コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
表目次 3
略語一覧 5
2.6.6.1 まとめ 8
2.6.6.2 単回投与毒性 12
2.6.6.2.1 カニクイザルを用いた単回投与毒性試験（毒性評価項目を含む）－試験番号 [redacted]081101 12
2.6.6.2.2 カニクイザルを用いた、2 回繰返した単回投与 PK/PD 試験（毒性評価項目を含む）－試験番号 210156 12
2.6.6.2.3 カニクイザルを用いた用量漸増単回投与毒性試験－試験番号 208250 13
2.6.6.3 反復投与毒性 14
2.6.6.3.1 カニクイザルを用いた 4 週間静脈内投与及び皮下投与試験－試験番号 210130 14
2.6.6.3.2 カニクイザルを用いた 13 週間静脈内・皮下投与毒性試験及び 11 週間回復性試験－試験番号：209206 15
2.6.6.3.3 カニクイザルを用いた 26 週間静脈内・皮下投与慢性毒性試験及び 13 週間回復性試験－試験番号：211087 18
2.6.6.3.4 カニクイザルを用いた 52 週間皮下投与毒性試験－試験番号：213542 21
2.6.6.4 遺伝毒性試験 24
2.6.6.5 がん原性試験 24
2.6.6.6 生殖発生毒性 26
2.6.6.6.1 幼若動物を用いた試験 26
2.6.6.7 局所刺激性試験 26
2.6.6.8 その他の毒性試験 27
2.6.6.8.1 組織交差反応性（TCR） 27
2.6.6.8.2 コンシズマブのモノマー及びマルチマーの特性評価 28
2.6.6.8.3 免疫複合体が介在する病態解明のための作用機序検討試験 29
2.6.6.8.3.1 動物を用いた毒性試験における IC 沈着 29
2.6.6.8.3.2 カニクイザルの脈絡叢におけるコンシズマブと TFPI の生体内分布 32
2.6.6.8.3.3 IC が関連する病理変化の仮説を支持する証拠の重み付けアプローチ 32
2.6.6.8.3.3.1 SEC 後に実施された ADA-ELISA 32
2.6.6.8.3.3.2 循環性免疫複合体（CIC） 32
2.6.6.8.3.3.3 免疫組織化学的検査－組織沈着免疫複合体 33
2.6.6.8.3.3.4 26 週間反復投与毒性試験 33
2.6.6.8.3.3.5 52 週間反復投与毒性試験 33
2.6.6.8.3.3.6 結論－IC が介在する血管変化に関する証拠の重み付け 34
2.6.6.8.4 カニクイザルを用いた薬物相互作用毒性試験 35

2.6.6.8.5　組織因子の発現が増加した状態における理論的影響 37
2.6.6.8.6　コンシズマブの臨床用製剤に含まれる添加剤の評価 38
2.6.6.8.7　不純物の安全性評価 39
2.6.6.8.8　溶出物の安全性評価 44
2.6.6.8.9　臨床曝露量と比較した慢性投与毒性試験の曝露量 44
2.6.6.9　考察及び結論 46
参考文献 49

表目次

ページ

表 2.6.6-1　コンシズマブの毒性試験プログラム（カニクイザルを用いた *in vivo* 試験） 9
表 2.6.6-2　カニクイザルを用いた DRF 試験における用量及び 1 群当たりの動物数（試験番号：208250） 13
表 2.6.6-3　カニクイザルを用いた重要な反復投与毒性試験の概要 14
表 2.6.6-4　カニクイザルを用いた 4 週間毒性試験（試験番号：210130）における投与量及び 1 群当たりの動物数 14
表 2.6.6-5　カニクイザルを用いた 13 週間毒性試験（試験番号：209206）における投与量及び 1 群当たりの動物数 16
表 2.6.6-6　カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験（試験番号：211087）における投与量及び 1 群当たりの動物数 18
表 2.6.6-7　13 及び 26 週間の中間試験群を組み入れた、カニクイザルを用いた 52 週間慢性毒性試験（試験番号：213542）における投与量及び 1 群当たりの動物数 21
表 2.6.6-8　13、26 及び 52 週間毒性試験において IC が関連する所見の概要（試験番号：209206、211087 及び 213542） 31
表 2.6.6-9　26 週間毒性試験において、血管変化が認められた動物の組織学的検査所見と血漿／血清及び組織の特殊検査との相関性（試験番号：211087） 34
表 2.6.6-10　52 週間毒性試験において、血管変化が認められた動物の組織学的検査所見と血漿／血清及び組織の特殊検査との相関性（試験番号：213542） 35
表 2.6.6-11　カニクイザルを用いた rFVIIa との 4 週間薬物相互作用毒性試験における投与量及び 1 群当たりの動物数（試験番号：215431） 36
表 2.6.6-12　溶媒又はコンシズマブを 28 日間投与後の第 28 日に rFVIIa の 1 mg/kg を 2 時間間隔で 3 回投与し、第 29 日の終了試験時における血漿中 D-ダイマー及び TAT の変化（平均値±SD） 37
表 2.6.6-13　製剤組成開発の概要 38
表 2.6.6-14　非臨床試験バッチの概要 41
表 2.6.6-15　原薬の評価基準におけるコンシズマブ原薬由来不純物の適格性 42
表 2.6.6-16　提案する使用時規格におけるコンシズマブ製剤由来不純物の適格性 43
表 2.6.6-17　52 週間毒性試験と第 3 相臨床試験（4311 試験）における曝露量 44

表 2.6.6-18　動物における慢性毒性試験の NOAEL とヒトの平均曝露量に基づく動物－ヒトの曝露量比.....45

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）

2.6.6.1　まとめ

コンシズマブは、血友病 A 及び血友病 B（インヒビターの有無を問わない）の治療を目的とした、組織因子経路インヒビター（TFPI）を標的とする免疫グロブリン G4（IgG4）アイソタイプの遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（mAb）である。TFPI は血液凝固カスケードの初期相におけるダウンレギュレーションに関与する。コンシズマブは TFPI の Kunitz ドメイン 2（K2）に特異的に結合し、活性化血液凝固第 X 因子（FXa）の活性部位に TFPI が結合するのを抑制する。TFPI による阻害活性が低下すると、活性型血液凝固第 VII 因子（FVIIa）／組織因子（TF）複合体によって生成された FXa により、止血に十分な量のトロンビンが生成される。

コンシズマブの毒性試験プログラムは、ヒトに対する長期投与を支持するため医薬品規制国際調和会議（ICH） M3（R2）[1]及び ICH S6（R1）[2]ガイドラインに従って策定された。すべての重要な毒性試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施された（表 2.6.6-1）。

ウサギ及びカニクイザルがコンシズマブに薬理反応を示す動物種として特定されたが、マウス、ラット、イヌ又はブタの TFPI に対するコンシズマブの交差反応性は認められなかった。カニクイザルとヒトにおける TFPI 結合エピトープ部位アミノ酸が同一であり、カニクイザルとヒトの TFPI に対するコンシズマブの結合並びにカニクイザル及びヒトの全血中の内因性 TFPI に対する *in vitro* での中和作用が同等であることに基づき、カニクイザルは非臨床安全試験プログラムにおいて最適な動物種であることが確認された。組織交差反応性（TCR）試験において、コンシズマブは検査したヒト及びカニクイザルの組織において同様の一般的な結合パターンを示した。

コンシズマブの皮下又は静脈内投与による毒性学的及び安全性薬理学的プロファイルは、正常な血液凝固系を有する（非血友病）幼若（2～3 歳）及び性成熟（3.5～6 歳）した雌雄カニクイザルを用いた、単回投与毒性試験及び最長 52 週間の反復投与毒性試験で評価された（表 2.6.6-1）。カニクイザルを用いた非臨床毒性試験から、13 週間、26 週間及び 52 週間の投与期間において 2 つの明らかな毒性所見として血栓及び限局性の血管変化が認められた。

血栓は主に肺、心臓、その他のいくつかの器官で認められ、正常な血液凝固系を有するサルに血液凝固促進物質を投与した際の過剰な薬理反応と考えられた。血栓に関する無毒性量（NOAEL）は 52 週間皮下投与の 0.5 mg/kg/日であり、この用量はインヒビターを有する血友病 A 及び血友病 B 患者を組み入れた第 3 相臨床試験（4311 試験）から得られたヒト曝露量と比較して 70 倍超の曝露量比に相当する。

限局性の血管変化は、内皮細胞肥大、内皮下組織の肥厚又は炎症性細胞浸潤であり、主として脳の脈絡叢、肺及び注射部位で認められた。作用機序を詳細に検討した結果から、これらの所見は抗薬物抗体（ADA）の発生により生じる免疫複合体（IC）形成により引き起こされたものであると結論され、他のバイオ医薬品でも報告されている[3,4,5,6,7]。したがって、ADA に関連した IC の生成が動物の生理的な IC クリアランス容量を超えて形成されると、組織に IC が沈着し二次的に組織傷害が誘発される。13 週間及び 26 週間毒性試験はそれぞれ 11 週間及び 13 週間の回復期間が含まれていた。回復期間終了後に血管変化は認められず、予想された IC クリアランスと一致するものであった[7]。動物試験

は、一般的にヒト治療用タンパク質製剤に対する免疫反応の予測性が乏しいことが認識されている[2,6,8]。さらに、ヒトにはコンシズマブのようなヒト化 mAb に対する免疫反応は低いことが予想され、また、毒性試験の動物と比較してより低い濃度で曝露されることから、ヒトではクリアランス容量を超える IC 形成のリスクは低いと考えられる。

表 2.6.6-1　　コンシズマブの毒性試験プログラム（カニクイザルを用いた *in vivo* 試験）

Study type and duration	**Route of administration**	**Dose (mg/kg)[a]**	**Study ID (GLP status)**
Single-dose toxicology			
Single-dose PK study (with toxicity endpoints)	i.v.	2, 20	[redacted]081101 (non-GLP)
Repeat single-dose PK/PD study (with toxicity endpoints)	i.v. (2 administrations at 14-day intervals)	0, 0.1, 0.5, 1	210156 (GLP)
Repeat single-dose toxicity study (escalating doses) (Dose Range Finding)	s.c. (at 14-day intervals)	2 / 20 / 80 20 / 80 / 160 80 / 160 / 200	208250 (non-GLP)
Repeat-dose toxicology			
4-week study[b]	i.v. (weekly) s.c. (daily)	0, 30 3, 9	210130 (GLP)
13-week study with an 11-week recovery period[b]	i.v. (weekly) s.c. (daily)	200 0, 1, 10, 50	209206 (GLP)
26-week study with a 13-week recovery period[c, d]	i.v. (weekly) s.c. (daily)	30 0, 3, 9	211087 (GLP)
52-week study with 13- and 26-week interim groups[c]	s.c. (daily)	0, 0.5, 1, 9	213542 (GLP)
Genotoxicity	No studies performed - justification provided in Section 2.6.6.4		
Carcinogenicity	No studies performed - justification provided in Section 2.6.6.5		
Reproductive toxicity	No studies performed - justification provided in Section 2.6.6.6		
Local tolerance	Assessed as part of the repeat-dose toxicity studies and a drug-drug interaction study		
Other toxicity studies			
Tissue cross-reactivity	N/A	N/A	209125 (non-GLP), 209280 (GLP)
Characterisation of [redacted] and [redacted] forms of concizumab	N/A	N/A	215027, [redacted]130901, 215094, 214488, [redacted]131001, [redacted]130901 (all non-GLP)

Study type and duration	Route of administration	Dose (mg/kg)[a]	Study ID (GLP status)
Mechanistic studies to investigate immune complex-mediated pathology	N/A	N/A	[redacted]130402, 214449, 214471, 214391, 214400 (all non-GLP)
Drug-drug interaction toxicity study with rFVIIa - 4-week study	s.c. (daily) rFVIIa i.v. (3 doses at 2-hour intervals)	Group 1: 0 (Days 1-28) Groups 2, 3 and 4: 9 (Days 1-4) + 1 (Days 5-28) Groups 1 and 4: 1 (Day 28) Group 2: 0.25 (Day 28) Group 3: 0.5 (Day 28)	215431 (GLP)
Biomarker evaluations for toxicity studies	N/A	N/A	210142, 212058, 212391, 213391, 213528, [redacted]141003 (all non-GLP)

[a]The highest NOAEL is underlined. [b]Juvenile animals. [c]Sexually mature animals. [d]NOAEL not established due to thrombotic changes at all dose levels.

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; N/A = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s); rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII.

毒性試験を通して 3 頭の動物が試験途中で安楽死処置された。26 週間毒性試験では、9 mg/kg/日を 18 週間皮下投与された 1 頭のサルが死亡し、この動物では貧血に加え広範な肺実質壊死の原因となる血栓が認められたことから、おそらく投与に関連した変化と考えられた。その他の 2 頭の死因は、それぞれ同居動物との闘争後の胃腸管障害又は傷害によるものであったことから、投与との関連性はないと考えられた。

投与群の全動物でコンシズマブの曝露が確認された。予想された通り、コンシズマブの投与により遊離 TFPI 濃度が減少し、遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI を含む総 TFPI 濃度は増加した。コンシズマブに対する抗薬物抗体（ADA）の形成が数頭の動物で確認され、一部のケースではコンシズマブの曝露と血液凝固マーカーに関する薬理作用に影響を及ぼしたことが確認された。

局所刺激性は反復投与毒性試験に組み入れて評価された。毒性試験を通して皮下投与後に軽度の炎症反応が認められたが、ヒトにおける投与は許容可能と考えられた。

非臨床毒性試験を通して、投与に関連したフィブリノゲンの減少及び血液凝固マーカー〔トロンビンーアンチトロンビン（TAT）及び D-ダイマー〕の増加が認められ、このことはコンシズマブで予想される薬理作用である血液凝固促進作用と一致するものであった。血栓形成過程でフィブリノゲンはフィブリンへと変換され、主にフィブリン架橋によりフィブリン塊を形成する。TAT は凝固活性マーカーであり、トロンビンがアンチトロンビン（AT）で不活性化される際に生成される[9]。D-ダイマーは血栓中のフィブリン架橋が溶解されると形成され[10]、D-ダイマーの増加は血液凝固系が活性化状態にありかつフィブリン塊が溶解状態にあることを示す。毒性試験の第 1 日の投与後には、すでに D-ダイマー及び TAT の増加が認められ、1 週間後にはプラトーに達する傾向がみられたが、52 週間までの投与

期間中の変動はわずかであった。フィブリノゲン濃度は反復投与後に減少し、投与 1 週間後には低レベルで定常状態に達し、52 週間の投与期間を通してこの値からの変動はわずかであった。

血小板に関わるパラメータ及び血液凝固時間に関わるパラメータ〔活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）及びプロトロンビン時間（PT）〕に関して、26 週間及び 52 週間毒性試験で高用量を投与された動物（≥3 mg/kg/日；ヒト曝露量の 630 倍超）では、APTT 及び PT の軽微な延長又は血小板数が減少した以外に毒性は認められなかった。

コンシズマブは天然の内因性アミノ酸で構成されることから遺伝毒性を生じるとは予測されないこと、またコンシズマブの変異原性を示唆する作用機序データもないことから、コンシズマブの遺伝毒性試験は実施されていない。

コンシズマブはげっ歯類に作用しないことからがん原性試験は実施しなかった。その代わりとして、コンシズマブのがん原性評価について、作用機序の考察、関連する文献検討、非臨床試験及び臨床試験データの評価による証拠の重みづけアプローチを適用して検討した。他の血液凝固促進物からも予想されるように、コンシズマブの投与により、潜在的にある種のがん患者においてプロトロンビン形成状態を増強する可能性が考えられる。しかしながら、実施した評価において、コンシズマブの投与がヒトに腫瘍形成を誘発又は増強するリスクを高めるとの証拠は特定されなかった。

正常な血液凝固系を有する動物を用いてコンシズマブの初期胚発生、胚・胎児発生又は出生前及び出生後の発達に関する試験を実施する意義はないと考えられたことから、これらの試験は実施されなかった。性成熟した雌雄カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験において、受胎能評価項目に関する特別な評価が組み入れられた。これらの評価からは、コンシズマブの受胎能に及ぼす影響は認められなかった。さらに、幼若及び性成熟した雌雄カニクイザルを用いた最長 52 週間までの毒性試験において、生殖器官の病理組織学的検査を実施したが、生殖器官に毒性は認められなかった。

止血のための追加治療を必要とする患者にコンシズマブが投与される状況を模倣するため、4 週間薬物相互作用毒性試験が行われた。本試験では、コンシズマブをカニクイザルに 1 日 1 回 28 日間投与し、第 28 日の投与後から 2 時間間隔で 3 回、rFVIIa を 0.25、0.5 又は 1 mg/kg の用量で静脈内投与した。動物は第 29 日目に安楽死処置した。血栓又はその他の過剰な凝固に関連した一般状態変化も含め、投与に関連した毒性は認められなかった。

結論として、毒性試験プログラムからコンシズマブの安全性プロファイルは適切に特性解析がなされており、非臨床データは提案する効能を裏付けるものと考えられる。

2.6.6.2 単回投与毒性

2.6.6.2.1　　カニクイザルを用いた単回投与毒性試験（毒性評価項目を含む）－試験番号 [redacted]081101

雄性カニクイザルを用いた単回静脈内投与薬力学的試験（M 2.6.7.5、試験番号：[redacted]081101）

雄性カニクイザルを用いた単回静脈内投与による薬力学的（PD）試験が 2 用量（2 及び 20 mg/kg、1 頭／群）で実施され、厳選した安全性パラメータを組み入れた。一般状態観察、臨床検査、体重、血液学的検査並びに肉眼的及び顕微鏡的病理検査の評価項目には毒性学的意義のある所見はみられなかった。

