（試験番号：210130）

1 群あたり雌雄各 3 頭に、コンシズマブを 0、3 及び 9 mg/kg の用量で 1 日 1 回皮下投与、並びに 30 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与した（M 2.6.5.4.C、試験番号：210130）。初回及び最終投与後に TK が検討された。コンシズマブを投与した全動物でコンシズマブの曝露が確認された。投与開始後 1 日にコンシズマブ 3 又は 9 mg/kg を皮下投与時の曝露量は、用量の増加に伴い用量比を上回る増大を示した。1 日 1 回反復投与時（投与開始後 28 日を「第 28 日」と定義する）の曝露量は、投与量の増加に比

例して増大した。第 28 日時点でのコンシズマブ濃度が標的介在性のクリアランス飽和値（＞20,000 ng/mL、2.6.4.3.1）まで上昇していたことから、この結果は予想される所見であった。コンシズマブは 1 日 1 回反復皮下投与後の血漿中に大量に蓄積し、その蓄積比（Rac）は 50 以上であり、低用量群で最も高かった。mAbs の吸収が遅く、TMDD がコンシズマブの PK に影響を及ぼすため、次回の投与を行った 24 時間後には吸収相が完了しなかったことから、この結果は予想した通りであった。また、単回投与では TMDD による消失が飽和する可能性は低く、血漿中コンシズマブ濃度は低かった。週 1 回反復静脈内投与では、30 mg/kg を初回投与後に TMDD による消失が飽和したため、コンシズマブの Rac は 1 日 1 回皮下投与よりも非常に低く（Rac：2～3）、その結果、コンシズマブの $t_{1/2}$ が延長した。また、雌では雄と比較して曝露量がやや低い傾向が認められた。静脈内投与群の 1 頭では、最終投与後にコンシズマブの曝露量が減少した。このことは、当該動物では中和又は除去に関わる ADA が増加した可能性が考えらえる。しかしながら、本試験では ADA 分析は実施されなかった。

2.6.4.3.2.3　13 週間投与試験（試験番号：209206）

13 週間（及び 11 週間の回復期間）の皮下投与及び静脈内投与による毒性及び安全性薬理試験において、1 群あたり雌雄各 5 頭にコンシズマブを 0、1、10 及び 50 mg/kg/日の用量で皮下投与、又は 200 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与した（M 2.6.5.4.D、試験番号：209206）。初回及び最終投与後、並びに回復期間中に TK 用の血液試料を採取した。さらに、第 15 日、30 日及び 58 日に曝露の確認のため、別途血液試料を採取した。血液試料について、コンシズマブ濃度及び TFPI 機能活性を測定した。皮下投与後のコンシズマブ曝露量は、初回投与後 1～10 mg/kg では用量比を上回って増大した。10～50 mg/kg の曝露量の増大は、投与量の増加にほぼ比例した。第 91 日には、皮下投与した全用量で、曝露量は概して用量比例的な増大を示した。予想された通り、1 日 1 回反復投与時にはコンシズマブの顕著な蓄積が生じ、平均 Rac は低用量群で約 400 であった。週 1 回静脈内投与群では、Rac は約 3 であった。雌雄でコンシズマブの曝露量に一貫した性差は認められなかった。1 mg/kg/日投与群の 2 頭は、投与期間終了時に ADA 陽性であった。これらの動物では、第 30 日からコンシズマブの曝露量が低下した。また、回復期間終了時に 1 mg/kg/日群の 4 頭、10 mg/kg/日の 1 頭が ADA 陽性であった。

血漿中 TFPI 機能活性は、13 週間毒性試験の全投与群で阻害された。回復期間において、TFPI 機能活性は低用量群ではベースライン値に戻ったが、高用量（≧10 mg/kg）では回復期間を通して阻害された。これらの観察結果は、中用量及び高用量群では全回復期間を通じて血漿中コンシズマブ濃度が高かったことと一致するものであった。血漿中 TFPI 機能活性は、コンシズマブの曝露が減少した ADA 陽性動物で回復した。

2.6.4.3.2.4　26 週間投与試験（試験番号：211087）

26 週間（及び 13 週間の回復期間）の皮下及び静脈内投与による毒性試験において、1 群あたり雌雄各 5 頭にコンシズマブを 0、3 及び 9 mg/kg/日の皮下投与及び 30 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与した（M 2.6.5.4.E、試験番号：211087）。TK プロファイリング用に、初回及び最終投与後、並びに回復期間中に血液試料を採取した。さらに、試験期間の選択時点で、コンシズマブ濃度の投与前の血液試料、並びに遊離 TFPI、総 TFPI 及び TFPI 機能活性を測定した。皮下投与では、初回投与後に 3～9 mg/kg で用量比を上回る曝露量の増大が認められた。投与 26 週では用量に比例して曝露量が増大し

た。反復投与後、コンシズマブの顕著な蓄積がみられた。皮下投与後の蓄積比の個体別データは 29～191 であり、3 mg/kg/日群で最も高かった。静脈内投与群では、投与間隔が長いため、Rac は低く、1.5～6 であった。一部のケースでは、雌動物の方が曝露量は低かったが、この差異に一貫性はみられなかった。回復期間の動物では、曝露量はばらついたがコンシズマブの曝露が認められた。ADA は回復期間の動物 2 頭を含め、投与群で 7 頭検出された。ADA 陽性を示した動物の 5 頭では、ADA 反応を示さなかった動物と比較して、コンシズマブの血漿中濃度が低下した。

対照群では、遊離 TFPI 濃度は試験期間を通じて全般的に高かった（M 2.6.5.4.E、試験番号：213391）。投与群では ADA 反応が認められた一部の動物を除き、遊離 TFPI 濃度は第 6 週（投与開始後の最初の測定）以降に低下した。遊離 TFPI とは対照的に、総 TFPI 濃度はコンシズマブ投与後に増加した（M2.6.5.4.E、試験番号：213391）。試験中、複数の時点で総 TFPI を測定したところ、定常状態である 20～40 nmol/L（876～1,752 ng/mL）に達した。回復期間終了時には、一部の動物で総 TFPI 濃度がベースライン値まで低下し、その他の動物では上昇したままであった。このことは、コンシズマブ濃度と相関していた。すなわち、最も高いコンシズマブ濃度を示した動物で、総 TFPI の高値が観察された。

TFPI 機能活性は、投与群の動物で概して低下したが、結果に多少ばらつきがみられた。コンシズマブの濃度が低下すると、TFPI 機能活性はベースライン値まで増加した。

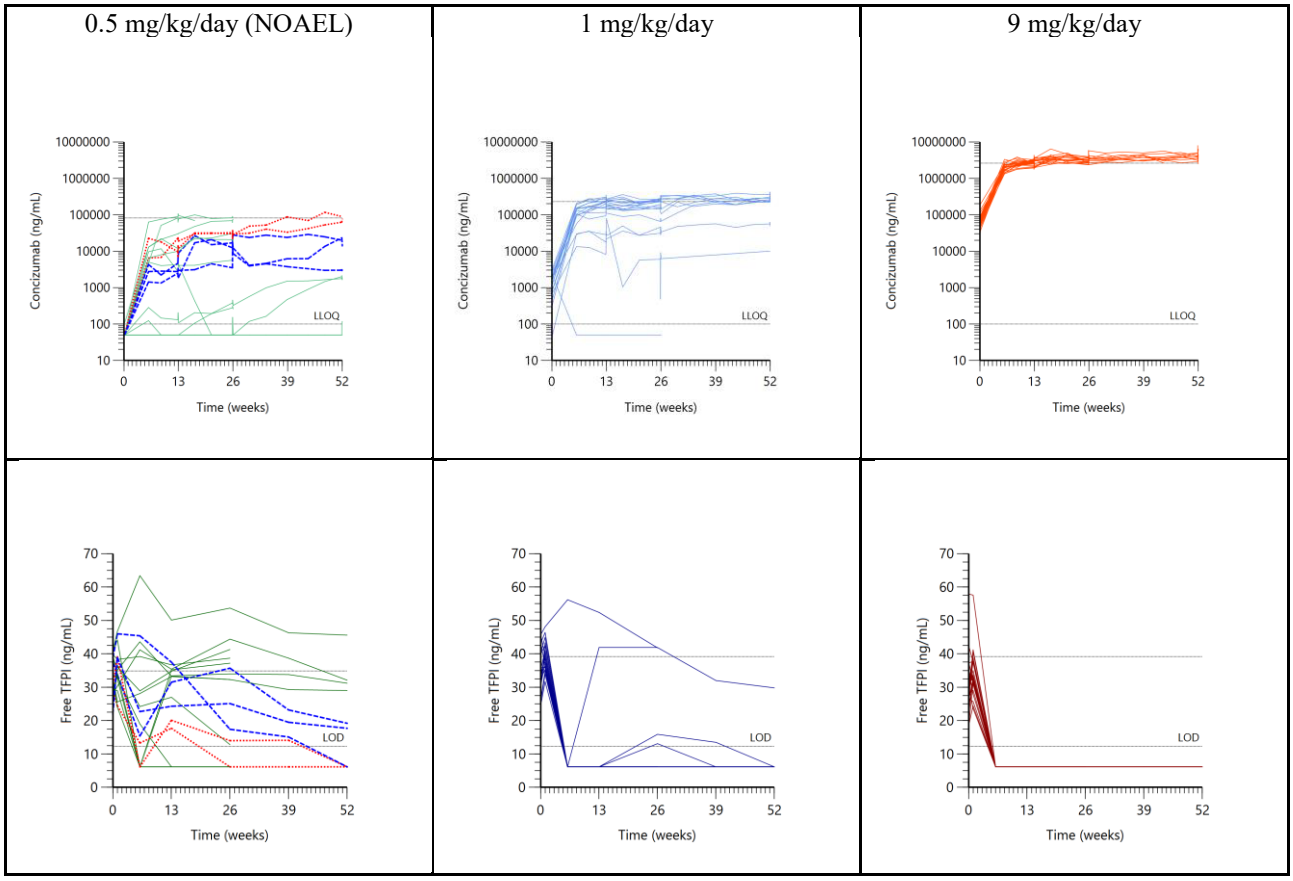
2.6.4.3.2.5　52 週間投与試験（試験番号：213542）

主に ADA を発生しないサルを用いてこれまでに実施された毒性試験の低用量群から得られた、血漿中コンシズマブ濃度データに基づき、母集団薬物動態モデルを構築した。52 週間試験における低用量群の選択は、このモデルにより裏付けられた。3 及び 9 mg/kg/日を皮下投与した 26 週間試験では NOAEL が設定できなかったが、13 週間試験では、NOAEL は 1mg/kg/日であった。したがって、52 週間試験では、可能な限り NOAEL が得られるようにするため、1 mg/kg 未満を目標とした。1 mg/kg/日投与時の定常状態におけるコンシズマブの C_{max} は 282,000 ng/mL であった（13 週間試験）。したがって、52 週間試験の最低用量群で目標とする定常状態の C_{max} の範囲は、50,000～100,000 ng/mL とした。PK モデルが開発され、52 週間試験における血漿中濃度のシミュレーションに用いた結果、0.5 mg/kg/日の投与量で C_{max} の中央値が約 81,000 ng/mL となることが示され、許容可能と考えられた。したがって、52 週間試験の低用量として設定した。52 週間試験のその他の投与量は、1 及び 9 mg/kg/日であった（M 2.6.5.4.F、試験番号：213542）。PK モデルは 2.6.4.8 項に詳細に記載する。