曝露が全 2 頭の動物で確認された。コンシズマブの血液凝固に関する薬理作用に関連する所見として、20 mg/kg 投与で D-ダイマー濃度の増加並びに 2 及び 20 mg/kg 投与でフィブリノゲン濃度の減少が認められた。血小板数、PT、APTT 又は TAT に特筆すべき変化はなかった。

試験した最高投与量である 20 mg/kg まで単回静脈内投与したが、毒性は認められなかった。

2.6.6.2.2　　カニクイザルを用いた、2 回繰返した単回投与 PK/PD 試験（毒性評価項目を含む）－試験番号 210156

サルにおける 3 週間静脈内投与毒性試験（M 2.6.7.5、試験番号：210156）

カニクイザル（雌雄各 2 頭／群）に 0、0.1、0.5、1 mg/kg の用量で、2 週間間隔で 2 回静脈内投与され、第 33～36 日に安楽死処置された。薬物動態（PK）／PD 試験には毒性学的評価項目が含まれた。

以下の標準的な毒性学的パラメータ、すなわち一般状態観察、体重、摂餌量、血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマーを含む）、器官重量、肉眼的病理検査及びトキシコキネティクス（TK）（TFPI 機能活性検査を含む）が評価された。

全動物で曝露が確認された。検査したパラメータのいずれにも毒性学的に意味のある変化は認められなかった。コンシズマブ投与後に TFPI 機能活性が低下し、血漿中コンシズマブ濃度が減少するとベースライン値に戻った。コンシズマブの薬理作用である血液凝固に関連した所見として、3 用量を投与後 24 時間まで TAT 及び D-ダイマーが増加（投与前と比較してそれぞれ 5.4 倍及び 7.2 倍増加）し、最終投与後 168 時間で対照群の値に戻った。血液学的検査項目、PT、APTT 並びにフィブリノゲンに変化は認められなかった。

試験した最高用量である 1 mg/kg まで単回静脈内投与したが、毒性は認められなかった。

2.6.6.2.3　カニクイザルを用いた用量漸増単回投与毒性試験－試験番号 208250

サルを用いた 4 週間皮下投与による用量範囲設定（DRF）試験（安全性薬理を含む）並びに 6 週間皮下投与及び静脈内投与毒性試験（M 2.6.7.5、試験番号：208250）

DRF 試験は 3 群のカニクイザル（雌雄各 1 頭／群）で構成され、コンシズマブの漸増用量（2/20/80、20/80/160 及び 80/160/200 mg/kg）を 2 週間間隔で 4 週間以上にわたり単回皮下投与し、最終投与 3 日後に動物を安楽死処置した（表 2.6.6-2）。さらに、20 mg/kg の皮下及び静脈内投与（雄 3 頭／群）後、6 週間以上にわたりコンシズマブの TK プロファイルを検討した。

表 2.6.6-2　カニクイザルを用いた DRF 試験における用量及び 1 群当たりの動物数（試験番号：208250）

Group number	Dose level (mg/kg)[a]	Number of animals and sex
1	2/20/80	1M+1F
2	20/80/160	1M+1F
3	80/160/200	1M+1F

[a]Escalating s.c. doses with a two-week interval.
Abbreviations: F = female; M = male.

標準的な血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマーを含む）並びに肉眼的及び顕微鏡的病理検査に加え、この試験では心電図、血圧、免疫表現型検査（T-リンパ球数、単球数及び B-リンパ球の総数）、サイトカイン測定〔インターロイキン（IL）-2、IL-4、IL-6、腫瘍壊死因子（TNF）-α、インターフェロン（INF）-γ〕（M 2.6.3.4、試験番号：208250）、ADA 分析及び TK も含まれた。さらに、遊離 TFPI 濃度、総 TFPI 濃度及び TFPI 機能活性が測定され、別途報告された（M 2.6.7.17.E、試験番号：210142）。

全動物で曝露が確認された。コンシズマブ投与に関連すると考えられる、毒性学的意義を有する所見及び ADA の変化は認められなかった。

コンシズマブの血液凝固に関する薬理作用に関連する所見として、160 mg/kg 以上で TAT の増加（投与前値の 142 倍）、20 mg/kg 以上で D-ダイマーの増加（投与前値の 42 倍）がそれぞれ認められた。また、フィブリノゲン濃度が減少し、試験終了時には概して投与前値より低かったが明確な用量反応性はみられなかった。フィブリノゲンの変化は 2 mg/kg では認められなかった。さらに、コンシズマブ投与群では遊離 TFPI 濃度の減少及び TFPI 機能活性低下並びに総 TFPI 濃度（遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI を含む）の増加がみられた（試験番号：210142、詳細を M 2.6.4.3.1 に示す）。血小板数、PT 又は APTT に変化は認められなかった。

結論として、コンシズマブを最大 200 mg/kg まで単回投与したが、毒性は認められず、忍容性は良好であった。本試験の無毒性量（NOAEL）は、最高用量である 200 mg/kg（皮下投与）であった。

2.6.6.3 反復投与毒性

コンシズマブの反復投与毒性試験は幼若及び性成熟した雌雄カニクイザルを用いた 4 週間、13 週間、26 週間及び 52 週間試験で構成された（表 2.6.6-3）。これらの試験において、臨床開発プログラムを支持するために静脈内及び皮下投与の両投与経路が評価された。

表 2.6.6-3　　カニクイザルを用いた重要な反復投与毒性試験の概要

Species	Duration	Dose levels (mg/kg)[a]	NOAEL (mg/kg)	Finding(s) defining NOAEL	Study ID
Cynomolgus monkey	4 weeks	i.v.: 0, 30 s.c.: 3, 9	i.v.: 30 s.c.: 9	No treatment-related adverse findings	210130
Cynomolgus monkey	13 weeks (11 weeks of recovery)	i.v.: 200 s.c.: 0, 1, 10, 50	i.v.: None s.c.: 1	Thrombi	209206
Cynomolgus monkey	26 weeks (13 weeks of recovery)	i.v.: 30 s.c.: 0, 3, 9	i.v.: None s.c.: None	Thrombi	211087
Cynomolgus monkey	52 weeks (13- & 26-week interim groups)	s.c.: 0, 0.5, 1, 9	s.c.: 0.5	Thrombi	213542

.[a]Dosing frequency: i.v.: weekly dosing; s.c.: daily dosing.

2.6.6.3.1　　カニクイザルを用いた 4 週間静脈内投与及び皮下投与試験－試験番号 210130

サルにおける 4 週間皮下投与及び静脈内投与毒性試験（M 2.6.7.7.A、試験番号：210130）

コンシズマブの局所毒性及び全身毒性を検討するため、カニクイザル（雌雄各 3 頭／群）を用いた 4 週間反復投与毒性試験が実施された。本試験には 3 又は 9 mg/kg/日の皮下投与及び 0 又は 30 mg/kg/週の静脈内投与が組み入れられた（表 2.6.6-4）。

表 2.6.6-4　　カニクイザルを用いた 4 週間毒性試験（試験番号：210130）における投与量及び 1 群当たりの動物数

Group number	Dose level (mg/kg/dose)	Route of administration[a]	Number of animals and sex
1	0	i.v.	3M+3F
2	3	s.c.	3M+3F
3	9	s.c.	3M+3F
4	30	i.v.	3M+3F

[a]s.c. doses administered daily, i.v. doses administered weekly.
Abbreviations: F = female; M = male.

以下の標準的な毒性学的パラメータ、すなわち一般状態観察、体重、摂餌量、血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマーを含む）、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査が評価された。また、この試験では TK も組み入れられた。非 GLP 適用の探索的分析法を用いて内因性非凝固因子（AT 及びプロテイン C）の血漿中濃度が測定され、別途報告された（M 2.6.7.17.E、試験番号：212058）。

結果

4 週間のコンシズマブ投与に対する忍容性は良好であり、一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査、血液学的検査又は肉眼的及び顕微鏡的病理検査からは、毒性学的意義のある影響は認められなかった。

予想されるコンシズマブの血液凝固作用と一致して、フィブリノゲン濃度は投与第 8 日から全用量群で用量非段階的に減少した（対照群の最小 0.59 倍）。さらに、投与第 2 日以降に TAT 濃度及び D-ダイマー濃度の非段階的な増加（それぞれ対照群の最大 19 倍及び 14 倍）が認められ、投与第 8 日以降に最高濃度となった。血漿中 AT 濃度の軽微な減少（対照群の最小 0.85 倍）が認められたが、毒性学的意義のある変化ではないと考えられた。PT、APTT、プロテイン C 又は血小板を含め、血液学的検査パラメータに特筆すべき変化は認められなかった。概して曝露量には影響が認められなかったことから、本試験では ADA 分析は実施されなかった。しかしながら、高用量を静脈内投与された雄 1 頭で、最終投与後のコンシズマブ曝露量が低下した。この動物では、血漿中 TAT 及び D-ダイマーは対照群の値に戻っており、ADA の除去又は中和があったことと合致するものであった。

TK を検討した結果、コンシズマブを投与された全動物でコンシズマブの曝露が確認され、TK パラメータに性差は認められなかった。消失速度及び投与回数から予想された通り、コンシズマブは反復投与後に血漿中への蓄積が認められた。

結論

コンシズマブのカニクイザルに対する忍容性は良好であり、フィブリノゲン、TAT 及び D-ダイマーの変化がみられたが、これらはいずれもコンシズマブで予想される薬理作用に関連する変化と考えられた。

本試験において毒性学的意義のある所見は認められなかったことから、NOAEL は投与された最高用量である 9 mg/kg/日（皮下投与）及び 30 mg/kg/週（静脈内投与）と設定された。

2.6.6.3.2　カニクイザルを用いた 13 週間静脈内・皮下投与毒性試験及び 11 週間回復性試験－試験番号：209206

サルを用いた 13 週間皮下投与及び静脈内投与による毒性・安全性薬理試験及び 11 週間回復性試験（M 2.6.7.7.B、試験番号：209206）

コンシズマブの局所毒性及び全身毒性を明らかにするため、カニクイザル（主試験では雌雄各 3 頭／群、回復試験では雌雄各 2 頭／群）を用いた 13 週間反復投与毒性試験及び 11 週間回復性試験が実施された。本試験には 0、1、10、50 mg/kg/日の皮下投与又は 200 mg/kg/週の静脈内投与が組み入れられた（表 2.6.6-5）。

表 2.6.6-5　　カニクイザルを用いた 13 週間毒性試験（試験番号：209206）における投与量及び 1 群当たりの動物数

Group number	Dose level (mg/kg/dose)	Route of administration[a]	Number of animals in group and sex	
			Main study group	Recovery group
1	0	s.c.	3M+3F	2M+2F
2	1	s.c.	3M+3F	2M+2F
3	10	s.c.	3M+3F	2M+2F
4	50	s.c.	3M+3F	2M+2F
5	200	i.v.	3M+3F	2M+2F

[a]s.c. doses administered daily, i.v. doses administered weekly.
Abbreviations: F = female; M = male.

以下の標準的な毒性学的パラメータ、すなわち一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、安全性薬理評価項目（中枢神経系、心血管系及び呼吸器系）、血液生化学的検査、尿検査、血液学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマーを含む）、ADA、免疫表現型検査（T-リンパ球、単球及び B-リンパ球の総数）、サイトカイン測定（IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNF-α、INF-γ）、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査並びに TK が評価された。さらに、血漿中 TFPI 機能活性が評価された。一部の動物では、非 GLP 適用の探索的分析法を用いて血漿中内因性非凝固因子（AT 及びプロテイン C）濃度が測定され、別途報告された（M 2.6.7.17.E、試験番号：212058）。

結果

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、安全性薬理試験項目、血液生化学的検査、尿成分、血液学的検査、サイトカイン又は器官重量には、投与による影響は認められなかった。一過性かつ高頻度で認められた免疫表現型検査パラメータの中等度の変化は、背景データの範囲内であったこと、用量相関性はみられなかったことから、毒性学的意義のある変化とは考えられなかった。

対照群を含む複数の動物で軟便／液状便といった胃腸管由来の一般状態変化が認められ、一部の動物では脱水／体重減少も認められた。これらの動物には投与開始前から変化がみられていたことから、投与との関連性は認められなかった。これらの一般状態変化の原因は特定されなかった。

コンシズマブを投与された全用量群の全動物で、予想されるコンシズマブの血液凝固促進作用と一致する血液凝固マーカーの変化が認められた。これらの変化は、試験第 16 日の開始時におけるフィブリノゲン濃度の減少（対照群の最小 0.67 倍）、TAT の増加（対照群の最大 28 倍）及び D-ダイマーの増加（対照群の最大 10 倍）であったが、明らかな用量反応性はみられなかった。PT、APTT、AT、プロテイン C 又は血小板を含む血液学的検査項目には、毒性学的意義のある変化は認められなかった。フィブリノゲン、TAT 及び D-ダイマーに関して、低用量（1 mg/kg/日の皮下投与）では、11 週間回復試験終了時に対照群の値に戻ったが、中用量（10 mg/kg/日の皮下投与）及び高用量（50 mg/kg/日の皮下投与及び 200 mg/kg/週の静脈内投与）では、回復期間中も血液凝固マーカーに明らかな影響が認められた。このことは、これらの動物では回復期間中にコンシズマブに曝露されていたことと一致する結果であった。

血漿中 TFPI 機能活性は全投与群で抑制されたが、回復期間中の低用量群ではベースライン値に戻った。コンシズマブの曝露量が低下した ADA 陽性動物では、血漿中 TFPI 機能活性は回復した。

病理組織学的検査から、心臓（50 mg/kg/日の皮下投与群の 1 頭）及び肺（50 mg/kg/日の皮下投与群の 1 頭及び 200 mg/kg/週の静脈内投与群の 1 頭）に軽微な血栓が認められ、これらはコンシズマブの過剰な薬理作用に関連すると考えられた。さらに、肺では内膜増殖のような血管変化が 50 mg/kg/日の皮下投与群の 1 頭と 200 mg/kg/週の静脈内投与群の 2 頭でみられた。回復試験群では、50 mg/kg/日の皮下投与群の雌 1 頭の肺及び心臓に血栓が 2、3 箇所みられた。血栓と血管変化の発生部位に重複は認められなかった。

中用量（10 mg/kg/日）を皮下投与された 1 頭（12M）が、胃腸管症状及び体重減少を含む一般状態の悪化を示したことから第 35 日に安楽死処置された。この動物では投与開始前から体重減少がみられており、また、対照群を含む全群の動物でも類似の胃腸不良に侵されていたことから、投与には関連しない変化であると考えられた。この動物の病理組織学的検査から、肝臓における単発性の早期血栓が認められ、投与に関連した可能性が考えられた。

13 週間の主試験期間の終了時に、曝露量の低下が認められた低用量群（1 mg/kg/日）の 2／10 頭では、いずれも ADA が検出されたが、11 週間の回復期間終了時には低用量群及び中用量群（1 及び 10 mg/kg/日でそれぞれ 4／4 頭及び 1／3 頭）でも ADA が検出された。主試験期間の終了時に中用量群及び高用量群（10、50、200 mg/kg/投与）から得られた試料を分析した結果、コンシズマブ濃度は ADA アッセイの drug tolerance limit を上回っており、これらの動物のほとんどは回復期間終了時でも同様であった。したがって、ADA が発生した可能性があるものの測定不能であった。しかしながら、これらの動物でみられた曝露量データ及び血液凝固パラメータに及ぼす影響から、コンシズマブの曝露と薬理作用が確認された。

TK の検討から、コンシズマブを投与されたサルがコンシズマブに曝露されたことが示された。低用量群で ADA 陽性を示した 2 頭ではコンシズマブの曝露量が低下しており、それに応じてフィブリノゲン、TAT 及び D-ダイマーは対照群の値に戻っており、抗体による中和作用又はクリアランスが示された。TK パラメータに性差はみられなかった。消失速度及び投与回数から予想された通り、コンシズマブの曝露における蓄積は、皮下投与及び静脈内投与のいずれも、投与後 13 週間以降まで認められた。

結論

カニクイザルにコンシズマブを投与した結果、予想される血液凝固の薬理作用であるフィブリノゲン、TAT 及び D-ダイマーの変化が認められた。内因性抗凝固物質（AT 及びプロテイン C）には毒性学的意義のある影響はみられなかった。さらに、高曝露量では過剰な薬理作用と一致する血栓形成がみられた。10 mg/kg/日の皮下投与群の死亡動物で肝臓の血栓が 1 箇所認められ、投与に関連した可能性が考えられた。以上の所見に基づき、皮下投与では、NOAEL は 1 mg/kg/日と設定された。静脈内投与では、試験用量とした 200 mg/kg で 1 頭に肺の血栓が認められたことから、NOAEL は設定されなかった。

2.6.6.3.3　カニクイザルを用いた 26 週間静脈内・皮下投与慢性毒性試験及び 13 週間回復性試験－試験番号：211087

カニクイザルを用いた静脈内投与及び皮下投与による 26 週間毒性試験及び 13 週間回復性試験（M 2.6.7.7.C、試験番号：211087）

コンシズマブの長期曝露後の局所毒性及び全身毒性を明らかにするため、性成熟したカニクイザル（主試験では雌雄各 3 頭／群、回復試験では雌雄各 2 頭／群）を用いた 26 週間反復投与毒性試験及び 13 週間回復性試験が実施された。コンシズマブは 0、3、9 mg/kg/日で皮下投与又は 30 mg/kg/週で静脈内投与された（表 2.6.6-6）。

本試験では、[redacted]、特にコンシズマブの[redacted]含量が高いコンシズマブ（[redacted]含有量：[redacted]%）の毒性が評価されたことから、[redacted]含有量は、提案する[redacted]の有効期間内規格の限度値（[redacted]%、2.6.6.8.7）よりも大幅に高かった。したがって、本試験で用いられた製剤は、4、13 及び 52 週間毒性試験で用いられた、臨床製剤と同様の品質特性を持つ低[redacted]含量製剤とは異なるものであった。

表 2.6.6-6　カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験（試験番号：211087）における投与量及び 1 群当たりの動物数

Group number	Dose level (mg/kg/dose)	Route of administration[a]	Number of animals in group and sex	
			Main study group	Recovery group
1	0	s.c.	3M+3F	2M+2F
2	3	s.c.	3M+3F	2M+2F
3	9	s.c.	3M+3F	2M+2F
4	30	i.v.	3M+3F	2M+2F

[a]s.c. doses administered daily, i.v. doses administered weekly.
Abbreviations: F = female; M = male.

以下の標準的な毒性学的パラメータ、すなわち一般状態観察、体重、摂餌量、生殖機能評価項目（月経周期、精巣のサイズ、精子数、精子運動性、精子形態）、眼科学的検査、血液生化学的検査、尿検査、血液学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマー含む）、ADA、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査並びに TK が評価された。さらに、血漿中 TFPI 機能活性が評価された。非 GLP 適用の探索的分析法を用いて血漿中内因性非凝固因子（AT 及びプロテイン C）（M 2.6.7.17.E、試験番号：212391）並びに総 TFPI 量及び遊離 TFPI 量（M 2.6.7.17.E、試験番号：213391）が測定され、別途報告された。病理組織学的検査で血管変化が認められた後、以下に示す複数の検討項目、すなわち血清中 IL-6、IL-1β、INF-γ、TNF-α、E-セレクチン及び細胞内接着分子 1（ICAM-1）の測定（M 2.6.7.17.E、試験番号：213528）、サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）を用いた、ADA とコンシズマブから成る循環性免疫複合体（CIC）アッセイ、コンシズマブ／ADA 複合体の特異的 IC アッセイ（2.6.6.8.3）、病理学的変化が認められた組織における免疫組織化学的検査（IHC）による IC の検出（2.6.6.8.3）が非 GLP 適用で実施され、別途報告された。

結果

一般状態（試験途中で安楽死処置された動物 34F を除く。以降に詳述）、体重、摂餌量、月経周期、精巣の長径・短径及び容積、総精子数、精子運動性及び形態並びに眼科学的検査、血液生化学的検査、尿成分、血液学的検査又は器官重量には、投与による影響は認められなかった。

コンシズマブの薬理作用に関連すると考えられる血液凝固マーカーの変化として、試験 6 週以降にフィブリノゲンの減少（対照群の最小 0.5 倍）、AT の増加（対照群の最大 19 倍）及び D-ダイマーの増加（対照群の最大 14 倍）が認められた。30 mg/kg/週の静脈内投与群の雄で、軽微な PT 延長がみられた（対照群の 1.29 倍）が、この群では投与前から若干の PT 延長（対照群の 1.1 倍）がみられていた。複数の群で、散発的に軽微な APTT の延長（対照群の 1.17 倍）がみられたが、明確な変化パターン又は用量反応性は認められなかった。特に 30 mg/kg/週の静脈内投与群でみられたプロテイン C 及び AT の軽微な減少（それぞれ対照群の最小 0.79 倍及び 0.81 倍）は、毒性学的意義のある変化とは考えられなかった。

TK の検討から、試験した全動物でコンシズマブの曝露が確認された。消失速度及び投与頻度から予想された通り、26 週間の投与以降でコンシズマブの蓄積が認められた。

ADA が検出された動物を除き、ほとんどの動物が回復期間中もコンシズマブに曝露されていた。血液凝固マーカー（APTT、PT、フィブリノゲン及び TAT）及び抗凝固因子（プロテイン C 及び AT）に関して、全用量群で 13 週間の回復期間終了後に対照群の値に戻った。D-ダイマーの増加に関して、9 mg/kg/日の皮下投与群の雌雄を除き、完全又は部分的に回復した。9 mg/kg/日の皮下投与群の雌雄で得られた結果は、回復試験期間終了時のコンシズマブ曝露量が高かったことを反映したものと考えられた。コンシズマブの薬理作用から予想された通り、遊離 TFPI 量は投与期間中に減少し、コンシズマブ濃度の減少に伴いベースライン値に戻った。遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI の両方を含む総 TFPI 量の増加が認められたが、用量段階的な変化ではなく、試験第 6 週以降は定常状態に達した。回復試験群では、コンシズマブ濃度の減少がみられた動物では総 TFPI 濃度が減少し、コンシズマブの曝露量が高い動物では高い状態を維持した。

TFPI 機能活性は、動物間で大きなばらつきが示されたが、予想されたコンシズマブの薬理作用と一致して、投与群では対照群より低かった。

血漿中 E-セクレチン、ICAM-1、IL-6、IL-1β、IFN-λ 又は TNF-α に関して、投与に関連した変化は認められなかった。

9 mg/kg/日の皮下投与群の雌性サル 1 頭（34F）が、不活発動作、歯茎蒼白、動作緩慢、浅呼吸及び虚脱といった、異常な一般状態変化が認められたことから、試験第 18 週に安楽死処置された。この動物の曝露量は試験期間中における同群のその他の動物の曝露量と同等であった〔試験第 17 週の濃度－時間推移曲線下面積（AUC）は、群平均の AUC 2,311,000 h*ng/mL に対して 2,510,000 h*ng/mL〕。この動物は生理出血が 9 日間続いたが、安楽死処置の前日でも異常な一般状態変化は認められなかった。試験前の観察では、生理出血の強度は正常範囲の上限を超えており、投与開始前でも同様の状態

にあった。安楽死処置直前に血液学的検査用に採取した試料の結果から、ヘモグロビン、赤血球数及びヘマトクリットの著しい減少並びに網状赤血球数の増加を伴う重度の貧血が示された。この動物は、試験第 13 週に軽度の貧血症状が示されており、血液凝固パラメータ（PT 及び APTT）は安楽死処置前日には正常範囲内であった。病理組織学的検査から、投与初期及び投与後期に形成された血栓が関連した可能性が考えられる、単核細胞性炎症と胸膜線維化を伴う肺実質の凝固壊死が認められた。さらに、血管変化（内皮細胞下の内膜肥厚、内皮細胞の肥大及び過形成）が肺の血栓を伴う領域とその他の領域でも認められた。重度の貧血に伴う肺の血栓と壊死がこの動物の状態悪化の原因であると考えられ、投与に関連した可能性が考えられた。

26 週の試験終了時に安楽死処置した動物において、投与に関連した 2 つの明確な病理組織学的所見として、種々の器官における血栓と、肺、脳脈絡叢及び注射部位における血管変化が認められた。

血栓が全投与群の数頭（0、3 又は 9 mg/kg/日の皮下投与群の各々1、3、2 頭、30 mg/kg/週の静脈内投与群の 3 頭）の肺でみられ、3 mg/kg/日の皮下投与群及び 30 mg/kg/週の静脈内投与群の回復試験動物でも各々2 頭に血栓が認められた。さらに、肺の血栓が認められた 1 頭では、精巣上体、胸腺、肝臓又は注射部位にも単発性の血栓が認められた。血栓形成は血液凝固促進物質で予想される過剰な薬理作用である。対照群の動物で認められた肺の血栓は、自然発生性の所見と考えられた[11]。

全投与群（3、9 mg/kg/日の皮下投与群及び 30 mg/kg/週の静脈内投与群）で、投与に関連する血管／血管周囲の変化（炎症、内皮細胞の肥大／過形成及び平滑筋肥大並びに中膜肥厚）が脳の脈絡叢内又は脈絡叢近接部位で認められた。同様に、全投与群（試験途中で安楽死処置された動物 34F を含む）で、投与に関連する血管変化（内皮細胞下内膜肥厚、内皮細胞の肥大及び過形成）が肺で認められた。試験途中で安楽死処置された雌性動物（34F）では、これらの所見が広範囲に分布していた。13 週間の回復期間終了後には、いずれの投与群の動物も肺又は脈絡叢に異常な血管変化は認められなかった。

認められた血管変化は、ADA の発生により生じる IC 沈着が関連すると考えられ、ヒトタンパク質をカニクイザルに投与すると生じる既知の影響であり、この仮説についてさらに検討した。IHC により、IC〔ヒト IgG（コンシズマブ）、サル IgG、IgM 又は補体成分 C3a〕の顆粒状沈着が、変化のみられた 6／10 頭の組織（脈絡叢及び肺）で確認された（2.6.6.8.3）。肺及び脈絡叢における炎症性細胞浸潤又は血管変化に関連する IC 沈着が検出され、認められた病変の病理発生における IC の役割が裏付けられた。

コンシズマブを投与された全群の 7／13 頭で、非常に高い力価を示す ADA が産生された。ADA 陽性であった 5 頭では、コンシズマブの曝露量は減少していた。これは、いくつかのケースでは部分的にフィブリノゲン及び D-ダイマーの正常化が並行しており、抗体による中和又はクリアランスが生じた可能性が考えられる。他の動物では、ADA アッセイにおいて ADA の検出を妨害する可能性のある高濃度のコンシズマブの曝露により ADA が検出されなかった可能性が考えられる。SEC と特異的 IC アッセイの組み合わせを用いると、脈絡叢又は肺で炎症性細胞浸潤又は血管変化が認められた全動物で、血漿試料中の ADA／コンシズマブ IC が検出された（2.6.6.8.3）。

結論

性成熟したカニクイザルにコンシズマブを投与した結果、予想される血液凝固の薬理作用である血液凝固マーカー（フィブリノゲン、TAT 及び D-ダイマー）の変化が認められた。9 mg/kg/日の皮下投与群の雌性サル 1 頭が一般状態の悪化により試験途中で安楽死処置され、コンシズマブ投与に関連した可能性が考えられた。

全投与群の各数頭の肺と、各 1 頭の種々の器官で認められた血栓は、投与に関連した変化と考えられ、血液凝固活性物質による過剰な薬理作用に一致するものであった。

詳細な作用機序検討に基づき（2.6.6.8.3）、肺及び脈絡叢に認められた血管変化は、ADA の発生により生じる組織への IC 沈着が関連すると考えられた。結果として、IC はこれらの変化を認める全動物の血漿中から検出され、IHC 検査から脈絡叢又は肺の血管病変部位に IC が認められた。したがって、本試験において、ADA 発生と IC が関連する病理所見は、高含有量の [redacted] 特に [redacted] を含む使用製剤の不純物プロファイルにより悪化された可能性が考えられる。

全投与群で血栓性の変化が認められたことから、本試験の NOAEL は設定されなかった。

2.6.6.3.4　カニクイザルを用いた 52 週間皮下投与毒性試験－試験番号：213542

カニクイザルを用いた皮下投与経路による 52 週間毒性試験（M 2.6.7.7.D、試験番号：213542）

コンシズマブの長期曝露後の局所毒性及び全身毒性を明らかにするため、性成熟したカニクイザルを用いて、コンシズマブ 0.5、1 又は 9 mg/kg/日を皮下投与する 52 週間反復投与毒性試験が実施された。本試験には、13 及び 26 週投与後に安楽死処置する中間試験群が組み入れられた（13 週間、26 週間又は 52 週間の 1 群当たり雌雄各 3～5 頭）（表 2.6.6-7）。

表 2.6.6-7　13 及び 26 週間の中間試験群を組み入れた、カニクイザルを用いた 52 週間慢性毒性試験（試験番号：213542）における投与量及び 1 群当たりの動物数

Group number	Dose level (mg/kg/day)	Route of administration	Number of animals in group and sex		
			13 weeks	26 weeks	52 weeks
1	0	s.c.	3M+3F	3M+3F	3M+3F
2	0.5	s.c.	-	4M+4F	5M+5F
3	1	s.c.	-	4M+4F	5M+5F
4	9	s.c.	4M+4F	4M+4F	5M+5F

Abbreviations: F = female; M = male.

以下の標準的な毒性学的パラメータ、すなわち体重、摂餌量、一般状態観察、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマーを含む）、バイオマーカー（プロテイン S、プロテイン C、遊離 TFPI）、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査、ADA 及び TK が評価された。さらに、血漿中 TFPI 機能活性が測定された。非 GLP 適用の探索的分析法を用いて血漿中総 TFPI 量が測定され、別途報告された（M 2.6.7.17.E、試験番号：[redacted]141003）。

26 週間毒性試験と同様に、試験開始後に以下に示す特殊検査、すなわち病理学的変化が認められた組織における IHC による IC の検出、SEC と特異的 IC アッセイを組み合わせた方法による ADA／コンシズマブ IC の測定、酵素免疫アッセイを用いた C3 フラグメントの沈着を伴う血清中 CIC 測定（2.6.6.8.3）が非 GLP 適用で実施され、別途報告された。

結果

一般状態、体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、血液生化学的検査、尿中成分又は器官重量には投与による影響は認められなかった。

低用量群の雄の 1 頭（2009M）が、同居動物との闘争により縫合不能な広範囲の引掻き傷を伴う外傷を負ったため、投与第 20 週で安楽死処置された。この動物では、投与に関連する一般状態又は病理所見は認められなかった。したがって、この動物の死亡は投与に関連しないと考えられた。

血液学的検査では、血小板数の減少が 9 mg/kg/日投与の雄で投与第 6 週以降（対照群の最小 0.44 倍）及び 9 mg/kg/日投与の雌で投与第 44 週以降（対照群の最小 0.58 倍）みられたが、それ以外に 投与に関連する変化は認められなかった。さらに、0.5 及び 1 mg/kg/日では、投与第 34 週以降に血小板の減少が、雄で数回、雌でわずかに認められた。

9 mg/kg/日群では投与第 13 週に、1 mg/kg/日以下の群では投与第 26 週に、対照群と比較して D-ダイマーが用量段階的に増加し（対照群の最大 13 倍）、統計学的有意差が認められた。プロテイン C 又は AT の軽微な減少は（それぞれ対照群の最小 0.84 倍又は 0.73 倍）、試験期間の 2、3 時点で統計学的有意差が認められたものの、毒性学的意義のある変化とは考えられなかった。プロテイン S に関して、投与に関連した変化は認められなかった。フィブリノゲン濃度の減少が全用量群で投与第 6 週以降に認められ、9 mg/kg/日投与で最低値が認められた（変動幅：対照群の 0.41～0.89 倍）。これらの所見は予想されるコンシズマブの薬理作用と一致する結果であり、また、4、13 及び 26 週間反復投与毒性試験の結果とも一致した。

9 mg/kg/日群で、軽度の PT 延長（対照群の最大 1.17 倍）が投与第 6 週～26 週で認められた。この変化は 26 週以降では数回みられたのみであった。9 mg/kg/日群では、軽度の APTT 延長（対照群の 1.16 倍まで）が試験期間中に数回認められた。

TK の検討から、消失速度及び投与回数から予想された通り、52 週間の投与以降でコンシズマブの用量比例性を超える曝露量の増大と蓄積が認められた。

0.5 及び 1 mg/kg/日群の数頭では、ADA の発生によりコンシズマブの全身曝露量が低下した。結果として、試料を採取した数時点で、低用量群（0.5 mg/kg/日）の 2 頭を除いたすべての動物で、コンシズマブに対する ADA が検出された。ADA 陽性動物には曝露の影響を受けた個体もみられたことから、52 週間投与後の 2/9 頭では予想通りの曝露量が示され、遊離 TFPI 濃度は検出できなかった。さらに、3 頭の ADA 陽性動物では試験期間中に遊離 TFPI 濃度が減少し、コンシズマブの曝露量も PK モデリングに基づく推定値を下回った（データの図は M 2.6.4.3.2 を参照）。

1 mg/kg/日群では、5/10 頭が ADA 陽性であり、曝露量が低下したが、このうちの 1 頭は投与第 34 週以降に ADA 陰性となった。特筆すべきこととして、1 mg/kg/日群の 6/8 頭は ADA 陰性であったが、26 週間の中間時点では予想通りの曝露量が示され、毒性所見は全く認められなかった。

9 mg/kg/日群では、ADA は検出されなかったが、この要因として、血漿中の高濃度コンシズマブが ADA アッセイを妨害した可能性が考えらえた。SEC と特異的 IC アッセイを組み合わせた方法を用いた結果、血管変化の認められた全動物の血漿試料から、ADA とコンシズマブの IC が検出された（2.6.6.8.3）。