52 週間試験における 1 群あたりの動物数は雌雄で各 9～13 頭であり、中間投与群では、13 週後（0 及び 9 mg/kg/日）及び 26 週後（0、0.5、1 及び 9 mg/kg/日）に安楽死処置された。TK プロファイリング用に、血液試料を第 1、13、26 及び 52 週に採取した。さらに、試験期間中に投与前の血液試料を採取し、コンシズマブ、遊離 TFPI 及び総 TFPI 濃度、TFPI 機能活性を測定した。

コンシズマブ及び遊離 TFPI の個体別の血漿中プロファイルを図 2.6.4-3 に示す。各用量群について以下に考察する。

図 2.6.4-3　　52 週間試験におけるコンシズマブの曝露量及び遊離 TFPI 濃度の個体別プロット（試験番号：213542）



Note: Top panels show the observed exposure in individual animals and bottom panels show the concentration of free TFPI. The dotted red lines in the group receiving 0.5 mg/kg/day represent the two animals that showed the expected exposure at 52 weeks. The dashed blue lines represent three ADA-positive animals in this group with a reduced TFPI concentration at 52 weeks, but which did not reach the expected exposure. The upper horizontal line in top panels indicates the PK model predicted C_{max} in each group at steady state. In the lower panels, the upper horizontal line represents the baseline TFPI in the group. The LLOQ (concizumab) and LOD (free TFPI) are shown in the figures. A value of ½LLOQ or ½LOD was assigned to values below LLOQ/LOD for them to be visible on the figures.
Abbreviations: LLOQ = lower limit of quantification; LOD = Level of detection. NOAEL: No observed effect level.

第 2 群（0.5 mg/kg/日; NOAEL)

第 2 群では、初回投与後の血漿中にコンシズマブはほぼ検出されなかった。ほとんどの試料で濃度は定量下限（LLOQ）未満であり、検出された試料の濃度は低かった（LLOQ の約 4 倍まで）。このことは、吸収が遅いことと TMDD の影響を受けた可能性が最も高いと考えられた。6 週間後、ほとんどの動物で曝露量が増加した。図 2.6.4-3 左上図に示されているように、0.5 mg/kg/日を投与された一部の動物ではコンシズマブの血漿中濃度が低く、このことは、中和又は除去に関わる ADA の増加を示すものであった。試験期間中に動物の ADA 状態が変化し、試験初期に ADA 陽性を示した一部の動物は後期に ADA 陰性となった。第 52 週の 0.5 mg/kg/日群では、図 2.6.4-3 の破線赤色で示したように、2 頭では PK モデルで予測された通りのコンシズマブの曝露量であった。これら 2 頭は試験前半に ADA 陽性を示したが、予測値よりも低いものの、依然としてコンシズマブに曝露されていた。同一投与群の他

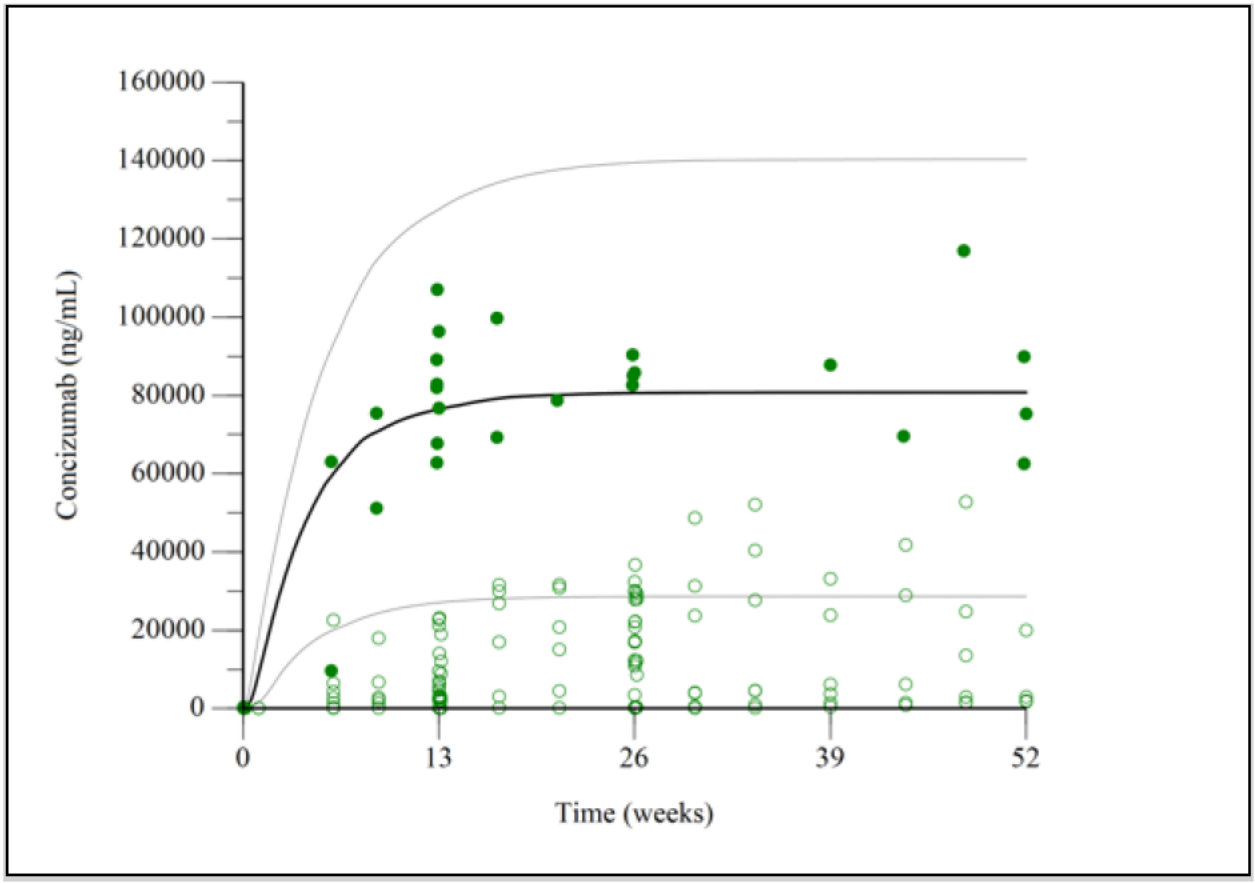
の動物では、第 52 週に曝露量が低下し、一部の動物では、全測定時点でコンシズマブ濃度が LLOQ を下回っていた（0.5×LLOQ 濃度としてグラフに提示）。0.5 mg/kg/日群では、別の 3 頭が ADA 陽性であったが、試験期間を通してコンシズマブの曝露がわずかに認められた（破線青色でマーク）。ADA データの解析から、コンシズマブ濃度は、ADA 陽性動物、特に強い抗体反応（すなわち、高い ADA 力価）を示す動物において、全般的に低下することが示された。この結果を図 2.6.4-4 に示す。ここでは、0.5 mg/kg/日群について、ADA 陰性試料と陽性試料のコンシズマブ濃度を別々にプロットする。また、予測濃度の中央値、5 及び 95 パーセンタイル値は図 2.6.4-4 の通りであり、ADA 陽性試料でコンシズマブの濃度が若干低下したことは明らかであった。

血漿中遊離 TFPI 濃度（M 2.6.5.4.F、試験番号：213542）は、ADA 陰性動物の検出限界（LOD）を下回っており、遊離 TFPI はコンシズマブにより完全に阻害されることが示された。この結果を図 2.6.4-3 の左下図に示す。ここでは、上記と同じ 2 頭の動物に破線赤色でマークされている。図 2.6.4-3 に示すように、これら 2 頭では、投与期間を通じて TFPI 値が低下し、LOD 付近又は LOD を下回っていた。コンシズマブの曝露がある程度認められた ADA 陽性動物 3 頭（破線青色）では、試験期間中に TFPI 値が低下し、このうち 1 頭では第 52 週に TFPI 値が LOD を下回った。全体として、ADA 陽性動物では抗体反応が弱く、コンシズマブの曝露がある程度認められた動物で遊離 TFPI がある程度低下していたが、抗体反応が強く、コンシズマブへの曝露がほとんどないか又は全く認められなかった動物では、遊離 TFPI 値はベースライン値に戻っていた。

遊離 TFPI パターンは残存 TFPI 機能活性に反映された。このように、残存 TFPI 機能活性は、ADA 陰性動物では投与後に低下したが、血漿中コンシズマブ値が LLOQ を下回った ADA 陽性動物ではベースライン値であり、曝露量が低下した ADA 陽性動物では中間値であった（M 2.6.5.4.F、試験番号：213542）。

動物の ADA の状態は、総 TFPI 濃度にも反映された。このように、ADA 陰性動物では投与後に総 TFPI が増加したが、ADA 陽性動物ではベースライン値であったことから（M2.6.5.4.F、試験番号：[redacted]141003）、コンシズマブの TFPI への結合は蓄積しないものの、ADA により除去されることが示唆された。ADA 反応が緩徐に減少した動物では、総 TFPI 濃度が増加した。

図 2.6.4-4　　52 週間試験で 0.5 mg/kg/日（NOAEL）を投与したサルにおいて ADA 陰性及び陽性を示した血漿中コンシズマブ濃度



Note: Open circles = ADA-positive samples; closed circles = ADA-negative or very low-titre samples. The black line represents the median of 200 simulations of daily administration of 0.5 mg/kg using a population PK model of concizumab in monkeys (Study ID 322182). The two grey lines represent the 5th and 95th percentiles.
Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; PK = pharmacokinetic(-s).