コンシズマブの投与後に、遊離 TFPI の用量段階的な低下が認められ、投与第 6 週以降の 1 mg/kg/日又は 9 mg/kg/日群のほとんどの動物で、遊離 TFPI が検出限界（LOD）未満であった。0.5 mg/kg/日群では、試験期間中、ほとんどの動物で低レベルの遊離 TFPI が散発的に検出された。ADA 陰性動物、あるいは弱い ADA 反応（低力価）を示し、コンシズマブの曝露がある程度みられた ADA 陽性動物では、試験期間中の特定の時期に遊離 TFPI 濃度が低下していた。強い抗体反応（高力価）を示し、コンシズマブの曝露がほとんど又は全くみられなかった動物では、遊離 TFPI 濃度がベースライン値に戻り、コンシズマブの作用が減弱したことが示された（データの図は M 2.6.4.3.2 を参照）。

遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI の両方を含む総 TFPI 量は用量段階的に増加し、9 mg/kg/日群では、ベースラインの平均値である 0.74 ～0.94 nmol/L（32.4～41.1 ng/mL）から、定常状態の濃度である 20 nmol/L（876 ng/mL）に達した。0.5 mg/kg/日群又は 1 mg/kg/日群の数頭では、ADA が発生したことにより、総 TFPI 量の増加はわずかであるか、又は一過性であった。

血漿中 TFPI 機能活性に関するデータは動物間で大きくばらついたが、予想されるコンシズマブの薬理作用に一致して、ほとんどの場合では、対照群よりもコンシズマブ投与群で低かった。

9 mg/kg/日を 13 週間投与された 1 頭の左肺尾状葉の血栓（「黒色巣」と記録）及び 52 週間投与された 1 頭（9 mg/kg/日）の心臓と別の 1 頭（1 mg/kg/日）の肺の血栓（いずれも「腫瘤」と記録）を除いて、コンシズマブ投与に起因する器官重量の変化及び剖検所見は認められなかった。

52 週間試験では、26 週間毒性試験（試験番号：211087）と同様に 2 つの明確な病理組織学的所見として、種々の器官における血栓と、主に肺、脈絡叢及び注射部位における限局性の血管変化が認められた。本試験において、血栓と血管所見の局在部位に重複は認められなかった。

過剰な薬理作用によると考えられる血栓が、9 mg/kg/日群の計 12／26 頭で、投与第 13、26 及び 52 週に心臓、肝臓、腋下及び腸間膜リンパ節、肺、精巣上体又は脾臓で認められた。さらに、1 mg/kg/日の 52 週間投与群の 3／8 頭で、血栓が心臓、肺又は肝臓で認められた。1 mg/kg/日の 26 週間投与群又は 0.5 mg/kg/日の 52 週間投与群では、血栓は認められなかった。

肺の小～中血管における内皮細胞下内膜肥厚が、1 mg/kg/日の 52 週間投与群の雌 1 頭と、9 mg/kg/日の 13、26 又は 52 週間投与群の計 5／26 頭に認められた。肝臓における血管の内皮細胞下内膜肥厚は 9 mg/kg/日の 26 週間投与群の 1 頭でみられた。さらに、脈絡叢における炎症性細胞浸潤が、9 mg/kg/日の

13 週間投与群の雄 1 頭並びに 26 週及び 52 週の全用量群の数頭でそれぞれ認められ、総発生数は 0.5、1 及び 9 mg/kg/日群でそれぞれ 3／18 頭、2／18 頭及び 7／26 頭であった。これらは、免疫能を有する動物への異種タンパク質の投与に関連した免疫反応に続いて生じる、IC 介在性の病変に一致する所見と考えられた。IHC 法を適用すると、これらの変化が認められた多くの組織で IC の顆粒状沈着が確認された。IC の顆粒状沈着は、ヒト IgG（コンシズマブ）、サルの IgG、IgM 又は C3a で構成されていた（2.6.6.8.3）。

最初のサンプリング時点である第 26 週では、すべてのコンシズマブ投与群で循環血中免疫複合体（CIC）が認められた（2.6.6.8.3）。概して、CIC レベルは高用量群（9 mg/kg/日）で高く、全用量群の投与後 4 時間で上昇した。第 52 週では、コンシズマブ投与群において統計学的に有意な CIC 濃度の高値傾向はみられず、投与後の変化は特に認められなかった。

結論

性成熟したカニクイザルにコンシズマブを投与した結果、予想される血液凝固の薬理作用であるフィブリノゲンの減少並びに TAT 及び D-ダイマーの増加が認められた。さらに、血小板の減少、PT 及び APTT の延長が主に最高用量である 9 mg/kg/日で認められた。

病理組織学的検査から、2 つの明確な所見、すなわち種々の器官（心臓、肝臓、肺、脾臓、精巣上体及びリンパ節）における血栓並びに主として肺、脳の脈絡叢及び注射部位における限局性の血管変化が認められた。

詳細な作用機序検討に基づき、肺及び脈絡叢に認められた血管変化は、ADA の発生により生じる組織への IC 沈着が関連することが示された。結果として、IC はこれらの変化を認める全動物の血漿中から検出され、IHC 検査から病変部に IC が認められた。

血栓形成は過剰な薬理作用である血液凝固に一致する所見であり、9 mg/kg/日の 13、26 及び 52 週間投与群と 1 mg/kg/日の 52 週間投与群でみられた 。したがって、血栓に関する NOAEL は、1 日 1 回 26 週間投与後では 1 mg/kg/日、1 日 1 回 52 週間投与後では 0.5 mg/kg/日であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

コンシズマブは mAb であり、天然の内因性アミノ酸から構成され、遺伝毒性を有すること又は DNA や染色体と直接的に相互作用するとは考えられない。コンシズマブの変異原性又は細胞増殖を示唆する作用機序データはない。したがって、ICH S6（R1）ガイドライン [2] に従い、コンシズマブの遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.6.5 がん原性試験

コンシズマブはげっ歯類に作用しないことから、承認申請における標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験を実施する意義はない。したがって、コンシズマブのがん原性評価は、作用機序、関連文献レビュー（670 件を超える科学的出版物の評価を含む）及び ICH S6（R1）ガイドライン [2] に準拠した、

非臨床及び臨床データの評価を考慮した証拠の重み付け評価に基づいて行った〔文献を含むフルパッケージのがん原性の証拠の重みづけ評価書は、321420 試験（M 4.2.3.4.3-1）を参照〕。

腫瘍の成長及び転移は多因子が関与する非常に複雑なプロセスを経る。がん関連プロセスにおいて TF-FVIIa シグナル伝達には何らかの役割を果たすものの、生理的レベルの TFPI がこれらの反応に影響を及ぼすとは考えられない。代わりに、生理的レベルの TFPI（及びコンシズマブ）が TF/FVIIa/FXa を介してシグナル伝達に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、このシグナル伝達経路はがんのプロセスには関与していない。

TFPI の C 末端部は腫瘍の細胞増殖、血管新生及び転移を抑制する作用が示唆されている。これらのプロセスが、TFPI の K2 ドメインに対するコンシズマブの特異的結合により影響を受けるとは考えられない。

コンシズマブにより TFPI が抑制されると、血液凝固プロセス下流におけるトロンビン生成が増加する。トロンビンはがんに関与するとされるシグナル伝達反応を介在することが報告されており、血友病において止血機能が修復された際に、これらの反応が継続する可能性がある。したがって、コンシズマブや血液凝固促進化合物は、多くのがん種で認められる凝固亢進状態を含め、トロンビンの作用を増強する可能性が考えられる。

TFPI は数種のがん細胞株で認められるが、発現レベルにはばらつきがみられる。高発現の TFPI は TF の血液凝固作用を抑制する可能性があることから、コンシズマブは他の血液凝固促進物質と同様に、がんでしばしば認められる凝固亢進状態を増強することもあり得る。したがって、コンシズマブのような TFPI 抗体による血友病患者の治療は、悪性度診断を行っていない患者における血栓塞栓事象のリスクを高める可能性がある。

部分的 TFPI 欠損症（特異的 TFPI 遺伝子多型）や第 V 因子（FV）欠損症の個人データ又はエストロゲン製剤（経口避妊薬）を摂取している個人データからは、ほとんどがヒトの一般的ながんリスクに関して TFPI を減弱させる中和作用の傾向がみられる。

コンシズマブは TFPI に対する first-in-class の mAb である。コンシズマブ以外に臨床開発が行われている 3 種類の TFPI 抗体に関して、これまでに得られている文献からは、ヒトのがんリスクに関連した情報は示されていない。

コンシズマブはカニクイザルを用いた最長 52 週間の 1 日 1 回皮下投与による非臨床反復投与毒性試験において評価されている。これらの試験では、細胞増殖の徴候、血管新生、免疫抑制又は器官重量の変化は認められなかった。

コンシズマブは現在第 3 相臨床試験を 2 試験実施中である。これらの試験で報告された重篤な有害事象に加え、すでに完了した第 1 相試験と 2 種類の第 2 相臨床試験データからは、がんに関連した安全性上の懸念は認められていない。

ノボ ノルディスク社は、コンシズマブのがん原性は証拠の重み付け評価により適切に評価されたと考えている。他の血液凝固化合物と同様に、コンシズマブの投与により、ある種のがん患者で認められる凝固亢進状態を増強する可能性があると結論付けられる。しかしながら、実施された評価からは、コンシズマブの投与により、ヒトにおける腫瘍の発生が誘発又は増強されるリスクを高めるとの証拠は得られていない。

2.6.6.6 生殖発生毒性

生殖発生毒性試験は実施されていない。ICH S6（R1）[2]にて提供されたガイダンスに基づき、性成熟したカニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験に生殖能パラメータの特殊評価が組み入れられた（試験番号：211087）。月経周期、個々の精巣の長径・短径及び容積、総精子数、精子運動性又は精子形態に投与による影響は認められなかった。さらに、幼若及び性成熟した雌雄カニクイザルを用いた最長 52 週間の毒性試験において、生殖器官の病理組織学的検査を実施した結果、生殖器官に及ぼす毒性は認められなかった。一方、正常な血液凝固能を有するカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、種々の器官に血栓が認められている。血栓は過剰な薬理作用、すなわち、凝固カスケードの活性化と一致する。血栓は流産のリスク要因の一つとなることが報告されており[12,13]、正常な血液凝固能を有する動物に高用量のコンシズマブを投与すると、血栓が生じることにより生殖発生毒性が誘発される可能性がある。以上のことから、正常な血液凝固能を有する動物を用いてコンシズマブの生殖発生毒性試験を実施する意義はないと考えられる。

マウスでは、TFPI 遺伝子の不活化により胚致死が誘発されることが示されている[14,15]。完全 TFPI 欠損症は臨床的には報告されていない[16]。しかしながら、ヒトでは器官形成期に IgG の胎盤移行が生じるが、ごくわずかであることから、コンシズマブのようなモノクローナル IgG 抗体をヒトへ投与する場合、胚致死の所見はヒトに関連しない可能性が考えられる[1,17]。活性化プロテイン C（APC）抵抗性の表現型を保有する TFPI 欠損症女性、抗リン脂質抗体と抗 TFPI 抗体を両方保有する女性では、再発性流産との関連性が報告されており、TFPI は正常な妊娠に重要である可能性が示されている[18,19]。妊婦におけるモノクローナル抗体による TFPI 阻害の意義は不明である。

2.6.6.6.1 幼若動物を用いた試験

これまでに毒性学的所見が認められた唯一の標的器官は血液凝固系であり、予想されるコンシズマブの薬理作用に一致する。ヒトの血液凝固系は出生後の早期の週又は月内に成熟し、ほとんどの血液凝固タンパク質濃度は、満期産児及び早産児とも 6 カ月齢で成人の値に近づく[20,21]。したがって、コンシズマブの毒性は幼若（2～3 年齢）及び性成熟（3.5～6 年齢）した動物を用いた一般毒性試験プログラムで適切に特性解析されていると考えられたことから、幼若動物を用いた試験は実施されていない。

2.6.6.7 局所刺激性試験

ICH S6（R1）ガイドライン[2]に準拠し、局所刺激性はカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（M 2.6.7.16、試験番号：210130、209206、211087、213542）及び rFVIIa との薬物相互作用毒性試験（M 2.6.7.16、試験番号：215431）の一部に組み入れて評価された。局所刺激性試験は実施されなかった。

26 及び 52 週間毒性試験で使用された製剤組成は、以下の通りであった：コンシズマブ（100 mg/mL）、L-アルギニン塩酸塩 [redacted] 、L-ヒスチジン [redacted] 、塩化ナトリウム [redacted] 、精製白糖 [redacted] 、ポリソルベート 80 [redacted] 、pH[redacted] 臨床用製剤組成では、臨床用デバイスを用いて頻回注射ができるようにするため、防腐剤としてフェノール [redacted] を加えた以外は同様であった。

動物は、皮下注射（0.5、1、3、9、10、50 mg/kg/日）で 4～52 週間、静脈内注射（30、200 mg/kg/週）では 4～26 週間投与された。

静脈内注射部位では、30 mg/kg/週の 26 週間投与群の 1 頭に血栓が認められたことを除いて、コンシズマブの影響に関連すると考えられる病理組織学的所見は認められなかった。

皮下注射部位の病理組織学的検査から、全投与群に炎症細胞巣／血管周囲白血球集積が認められた。これらの変化は、4 週間毒性試験ではわずかに用量段階的な発生頻度の増加がみられたものの、13 週間毒性試験では用量との明らかな関連性はみられなかった。26 週間毒性試験ではこれらの変化がより高い発生頻度で認められたが、26 週間毒性試験では [redacted] 、特に [redacted] 量の高い製剤が使用された。リンパ球に加え、大多数の形質細胞、好中球、好酸球及び散発性の巨細胞を含む血管周囲の細胞浸潤が認められた。52 週間毒性試験では、少数の形質細胞を含む血管周囲の細胞浸潤が、13 週間、26 週間及び 52 週間の全皮下投与群の投与部位にみられた。

概して、試験では回復性試験動物を含め、注射部位のほぼ完全な回復がみられた。

4 週間薬物相互作用毒性試験において、皮下及び静脈内注射部位にはコンシズマブ及び rFVIIa のそれぞれに関連する顕微鏡的所見はなかった。

皮下注射部位で認められた局所性の影響は他のヒトタンパク質の皮下注射後の動物で認められたものと類似していた[22]。この影響は可逆的であり、コンシズマブに対する免疫原性反応に関連しているものと考えられる。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 組織交差反応性（TCR）

ICH S6（R1）[2] に従い、第 1 相臨床試験に必要な初期安全性評価の一部として、潜在的な標的外結合を評価するためにコンシズマブのヒト組織との結合性を特性化する組織交差反応性（TCR）試験が実施された。動物種の適格性確認に関する初期検討の一部で、カニクイザルの組織パネルが含まれた。

コンシズマブとヒト及びカニクイザル組織との結合性を評価するための TCR 予備試験（M 2.6.7.17.A、試験番号：209125）が実施され、引き続き GLP 適用の TCR 試験（M 2.6.7.17.A、試験番号：209280）が実施された。

予備試験では、評価対象として選択した 12 種のヒト及びカニクイザルの組織においてコンシズマブは同様の結合パターンを示した。結合は、ヒト及びカニクイザルともに内皮細胞、紡錘細胞及び単核

細胞の細胞質と細胞質顆粒並びに種々の組織の細胞外タンパク性物質で認められた。さらに、カニクイザルの組織パネルのみ、細胞質及び細胞質顆粒の染色性が、大脳（内皮細胞、紡錘細胞及び細胞外タンパク性物質）、膵臓（島細胞及び腺房上皮細胞）並びに脾臓（中皮細胞）で認められた。

フルパッケージのヒト及びカニクイザルの組織パネルを用いた GLP 準拠の TCR 試験においても、コンシズマブのヒト組織との結合パターンはカニクイザル組織における結合パターンと同様であった。検討したヒト組織を通して、結合が小血管及び中型血管の内皮細胞の細胞質、造血前駆細胞及び単核白血球細胞、紡錘細胞、胎盤脱落膜細胞並びに細胞外タンパク性物質で認められた。カニクイザルでは、胎盤脱落膜細胞を除いて、同じ細胞タイプの細胞質との結合が認められた。さらに、カニクイザルでは胎盤のマクロファージ（Hofbauer cells）及び栄養膜上皮に加え精巣の精原細胞において認められたが、ヒトの組織パネルでは認められなかった。

結論として、コンシズマブは検討したカニクイザル組織と対比してヒト組織においても類似の結合パターンを示した。コンシズマブによる結合のほとんどは TFPI の発現が既知の組織、すなわち内皮細胞、単核球及び紡錘細胞で認められたが[23,24,25]、例外的に TFPI の発現が知られていない部位においてもみられた。しかしながら、検出された結合は細胞質内に限局したことから、*in vivo* でコンシズマブが細胞質に到達することはないと考えられる。

2.6.6.8.2　コンシズマブの[redacted]及び[redacted]の特性評価

前述したように、26 週間毒性試験で使用した被験物質は高含有量の[redacted]（[redacted]%）、特にコンシズマブの[redacted]が含まれていた。反対に、4、13 及び 52 週間毒性試験で使用された被験物質は、[redacted]含量が低く、臨床試験で使用した被験物質との同等性・同質性が確認された。26 週間反復投与毒性試験では、血栓及び血管変化が認められたことから、NOAEL は設定されず、それ故、不純物プロファイルの変化、すなわち[redacted]の高含有量がこれらの所見を説明し得るか評価するため、特性解析が実施された。