第 3 群（1 mg/kg/日）

第 3 群では、5 頭が ADA を発生し、その結果、コンシズマブの曝露量が減少した（図 2.6.4-3、中央上図）。第 2 群と同様に、ADA 陰性動物では遊離 TFPI 値が LOD を下回っていた（図 2.6.4-3、中央下図）。ADA 陽性動物では、遊離 TFPI はベースライン値に戻ったか、ベースラインと比較して低下した又は LOD を下回った。TFPI 機能活性は、ADA 陽性動物では概してベースライン値に戻っていた。ADA の産生量は総 TFPI 値にも反映され、本投与群の ADA 陽性動物ではベースラインに近い値にまで低下した。

第 4 群（9 mg/kg/日）

最後に、第 4 群における投与第 13 週及び 26 週の曝露量は、これまでに実施された試験の同一用量で認められた曝露量と同程度であった（M2.6.5.4.C、試験番号：210130 及び M2.6.5.4.E、試験番号：211087）。投与第 52 週時において、本投与群の曝露量は投与第 26 週時の値を上回って増加したと思われ（投与第 26 週及び 52 週時の C_{max} はそれぞれ 3,960,000 及び 5,070,000 ng/mL）、コンシズマブの継

続的な蓄積が示唆された（表 2.6.4-15 及び図 2.6.4-3 右上図）。本投与群では、遊離 TFPI（図 2.6.4-3 右下図）及び残存 TFPI 機能活性は、全動物の全測定時点で低下していた。総 TFPI 濃度は、投与 26、39 及び 52 週で約 20 nmol/L であり、プラトーに達した。

これまでに実施された毒性試験で認められたように、TMDD がコンシズマブの PK に大きな影響を及ぼすことから、曝露量は投与第 1 日に用量比を上回る増加を示し、特に 0.5 mg/kg の初回投与後の曝露量が非常に低かったため、0.5～1 mg/kg で増加した。反復投与時の曝露量の増加は、依然として用量比例的な増加を上回っていたが、その程度は単回投与時よりも小さかった。これまでの観察結果と一致して、コンシズマブは反復投与後に大きく蓄積した。個体別の Rac は 33～639 であり、0.5 及び 1 mg/kg/日投与群の動物で最高値を示した。一部のケースでは、特に ADA の発生がコンシズマブの濃度に影響する低用量の雌で曝露量が低かった。しかしながら、全体的にその差異に一貫性は認められなかった。

2.6.4.4　分布

コンシズマブの分布試験は実施されていない。コンシズマブの分布は、ウサギを用いた免疫組織化学的検査[13]、カニクイザル及びヒト組織を用いた組織交差反応性試験、カニクイザルを用いた免疫組織化学的検査により評価されている。一般に、コンシズマブは血液中に存在し、血管内皮と関連していることが認められ、動物種間で差異は認められなかった。

2.6.4.5　代謝

コンシズマブは天然に存在するアミノ酸からなる mAb である。したがって、その代謝は十分に知られている（すなわち、酵素によるペプチド及び構成アミノ酸へのタンパク質分解消化）。ICH S6（R1）ガイドラインに従うと[14]、古典的な生体内変化を調べる試験はコンシズマブには必要ないと考えられる。

2.6.4.6　排泄

コンシズマブの排泄試験は実施されていない。前述したように、コンシズマブはペプチド及びアミノ酸に分解され、体内で再利用又は排泄されると考えられる。

2.6.4.7　薬物動態学的相互作用

コンシズマブによる予防治療を受けている血友病患者では、出血時に追加治療が必要となる可能性がある。コンシズマブによる予防治療を受けているインヒビターを保有する血友病患者におけるノボセブン®（rFVIIa、破綻出血治療薬）の投与を裏付けるため、カニクイザルを用いた 4 週間薬物相互作用試験（M 2.6.5.15.A、試験番号：215431[15]）において、コンシズマブと rFVIIa との薬物相互作用が生じるか検討した。コンシズマブを 3 群のカニクイザル（雌雄各 3 頭）に 1 日 1 回皮下投与した。投与用量は全群で同様であり、試験の最初の 4 日間は 9 mg/kg/日、残りの期間は 1 mg/kg/日であった。初回に負荷用量として 9 mg/kg/日を投与することにより、1 mg/kg/日投与後の定常状態に相当するコンシズマブ濃度に到達させた。第 28 日にコンシズマブを投与した 3 群に rFVIIa を 0.25、0.5 又は 1 mg/kg の用量で、あるいはコンシズマブを投与しなかった群に 1 mg/kg で静脈内投与した。サルに rFVIIa を 2 時間間

隔で 3 回静脈内投与した。第 1 日及び 27 日の投与後、NCA によりコンシズマブの血漿中濃度推移を評価した。rFVIIa の PK プロファイルは、3 回の静脈内投与の最後に評価した。定常状態におけるコンシズマブの曝露量は、13 週間投与試験（M 2.6.5.4.D、試験番号：209206）における 1 mg/kg/日投与時の曝露量と概ね同程度であった。1 頭が ADA を発生し、コンシズマブの曝露に影響を及ぼした。rFVIIa の PK 解析では、$t_{1/2}$ の平均は 1.4～1.8 時間であった。雌雄で曝露量に明らかな性差は認められず、rFVIIa の曝露量は見かけ上、用量に比例して増加した。さらに、1 mg/kg 投与後の rFVIIa の曝露量に関して、コンシズマブの有無による差異はないと考えられた。

遊離 TFPI 濃度は、投与前及び投与第 26 日及び 29 日に測定された。投与第 26 日及び 29 日の遊離 TFPI 値は、ADA を発生した動物を除き、いずれの動物においても LOD 未満であった。TFPI 機能活性を第 1 日から 27 日まで一定の間隔で評価した結果、その他の毒性試験で観察されたように、コンシズマブを投与した全動物で TFPI 機能活性がベースライン値から低下した。ADA を発生した動物では、TFPI 機能活性は依然として阻害されていた。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

2.6.4.8.1　　カニクイザル PK モデル（試験番号：322182）

非線形クリアランスをミカエリス-メンテン式で表した 2 コンパートメントモデルによる、カニクイザルにおけるコンシズマブの PK が説明されている [12]。本モデルにおいて、V_{max} は非線形クリアランスの最大消失速度であり、K_m は非線形クリアランスが 50%低下する血漿中濃度である。

52 週間毒性試験（2.6.4.3.2.5）における最低用量の設定を裏付けるため、サルにおけるコンシズマブの新たな PK モデルが開発された。当該モデルは、上記のモデルと構造的に類似していたが、主に毒性試験の最低用量から得られた曝露データに基づくものであった。なお、当該モデルについては、322182 試験（M 4.2.2.2-7）に詳細に記載されている。

2.6.4.9　考察及び結論

ウサギ及びカニクイザルにコンシズマブ 0.1～20 mg/kg の用量を単回静脈内投与及び皮下投与時の PK を評価した。さらに、カニクイザルを用いた DRF 試験並びに 4、13、26 及び 52 週間反復投与毒性試験（rFVIIa との相互作用試験を含む）の 5 試験の一部で、コンシズマブの TK を評価した。

PK 試験から、コンシズマブは TMDD の影響を受けることが示されている。これは予想された所見であり、モノクローナル抗体医薬品に共通した特性である[1]。抗体とその標的との相互作用が薬物－標的複合体の排泄につながる場合に観察される。これは飽和可能なプロセスであり、TMDD による薬物消失の程度は生体に存在する標的の量によって決まる。このクリアランス経路は、抗体の全体的なクリアランスに寄与し、血漿中濃度が高い場合に飽和する。TMDD が生じると、抗体の体内動態は非線形となり、抗体の用量が増加するとクリアランス値が低下することに典型的に反映される。カニクイザルにおけるコンシズマブの TMDD は、単回投与及び反復投与試験のモデリングデータを用いて説明されている[12]。クリアランスの非線形部分は、ミカエリス-メンテン式、すなわち V_{max} と非線形クリアランスが 50%低下した血漿中濃度である K_m を用いて算出された。TMDD が生じることにより、コンシズマブの $t_{1/2}$ は血漿中濃度に依存し、評価された用量範囲にわたってコンシズマブの全体的な $t_{1/2}$ を提示することは意味がない。しかしながら、TMDD が飽和している高濃度（典型的に、ウサギ及びカニクイザルで血漿中濃度が 20,000 ng/mL を超える場合）では、コンシズマブの $t_{1/2}$ はウサギで約 83 時間、カニクイザルで約 200 時間であった（表 2.6.4-13 及び表 2.6.4-14）。すなわち、$t_{1/2}$ は、モノクローナル IgG 抗体の典型的な $t_{1/2}$（例えば、サルでは 11~19 日）に近いものであった[8,9,10,11]。$t_{1/2}$ は低濃度で非常に短い。コンシズマブ 2 及び 20 mg/kg を皮下投与時のバイオアベイラビリティは、ウサギ及びカニクイザルで約 80%であった。

毒性試験において、コンシズマブをカニクイザルに静脈内（30 又は 200 mg/kg/週）及び皮下（0.5～50mg/kg/日）投与した結果、高濃度の血漿中コンシズマブに曝露された。TMDD の影響を回避するために、コンシズマブを 1 日 1 回皮下投与した。この投与方法を用いることで、曝露の飽和が生じる血漿中濃度を維持することができた。1 日 1 回皮下反復投与後のコンシズマブの蓄積は大きく、特に低用量（平均 Rac が最大で約 400）で蓄積が大きかった。このことは、内皮上の TFPI にコンシズマブが結合することによって引き起こされる TMDD により説明可能であり、初回投与時の投与部位から吸収される曝露量に影響を及ぼす。また、吸収が緩徐で投与間隔が短いことが、初回投与時の低曝露量の一因となった。これは特に最低用量、例えば 52 週間試験（213542 試験）の 0.5 mg/kg/日で顕著であり、初回投与後の血漿中にコンシズマブはほとんど検出されなかった。しかしながら、反復投与後、TMDD 経路が飽和した時点で、曝露の飽和が生じたときのコンシズマブの $t_{1/2}$ によりクリアランスが決定され、投与間隔を 24 時間にすると、コンシズマブの顕著な蓄積が生じると考えられる。週 1 回の静脈内投与後には、蓄積はそれほど顕著ではなかった（Rac ：2～6）。毒性試験の一部のケースでは、雌動物の方が曝露量は低かったが、この差異に一貫性はみられなかった。

ADA の発生により、反復投与試験において、一部の動物で曝露量が低下した。これは、52 週間試験（213542 試験）の NOAEL（0.5 mg/kg/日）でも認められ、ほとんどの動物で影響が認められた。

カニクイザルを用いたコンシズマブの PK 及び毒性試験において、血漿中に残存した TFPI 機能活性が測定されている。試験から、血漿中 TFPI 機能活性がコンシズマブ投与後に中和されたことが示された。回復期間中、あるいは中和又は除去に関わる ADA が発生した場合に血漿中コンシズマブ濃度が低下すると、TFPI 機能活性はベースライン値に戻った。