誘導された[redacted]成分の特性評価から、非共有結合性のコンシズマブの[redacted]及び[redacted]が本質的には不可逆性で十分な活性を有するものであることが示された。26 週間試験の試験物質から各[redacted]成分が分離され（M 2.6.7.17.B、試験番号：215027）、濃縮されて特性が評価された。分離画分の特性評価により、[redacted]は不可逆性で非共有結合性であることが確認された。

[redacted]バッチに対するコンシズマブの[redacted]バッチの機能活性及び FXa 生成は、血漿中トロンビン生成のためのアッセイ法を用い、TFPI 発現内皮細胞の存在下及び非存在下で血液トロンボエラストグラフィー及び FXa 生成が比較された（M 2.6.7.17.B、試験番号：[redacted]130901）。様々な種類のコンシズマブは、一部のアッセイでは[redacted]の活性が[redacted]の活性に比較して高かったが、他のアッセイでは同等かわずかに低く、TFPI に関しては、いずれの試験条件下でも十分な活性抑制が示された。

表面プラズモン共鳴で特定されたコンシズマブの[redacted]のヒト及びカニクイザルの Fcγ-レセプター（FcγR）との結合親和性は同等であった（M 2.6.7.17.B、試験番号：215094）。コンシズマブの[redacted]

[redacted]の結合親和性は、ヒト及びカニクイザルともに同等かわずかに低かった。[redacted]は[redacted]と比較してカニクイザル FcγR からの解離がより緩徐であり、アビディティにつながる[redacted]特性とも一致していた。ヒトの FcγR に対しても同様に、コンシズマブの[redacted]が増強されると考えられる。

In vitro 細胞毒性試験が実施され、[redacted]含量の異なるコンシズマブバッチにより、TFPI を発現した標的細胞（内皮細胞系；EA.hy926WT）に対する抗体依存性細胞障害（ADCC）が誘発されるか検討された。これらのコンシズマブバッチのいずれも、標的介在性結合による ADCC は誘発されなかった（M 2.6.7.17.B、試験番号：214488）。

培養内皮細胞〔EAHy926 及びヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）〕における放射能標識のコンシズマブの[redacted]タイプと[redacted]タイプの取り込みと内在化が、細胞膜又は細胞質に結合した特異的放射能として測定された（M 2.6.7.17.B、試験番号：[redacted]131001）。[redacted]及び[redacted]ともごく少量が取り込まれ、[redacted]と[redacted]間で差異は認められなかった。

HUVEC において内皮細胞活性化マーカーである E-セレクチン、ICAM-1 及び血管細胞接着分子因子 1（VCAM-1）の細胞表面発現に及ぼすコンシズマブの[redacted]及び[redacted]の潜在的な影響が検討された（M 2.6.7.17.B、試験番号：[redacted]130901）。さらに、内皮細胞表面の FcγR 発現がコンシズマブの[redacted]及び[redacted]によって誘導されうるかどうかについても評価された。フローサイトメトリーで評価した内皮細胞表面マーカーの発現上昇が TNF-α 及び IL-1β で誘導された一方、コンシズマブの[redacted]及び[redacted]のいずれも ICAM-1、E-セレクチン又は VCAM-1 の細胞表面発現を誘導せず、サイトカインで誘発された発現上昇をさらに促進しなかった。コンシズマブ又はコンシズマブの[redacted]は FcγRI、FcγRII 又は FcγRIII の発現に影響を与えなかった。

コンシズマブの[redacted]及び[redacted]の潜在的な相違に関する結論

[redacted]成分の特性評価から、コンシズマブの[redacted]及び[redacted]は共有結合したものであること、本質的に不可逆性で十分な活性を有することが示された。*In vitro* 試験で認められた差異に関して、複数のアッセイでコンシズマブの[redacted]型が[redacted]型よりも高い活性が認められたことと、コンシズマブの[redacted]型は[redacted]型に比較して種々の FcγR からの解離が緩徐であった。結合性、取り込み及び内在化は両バッチとも同等であった。種々のコンシズマブバッチのいずれも ADCC、活性化内皮細胞表面マーカー又は刺激影響下での FcγR を誘導しなかった。総合すると、これらのアッセイにおいてコンシズマブの[redacted]フォームに及ぼす影響は非常に小さかった。この結果から、26 週間試験で認められた病理所見に関して、コンシズマブの[redacted]型は、主に IC の生成を誘発する免疫原性に関連したことが示された（2.6.6.8.3）。

2.6.6.8.3　免疫複合体が介在する病態解明のための作用機序検討試験

2.6.6.8.3.1　動物を用いた毒性試験における IC 沈着

13、26 及び 52 週間の反復投与毒性試験において、限局性の血管変化が主に注射部位、脳の脈絡叢及び肺で認められた（所見の概要を表 2.6.6-8 に示す）。

コンシズマブ投与動物に認められた血管所見と同様の血管所見が、mAb を含む他のヒト型タンパク質投与のサルでも報告されている[3,4,5,6,7]。これらの所見は、典型的には腎臓（糸球体）、滑膜、肺、肝臓、皮膚、眼球及び脈絡叢などの種々の器官における血管内及びその周囲に局在しており、注射されたタンパク質の免疫原性と関連付けられている[3,4,5,6,7]。

したがって、抗体と抗原、例えば薬物と ADA が存在すると、正常な環境では IC が形成されても血漿中から除去される。しかしながら、大量の ADA が発生した場合、大量の抗体―抗原複合体が形成され、動物では、このような複合体に対する生理的なクリアランス容量を超えた場合には、コンシズマブの毒性試験でみられたように IC の組織沈着を引き起こす可能性がある。

限局性の血管所見の発生頻度と重症度は試験間で相違しており、試験製剤が高含量の[redacted]、特に[redacted]を多く含んでいた 26 週間毒性試験では発生頻度は高く、より重症度の高い病変（限局性の血管変化及び炎症）を伴っていた（表 2.6.6-8）。このことは、製剤中の含量が高い[redacted]が、潜在的にはより高度の免疫原性による血管所見の発生と重症化に役割を果たしていた可能性が考えられる。

表 2.6.6-8　　13、26 及び 52 週間毒性試験において IC が関連する所見の概要（試験番号：209206、211087 及び 213542）

Studies		**13-week toxicity study (Study ID 209206) Affected animals, n (%)**						**26-week toxicity study (Study ID 211087) Affected animals, n (%)**					**52-week toxicity study (Study ID 213542) Affected animals, n (%)**			
Dose level (s.c. mg/kg/day, i.v. mg/kg/week)		**0 s.c.**	**1 s.c.**	**10 s.c.**	**50 s.c.**	**200 i.v.**	**Recovery (11 weeks)[b]**	**0 s.c.**	**3 s.c.**	**9 s.c.**	**30 i.v.**	**Recovery (13 weeks)[d]**	**0 s.c.**	**0.5 s.c.**	**1 s.c.**	**9 s.c.**
Number of animals examined		**10**	**6**	**6[a]**	**6**	**6**	**16**	**10**	**6**	**7[c]**	**6**	**11**	**18**	**18[e]**	**18**	**26**
Immune complex related findings	Focal vascular changes (lung, choroid plexus or liver)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (17)	2 (33)	0 (0)	0 (0)	4 (67)	3 (43)	3 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)	5 (19)
	Inflammation (choroid plexus)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	1 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Inflammatory cell infiltration (choroid plexus)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (17)	2 (11)	7 (27)

Note: Vascular changes at injection site are not included in the table.

[a]Including decedent animal 12M. [b]Recovery groups at all dose levels in 13-week toxicity study (Study ID 209206). [c]Including decedent animal 34F. [c]Recovery groups at all dose levels in 26-week toxicity study (Study ID 211087). [e]Including decedent animal 2009M.

2.6.6.8.3.2　カニクイザルの脈絡叢におけるコンシズマブと TFPI の生体内分布

毒性試験において脈絡叢に認められた血管所見にコンシズマブが関連した可能性を検討するため、26 週間毒性試験から得たカニクイザル脈絡叢試料を用いて IHC によるコンシズマブの組織中分布及び内因性 TFPI の有無を検討した（M 2.6.7.17.C、試験番号：[redacted]130402）。

脈絡叢においてコンシズマブの IHC 染色強度の用量段階的な増加が認められた。コンシズマブは、主に血管腔内に検出されたことから、コンシズマブは血中に存在し、血管内皮との関連性が示された。炎症を来した脈絡叢の 1 試料では、IHC により点状パターンを示すコンシズマブ反応が認められ、これは顆粒状沈殿物と一致する所見であり、IC の沈着時にみられることが文献で報告されている[3,4,5,7]。内皮の TFPI 染色強度は、溶媒投与群と比較して 3 用量のコンシズマブ投与群で強かった。

2.6.6.8.3.3　IC が関連する病理変化の仮説を支持する証拠の重み付けアプローチ

Society of Toxicological Pathology で組織されたワーキンググループが提唱する内容[7]に従い、証拠の重み付けアプローチを用いて血漿中及び組織中における IC の有無を評価するため、サルの血漿及び組織を用いた特殊検査が計画された。

2.6.6.8.3.3.1　SEC 後に実施された ADA-ELISA

抗コンシズマブ抗体の検出は、高濃度の血漿中コンシズマブにより妨害される可能性があることから、高用量群では ADA を有する動物数が過少評価された可能性が考えられる。一方、52 週間毒性試験で 0.5 mg/kg/日を投与された低用量群では、ADA の発生頻度が高かった。コンシズマブの妨害を受けずに ADA／IC を検出するため、26 及び 52 週間毒性試験において血管病変が認められた動物（M 2.6.7.17.C、試験番号：214449）から選択した血漿試料に対して SEC を用いて複合体を分離後、ADA／コンシズマブ複合体特異的な ELISA を実施した。コンシズマブを投与された全動物で、投与前値と比較してコンシズマブを含む各種サイズの IC が経時的に生成されていたが、対照群では IC の生成は認められなかった。

2.6.6.8.3.3.2　循環性免疫複合体（CIC）

52 週間試験における 26 週間及び 52 週間後の投与前に、CIC 測定専用血漿試料が採取された（M 2.6.7.17.C、試験番号：214471）。用いた酵素免疫アッセイにより CIC が測定された。CIC は C3 フラグメントと補体活性化 IC が共有結合されているが、コンシズマブを含む CIC 非特異的ではない。第 26 週では、高用量群（9 mg/kg/日）の動物における CIC 濃度は投与前よりも増加し、さらに、統計学的に有意な CIC 濃度の増加が全コンシズマブ投与群で投与後 4 時間まで認められた。第 52 週では、コンシズマブ投与群において統計学的に有意な CIC 濃度の高値傾向はみられず、投与後の変化は特に認められなかった。

2.6.6.8.3.3.3　免疫組織化学的検査－組織沈着免疫複合体

顆粒状沈着物〔ヒト IgG（コンシズマブ）、サル IgG、IgM 又は C3a から構成〕中の IC は IC 沈着が一致する部位である病変血管部、すなわち血管壁の内膜／中膜又は血管分岐部に認められたが、病変のみられない血管又は対照群動物の血管では IC は認められなかった。

炎症性細胞浸潤及び血管変化に関連した IC の存在は、IC が認められた病変における病理発生の関与と一致する結果であった。

2.6.6.8.3.3.4　26 週間反復投与毒性試験

IC は、それぞれ 3 頭（3 mg/kg/日の皮下投与又は 30 mg/kg/週の静脈内投与）の病変のみられた肺血管内と 2 頭（3 mg/kg/日の皮下投与又は 30 mg/kg/週の静脈内投与）の脈絡叢に認められ、炎症又は血管変化（内皮の過形成／肥大又は内皮化の肥厚）を伴っていた（M 2.6.7.17.C、試験番号：214391）。

2.6.6.8.3.3.5　52 週間反復投与毒性試験

IC は、13 週試験群（9 mg/kg/日）の 1 頭及び 52 週試験群（1 又は 9 mg/kg/日）の 2 頭において、血管変化（内皮細胞下の肥厚）を伴っていた肺の血管、並びに 26 週試験群（1 又は 9 mg/kg/日）の 2 頭及び 52 週試験群（0.5、1 又は 9 mg/kg/日）の 4 頭において、炎症反応を伴っていた脈絡叢に認められた（M 2.6.7.17.C、試験番号：214400）。

IC の顆粒状沈着は、血管又は炎症変化を伴うすべての組織からは確認されなかった。このことは、文献で報告されている事例と一致する結果であった[3,4,5,7]。炎症のプロセスはマクロファージによる食作用へと進行することから、IC が処理されることにより、病変部で認められた IC が減少した可能性が考えられる。このプロセスは個々の動物における炎症反応の進行と特性に依存する。個体差があることから、文献では、血管及び炎症変化における IC 関与の評価は、全体像評価のために作用機序を考慮した証拠の重みづけアプローチによる評価の重要性が強調されている。さらに、作用機序に関与するすべての要因が 1 頭の動物から矛盾なく確認されることは稀である[3,4,5,7]。したがって、IC は変化が認められたすべての動物における変化の類似性や、ADA 又は CIC の同時検出による病変の発症機序に関連していると考えられる。

4、13 及び 52 週間毒性試験で使用された試験物質の品質は、市販用製剤と同様であった。一方、26 週間毒性試験で使用された試験物質は高含有量の [redacted]（含有量：[redacted]%）、特に [redacted] を含んでおり、市販用製剤の代表ではなかった。表 2.6.6-8 に示されたように、13 及び 52 週間毒性試験で認められた血管変化は、26 週間毒性試験と比べると発生頻度は低く、重症度も低かった。このことは、26 週間毒性試験では高含有量の [redacted] によってこれらの所見がさらに悪化された仮説とも合致する。

13 及び 26 週間毒性試験ではそれぞれ 11 週間と 13 週間の回復期間が設定された。回復期間終了後に血管変化は認められず、マクロファージの食作用を含む IC の予想されたクリアランス[7]と一致する結果であった。

2.6.6.8.3.3.6　結論－IC が介在する血管変化に関する証拠の重み付け

検討結果の概要は表 2.6.6-9 及び表 2.6.6-10 に示されている。

作用機序評価から組み合わせた証拠の重み付けに基づくと、13、26 及び 52 週間反復投与毒性試験で認められた、主に肺及び脈絡叢における限局性の血管変化は、ADA の発生により二次的に生じた局所的な IC 沈着を介したものと考えられた。病変が特定の組織に局在した原因は不明であったものの、コンシズマブで認められた脈絡叢及び肺への局在を含む所見は、ヒトタンパク質をサルに投与すると生じる変化と一致していた [4,5,6,7]。

表 2.6.6-9　　26 週間毒性試験において、血管変化が認められた動物の組織学的検査所見と血漿／血清及び組織の特殊検査との相関性（試験番号：211087）

Animal#/ Sex	Dose (mg/kg)	Histopathology	IC-related granular deposits	ADAs	ICs (SEC+ ELISA)
6/M	3	CP: Inflammation, lymphoid foci Lung: Hypertrophy - endothelial cell	√ (lung)	Incon[b]	√
7/M	3	CP: Hypertrophy- endothelial cell	-	Pos	√
8/M	3	CP: Inflammation, lymphoid foci, Hypertrophy/hyperplasia- endothelial cell	√	Pos	√
26/F	3	CP: Inflammation, Hypertrophy/hyperplasia- endothelial cell	√[a]	Incon[b]	√
32/F	9	CP: Hypertrophy-endothelial cell	NA	Incon[b]	√
33/F	9	Lung: Intimal thickening	-	Incon[b]	√
34/F (decedent)	9	Lung: Intimal thickening, hypertrophy/ hyperplasia-endothelial cell	-	Incon[b]	√
16/M	30	CP: Inflammation (Vasculitis), Hypertrophy/hyperplasia –endothelial cell	√	Incon[b]	√
17/M	30	Lung: Intimal thickening, hypertrophy – endothelial cell	√	Incon[b]	√
18/M	30	Lung: Intimal thickening	√	Pos	√

[a]IC present only in associated macrophages. [b]Due to drug interference antibodies may be present, but not detectable.
Abbreviations: - = not detected; √ = present; ADA = anti-drug antibody; CP = choroid plexus; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; F = female(-s); IC = immune complex; IHC = immunohistochemistry; Incon = inconclusive; M = male(-s); NA = not analysed; Pos = positive; SEC = size exclusion chromatography.