PK 試験、DRF 試験、26 及び 52 週間投与毒性試験（211087 試験及び 213542 試験）において、遊離 TFPI 及び総 TFPI（遊離 TFPI 及びコンシズマブ結合型 TFPI の両方を含む）の血漿中濃度を測定した。コンシズマブ投与により、遊離 TFPI 濃度は減少し、コンシズマブが血漿中から消失するとベースライン値に戻ったが、遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI の両方を含む総 TFPI は増加した。コンシズマブを低用量で単回皮下投与した場合、総 TFPI の増加はわずかであり、持続性は低かったが、反復投与後には総 TFPI が蓄積し、定常状態レベル（10～40 nmol/L）となった。これに対し、毒性試験で投与された最低用量（0.5 mg/kg/日）における定常状態のコンシズマブ濃度は約 500 nmol/L (80,000 ng/mL）であり、回復期間中、あるいは中和又は除去に関わる ADA が発生した場合のいずれにおいても、総 TFPI 濃度の低下はコンシズマブの消失と相関していた。

カニクイザルを用いた 4 週間試験において、コンシズマブを 1 日 1 回 28 日間投与し、試験最終日に rFVIIa を投与することにより、rFVIIa の PK に及ぼすコンシズマブの影響が検討された。rFVIIa の PK に対するコンシズマブの影響は認められなかった。

結論として、コンシズマブの PK は、静脈内及び皮下投与後のウサギ及びサルで特性解析がなされている。いずれの動物種でも TMDD により非線形の PK が示され、曝露の飽和を超える血漿中濃度では $t_{1/2}$ が延長したが、血漿中濃度が低い場合には、コンシズマブのクリアランスは速やかであった。いずれの動物種においても、皮下投与時のバイオアベイラビリティは約 80%であった。毒性試験では、非線形性のため曝露量の用量比を超える増加が認められた。TMDD は初回投与後の曝露量に影響し、その後、曝露の飽和が生じる血漿中濃度に達すると、IgG 抗体で予測されるように長い $t_{1/2}$ が続いたことから、1 日 1 回反復投与後のコンシズマブの蓄積は大きかった。雌雄の曝露量に一貫した性差は認められなかった。毒性試験の一部の動物で ADA の発生が認められ、コンシズマブの曝露量が低下したか、又は全く認められなかった。これは特に最低用量を投与された動物でみられた。血漿中の遊離 TFPI 濃度と TFPI 機能活性の低下が示された。カニクイザルにコンシズマブを rFVIIa と併用投与した場合、コンシズマブは rFVIIa の PK に影響を及ぼさなかった。

参考文献

[1] Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(5):548-58.

[2] Broze GJ, Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. Front Biosci (Landmark Ed). 2012;17:262-80.

[3] Food and Drug Administration, CDER. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001.

[4] DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, et al. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. Pharm Res. 2003;20(11):1885-900.

[5] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et al. Workshop/conference report - Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays. Aaps Journal. 2007;9(1):E30-E42.

[6] Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, et al. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. J Immunol Methods. 2004;289(1-2):1-16.

[7] Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. J Pharm Biomed Anal. 2008;48(5):1267-81.

[8] Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. Blood. 2014;124(20):3165-71.

[9] Vugmeyster Y, Szklut P, Tchistiakova L, Abraham W, Kasaian M, Xu X. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of humanized monoclonal anti-IL-13 antibodies with different IL-13 neutralization mechanisms. Int Immunopharmacol. 2008;8(3):477-83.

[10] Lin YS, Nguyen C, Mendoza JL, Escandon E, Fei D, Meng YG, et al. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. J Pharmacol Exp Ther. 1999;288(1):371-8.

[11] Østergaard H, Lund J, Greisen PJ, Kjellev S, Henriksen A, Lorenzen N, et al. FVIIIa-mimetic bispecific antibody (Mim8) ameliorates bleeding upon severe vascular challenge in hemophilia A mice. Blood. 2021;138:1258-68.

[12] Agersø H, Overgaard RV, Petersen MB, Hansen L, Hermit MB, Sorensen MH, et al. Pharmacokinetics of an anti-TFPI monoclonal antibody (concizumab) blocking the TFPI interaction with the active site of FXa in Cynomolgus monkeys after iv and sc administration. Eur J Pharm Sci. 2014;56:65-9.

[13] Hansen L, Petersen LC, Lauritzen B, Clausen JT, Grell SN, Agersø H, et al. Target-mediated clearance and bio-distribution of a monoclonal antibody against the Kunitz-type protease inhibitor 2 domain of Tissue Factor Pathway Inhibitor. Thromb Res. 2014;133(3):464-71.

[14] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1), Current step 4 version. Parent guideline dated 16 July 1997. Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011. 16 Jul 1997.

[15] Lauritzen B, Olling J, Abel KL, Augustsson C, Balling K, Bjelke M, et al. Administration of recombinant FVIIa (rFVIIa) to concizumab-dosed monkeys is safe, and concizumab does not affect the potency of rFVIIa in hemophilic rabbits. J Thromb Haemost. 2019;17(3):460-9.

コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.5 薬物動態試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
薬物動態試験の概要表 3
2.6.5.1 薬物動態試験一覧 3
2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告書 6
2.6.5.3 吸収（単回投与） 7
2.6.5.4 吸収（反復投与） 10
2.6.5.4.A ウサギを用いた 6 週間皮下及び静脈内投与試験（209305） 10
2.6.5.4.B カニクイザルを用いた用量範囲設定（DRF）試験（208250） 11
2.6.5.4.C カニクイザルを用いた 4 週間皮下及び静脈内投与試験（210130） 12
2.6.5.4.D カニクイザルを用いた 13 週間皮下及び静脈内投与試験（209206） 13
2.6.5.4.E カニクイザルを用いた 26 週間皮下及び静脈内投与試験（211087 及び 213391） 14
2.6.5.4.F カニクイザルを用いた 52 週間皮下投与試験（213542 及び [redacted]141003） 18
2.6.5.5 組織分布 22
2.6.5.6 血漿タンパク結合 22
2.6.5.7 妊娠又は授乳動物を用いた試験 22
2.6.5.8 その他の分布試験 22
2.6.5.9 *In vivo* 代謝 22
2.6.5.10 *In vitro* 代謝 22
2.6.5.11 推定代謝経路 22
2.6.5.12 薬物代謝酵素誘導／阻害 22
2.6.5.13 排泄 23
2.6.5.14 胆汁中排泄 23
2.6.5.15 薬物相互作用 24
2.6.5.15.A カニクイザルを用いた rFVIIa との併用による 4 週間薬物相互作用試験（215431） 24
2.6.5.16 その他の薬物動態試験 28

薬物動態試験の概要表

2.6.5.1　薬物動態試験一覧

Test article: concizumab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Absorption					
Absorption after a single dose					
Single-dose pharmacokinetics	Rabbit (NZW)	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	209176	4.2.2.2-1
Single-dose pharmacokinetics	Rabbit (NZW)	i.v., s.c.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]081102	4.2.2.2-2
Single-dose pharmacokinetics	Rabbit (NZW)	i.v., s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	209305	4.2.2.2-3
Single-dose pharmacokinetics (with toxicity endpoints)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]081101	4.2.2.2-4
Repeated single-dose PK/PD study (with toxicity endpoints)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	210156	4.2.2.2-5
Repeat single-dose toxicity study (Dose Range Finding) (Escalating doses)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v., s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	208250	4.2.3.1-1

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Absorption after repeated doses					
Repeat-dose pharmacokinetics	Rabbit (NZW)	s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	209305	4.2.2.2-3
Repeat single-dose toxicity study (Dose Range Finding) (Escalating doses)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	208250	4.2.3.1-1
4-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v., s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	210130	4.2.3.2-1
13-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v., s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	209206	4.2.3.2-2
26-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v., s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	211087	4.2.3.2-3
Total (concizumab bound) TFPI from 26-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v., s.c.	Analysis at Novo Nordisk A/S, DK	213391	4.2.3.7.7-5
52-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	213542	4.2.3.2-4

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Total (concizumab bound) TFPI from 52-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	Analysis at Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]141003	4.2.3.7.7-8
Distribution No studies performed - rationale provided in M 2.6.4.4.					
Metabolism No studies performed - rationale provided in M 2.6.4.5.					
Excretion No studies performed.					
Pharmacokinetic drug interactions					
4-week drug-drug interaction study with rFVIIa	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	concizumab: s.c. (once daily) rFVIIa: i.v. (three administrations with two-hour intervals)	[redacted] PK/PD evaluation: Novo Nordisk A/S, DK	215431	4.2.3.7.7-3
Other No studies performed.					

2.6.5.2　分析法及びバリデーション報告書

See M 2.6.4.2.

2.6.5.3 吸収（単回投与）

Test article: concizumab

Location in CTD	4.2.2.2-1	4.2.2.2-2	4.2.2.2-3	4.2.2.2-4	4.2.2.2-5	4.2.3.1-1
	Study ID: 209176	**Study ID: [redacted]081102**	**Study ID: 209305**	**Study ID: [redacted]081101**	**Study ID: 210156**	**Study ID: 208250 (part of DRF study)**
	209176	**[redacted]081102**	**209305**	**[redacted]081101**	**210156**	**208250**
Species	**Rabbit**	**Rabbit**	**Rabbit**	**Cynomolgus monkey**	**Cynomolgus monkey**	**Cynomolgus monkey**
Gender (M/F) / Number of animals	F/3	F/2-3 i.v. and 2 s.c.	M/4 per dose group	M/1 per dose	M/2 per dose F/2 per dose	M/3 per dose
Feeding condition	Fed	Fed	Fed	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	NR	34 mM Histidine Sucrose Tween 80 pH 6.5	34 mM Histidine 250 mM sucrose 0.03% Tween 80 pH 6.5	20 mM sodium phosphate 150 mM sodium chloride pH 7.2	34 mM Histidine 251 mM sucrose 0.03% Tween 80 pH 6.5	34 mM Histidine 250 mM sucrose 0.03% Tween 80 pH 6.5
Method of Administration	i.v.	i.v./s.c.	i.v./s.c.	i.v.	i.v.	i.v./s.c.
Dose (mg/kg)	2	2 (i.v., s.c.) 20 (i.v.)	2, 5, 10 (s.c.) 20 (i.v., s.c.)	2, 20	0.1, 0.5, 1	20
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	concizumab	concizumab	concizumab	concizumab	concizumab	concizumab
Assay	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA

	Study ID: 209176	**Study ID: [redacted]081102**	**Study ID: 209305**	**Study ID: [redacted]081101**	**Study ID: 210156**	**Study ID: 208250 (part of DRF study)**
PK parameters: **t_{max} (h)**	NR	NR	2 mg/kg s.c.: 36 5 mg/kg s.c.: 48 10 mg/kg s.c.: 60 20 mg/kg s.c.: 120	0.5	NR	20 mg/kg s.c.: 168 For i.v.: NR
C_{max} (ng/mL)	2 mg/kg i.v.: 96,000	2 mg/kg s.c.: 9,000 2 mg/kg i.v.: 36,000 20 mg/kg i.v.: 363,000	2 mg/kg s.c.: 2,960 5 mg/kg s.c.: 19,500 10 mg/kg s.c.: 63,300 20 mg/kg s.c.: 175,000 20 mg/kg, i.v.: 417,000	2 mg/kg i.v.: 33,993 20 mg/kg i.v.: 331,654	0.1 mg/kg: M:137-277, F: 143-552 0.5 mg/kg[a]: M: 5,020-7,460, F: 6,990-7,140 1 mg/kg: M:15,900-28,900 F: 17,600-23,400	20 mg/kg s.c.: 145,000 20 mg/kg i.v.: NR
AUC (h * ng/mL)	2 mg/kg i.v.: 1,207,000	2 mg/kg s.c.: 868,000 2 mg/kg i.v.: 1,083,000 20 mg/kg i.v.: 39,441,000	2 mg/kg s.c.: 144,000 5 mg/kg s.c.: 1,450,000 10 mg/kg s.c.: 7,490,000 20 mg/kg s.c.: 27,400,000 20 mg/kg, i.v.: 33,000,000	2 mg/kg i.v.: 746,609 20 mg/kg i.v.: 46,647,523	0.1 mg/kg: M: 819-924, F: 824-1,770 0.5 mg/kg[a]: M: 44,700-90,600 F: 65,800-77,600 1 mg/kg: M: 418,000-539,000 F: 293,000-389,000	20 mg/kg s.c.: 50,700,000 20 mg/kg i.v.: 66,000,000
$t_{1/2}$ (h)	2 mg/kg i.v.: 18	2 mg/kg s.c.: 113 2 mg/kg i.v.: 65 20 mg/kg i.v.: 162	2 mg/kg s.c.: 21 5 mg/kg s.c.: 11 10 mg/kg s.c.: 11 20 mg/kg s.c.: 26 20 mg/kg, i.v.: 31 (harmonic mean)	2 mg/kg i.v.: 16 20 mg/kg i.v.: 210	0.1 mg/kg: M: 24.0-28.7, F: 18.9-46.6 0.5 mg/kg[a]: M: 85.5-121, F: 92.3-113 1 mg/kg: M: 24.9-76.6, F: 32.7-90.7	20 mg/kg s.c.: 56 20 mg/kg i.v.: 49 (harmonic mean)

	Study ID: 209176	**Study ID: [redacted]081102**	**Study ID: 209305**	**Study ID: [redacted]081101**	**Study ID: 210156**	**Study ID: 208250 (part of DRF study)**
Time for calculation – h	NR	2 mg/kg s.c.: 24-54 h 2 mg/kg i.v.: 3-48 h 20 mg/kg i.v.: 24-264 h	2 mg/kg s.c.: 48-240 h 5 mg/kg s.c.: 48-384 h 10 mg/kg s.c.: 120-312h 20 mg/kg s.c.: 240-888h 20 mg/kg, i.v.: 240-696h	2 mg/kg i.v.: 6-48 h 20 mg/kg i.v.: 48-360 h	0.1 mg/kg: M: 6-72, F: 6-120 0.5 mg/kg[a]: M: 48-432, F: 48-432 1 mg/kg: M: 72-336, F: 48-336	20 mg/kg s.c.: 456-984 h 20 mg/kg i.v.: 456-984 h
CL (mL/h/kg)	2 mg/kg i.v.: 1.7	2 mg/kg i.v.: 1.9 20 mg/kg i.v.: 0.5	20 mg/kg, i.v.: 0.63	2 mg/kg i.v.: 2.7 20 mg/kg i.v.: 0.4	0.1 mg/kg: M: 108-122, F: 56.6- 121 0.5 mg/kg[a]: M: 5.52-11.2, F: 6.45-7.60 1 mg/kg: M: 1.85-2.39, F: 2.57-3.41	20 mg/kg i.v.: 0.31
V_d (mL/kg)	2 mg/kg i.v.: 44[b]	2 mg/kg i.v.: 171[b] 20 mg/kg i.v.: 123[b]	20 mg/kg i.v.: 52[c]	2 mg/kg i.v.: 55[c] 20 mg/kg i.v.: 86[c]	0.1 mg/kg: M: 2,160-4,490, F: 1,630-4,570 0.5 mg/kg[a]: M: 960-1,380, F: 858-1,240 1 mg/kg: M: 76.5-265, F: 161-350	NR
Bioavailability (%)		2 mg/kg s.c.: 80	20 mg/kg s.c.: 83			20 mg/kg s.c.: 77

Additional information: For Study ID [redacted]081101, the reported values are for a single animal at each dose. In Study ID 210156, two single doses of concizumab were administered with a two-week interval and the values reported are the minimum and maximum of both administrations. For t_{max}, the median and for other parameters the mean, is reported unless otherwise specified (harmonic mean for $t_{½}$ in some studies).

[a]Only results from second single dose reported. [b]Vz. [c]Vss.

NR = not reported.

2.6.5.4 吸収（反復投与）

Test article: concizumab

2.6.5.4.A ウサギを用いた 6 週間皮下及び静脈内投与試験（209305）

Test article: concizumab

Study ID 209305

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.2.2-3

Duration of dosing: Three weeks

Species/strain	Rabbit/New Zealand White	**Sex/number of animals**	Male /4
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	s.c.
Vehicle	34 mM Histidine, 250 mM sucrose, 0.03% Tween 80, pH 6.5	**Dose**	5 mg/kg/week
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA

		Route	**s.c.**		
		Dose (mg/kg)	**5**		
		Week	**1**	**2**	**3**
Male	t_{max}	**h**	48	48	24
	C_{max}	**ng/mL**	23,800	12,500	4,760
	$AUC_{0\text{-}168h}$	**h*ng/mL**	2,070,000	656,000	181,000

Additional information: For t_{max} the median is shown. For C_{max} and AUC, the mean values are shown. The concentration of concizumab decreased after repeated administration in all animals. Plasma samples taken at the end of the study were analyzed for antibodies to concizumab and high antibody titers were found in all animals.

2.6.5.4.B　カニクイザルを用いた用量範囲設定（DRF）試験（208250）

Test article: concizumab

Study ID 208250

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.3.1-1

Duration of dosing: 1 day to four weeks

Species/strain	Monkey/cynomolgus (*Macaca fascicularis*)	**Sex/number of animals**	Male and female/1M and 1F per group
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	s.c.
Vehicle	34 mM Histidine, 250 mM sucrose, 0.03% Tween 80, pH 6.5	**Dose**	2, 20, 80 mg/kg at two-week intervals 20, 80, 160 mg/kg at two-week intervals 80, 160, 200 mg/kg at two-week intervals
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA

		Route	**s.c.**								
		Group	**1**			**2**			**3**		
		Dose (mg/kg)	**2**	**20**	**80**	**20**	**80**	**160**	**80**	**160**	**200**
Male	**t_{max}**	**h**	24	24	72	168	168	72	72	72	72
	C_{max}	**ng/mL**	6,070	155,000	826,000	183,000	936,000	1,820,000	700,000	2,040,000	3,590,000
	$AUC_{0\text{-}336h}$	**h*ng/mL**	410,000	44,800,000	50,100,000	51,900,000	274,000,000	106,000,000	191,000,000	561,000,000	212,000,000
Female	**t_{max}**	**h**	72	72	72	72	24	72	168	24	24
	C_{max}	**ng/mL**	3,340	212,000	625,000	189,000	847,000	1,950,000	655,000	2,100,000	2,900,000
	$AUC_{0\text{-}336h}$	**h*ng/mL**	302,000	35,300,000	37,200,000	46,200,000	227,000,000	124,000,000	189,000,000	499,000,000	191,000,000

Additional information: Individual values from each animal. For AUC, the values for the last dose is $AUC_{0\text{-}72h}$

2.6.5.4.C　カニクイザルを用いた 4 週間皮下及び静脈内投与試験（210130）

Test article: concizumab

Study ID 210130

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.3.2-1

Duration of dosing: 4 weeks

Species/strain	Monkey/cynomolgus *(Macaca fascicularis*)	**Sex/number of animals**	Male and female/3M and 3F per group
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	s.c. and i.v.
Vehicle	34 mM Histidine, 251 mM sucrose, 0.03% Tween 80, pH 6.5	**Dose**	s.c.: 3 and 9 mg/kg/day i.v.: 30 mg/kg/week
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA

			Route	**s.c.**				**i.v.**	
			Dose	**3 mg/kg/day**		**9 mg/kg/day**		**30 mg/kg/week**	
			Day	**1**	**29**	**1**	**29**	**1**	**22**
Male	t_{max}	**h**		24	24	24	6	-	-
	C_{max} (C_{2h} for i.v.)	**ng/mL**		6,360	733,000	48,600	1,870,000	657,000	1,310,000
	AUC_{0-24h} (AUC_{0-168h} for i.v.)	**h*ng/mL**		83,400	15,700,000	685,000	40,500,000	65,800,000	170,000,000
	Rac_{Obs}			-	201	-	62	-	2.7
	$t_{½}$	**h**		-	-	-	-	122; 140	191
Female	t_{max}	**h**		24	2	24	24	-	-
	C_{max} (C_{2h} for i.v.)	**ng/mL**		7,230	542,000	34,500	1,580,000	684,000	1,250,000
	AUC_{0-24h} (AUC_{0-168h} for i.v.)	**h*ng/mL**		106,000	12,400,000	408,000	34,300,000	53,900,000	137,000,000
	Rac_{Obs}			-	122	-	84	-	2.6
	$t_{½}$	**h**		-	-	-	-	181; 194; 340	276

Additional information: For t_{max} the median is shown. For C_{max}, AUC and Rac_{Obs} the mean values are shown. For $t_{½}$ individual values are listed. In the i.v. group, the C_{2h} is reported instead of C_{max}, and the AUC is AUC_{0-168h}. The $t_{½}$ in Animal 11 (male) of 24 hours on Day 22 is not listed here as this animal had lowered exposure, possibly due to development of an ADA response.