表 2.6.6-10　52 週間毒性試験において、血管変化が認められた動物の組織学的検査所見と血漿／血清及び組織の特殊検査との相関性（試験番号：213542）

Animal#/ Sex	Dose (mg/kg)	Histopathology	IC-related granular deposits	ADAs	ICs (SEC+ ELISA)	CIC[a]
13-week interim sacrifice						
4001/M	9	CP: Inflammatory cell infiltration	-	Incon[c]	√	NA
4002/M	9	Lung: Intimal thickening	-	Incon[c]	√	NA
4502/F	9	Lung: Intimal thickening	√	Incon[c]	√	NA
4503/F	9	Lung: Intimal thickening	-	Incon[c]	√	NA
26-week interim sacrifice						
2004/M	0.5	CP: Inflammatory cell infiltration	-	Pos	√	√
3002/M	1	CP: Inflammatory cell infiltration	√	Pos	√	√
4006/M	9	Lung/liver: Intimal thickening	No clear deposits but increased IHC staining	Incon[c]	√	√
4506/F	9	CP: Inflammatory cell infiltration	√	Incon[c]	√	√
4508/F	9	CP: Inflammatory cell infiltration	-	Incon[c]	√	√
52-week repeat-dose toxicity study - 52-week terminal sacrifice						
2007/M	0.5	CP: Inflammatory cell infiltration	√	Pos[b]	√	-
2507/F	0.5	CP: Inflammatory cell infiltration	√	Pos	√	-
3505/F	1	CP: Inflammatory cell infiltration Lung: Intimal thickening	√ √	Incon[c]	√	-
4010/M	9	CP: Inflammatory cell infiltration	-	Incon[c]	√	-
4012/M	9	Lung: Intimal thickening	√	Incon[c]	√	√
4510/F	9	CP: Inflammatory cell infiltration	√	Incon[c]	√	-
4511/F	9	CP: Inflammatory cell infiltration	-	Incon[c]	√	-
4512/F	9	CP: Inflammatory cell infiltration	-	Incon[c]	√	-

[a]Increase in CIC levels 4 hours post-dose. [b]Negative in Weeks 44+52. [c]Inconclusive: due to drug interference antibodies may be present, but not detectable.

Abbreviations: - = not detected; √ = present; ADA = anti-drug antibody; CIC = circulating immune complex; CP = choroid plexus; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; F = female(-s); IC = immune complex; IHC = immunohistochemistry; Incon = inconclusive; M = male(-s); NA = not analysed; Pos = positive; SEC = size exclusion chromatography.

2.6.6.8.4　カニクイザルを用いた薬物相互作用毒性試験

コンシズマブによる予防治療を受ける血友病患者は出血に対する追加治療が必要になると考えられる。定常状態におけるコンシズマブの存在下で rFVIIa（ノボセブン®、破綻出血治療薬）を投与した際の安全性プロファイルと薬力学的相互作用を検討するため、カニクイザルを用いた 4 週間薬物相互作用毒性試験が実施された（M 2.6.7.17.D、試験番号：215431）[26]。コンシズマブが定常状態に達するよう、3 試験群のカニクイザル（1 群当たり雌雄各 3 頭）に負荷用量である 9 mg/kg を 4 日間投与した後、第 5 日～28 日まで 1 mg/kg/日を 28 日間投与した（表 2.6.6-11）。第 28 日に、0.25、0.5 及び 1 mg/kg の rFVIIa を 2 時間間隔で 3 回、ボーラスで静脈内注射したが、初回はコンシズマブ最終投与直後に注射した。対照群には溶媒を 28 日間皮下投与後、第 28 日に 1 mg/kg の rFVIIa を 3 回静脈内投与した。第 29 日にすべての動物を安楽死処置し、肉眼的及び顕微鏡的検査を行った。rFVIIa の投与時間

は、rFVIIa の終末相半減期が 2 時間未満であることから、rFVIIa によって潜在的な血栓が引き起こされることが予想される時間として選択された。最終投与後 1 日以内には血栓が形成されると考えられる。さらに、形成された血栓がこの時間で溶解されることは考えられない。

表 2.6.6-11　　カニクイザルを用いた rFVIIa との 4 週間薬物相互作用毒性試験における投与量及び 1 群当たりの動物数（試験番号：215431）

Group number	Dose level of concizumab s.c. (mg/kg/day)[a]	Dose level of rFVIIa i.v. (mg/kg/dose)[b]	Number of animals and sex
1	0	1	3M+3F
2	9/1	0.25	3M+3F
3	9/1	0.5	3M+3F
4	9/1	1	3M+3F

[a]Concizumab was administered with a loading dose of 9 mg/kg/day for Days 1-4, and 1 mg/kg/day from Day 5 to 28.
[b]rFVIIa was administered as three injections, two hours apart on Day 28, the first dose administered immediately after administration of concizumab.
Abbreviations: F = female; M = male; rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII.

標準的な毒性学的パラメータとして一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査（TAT 及び D-ダイマーを含む）、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査が実施された。さらに、コンシズマブに対する ADA 分析に加え、バイオマーカー（AT、プロテイン S、プロテイン C、遊離 TFPI）、rFVIIa（rFVIIa 血栓）とコンシズマブの TK（ELISA 及び TFPI 機能活性）も検査された。

結果

全投与動物でコンシズマブ又は rFVIIa の全身曝露が確認された。一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、プロテイン C、プロテイン S 及び器官重量は、いずれもコンシズマブ投与、rFVIIa 投与又はコンシズマブと rFVlla の併用投与による影響は認められなかった。さらに、投与に関連する肉眼的検査及び顕微鏡的検査の所見も認められなかった。

コンシズマブ又は rFVIIa の薬理作用に関連した変化は以下であった。遊離 TFPI はコンシズマブ投与動物の 1 頭を除くすべての動物で定量下限未満に低下したが、rFVIIa による影響は認められなかった。このコンシズマブ投与動物の 1 頭では、定量可能なレベルの遊離 TFPI が検出され、ADA 発生及びコンシズマブ曝露量の低下と相関していた。その他には投与に関連する ADA は検出されなかった。血漿中の TFPI 機能活性はコンシズマブを投与されたすべての動物で低下したが、rFVIIa 投与の影響はコンシズマブが投与されていても認められなかった。コンシズマブ投与動物において第 26 日のフィブリノゲン濃度は減少したが（投与前値の最小 0.61 倍）、rFVIIa の単独投与又はコンシズマブ存在下での併用投与に関して、意味のある影響は認められなかった。コンシズマブの事前投与の有無にかかわらず rFVIIa 投与後に PT が短縮し、第 29 日には投与前の値に戻った。コンシズマブと rFVIIa を併用投与後、TAT 濃度の増加（雄で投与前の最大 2.2 倍、雌で投与前の最大 6.3 倍）及び D-ダイマーの増加（雄で投与前の最大 6.5 倍、雌で投与前の最大 3.2 倍）が認められた（表 2.6.6-12）。コンシズマブ存在下での rFVIIa 投与群では、TAT 及び D-ダイマーに及ぼす影響は相加的であった。第 29 日では、TAT 及び D-ダイマーの濃度は概して投与前の濃度に戻ったが、コンシズマブと rFVIIa が投与された動物にお

ける濃度は、rFVIIa の単独投与よりも高い状態を維持した。定常状態濃度のコンシズマブ存在下での rFVIIa 投与群の AT 濃度は、第 28 日の rFVIIa 投与後に減少した（投与前の最小 0.8 倍）が、rFVIIa 及びコンシズマブの単独投与後では統計学的に有意な変化は認められなかった。

表 2.6.6-12　溶媒又はコンシズマブを 28 日間投与後の第 28 日に rFVIIa の 1 mg/kg を 2 時間間隔で 3 回投与し、第 29 日の終了試験時における血漿中 D-ダイマー及び TAT の変化（平均値±SD）

	Group 1 vehicle + 3 x 1 mg/kg rFVIIa (n=6; 3 males + 3 females)	**Group 4 concizumab + 3 x 1 mg/kg rFVIIa (n=6; 3 males + 3 females)**
D-dimers (mg/L)		
Day 26[a]	0.7 ± 0.2	3.8 ± 0.7
Day 28.3[b]	2.3 ± 0.6	7.0 ± 2.0
Day 29[c]	1.2 ± 0.3	4.7 ± 1.2
TAT (µg/L)		
Day 26[a]	7.9 ± 4.1	31.4 ± 6.9
Day 28.3[b]	49.6 ± 70.2	73.1 ± 49.9
Day 29[c]	13.6 ± 10.1	24.2 ± 6.7

[a]Effect of dosing of vehicle (Group 1) or concizumab (Group 4; 9 mg/kg/day for Days 1-4, 1 mg/kg/day from Day 5).
[b]Effect of 3 x 1 mg/kg rFVIIa at 2-hour intervals on Day 28 in the presence of vehicle (Group 1) or concizumab (Group 4). [c]On Day 29, full or partial recovery of increases in D-dimers and TAT was seen.
Abbreviations: rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII.

結論

カニクイザルに 28 日間投与されたコンシズマブは予想された血液凝固バイオマーカーに対する薬理作用、すなわちフィブリノゲンの減少並びに TAT 及び D-ダイマーの増加を引き起こし、第 28 日の rFVIIa 投与は予想された薬理作用である TAT 及び D-ダイマーの増加並びに PT 短縮を引き起こした。定常状態のコンシズマブ存在下での rFVIIa 投与群における TAT 及び D-ダイマーに対する効果は相加的であった。

定常状態のコンシズマブ存在下での rFVIIa の 3 回静脈内静脈内投与（1 回当たり 0.25、0.5 又は 1 mg/kg）のカニクイザルに対する忍容性は良好であり、毒性所見は認められず、定常状態濃度のコンシズマブが rFVIIa の安全性プロファイルに悪影響を及ぼす証拠も確認されなかった。定常状態濃度のコンシズマブ存在下での rFVIIa の NOAEL は 1 mg/kg、すなわち試験した最高用量であった。

2.6.6.8.5　組織因子の発現が増加した状態における理論的影響

特定の病理学的状態、例えば重度の全身性感染症及び敗血症では、TF の発現が増加する場合がある[27,28,29,30,31]。TFPI は TF 関連反応の制御に関与することから、TF の発現が増加した状況で TFPI が抑制されると、血栓形成が増加することにより、病理的状態が一層悪化する可能性が理論的に懸念されている[32]。

この懸念は非臨床試験モデルで評価されており、文献で報告されている。これらのデータから、非臨床試験モデルの TFPI が抑制されると、エンドトキシン血症又は重度の敗血症の状態に影響を及ぼす可能性が示唆されている。ウサギモデルでは、ポリクローナル TFPI 抗体を予め投与した後に TF 又はリポ多糖（LPS）を注入すると、血液凝固因子の濃度低下、血小板数の減少及び腎糸球体毛細血管床のフィブリン沈着が誘発される[33,34]。さらに、モノクローナル TFPI 抗体をヒヒに投与した検討では、モノクローナル TFPI 抗体により TFPI が抑制され、抗原として *Escherichia coli* を静脈内接種 24 時間後、2 頭に肺のフィブリン沈着が増強された。この要因としては、おそらく TF と TFPI の不均衡によるものと考えられる[35]。最後に、内皮細胞特異的 TFPI 欠損マウスでは、LPS 誘発肺炎症及び血管内皮細胞バリアの透過性が亢進した[36]。

エンドトキシン血症及び敗血症の動物モデルはヒトへの外挿性が乏しいことが知られていることから[37,38,39,40]、これらの研究結果がコンシズマブの予防治療を受ける血友病患者に関連するかは不明である。

コンシズマブの非臨床安全性試験では、TF の発現が増加する状態について特に検討していない。また、このようなモデルは臨床状況への外挿性が乏しいことから、非臨床モデルで評価する意義はないと考えられる。

文献の報告に基づくと、仮に TF の発現が増加した患者にコンシズマブが使用される場合には、他の血液凝固促進物質で予想されるように、理論的には血栓事象の懸念は否定できない。

2.6.6.8.6　コンシズマブの臨床用製剤に含まれる添加剤の評価

非臨床安全性試験で使用された製剤処方（NNC 0172-2021 及びコンシズマブ A）並びに臨床試験及び計画中の市販用製剤処方の比較を表 2.6.6-13 に示す。非臨床試験で使用された製剤は開発ステージでの異なる段階のものを示している。

表 2.6.6-13　製剤組成開発の概要

Drug product composition	**NNC 0172-2021**	**Concizumab A**	**Concizumab B**	**Concizumab C (commercial)**
Formulation	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Component	[redacted]			
Concizumab DS	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
L-arginine HCl	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
L-histidine	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Sodium Chloride	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

Drug product composition	**NNC 0172-2021**	**Concizumab A**	**Concizumab B**	**Concizumab C (commercial)**
Sucrose	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Polysorbate 80	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Phenol	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Water for injection	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
pH[a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Nonclinical safety studies	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Clinical trials	Phase 1a (NN7415-3813, -3981 and -3986)	Phase 1b (NN7415-4159)	Phase 2 (NN7415-4255 and -4310)	Phase 3 (NN7415-4311, -4307 and -4807)

[a]pH adjusted by HCl / NaOH.

Abbreviations: N/A = not applicable; q.s. = quantum satis.

臨床製剤処方に含まれた添加剤は既知のものであり、また、長期間の皮下及び静脈内投与で使用される、他の既承認医薬品における使用量と同等又はより高用量が使用されている。また、これらの添加剤は[redacted]〔[redacted]（3.2.P.2.1）〕に示されている。

フェノールを除き、非臨床試験に含まれたすべての添加剤は臨床用製剤の濃度と同様であった。コンシズマブ製剤中のフェノール含量は[redacted]%（w/v）であり、既承認医薬品に含まれるフェノール含有量を下回っている。

2.6.6.8.7　不純物の安全性評価

不純物の安全性評価は製造バッチ並びにカニクイザルを用いた 4、13 及び 52 週間毒性試験で得られた NOAEL に基づいている。各相の臨床開発を裏付ける非臨床試験使用バッチの概要を表 2.6.6-14 に示す。

開発中、目的物質由来不純物の測定に適用した分析原理が継続的に最適化された（3.2.S.4.2）。製造段階と市販段階の製品の直接比較を容易にするため、非臨床試験で使用された製剤バッチは、純度と[redacted]（[redacted]）を測定する出荷規格試験法を用いて再分析された。得られた測定結果は第 3 相試験用に製造された製剤の原薬バッチで得られた測定結果の範囲内であり（3.2.S.4.5）、代表的な非臨床試験用バッチと考えられる。原薬バッチは製造後-80°C で保存され、この保存条件は原薬の安定性確保に最適であることが示されている（3.2.S.7.1）。

[redacted]及び[redacted]の分析パラメータが開発後期に採用されたが、非臨床試験で使用された原薬バッチに関して新たに得られたデータ（表 2.6.6-16）は、原薬及び製剤バッチで得られ

た範囲内のレベルである（3.2.S.4.4 及び 3.2.P.5.4）。したがって、[redacted]及び[redacted]のレベルは、非臨床試験で使用された時点での原薬レベルとも同等と考えられる。

ICH M4S（R2）ガイドライン[41]に準拠し、開発中に非臨床試験及び臨床試験で使用された被験物質の同等性・同質性が評価されている（3.2.S.2.6）。4、13 及び 52 週間毒性試験で使用された被験物質の品質は、臨床試験で使用された被験物質及び市販用製剤との同等性・同質性が確認された。一方、26 週間毒性試験で使用された被験物質には高含有量の[redacted]（[redacted]%）、特に[redacted]が含まれており、現在の保存期間中の[redacted]に関する有効期間内規格の限界値（[redacted]%；表 2.6.6-16）よりもはるかに高かった。したがって、この被験物質は代表的な臨床試験用物質ではないことから、不純物の安全性評価には用いられなかった。

原薬に関して、非臨床試験用バッチの製造工程由来不純物の含量が提案される原薬の出荷時規格の評価基準と比較されており、毒性試験で使用された動物は、ヒトにおける最大臨床用量（0.25 mg/kg/日）と比較して、NOAEL 投与でも同等かそれ以上に不純物に曝露されていたことが示された。（表 2.6.6-15）。製造工程由来不純物は原薬の規格（3.2.S.4.1）で管理されており、製剤の製造における精製行程で効率的に除去された（3.2.S.2.5）。したがって、製造工程由来不純物によるヒトでの毒性学的懸念は生じないと考えられる。

製剤に関して、非臨床試験用バッチにおける製造工程由来不純物の含量は、提案される有効期間内規格（EOSL）及び製品使用時の評価基準と比較されている。ヒトにおける最大臨床用量（0.25 mg/kg/日）と比較すると、毒性試験における NOAEL 投与では、動物はより高濃度の不純物に曝露されていたことが示されている（表 2.6.6-16）。

結論として、コンシズマブ製剤の不純物量は非臨床試験において安全性が確認されたと考えられ、提案される製品使用時の評価基準は妥当と考えられる。EOSL の規格限界は製品使用時の評価基準よりも低値であることから、EOSL の規格限界も妥当と考えられる。

表 2.6.6-14　　非臨床試験バッチの概要

Drug product batch no.	Drug substance batch no.	Study ID	Type of study	Other use of drug substance batch
[redacted]	[redacted]	210130	4-week s.c. and i.v. administration toxicity study in the cynomolgus monkey	[redacted]
[redacted]	[redacted]	209206	13-week s.c. and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys followed by an 11-week recovery period	[redacted]
[redacted]	[redacted]	211087	26-week s.c. and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys followed by a 13-week recovery period	[redacted]
[redacted]	[redacted]	211087	26-week s.c. and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys followed by a 13-week recovery period	[redacted]
[redacted]	[redacted]	213542	52-week s.c. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys with 13- and 26-week interim groups	[redacted]

[redacted]

表 2.6.6-15　　原薬の評価基準におけるコンシズマブ原薬由来不純物の適格性

Process-related impurities	**Drug substance acceptance criteria**	**Content Nonclinical Batch [redacted] (4-week tox)**	**Content Nonclinical Batch [redacted] (13-week tox)**	**Content Nonclinical Batch [redacted] (52-week tox)**	**Impurity exposure at nonclinical NOAEL vs clinical exposure at 0.25 mg/kg[b,c] (Ratio)**
Host Cell Protein (HCP) ([redacted])	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Residual ＊不純物J	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