2.6.5.4.D　カニクイザルを用いた 13 週間皮下及び静脈内投与試験（209206）

Test article: concizumab

Study ID 209206

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.3.2-2

Duration of dosing: 13 weeks

Species/strain	Monkey/cynomolgus (*Macaca fascicularis*)	**Sex/number of animals**	Male and female/5M and 5F per group
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	s.c. and i.v.
Vehicle	34 mM Histidine, 251 mM sucrose, 0.03% Tween 80, pH 6.5	**Dose**	s.c.: 1, 10 and 50 mg/kg/day i.v.: 200 mg/kg/week
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA

			Route	**s.c.**						**i.v.**	
			Dose	**1 mg/kg/day**		**10 mg/kg/day**		**50 mg/kg/day**		**200 mg/kg/week**	
			Day	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**91**	**1**	**85**
Male	**t_{max}**	**h**		6-24	0-24	24	2-6	24	2-24	-	-
	C_{max} (C_{2h} for i.v.)	**ng/mL**		1,280	291,000	44,500	4,060,000	365,000	15,800,000	4,580,000	11,300,000
	AUC_{0-24h} (AUC_{0-168h} for i.v.)	**h*ng/mL**		20,100	5,900,000	695,000	88,200,000	5,610,000	354,000,000	446,000,000	1,520,000,000
	Rac_{Obs}			-	380	-	130	-	63	-	2.7
	$t_{½}$	**h**		-	57; 73	-	68	-	460; 500	-	70; 650
Female	**t_{max}**	**h**		6-24	0-24	24	0-24	24	0-24	-	-
	C_{max} (C_{2h} for i.v.)	**ng/mL**		1,340	273,000	69,500	4,340,000	444,000	13,500,000	5,040,000	12,200,000
	AUC_{0-24h} (AUC_{0-168h} for i.v.)	**h*ng/mL**		17,500	5,950,000	967,000	79,000,000	5,840,000	297,000,000	451,000,000	1,630,000,000
	Rac_{Obs}			-	390	-	86	-	52	-	2.8
	$t_{½}$	**h**		-	46; 110	-	440; 510	-	420; 540	-	360; 720

Additional information: For t_{max} the minimum and maximum values are shown. For C_{max}, AUC and Rac_{Obs} the mean values are shown. For $t_{½}$ individual values for recovery animals are listed. In the i.v. group, the C_{2h} is reported instead of C_{max}., and the AUC is AUC_{0-168h}.

2.6.5.4.E　カニクイザルを用いた 26 週間皮下及び静脈内投与試験（211087 及び 213391）

Test article: concizumab

Study ID 211087 and 213391

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.3.2-3 (211087) and 4.2.3.7.7-5 (213391)

Duration of dosing: 26 weeks

Species/strain	Monkey/cynomolgus (*Macaca fascicularis*)	**Sex/number of animals**	Male and female/5M and 5F per group
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	s.c. and i.v.
Vehicle	33 mM L-Histidine, 150 mM sucrose, 0.01 mg/mL polysorbate 80, 25 mM arginine HCl, 25 mM sodium chloride, pH 6.0	**Dose**	s.c. 3 and 9 mg/kg/day i.v. 30 mg/kg/week
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA

Study ID 211087

			Route	**s.c.**				**i.v.**	
			Dose	**3 mg/kg/day**		**9 mg/kg/day**		**30 mg/kg/week**	
			Week	**1**	**26**	**1**	**26**	**1**	**26**
Male	**t_{max}**	**h**		24	2-6	24	2-24	2-6	2-6
	C_{max}	**ng/mL**		13,500	1,070,000	102,000	3,730,000	1,050,000	2,270,000
	AUC_{0-24h}	**h*ng/mL**		219,000	23,500,000	1,640,000	86,000,000	92,100,000	238,000,000
	Rac_{Obs}			-	110	-	63	-	2.6
	$t_{½}$	**h**		-	236; 384	-	311; 334	-	103; 252
Female	**t_{max}**	**h**		6-24	0-24	6-24	2-24	2	2-120
	C_{max}	**ng/mL**		10,500	914,000	79,600	2,890,000	883,000	3,030,000
	AUC_{0-24h}	**h*ng/mL**		180,000	19,200,000	1,220,000	67,000,000	76,000,000	376,000,000
	Rac_{Obs}			-	150	-	53	-	4.9
	$t_{½}$	**h**		-	60; 169	-	273	-	163; 227

Additional information: For t_{max} the minimum and maximum values are shown. For C_{max}, AUC and Rac_{Obs} the mean values are shown. For $t_{½}$ individual values for recovery animals are listed. In the i.v. group, the AUC is AUC_{0-168h} and C_0 is reported instead of C_{max}.

TFPI functionality (U/mL) in pre-trial samples, in pre-dose samples on Day 1 through Week 26 of the dosing period and in Week 2 through 13 of the recovery period (mean ± SD). The number of animals was 3/sex for main study groups and 2/sex for recovery groups.

Dose level:	**0 mg/kg/day**		**3 mg/kg/day**		**9 mg/kg/day**		**30 mg/kg/week**	
Sex/number of animals	**M/5**	**F/5**	**M/5**	**F/5**	**M/5**	**F/5**	**M/5**	**F/5**
Pretrial	0.689±0.0681	0.835±0.0469	0.676±0.0671	0.822±0.0522	0.810±0.0594	0.805±0.0543	0.801±0.0384	0.781±0.0616
Week 1	0.691±0.0382	0.715±0.0462	0.746±0.123	0.696±0.0351	0.810±0.0476	0.789±0.125	0.715±0.0936	0.782±0.0554
Week 5	0.705±0.0420	0.712±0.0635	0.583±0.0629	0.596±0.0387	0.708±0.0334	0.605±0.114	0.581±0.0813	0.595±0.0926
Week 9	0.697±0.0178	0.696±0.0792	0.622±0.0984	0.607±0.0349	0.752±0.0537	0.628±0.122	0.558±0.0337	0.663±0.119
Week 13	0.686±0.0181	0.702±0.0723	0.634±0.0775	0.577±0.0307	0.701±0.0310	0.608±0.0928	0.588±0.0418	0.635±0.131
Week 17	0.809±0.102	0.792±0.116	0.591±0.120	0.665±0.0192	0.607±0.109	0.704±0.0738	0.637±0.0175$^{n=4}$	0.706±0.0652
Week 21	0.712±0.0645	0.771±0.0816	0.509±0.0874	0.548±0.132	0.419±0.0247	0.630± 0.0471$^{n=4}$	0.482±0.0335	0.665±0.0180
Week 25	0.768±0.109	0.681±0.0556	0.730±0.0144	0.544±0.114	0.611±0.0903	0.551± 0.0727$^{n=4}$	0.607±0.0409	0.503±0.0252
Week 26	0.774±0.0904	0.721±0.122	0.679±0.115	0.502±0.0275	0.544±0.0797	0.591± 0.0363$^{n=4}$	0.599±0.0686	0.454±0.0286
Recovery Week 2	0.770; 0.830	0.672; 0.708	0.562; 0.768	0.562; 0.721	0.617; 0.729	0.601	0.410; 0427	0.424; 0.603
Recovery Week 3	0.802; 0.813	0.619; 0.676	0.716; 0.726	0.546; 0.686	0.621; 0.664	0.609	0.452	0.545
Recovery Week 4	0.675; 0.668	0.635; 0.706	0.606; 0.642	0.582; 0.649	0.613; 0.626	0.568	0.570; 0.621	0.568; 0.576
Recovery Week 6	0.625; 0.626	0.706; 0.710	0.539; 0.550	0.549; 0.652	0.618	0.547	0.525; 0.529	0.567; 0.616
Recovery Week 8	0.701; 0.755	0.774; 0.775	0.658; 0.686	0.610; 0.635	0.607; 0.728	0.493	0.640; 0.643	0.661; 0.686
Recovery Week 10	0.709; 0.712	0.782; 0.819	0.659; 0.689	0.607; 0.617	0.646; 0.679	0.601	0.570; 0.824	0.601; 0.841
Recovery Week 12	0.711; 0.734	0.691; 0.773	0.650; 0.746	0.649; 0.739	0.628; 0.670	0.618	0.485; 0.740	0.684; 0.733
Recovery Week 13	0.603; 0.637	0.763; 0.833	0.517; 0.581	0.638; 0.836	0.583; 0.592	0.726	0.557; 0.667	0.684; 0.704

Study ID 213391

Total TFPI concentration (pmol/L) in pre-dose samples on Day 1 and in Weeks 6 (pre-dose and 2 and 8 h after dose), 13 (8 h after dose), 17 (pre-dose), 26 (8 h after dose) and 39 (end of the recovery period). The values are the mean ± SD. The number of animals is 5/sex for main study groups and 2/sex for recovery groups.

	0 mg/kg/day		**3 mg/kg/day**		**9 mg/kg/day**		**30 mg/kg/week**	
Sex/number of animals	**M/5**	**F/5**	**M/5**	**F/5**	**M/5**	**F/5**	**M/5**	**F/5**
Day 1	817 ± 182	804 ± 123	905 ± 215	869 ± 187	1,050 ± 332	1,100 ± 366	1,060 ± 254	921 ± 223
Week 6								
- Pre-dose	831 ± 207	861 ± 56.9	36,200 ± 20,700	34,400 ± 19,200	63,100 ± 11,300	40,600 ± 6,690	42,800 ± 27,400	31,900 ± 22,100
- 2 hours	775 ± 185	859 ± 74.3	35,600 ± 24,300	33,700 ± 17,700	61,500 ± 10,400	41,600 ± 10,400	43,000 ± 29,400	31,900 ± 19,300
- 8 hours	921 ± 274	953 ± 115	33,100 ± 19,600	30,000 ± 14,000	62,500 ± 12,700	39,900 ± 4,070	42,900 ± 29,900	30,600 ± 19,300
Week 13	713 ± 128	669 ± 218	33,900 ± 13,400	23,500 ± 13,700	26,000 ± 5,310	20,500 ± 4,180	26,700 ± 9,480	20,300 ± 11,500
Week 17	767 ± 183	833 ± 193	31,500 ± 9,160	22,800 ± 13,200	35,900 ± 7,200	33,100 ± 7,070	30,500 ± 9,480	24,600 ± 13,800
Week 26	1,360 ± 579	1,310 ± 912	36,100 ± 6,100	21,900 ± 12,000	33,500 ± 5,130	26,400 ± 5,230	29,700 ± 13,300	16,800 ± 8,830
Week 39	530 ± 94.9	738 ± 54.1	42,700 ± 5,710	742 ± 599	27,200 ± 4,630	21,700 ± 0.00	7,590 ± 9,760	2,070 ± 1,410

Free TFPI concentration in pmol/L (ng/mL[a]) in pre-dose samples on Day 1 and in Weeks 6 (pre-dose and 2 and 8 h after dose), 13 (8 h after dose), 17 (pre-dose), 26 (8 h after dose) and end of the recovery period. The values are the mean ± SD. The number of animals is 5/sex for main study groups and 2/sex for recovery groups.