＊新薬承認情報情報提供時に置き換え

表 2.6.6-16　　提案する使用時規格におけるコンシズマブ製剤由来不純物の適格性

Purity or product-related impurity	Drug product specification criteria		Content Nonclinical batches			Impurity exposure at nonclinical NOAEL vs. clinical exposure at 0.25 mg/kg [redacted] (Ratio)
	End-of-shelf-life	In-use	[redacted] (4-week tox)	[redacted] (13-week tox)	[redacted] (52-week tox)	
Purity (%)[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted] (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

[redacted]

2.6.6.8.8　溶出物の安全性評価

一次包装材料からの溶出物の安全性が評価されており、患者への安全性の懸念はないと考えられる（詳細は 3.2.P.2.4 を参照）。

2.6.6.8.9　臨床曝露量と比較した慢性投与毒性試験の曝露量

カニクイザルを用いた慢性毒性試験で関連した用量での血漿中コンシズマブ曝露量と、インヒビターを有する血友病 A 及び血友病 B 患者を組み入れた第 3 相臨床試験（4311 試験）で得られた臨床曝露量の概要を表 2.6.6-17 に示す。

表 2.6.6-17　52 週間毒性試験と第 3 相臨床試験（4311 試験）における曝露量

Species	Study/trial	Dose frequency	Subcutaneous dose (mg/kg/day)	Exposure	
				C_{max} (ng/mL) mean (min; max)	$AUC_{0\text{-}24h\ SS}$ (h*ng/mL) mean (min; max)
Monkey	213542[a]	Daily	0.5 (NOAEL)	82,600 (75,300; 89,900)	1,910,000 (1,660,000; 2,160,000)
			1 (thrombi)	309,000 (249,000; 423,000)	6,890,000 (5,700,000; 9,140,000)
Human	NN7415-4311	Daily	0.2[b]	1,167 (70.4; 6,710)	22,400 (1,480; 145,590)

Note: For Study ID 213542, the values are the geometric mean (min; max) of male and female animals. Values are shown with three significant digits. For the human data, the values are the geometric mean (min; max).
[a]Mean of ADA-negative or low ADA titre animals. [b]Clinical dosing regimen as described in text below.
Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximum concentration; NOAEL = no observed adverse effect level; SS = steady state

4311 試験におけるコンシズマブの用法・用量は、1 日目に 1 mg/kg を負荷投与後、以降は 1 日 1 回、0.20 mg/kg 投与である。4 週間投与後に測定される血漿中コンシズマブ曝露量に基づき、維持用量は 1 日 1 回、0.15、0.20 又は 0.25 mg/kg に増減された。曝露量比の算出用に 3 用量がすべて使用された。

0.15 及び 0.25 mg/kg/日の用量は、0.2 mg/kg/日では高すぎる又は十分な血漿中曝露が得られない患者でのみ使用された。これらの曝露量の差異は患者ごとの標的介在性の薬物動態（TMDD）の変動によって引き起こされる。

曝露量比の算出には、投与 24 週間後の臨床曝露量が用いられた。52 週間毒性試験〔試験番号：213542（2.6.6.3.4）〕の NOAEL（0.5 mg/kg/日）及び血栓が認められた用量の定常状態での平均曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）がコンシズマブの臨床曝露量と比較された（表 2.6.6-18）。NOAEL（0.5 mg/kg/日）におけるサルの曝露量は、4311 試験で得られたヒトの曝露量の 70 倍超であった。

表 2.6.6-18　　動物における慢性毒性試験の NOAEL とヒトの平均曝露量に基づく動物－ヒトの曝露量比

Clinical dose[a] (mg/kg/day)	**Exposure ratios (monkey/human)[b]**			
	At NOAEL (0.5 mg/kg/day)		**At lowest exposure level where thrombi were seen (1 mg/kg/day)**	
	C_{max} (ng/mL)	**$AUC_{0\text{-}24h\ SS}$ (h*ng/mL)**	**C_{max} (ng/mL)**	**$AUC_{0\text{-}24h\ SS}$ (h*ng/mL)**
0.2	71	85	264	308

[a]Clinical dosing regimen as described in text above. [b]Calculation of exposure ratios: monkey exposure/human exposure (see 表 2.6.6-17 for exposures).

Abbreviations: AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximum concentration; SS = steady state.

サルにおいて血栓が認められた最低用量（1 mg/kg/日）での曝露量は、ヒトの曝露量の 250 倍超であった（表 2.6.6-18）。

2.6.6.9 考察及び結論

コンシズマブの毒性試験プログラムは、ヒトに対する長期投与を支持するため ICH M3（R2）[1] 及び ICH S6（R1）[2] ガイドラインに従って策定された。幼若及び性成熟に達した雌雄カニクイザルにおいて実施された最長 52 週間の非臨床毒性試験において、コンシズマブの概ね良好な忍容性が示され、性差は認められなかった。

13、26 及び 52 週間毒性試験において 2 つの明らかな毒性所見として血栓及び限局性の血管変化が認められた。これらの所見は概して同一の動物からは認められなかったことから、異なる病因により発症したものと考えられた。安全性薬理、免疫毒性及び受胎能の評価項目には毒性学的に意味のある変化はみられなかった。

血栓は主に肺及び心臓に、また他の器官（肝臓、脾臓、精巣上体、胸腺及びリンパ節）でも認められ、正常な血液凝固系を有するサル（非血友病）に血液凝固促進物質を投与した際の過剰な薬理反応と考えられた。血栓に関する NOAEL は 52 週間慢性毒性試験の 0.5 mg/kg/日（皮下投与）であり、この用量での曝露量比はヒト曝露量の 70 倍超であった。サルで 52 週間後に血栓が認められた最低用量（1 mg/kg/日）での曝露量は、ヒト曝露量の 250 倍超であった。

局所性の血管変化は、内皮細胞肥大、内皮細胞下の肥厚又は炎症性細胞浸潤であり、主として脳の脈絡叢、肺及び注射部位で認められた。作用機序を詳細に検討した結果から、これらの所見は ADA の発生により生じる IC 形成により引き起こされたものであると結論され、他のバイオ医薬品でも報告されている [3,4,5,6,7]。動物試験は、一般的にヒト治療用タンパク質製剤に対する免疫反応の予測可能性が乏しいことが認識されている [2,6,8]。さらに、ヒトではコンシズマブのようなヒト化モノクローナル IgG 抗体に対する免疫反応は低いことが予想され、また、毒性試験の動物と比較してより低濃度のコンシズマブに曝露されることから、ヒトではクリアランス容量を超える IC 形成のリスクは低いと考えられる。

毒性試験を通して 3 頭の動物が試験途中で安楽死処置された。26 週間毒性試験では、9 mg/kg/日を 18 週間皮下投与された 1 頭が死亡し、この動物では貧血に加え広範な肺実質壊死の原因となる血栓が認められたことから、おそらく投与に関連した過剰な薬理作用による可能性が考えられた。その他の 2 頭の動物の死因は、それぞれ同居動物との闘争後の胃腸管障害又は傷害によるものであったことから、投与との関連性はないと考えられた。

すべての毒性試験で、予想されるコンシズマブの薬理作用である血液凝固促進作用と一致して、投与に関連したフィブリノゲンの減少並びに D-ダイマー及び TAT の増加が認められた。毒性試験の第 1 日の投与後には、すでに D-ダイマー及び TAT の増加が認められ、1 週間後にはプラトーに達する傾向がみられたが、52 週間までの投与期間中の変動はわずかであった。

血栓成過程でフィブリノゲンはフィブリンへと変換され、主にフィブリン架橋によりフィブリン塊を形成する。TAT は凝固活性マーカーであり、トロンビンが AT 不活性化される際に生成される [9]。D-ダイマーは血栓形成中に架橋形成フィブリンが溶解されるときに形成され [10]、D-ダイマーの増加は血

液凝固系が活性化状態にありかつフィブリン塊が溶解状態にあることを示す。臨床の使用状況（血友病以外）では、D-ダイマーは血栓症の陰性判定の指標として利用され、すなわち、D-ダイマーが正常レベルにあれば血栓症は除外される[10]。しかしながら、D-ダイマーの増加は複数の病因を有していることから、血栓症の指標としての D-ダイマー濃度変化の特異性は低い[42]。

フィブリノゲン濃度は反復投与後に減少し、52 週間の投与期間中の変動はわずかであり（対照群動物の 0.41 倍～0.89 倍の変動）、投与 1 週間後には低レベルで定常状態に達した。

26 及び 52 週間毒性試験においてヒトの曝露量の 630 倍を超える曝露量に相当する高用量（≥ 3 mg/kg/日）を投与された動物では、軽度な APTT 及び PT の延長（対照群動物の最大 1.29 倍）又は血小板数が減少（対照群動物の最小 0.44 倍）した以外に、血小板パラメータ、APTT 及び PT に関して毒性は認められなかった。

軽微な AT 及びプロテイン C の減少がみられたが、大きな変化ではなかったことから毒性学的意義はないと考えられ、プロテイン S にも特筆すべき影響はみられなかった。

全体として、これらの変化は予想されたコンシズマブの薬理作用に一致する変化であり、臨床の使用状況ではいずれもモニタリング可能である。サルで認められた血栓所見から示されたように、正常な血液凝固能を有するサルでは、血液凝固系の過剰反応が起こっていたと考えられる。

投与群の全動物でコンシズマブの曝露が確認された。予想された通り、コンシズマブの投与により遊離 TFPI 濃度が減少し、遊離 TFPI とコンシズマブ結合型 TFPI を含む総 TFPI 濃度は増加した。コンシズマブに対する ADA の発生が数頭の動物で確認され、一部のケースではコンシズマブの曝露と血液凝固マーカーに関する薬理作用に影響を及ぼしたことが確認された。

局所刺激性は反復投与毒性試験に組み入れて評価された。毒性試験を通して皮下投与後に軽度の炎症反応が認められたが、ヒトにおける投与は許容可能と考えられた。

コンシズマブの予防治療中の出血に対し、止血の追加治療を必要とする患者の状況を模倣するため、4 週間薬物相互作用毒性試験が行われた。本試験では、コンシズマブをカニクイザルに 1 日 1 回 28 日間投与し、第 28 日の投与後から 2 時間間隔で 3 回、rFVIIa を 0.25, 0.5 又は 1 mg/kg の用量で静脈内投与した。動物は第 29 日に安楽死処置した。血栓又はその他の過剰な凝固に関連した一般状態変化も含め、投与に関連した毒性は認められなかった。コンシズマブ又は rFVIIa 投与は、両薬物が存在するとき相加的傾向のある血液凝固系の活性化を示唆する TAT 及び D-ダイマーの増加を誘発した。

非臨床毒性試験は正常レベルの凝固因子である FVIII 及び FIX を有する正常な血液凝固能を有するカニクイザルにおいて実施された。この状況は血友病 A 及び B の患者にそれぞれ FVIII 製剤又は FIX 製剤が投与され、その上にコンシズマブが併用投与される状況に対応することから、ノボ ノルディスク社は、血友病患者における FVIII 剤又は FIX 剤の併用用法に関連した安全性は、毒性試験で裏付けられていると考える。したがって、コンシズマブと FVIII 及び FIX に関連した追加の *in vivo* 薬物相互作用試験は実施していない。

コンシズマブは天然の内因性アミノ酸で構成されることから遺伝毒性は生じないと予想され、またコンシズマブの変異原性を示唆する作用機序データもないことから、コンシズマブの遺伝毒性試験は実施されていない。

コンシズマブはげっ歯類に作用しないことからがん原性試験は実施しなかった。その代わり、コンシズマブのがん原性評価について、作用機序の考察、関連する文献検討、非臨床試験及び臨床試験データの評価による証拠の重みづけアプローチを適用して検討した。他の血液凝固促進物からも予想されるように、コンシズマブの投与により、潜在的にある種のがん患者においてプロトロンビン形成状態を増強する可能性が考えられる。しかしながら、実施された評価からは、コンシズマブの投与がヒトに腫瘍形成を誘発又は増強するリスクを高めるとの証拠は特定されなかった。

正常な血液凝固系を有する動物を用いてコンシズマブの生殖発生毒性試験を実施する意義はないと考えられたことから、これらの試験は実施されなかった。性成熟した雌雄カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験において、受胎能評価項目に関する特別な評価が組み入れられた。これらの評価からは、コンシズマブの受胎能に及ぼす影響は認められなかった。さらに、幼若及び性成熟した雌雄カニクイザルを用いた最長 52 週間までの毒性試験において、生殖器官の病理組織学的検査を実施したが、生殖器官に毒性は認められなかった。

総合すると、毒性試験プログラムからコンシズマブの安全性プロファイルは適切に特性解析がなされており、非臨床データは提案する効能を裏付けると考える。

参考文献

[1] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2), Current step 4 version. 11 Jun 2009.

[2] 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.

[3] Heyen JR, Rojko J, Evans M, Brown TP, Bobrowski WF, Vitsky A, et al. Characterization, Biomarkers, and Reversibility of a Monoclonal Antibody-induced Immune Complex Disease in Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis). Toxicol Pathol. 2014;42(4):765-73.

[4] Leach MW, Rottman JB, Hock MB, Finco D, Rojko JL, Beyer JC. Immunogenicity/hypersensitivity of biologics. Toxicol Pathol. 2014;42(1):293-300.

[5] Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, et al. Formation, Clearance, Deposition, Pathogenicity, and Identification of Biopharmaceutical-related Immune Complexes: Review and Case Studies 1. Toxicol Pathol. 2014;42(4):725-64.

[6] Brennan FR, Baumann A, Blaich G, de HL, Fagg R, Kiessling A, et al. Nonclinical safety testing of biopharmaceuticals - Addressing current challenges of these novel and emerging therapies. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;73(1):265-75.

[7] Frazier KS, Engelhardt JA, Fant P, Guionaud S, Henry SP, Leach MW, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee Points-to-consider Paper: Drug-induced Vascular Injury Associated with Nonsmall Molecule Therapeutics in Preclinical Development: Part I. Biotherapeutics 1. Toxicol Pathol. 2015.

[8] Food and Drug Administration, CDER and CBER. Guidance for Industry. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. Aug 2014.

[9] Stegnar M, Vene N, Bozic M. Do haemostasis activation markers that predict cardiovascular disease exist? Pathophysiol Haemost Thromb. 2003;33(5-6):302-8.

[10] Wells PS, Owen C, Doucette S, Fergusson D, Tran H. Does this patient have deep vein thrombosis? JAMA. 2006;295(2):199-207.

[11] Chamanza R. Non-human primates: cynomolgus (Macaca fascicularis) and rhesus (Macaca mulatta) macaques and the common marmoset (Callithrix jacchus). In: McInnes E, Mann P, editors. Background Lesions in Laboratory Animals: W.B. Saunders; 2012. p. 1-15.

[12] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7 (6): 330-339.

[13] Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2007; 109 (5): 1146-1155.

[14] Ellery PE, Maroney SA, Cooley BC, Luyendyk JP, Zogg M, Weiler H, et al. A balance between TFPI and thrombin-mediated platelet activation is required for murine embryonic development. Blood. 2015;125(26):4078-84.

[15] Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. Blood. 1997;90(3):944-51.

[16] Wood JP, Ellery PE, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. Blood. 2014;123(19):2934-43.

[17] DeSesso JM, Williams AL, Ahuja A, Bowman CJ, Hurtt ME. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. Crit Rev Toxicol. 2012;42(3):185-210.

[18] Gardiner C, Cohen H, Austin SK, Machin SJ, Mackie IJ. Pregnancy loss, tissue factor pathway inhibitor deficiency and resistance to activated protein C. J Thromb Haemost. 2006;4(12):2724-6.

[19] Martinuzzo M, Iglesias Varela ML, Adamczuk Y, Broze GJ, Forastiero R. Antiphospholipid antibodies and antibodies to tissue factor pathway inhibitor in women with implantation failures or early and late pregnancy losses. J Thromb Haemost. 2005;3(11):2587-9.

[20] Chalmers EA. Neonatal coagulation problems. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004;89(6):F475-8.

[21] Albisetti M. The fibrinolytic system in children. Semin Thromb Hemost. 2003;29(4):339-48.

[22] Engelhardt JA. Predictivity of animal studies for human injection site reactions with parenteral drug products. Exp Toxicol Pathol. 2008;60(4-5):323-7.

[23] Bajaj MS, Steer S, Kuppuswamy MN, Kisiel W, Bajaj SP. Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes. Thromb Haemost. 1999;82(6):1663-72.

[24] Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. J Pathol. 2006;208(3):327-39.

[25] Rugeri L, Susen S, Bard JM, Corseaux D, Gavériaux V, Devos P, et al. Monocyte tissue factor response is decreased in patients with hyperlipidemia. Thromb Res. 1999;96(4):283-92.

[26] 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.

[27] Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(1):47-56.

[28] Levi M, Keller TT, van GE, ten CH. Infection and inflammation and the coagulation system. Cardiovasc Res. 2003;60(1):26-39.

[29] Mast AE, Stadanlick JE, Lockett JM, Dietzen DJ, Hasty KA, Hall CL. Tissue factor pathway inhibitor binds to platelet thrombospondin-1. J Biol Chem. 2000;275(41):31715-21.

[30] Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(8):1545-50.