Dose level	**0 mg/kg/day**				**3 mg/kg/day**				**9 mg/kg/day**				**30 mg/kg/day**			
Sex/number of animals	**M/5**		**F/5**		**M/5**		**F/5**		**M/5**		**F/5**		**M/5**		**F/5**	
Week 1	1,310 (56.3)	±190 (8.17)	1,460 (62.8)	±224 (9.63)	1,640 (70.5)	±367 (15.8)	1,260 (54.2)	±279 (12.0)	1,590 (68.4)	±407 (17.5)	1,580 (67.9)	±480 (20.6)	1,530 (65.8)	±300 (12.9)	1,360 (58.5)	±121 (5.20)
Week 6																
- Pre-dose	906 (39.0)	±377 (16.2)	1,060 (45.6)	±445 (19.1)	189 (8.13)	±99.7 (4.29)	-	-	93.6 (4.02)	±12.3 (0.53)	76.9 (3.31)	-	100 (4.30)	±13.7 (0.59)	578 (24.9)	±699 (30.1)
- 2 hours	1,010 (43.4)	±148 (6.36)	1,290 (55.5)	±262 (11.3)	169 (7.27)	±83.2 (3.58)	-	-	87.7 (3.77)	±2.32 (0.10)	-	-	214 (9.20)	±217 (9.33)	-	-
- 8 hours	1,090 (46.9)	±206 (8.86)	1,230 (52.9)	±323 (13.9)	152 (6.54)	±76.2 (3.28)	-	-	82.9 (3.56)	±7.02 (0.302)	-	-	99.9 (4.30)	±26.7 (1.15)	-	-
Week 13	1,070 (46.0)	±316 (13.6)	698 (30.0)	±533 (22.9)	142 (6.11)	±79.8 (3.43)	82.7 (3.56)	±7.64 (0.329)	79.8 (3.43)	±14.2 (0.61)	-	-	-	-	-	-
Week 17	1,160 (49.9)	±497 (21.4)	1,090 (46.9)	±594 (25.5)	-	-	282 (12.1)	-	-	-	137 (5.89)	-	149 (6.41)	-	1,220 (52.5)	-
Week 26	209 (8.99)	±49.5 (2.13)	514 (22.1)	±331 (14.2)	197 (8.47)	-	335 (14.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recovery Week 13	916 (39.4)	±5.66 (0.24)	953 (41.0)	±99.0 (4.3)	469 (20.2)	±84.9 (3.7)	1,170 (50.3)	±366 (15.7)	320 (13.8)	±41.0 (1.8)	743 (31.9)	-	1,450 (62.4)	±464 (20.0)	1,330 (57.2)	±344 (14.8)

Note: "-" if in mean: all values below LLOQ. If SD is not shown, n = 1 sample above LLOQ.

[a]: Molecular weight of TFPI = 43 kDa

2.6.5.4.F　カニクイザルを用いた 52 週間皮下投与試験（213542 及び [redacted]141003）

Test article: concizumab

Study ID 213542 and [redacted]141003

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.3.2-4 (213542) and 4.2.3.7.7-8 ([redacted]141003)

Duration of dosing: 52 weeks

Species/strain	Monkey/cynomolgus (*Macaca fascicularis*)	**Sex/number of animals**	Male and female/9-13M and 9-13F per group
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	s.c.
Vehicle	33 mM L-Histidine, 150 mM sucrose, 0.01 mg/mL Tween 80, 25 mM arginine HCl, 25 mM sodium chloride, pH 6.0	**Dose**	0.5, 1 and 9 mg/kg/day
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA

Study ID 213542

		Route	**s.c.**										
		Dose (mg/kg/day)	**0.5**				**1**				**9**			
		Week	**1**	**13**	**26**	**52**	**1**	**13**	**26**	**52**	**1**	**13**	**26**	**52**
Male	t_{max}	**h**	6	0-6	2-24	0[b]	6-24	0-6	0-24	2-6	24	0-24	0-24	0-24
	C_{max}	**ng/mL**	207	94,500	83,100	89,900[b]	2,290	257,000	280,000	303,000	78,500	3,280,000	4,120,000	5,550,000
	AUC_{0-24h}	**h*ng/mL**	5,400	2,040,000	1,900,000	2,160,000[c]	40,000	5,590,000	6,040,000	6,790,000	1,140,000	71,900,000	82,500,000	101,000,000
	Rac_{Obs}			-	323	-		119	128	278		73	67	84
Female	t_{max}	**h**	6	-	-	24	2-24	0-24	0-24	2-6	6-24	0-24	0-24	0-24
	C_{max}	**ng/mL**	139	-	-	75,300	2,000	231,000	252,000	314,000	79,400	2,980,000	3,790,000	4,590,000
	AUC_{0-24h}	**h*ng/mL**	416[a]	-	-	1,660,000	32,100	4,980,000	5,290,000	6,990,000	1,140,000	63,800,000	74,300,000	97,500,000
	Rac_{Obs}			-	-	-		204	217	186		65	91	92

Note: For t_{max} the minimum and maximum values are shown. For C_{max}, AUC and Rac_{Obs} the mean values are shown. No exposure data available in female animals receiving 0.5 mg/kg/day in Weeks 13 and 26 due to anti-drug antibody (ADA) development (M 2.6.7.7.D, 213542). "-" means no data available due to plasma concentrations below LLOQ or missing samples [a]AUC_{0-6h}. [b]The only result available was the pre-dose sample from one animal (2007M), so this value has been listed as C_{max}. [c]The AUC was based on the concentration in the pre-dose sample, i.e. calculated as 89,900 ng/mL * 24 h = 2,160,000 h*ng/mL.

TFPI functionality (U/mL) in pre-dose samples on Day 1 and in Weeks 6, 9, 13, 17, 21 and 26 (mean ± SD). Overall mean values (all animals), and mean values for ADA-negative and ADA-positive animals are included.

	0 mg/kg/day		0.5 mg/kg/day		1 mg/kg/day		9 mg/kg/day[a]	
Sex/number of animals	**M/9**	**F/9**	**M/9**	**F/9[b]**	**M/9**	**F/9**	**M/13**	**F/13**
Pre-treatment	0.57 ± 0.13	0.50 ± 0.06	0.52 ± 0.12	0.50 ± 0.07	0.54 ± 0.04	0.56 ± 0.06	0.53 ± 0.12	0.47 ± 0.07
Day 1 (pre-dose)	0.67 ± 0.19	0.52 ± 0.08	0.53 ± 0.14	0.59 ± 0.05	0.56 ± 0.09	0.60 ± 0.05	0.51 ± 0.11	0.55 ± 0.07
Week 6 (pre-dose)								
- All	0.64 ± 0.13	0.57 ± 0.09	0.38 ± 0.09	0.55 ± 0.16	0.46 ± 0.11	0.39 ± 0.06	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.05
- ADA-negative[c]			0.32 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.41 ± 0.08	0.40 ± 0.07	- -	- -
- ADA-positive			0.40 ± 0.10	0.59 ± 0.14	0.55 ± 0.13	0.35	- -	- -
Week 13 (pre-dose)								
- All	0.66 ± 0.17	0.55 ± 0.09	0.43 ± 0.11	0.56 ± 0.12	0.48 ± 0.11	0.40 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.36 ± 0.05
- ADA-negative[c]			0.31 ± 0.02	- -	0.42 ± 0.07	0.40 ± 0.06	- -	- -
- ADA-positive			0.46 ± 0.11	0.56 ± 0.12	0.58 ± 0.09	0.41 ± 0.05	- -	- -
Week 21 (pre-dose)								
- All	0.65 ± 0.07	0.62 ± 0.06	0.47 ± 0.10	0.53 ± 0.15	0.43 ± 0.11	0.44 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.46 ± 0.10
- ADA-negative[c]			0.37	- -	0.39 ± 0.04	0.43 ± 0.07	- -	- -
- ADA-positive			0.48 ± 0.10	0.53 ± 0.15	0.52 ± 0.16	0.47 ± 0.01	- -	- -
Week 26 (pre-dose)								
- All	0.64 ± 0.07	0.62 ± 0.02	0.46 ± 0.10	0.52 ± 0.14	0.42 ± 0.10	0.46 ± 0.08	0.39 ± 0.06	0.45 ± 0.08
- ADA-negative[c]			0.36	- -	0.38 ± 0.03	0.44 ± 0.07	- -	- -
- ADA-positive			0.48 ± 0.10	0.52 ± 0.14	0.50 ± 0.16	0.52 ± 0.06	- -	- -
Week 52 (pre-dose)								
- All	0.69 ± 0.18	0.57 ± 0.03	0.43 ± 0.09	0.62 ± 0.18	0.45 ± 0.11	0.45 ± 0.04	0.40 ± 0.05	0.37 ± 0.06
- ADA-negative[c]			0.37	0.44[d]	0.40 ± 0.03	0.46 ± 0.05	- -	- -
- ADA-positive			0.45 ± 0.10	0.67 ± 0.17	0.62	0.43	- -	- -

Note: "-" in ADA-negative rows: all samples below LLOQ, or no ADA-negative animals in group; "-" in ADA-positive rows: no ADA-positive animals. If SD is not shown, n = 1 sample above LLOQ.

[a]All animals ADA-inconclusive. [b]All animals ADA-positive from Week 13 through Week 26. [c]Due to drug interference, antibodies may be present in the 1 and 9 mg/kg/day group animals but not detectable. [d]Animal 2506 included as ADA-negative due to a very low titre (OD 0.053 with OD cut point 0.044 [Study 213542 (M 4.2.3.2-4), page 1171 (Table 19)]).

Free TFPI concentration (ng/mL) in pre-dose samples on Day 1 and in Weeks 6, 13, 26, 39 and 52 (mean ± SD). Overall mean values (all animals), and mean values for ADA-negative and ADA-positive animals are included.

	0 mg/kg/day				0.5 mg/kg/day				1 mg/kg/day				9 mg/kg/day[a]			
Sex/number of animals	**M/9**		**F/9**		**M/9**		**F/9[b]**		**M/9**		**F/9**		**M/13**		**F/13**	
Day 1 (pre-dose)	39.6	±8.94	33.8	±6.72	31.4	±6.51	38.4	±5.30	39.9	±4.66	38.6	±4.49	33.8	±8.42	34.5	±4.67
Week 6 (pre-dose)																
- ADA-negative[c]	38.1	±8.10	33.3	±5.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- ADA-positive	-	-	-	-	20.9	±7.20	40.0	±13.8	56.2		-	-	-	-	-	-
Week 13 (pre-dose)																
- ADA-negative[c]	37.8	±10.2	29.9	±5.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- ADA-positive	-	-	-	-	31.0	±6.63	33.1	±9.34	47.2	±7.42	-	-	-	-	-	-
Week 26 (pre-dose)																
- ADA-negative[c]	41.5	±7.84	35.8	±7.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- ADA-positive	-	-	-	-	36.1	±3.44	29.8	±15.0	32.3	±16.6	15.9		-	-	-	-
Week 39 (pre-dose)																
- ADA-negative[c]	42.2	±14.6	28.2	±3.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- ADA-positive	-	-	-	-	28.8	±5.32	26.7	±14.8	32.0		13.5		-	-	-	-
Week 52 (pre-dose)																
- ADA-negative[c]	39.7	±11.4	27.8	±7.56	-	-	-[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- ADA-positive	-	-	-	-	26.5	±6.39	31.8	±14.0	29.8		-	-	-	-	-	-

Note: "-" in ADA-negative rows: all samples below LLOQ, or no ADA-negative animals in group; "-" in ADA-positive rows: no ADA-positive animals. If SD is not shown, n = 1 sample above LLOQ.

[a]All animals ADA-inconclusive. [b]All animals ADA-positive from Week 13 through Week 26. [c]Due to drug interference antibodies may be present in the 1 and 9 mg/kg/day group animals but not detectable. [d]Animal 2506 included as ADA-negative due to a very low titre (OD 0.053 with OD cut point 0.044 [Study 213542 (M 4.2.3.2-4), page 1171 (Table 19)]).

Study ID [redacted]141003

Total TFPI concentration (pmol/L) in pre-dose samples on Day 1 and in Weeks 6, 13, 26, 39 and 52 (mean ± SD). Overall mean values (all animals), and mean values for ADA-negative and ADA-positive animals are included.

	0 mg/kg/day		0.5 mg/kg/day		1 mg/kg/day		9 mg/kg/day[a]	
Sex/number of animals	**M/9**	**F/9**	**M/9**	**F/9[b]**	**M/9**	**F/9**	**M/13**	**F/13**
Day 1 (pre-dose)	860 ± 204	806 ± 169	737 ± 173	750 ± 83	884 ± 118	936 ± 92	743 ± 201	916 ± 126
Week 6 (pre-dose)								
- All animals	749 ± 177	726 ± 133	3,469 ± 4,531	1,767 ± 2330	9,598 ± 5,431	10,768 ± 5,019	21,207 ± 4,162	19,576 ± 3,098
- ADA-negative animals[f]			11,329 ± 899	3,880 ± 3411	12,629 ± 2,425	11,806 ± 4,208	-	-
- ADA-positive animals			1,223 ± 874	711 ± 101	3,536 ± 4,541	2,463	-	-
Week 13 (pre-dose)								
- All animals	706 ± 177	600 ± 131	5,167 ± 6,869	677 ± 126	11,544 ± 8,905	9,989 ± 4,147	19,041 ± 3,356	17,406 ± 2,460
- ADA-negative animals[f]			15,878 ± 782	-	17,765 ± 3,116	11,327 ± 1,832	-	-
- ADA-positive animals			1,597 ± 2,181	677 ± 126	1,177 ± 415	624 ± 1,597	-	-
Week 26 (pre-dose)								
- All animals	491 ± 175	475 ± 138	4,143 ± 6,563	768 ± 460	11,841 ± 7,179	10,948 ± 6,168	21,172 ± 2,463	19,355 ± 1,631
- ADA-negative animals[f]			17,289	-	15,338 ± 3,635	13,854 ± 2,529	-	-
- ADA-positive animals			2,266 ± 4,164	768 ± 460	1,352 ± 1,124	780 ± 296	-	-
Week 52 (pre-dose)								
- All animals	-	-	414 ± 110	1,703 ± 2241	11,151 ± 9,379	923	17,684 ± 3,636	16,463 ± 4,427
- ADA-negative animals[f]			-[d]	5,628	16,524 ± 1,652	-[e]	-	-
- ADA-positive animals			414 ± 110	721 ± 527	404	923	-	-

Note: "-" in All animals row: no result; "-" in ADA-negative rows: all samples below LLOQ, or no ADA-negative animals in group; "-" in ADA-positive rows: no ADA-positive animals. If SD is not shown, n = 1 sample above LLOQ.

[a]All animals ADA-negative. [b]All animals ADA-positive Weeks 13, 26 and 39. [c]All animals were ADA-positive. [d]No result available for the ADA-negative animal (2007M). [e]No results available for all ADA-negative animals. [f]Due to drug interference antibodies may be present in the 1 and 9 mg/kg/day group animals but not detectable.

2.6.5.5 組織分布

Test article: concizumab

No dedicated distribution studies have been performed with concizumab at this stage of development. The distribution of concizumab has been evaluated by immunohistochemistry in rabbits (M 2.6.4.4) and tissue cross reactivity studies (M 2.6.6.8.1) as well as immunohistochemistry (M 2.6.6.8.3) in cynomolgus monkeys.

2.6.5.6 血漿タンパク結合

Test article: concizumab

No studies performed.

2.6.5.7 妊娠又は授乳動物を用いた試験

Test article: concizumab

No studies performed.

2.6.5.8 その他の分布試験

Test article: concizumab

No studies performed.

2.6.5.9 *In vivo* 代謝

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.4.5.

2.6.5.10 *In vitro* 代謝

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.4.5.

2.6.5.11 推定代謝経路

Test article: concizumab

No studies performed.

2.6.5.12 薬物代謝酵素誘導／阻害

Test article: concizumab

No studies performed.

2.6.5.13 排泄

No studies performed.

Test article: concizumab

2.6.5.14 胆汁中排泄

No studies performed.

Test article: concizumab

2.6.5.15　薬物相互作用

Test article: concizumab

2.6.5.15.A　カニクイザルを用いた rFVIIa との併用による 4 週間薬物相互作用試験（215431）

Test article: concizumab and rFVIIa

Study ID 215431

Date of first dose: [redacted]

Location in CTD: 4.2.3.7.7-3

Duration of dosing: 4 weeks

Species/strain	Monkey/cynomolgus (*Macaca fascicularis*)	**Sex/number of animals**	Male and female/3M and 3F per group
Feeding condition	Fed	**Method of administration**	Concizumab: s.c.; rFVIIa: i.v.
Vehicle	Concizumab: 33 mM L-Histidine, 150 mM sucrose, 0.01 mg/ml Tween 80, 25 mM arginine HCl, 25 mM sodium chloride, pH 6.0 rFVIIa: Histidine 10 mM, pH 6.1	**Dose**	Concizumab: Days 1-4: 9 mg/kg/day Days 5-28: 1 mg/kg/day rFVIIa: Day 28: 0.25, 0.5 or 1 mg/kg. Three doses at 2-hour intervals
Matrix	Plasma	**Analyte/assay**	concizumab/ELISA. rFVIIa/clot assay

Study ID 215431

Concizumab

				Route	**Subcutaneous**					
				Group	**2**		**3**		**4**	
Day	**Dose (mg/kg)**	**Sex**	**Parameter[a]**	**Unit**	**Mean**	**Geometric mean**	**Mean**	**Geometric mean**	**Mean**	**Geometric mean**
1	9	Male	C_{max}	ng/mL	49,600	49,400	59,600	54,900	50,700	50,700
			AUC_{0-24h}	h*ng/mL	823,000	808,000	931,000	868,000	786,000	785,000
			t_{max}	h		24		24		24
1	9	Female	C_{max}	ng/mL	48,100	45,700	56,200	55,900	41,300	40,100
			AUC_{0-24h}	h*ng/mL	740,000	701,000	820,000	817,000	739,000	691,000
			t_{max}	h		24		24		24

			Route		Subcutaneous					
			Group		2		3		4	
Day	Dose (mg/kg)	Sex	Parameter[a]	Unit	Mean	Geometric mean	Mean	Geometric mean	Mean	Geometric mean
27	1	Male	C_{max}	ng/mL	206,000	200,000	244,000	243,000	237,000	237,000
			AUC_{0-24h}	h*ng/mL	4,670,000	4,520,000	4,590,000	4,560,000	5,350,000	5,350,000
			t_{max}	h	4-24		4-6		6	
27	1	Female	C_{max}	ng/mL	222,000	219,000	169,000	165,000	197,000	196,000
			AUC_{0-24h}	h*ng/mL	4,840,000	4,790,000	3,720,000	3,640,000	4,380,000	4,360,000
			t_{max}	h	1-24		0-24		2-6	

[a]Minimum-maximum for t_{max}

Study ID 215431

rFVIIa (post 3rd dose)

		Route	Intravenous							
		Dose (mg/kg)	0.25		0.50		1.0			
		Group	2		3		1		4	
Sex	Parameter[a]	Unit	Mean	Geometric Mean	Mean	Geometric Mean	Mean	Geometric Mean	Mean	Geometric Mean
Male	C_0	IU/mL	209	207	374	372	790	789	875	871
	C_{max}	IU/mL	190	189	321	318	632	626	743	739
	AUC	h*IU/mL	442	439	622	619	1,340	1,340	1,430	1,420
	t_{max}	h	0.17		0.17		0.17-0.5		0.17	
Female	C_0	IU/mL	194	193	386	381	693	688	833	826
	C_{max}	IU/mL	162	161	349	346	634	632	692	689
	AUC	h*IU/mL	275	275	735	733	1,390	1,390	1,410	1,410
	t_{max}	h	0.17		0.17		0.17		0.17	

[a]Minimum-maximum for t_{max}; AUC is $AUC_{0-\infty}$

Study ID 215431

Mean TFPI functionality (U/mL) in on Days 1, 6, 14, 21 and 27

		Group	1	2	3	4
		Dose[a] (mg/kg/day)	0	9/1	9/1	9/1
Day	Sex	Time (h)	TFPI functionality (U/ml)			
1	Male	0	0.73	0.79	0.59	0.69
		24	0.70	0.40	0.40	0.40
1	Female	0	0.59	0.63	0.72	0.85
		24	0.61	0.40	0.42	0.40
6	Male	24	0.72	0.45	0.40	0.40
6	Female	24	0.60	0.49	0.44	0.42
14	Male	24	0.75	0.44	0.40	0.40
14	Female	24	0.61	0.44	0.43	0.43
21	Male	24	0.71	0.44	0.40	0.40
21	Female	24	0.57	0.43	0.44	0.43
27	Male	0	0.67	0.45	0.40	0.40
		24	0.68	0.45	0.40	0.40
27	Female	0	0.60	0.44	0.42	0.44
		24	0.56	0.45	0.41	0.41

[a]Dose of concizumab: Groups 2, 3 and 4 received 9 mg/kg/day on Days 1-4, and 1 mg/kg/day on Days 5-27.

Free TFPI concentration (ng/mL) in pre-dose samples on Day 1, 26 and 29 (mean and SD)

		Group							
		1		2		3		4	
Study Day	**Sex**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Day 1	M	49.7	9.13	61.8	9.46	49.6	5.40	52.5	5.40
	F	44.5	5.78	42.2	7.17	47.2	4.78	48.8	3.70
Day 26	M	45.6	6.68	-	-	14.7		-	-
	F	44.7	5.17	-	-	-	-	-	-
Day 29	M	32.0	2.58	-	-	26.8		-	-
	F	32.7	7.75	-	-	-	-	-	-

Note: "-" all samples below the LLOQ. If SD is empty, n = 1 sample above LLOQ.

2.6.5.16　その他の薬物動態試験

No studies performed.