[31] Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(6):1015-22.

[32] Boban A, Hermans C. Safety of relaxing coagulation control by anti-tissue factor pathway inhibitor in hemophilia patients: Impact of tissue distribution of tissue factor. J Thromb Haemost. 2020;18(9):2412-4.

[33] Sandset PM, Warn-Cramer BJ, Rao LV, Maki SL, Rapaport SI. Depletion of extrinsic pathway inhibitor (EPI) sensitizes rabbits to disseminated intravascular coagulation induced with tissue factor: evidence supporting a physiologic role for EPI as a natural anticoagulant. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(3):708-12.

[34] Sandset PM, Warn-Cramer BJ, Maki SL, Rapaport SI. Immunodepletion of extrinsic pathway inhibitor sensitizes rabbits to endotoxin-induced intravascular coagulation and the generalized Shwartzman reaction. Blood. 1991;78(6):1496-502.

[35] Tang H, Ivanciu L, Popescu N, Peer G, Hack E, Lupu C, et al. Sepsis-induced coagulation in the baboon lung is associated with decreased tissue factor pathway inhibitor. Am J Pathol. 2007;171(3):1066-77.

[36] Wang BQ, Shi M, Zhang JP, Wu X, Chang MJ, Chen ZH, et al. Knockdown of TFPI-Anchored Endothelial Cells Exacerbates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Via NF-κB Signaling Pathway. Shock. 2019;51(2):235-46.

[37] Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(10):854-65.

[38] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. J Clin Invest. 2003;112(4):460-7.

[39] Munford RS. Murine responses to endotoxin: another dirty little secret? J Infect Dis. 2010;201(2):175-7.

[40] Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Moldawer LL, Mohr AM, Efron PA. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? ILAR J. 2017;58(1):90-105.

[41] ICH Harmonised Tripartite Guideline. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Safety - M4S(R2). Nonclinical Overview and Nonclinical Summaries of Module 2. Organisation of Module 4, Current Step 4 version. 20 Dec 2002.

[42] Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, Büller HR, Zwinderman AH, Bossuyt PM. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. J Thromb Haemost. 2007;5(2):296-304.

コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
毒性試験の概要表 3
2.6.7.1 毒性試験の一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 9
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 11
2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧 14
2.6.7.5 単回投与毒性試験 15
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 17
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 18
2.6.7.7.A カニクイザルを用いた 4 週間皮下投与及び静脈内投与毒性試験（210130） 18
2.6.7.7.B カニクイザルを用いた 13 週間皮下投与及び静脈内投与毒性／安全性薬理試験及び 11 週間回復性試験（209206） 24
2.6.7.7.C カニクイザルを用いた 26 週間皮下投与及び静脈内投与毒性・安全性薬理試験及び 13 週間回復性試験（211087） 40
2.6.7.7.D カニクイザルを用いた 52 週間皮下投与毒性試験（213542） 56
2.6.7.8 遺伝毒性試験：*in vitro* 69
2.6.7.9 遺伝毒性試験：*in vivo* 69
2.6.7.10 がん原性試験 69
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 69
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 69
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験 70
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 70
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 70
2.6.7.16 局所刺激性 71
2.6.7.17 その他の毒性試験 73
2.6.7.17.A 交差反応性 73
2.6.7.17.B コンシズマブ[redacted]及び[redacted]型の特性解析 74
2.6.7.17.C 免疫複合体介在性の病理所見に関する作用機序検討試験 76
2.6.7.17.D カニクイザルを用いた rFVIIa との併用投与による薬物相互作用試験 79
2.6.7.17.E 毒性試験で評価されたバイオマーカー 83

毒性試験の概要表

2.6.7.1　毒性試験の一覧表

Test article: concizumab

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Single-dose toxicity								
Single-dose study (with toxicity endpoints)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v.	Single dose	2, 20	No	[redacted]	[redacted]081101 (part of pharmacokinetics study)	4.2.2.2-4
Repeated single-dose study (with toxicity endpoints)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v.	Two single doses, 14 days apart	0.1, 0.5, 1	Yes	[redacted]	210156 (part of pharmacokinetics study)	4.2.2.2-5
Repeated single-dose toxicity study (Escalating doses) (Dose Range Finding)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	Three single escalating doses, 14 days apart	2/20/80 20/80/160 80/160/200	No	[redacted]	208250	4.2.3.1-1
Repeat-dose toxicity								
4-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	4 weeks	3, 9 0, 30	Yes	[redacted]	210130	4.2.3.2-1
13-week repeat-dose toxicity study with an 11-week recovery period	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	13 weeks + 11 weeks recovery	0, 1, 10, 50 200	Yes	[redacted]	209206	4.2.3.2-2

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study ID	Location in CTD
26-week repeat-dose toxicity study with a 13-week recovery period	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 30	Yes	[redacted]	211087	4.2.3.2-3
52-week repeat-dose toxicity study with 13- and 26-week interim groups	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily)	52 weeks	0, 0.5, 1, 9	Yes	[redacted]	213542	4.2.3.2-4
Genotoxicity No studies performed								
Carcinogenicity No studies performed								
Reproductive and developmental toxicity No studies performed.								

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Local tolerance								
No dedicated local tolerance studies performed. Local tolerance assessment was integrated in the 4-, 13-, 26- and 52-week repeat-dose toxicity studies (Study IDs 210130, 209206, 211087 and 213542, respectively) and the 4-week drug-drug interaction study with rFVIIa (Study ID 215431).								
Other toxicity studies								
Tissue cross-reactivity								
Tissue cross-reactivity	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), Human	*In vitro*	N/A	N/A	No	[redacted]	209125	4.2.3.7.7-1
Tissue cross-reactivity	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), Human	*In vitro*	N/A	N/A	Yes	[redacted]	209280	4.2.3.7.7-2
Characterisation of [redacted] and [redacted] forms of concizumab								
Separation of concizumab [redacted] by SEC	N/A	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	215027	4.2.3.7.3-1
Functional characterisation of [redacted] and [redacted] forms of concizumab	N/A	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]130901	4.2.3.7.3-2

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study ID	Location in CTD
In vitro binding of concizumab batches with different [redacted] content to Fc receptors by SPR	Recombinant human and cynomolgus monkey proteins	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk Research Centre China, Novo Nordisk A/S, CN	215094	4.2.3.7.3-3
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of concizumab batches with different [redacted] content	EA hy926WT and EA hy926AR cell lines and human blood cells	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	214488	4.2.3.7.3-4
Binding and internalisation of concizumab batches with different [redacted] content	EAHy926, HUVEC	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]131001	4.2.3.7.3-5
Endothelial activation by concizumab	HUVEC	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]130901	4.2.3.7.3-6
Mechanistic studies to investigate immune complex-mediated pathology								
Biodistribution and IHC in choroid plexus from 26-week toxicity (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), tissue	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]130402	4.2.3.7.3-7
SEC followed by ADA analysis and IC ELISA in plasma samples from 52-week toxicity (Study ID 213542)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis),* plasma	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	214449	4.2.3.7.3-8

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Complement activation and CIC in serum samples from 52-week toxicity (Study ID 213542)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis),* serum	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S, DK	214471	4.2.3.7.3-9
Investigation of immune complexes in tissue (tissues of selected animals from 26-week toxicity (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	*In vitro* (Immunohisto-chemistry)	N/A	N/A	No	[redacted]	214391	4.2.3.7.3-10
Investigation of immune complexes in tissue (tissues of selected animals from 52-week toxicity (Study ID 213542)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	*In vitro* (Immunohisto-chemistry)	N/A	N/A	No	[redacted]	214400	4.2.3.7.3-11
Drug-drug interaction with rFVIIa								
4-week drug-drug interaction study with rFVIIa	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	concizumab: s.c. (once daily) rFVIIa: i.v. (Day 28; three administrations with two-hour intervals)	4 weeks	Day 1-4: 0, 9 Day 5-28: 0, 1 Day 28: 1, 0.25, 0.5, 1	Yes	[redacted]	215431	4.2.3.7.7-3
Biomarker evaluations for toxicity studies – reported separately								
Free TFPI, Total TFPI and TFPI functionality measurement in Repeated single-dose escalation toxicity study (Study ID 208250)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	Three single escalating doses, 14 days apart	2/20/80 20/80/160 80/160/200	No	Novo Nordisk A/S, Denmark	210142	4.2.2.2-6

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Antithrombin and Protein C measurement in 4- and 13-week repeat-dose toxicity studies (Study IDs 210130 and 209206, respectively)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	4 weeks 13 weeks + 11 weeks recovery	3, 9 (s.c.) 0, 30 (i.v.) 0, 1, 10, 50 (s.c.) 200 (i.v.)	No	[redacted] Novo Nordisk A/S, DK (statistics)	212058	4.2.3.7.7-4
Antithrombin and Protein C measurement in 26-week repeat-dose toxicity study (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 30	No	Novo Nordisk A/S, DK	212391	4.2.3.7.7-5
Concizumab bound TFPI and free TFPI measure-ment in 26-week repeat-dose toxicity study (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 30	No	Novo Nordisk A/S, DK	213391	4.2.3.7.7-6
IL-6, IL-1β, IFN-γ, TNFα, E-Selectin and ICAM-1 in 26-week repeat-dose toxicity study (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 30	No	[redacted]	213528	4.2.3.7.7-7
Biomarker Analysis of Total-TFPI in 52-week repeat-dose toxicity study (Study ID 213542)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily)	52 weeks	0, 0.5, 1, 9	No	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]141003	4.2.3.7.7-8

[a]The highest NOAEL is underlined.

Abbreviations: ADCC = Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; [redacted] = [redacted]; N/A = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level.

2.6.7.2　トキシコキネティクス試験の一覧表

Test article: concizumab

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Study ID	Location in CTD
Single-dose toxicity						
Single-dose study (with toxicity endpoints)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v.	2, 20	No	[redacted]081101	4.2.2.2-4
Repeat single-dose PK/PD study (with toxicity endpoints)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v.	0.1, 0.5, 1	Yes	210156	4.2.2.2-5
Repeat single-dose toxicity study (Escalating doses) (Dose Range Finding)	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	2/20/80 20/80/160 80/160/200	No	208250	4.2.3.1-1
Repeat-dose toxicity						
4-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	3, 9 0, 30	Yes	210130	4.2.3.2-1
13-week repeat-dose toxicity study with an 11-week recovery period	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	0, 1, 10, 50 200	Yes	209206	4.2.3.2-2
26-week repeat-dose toxicity study with a 13-week recovery period	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily) i.v.(once weekly)	0, 3, 9 30	Yes	211087	4.2.3.2-3
52-week repeat-dose toxicity study with 13- and 26-week interim groups	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (once daily)	0, 0.5, 1, 9	Yes	213542	4.2.3.2-4

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Study ID	Location in CTD
4-week drug-drug interaction study with rFVIIa	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	concizumab: s.c. (once daily) rFVIIa: i.v. (Day 28; three administrations with two-hour intervals)	Day 1-4: 0, 9 Day 5-28: 0, 1 Day 28: 1, 0.25, 0.5, 1	Yes	215431	4.2.3.7.7-3

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test article: concizumab

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/mL)[a]	
				M	F
Single-dose study in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	[redacted]081101 (with toxicity endpoints)	i.v	2 mg/kg 20 mg/kg	746,609 46,647,523	N/A N/A

[a]Values for individual animals.

Abbreviations: N/A = not applicable.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/mL)[a]	
				M	F
Repeated single-dose PK/PD study in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	210156 (with toxicity endpoints)	i.v	0.1 mg/kg 0.5 mg/kg 1 mg/kg	819-924 44,700-90,600 418,000-539,000	824-1,770 65,800-77,600 293,000-389,000

[a]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 0.5 mg/kg, only results from second single dose reported.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	AUC_{0-336h} (h*ng/mL)[a]	
				M	F
Repeated single-dose toxicity study in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (Escalating doses) (Dose Range Finding)	208250	s.c.	Group 1 2 mg/kg 20 mg/kg 80 mg/kg Group 2 20 mg/kg 80 mg/kg 160 mg/kg Group 3 80 mg/kg 160 mg/kg 200 mg/kg	M 410,000 44,800,000 50,100,000[b] 51,900,000 274,000,000 106,000,000[b] 191,000,000 561,000,000 212,000,000[b]	F 302,000 35300,000 37,200,000[b] 46,200,000 227,000,000 124,000,000[b] 189,000,000 499,000,000 191,000,000[b]

[a]Values for individual animals. [b]AUC_{0-72h}.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL)[a]			
				Day 1		Day 29	
				M	F	M	F
4-week repeat-dose toxicity study in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	210130	s.c. (once daily)	3 mg/kg	83,400	106,000	15,700,000	12,400,000
			9 mg/kg	685,000	408,000	40,500,000	34,300,000
		i.v. (once weekly)	30 mg/kg	65,800,000[b]	53,900,000[b]	170,000,000[b]	137,000,000[b]

[a]Arithmetic mean values. [b]$AUC_{0\text{-}168h}$.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL)[a]			
				Day 1		Day 91	
				M	F	M	F
13-week repeat-dose toxicity study with an 11-week recovery period in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	209206	s.c. (once daily)	1 mg/kg	20,100	17,500	5,900,000	5,950,000
			10 mg/kg	695,000	967,000	88,200,000	79,000,000
			50 mg/kg	5,610,000	5,840,000	354,000,000	297,000,000
		i.v. (once weekly)	200 mg/kg	446,000,000[b]	451,000,000[b]	1,520,000,000[b]	1,630,000,000[b]

[a]Arithmetic mean values. [b]$AUC_{0\text{-}168h}$.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL)[a]			
				Day 1		Week 26	
				M	F	M	F
26-week repeat-dose toxicity study with a 13-week recovery period in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	211087	s.c. (once daily)	3 mg/kg	219,000	180,000	23,500,000	19,200,000
			9 mg/kg	1,640,000	1,220,000	86,000,000	67,000,000
		i.v. (once weekly)	30 mg/kg	92,100,000[b]	76,000,000[b]	238,000,000[b]	376,000,000[b]

[a]Arithmetic mean values. [b]$AUC_{0\text{-}168h}$.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL)[a]					
				Day 1		Week 26		Week 52	
				M	F	M	F	M	F
52-week repeat-dose toxicity study with 13- and 26-week interim groups in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	213542	s.c. (once daily)	0.5 mg/kg	5,400	416[b]	1,900,000	NR	2,160,000[c]	1,660,000
			1 mg/kg	40,000	32,100	6,040,000	5290000	6,790,000	6,990,000
			9 mg/kg	1,140,000	1,140,000	8,250,0000	74300000	101,000,000	97,500,000

[a]Arithmetic mean values. [b]AUC_{last} ($AUC_{0\text{-}6h}$). [c]The AUC was based on the concentration in the pre-dose sample, i.e. calculated as 89,900 ng/mL * 24 h = 2,160,00 h*ng/mL (M 2.6.5.4.F, 213542).

Abbreviations: NR = no result.

Type of study	Study ID	Dose route	Dose	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL)/AUC (IU/mL)[a]			
				Day 1		Day 27/28[b]	
				M	F	M	F
4-week drug-drug interaction study with rFVIIa in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)	215431	s.c. (once daily)	9 mg/kg – 1 mg/kg				
			Group 2	823,000	740,000	4,670,000	4,840,000
			Group 3	931,000	820,000	4,590,000	3,720,000
			Group 4	786,000	739,000	5,350,000	4,380,000
		rFVIIa i.v. (three administrations with two-hour intervals)	0.25 mg/kg	N/A	N/A	442	275
			0.5 mg/kg	N/A	N/A	622	735
			1 mg/kg				
			-with concizumab	N/A	N/A	1,430	1,410
			-without concizumab	N/A	N/A	1,340	1,390

[a]Concizumab: arithmetic mean $AUC_{0\text{-}24h}$; rFVIIa: arithmetic mean $AUC_{0\text{-}\infty}$. [b]Concizumab: Day 27; rFVIIa: Day 28, last dose.

Abbreviations: N/A = not applicable.

2.6.7.4　毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Test article: concizumab

Drug Product Batch No.■ (Drug Substance Batch No.)	**Purity (%)**	**Specified impurities (%)**	**Study ID**	**Type of study**
Proposed Specifications Drug product; end-of-shelf-life (in use)			-	-
			081101	Single i.v. administration pharmacokinetic study in male cynomolgus monkeys
			208250	Repeated single-dose toxicity study in cynomolgus monkeys (escalating doses)
			210156	Repeated single-dose i.v. administration PK/PD study in cynomolgus monkeys
			210130	4-week s.c. and i.v. administration toxicity study in the cynomolgus monkey
			209206	13-week s.c. and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys followed by an 11-week recovery period
			209125	Pilot non-GLP tissue cross-reactivity study with human and cynomolgus monkey tissues
			209280	GLP tissue cross-reactivity study with human and cynomolgus monkey tissues
			211087 (Weeks 1-20 and 23-26)	26-week s.c. and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys followed by a 13-week recovery period
			211087 (Weeks 21 and 22)	26-week s.c. and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys followed by a 13-week recovery period
			213542	52-week s.c. administration toxicity and safety pharmacology study in cynomolgus monkeys with 13- and 26-week interim groups
			215431	4-week s.c. administration drug-drug interaction study with rFVIIa in cynomolgus monkeys
			215431	4-week s.c. administration drug-drug interaction study with rFVIIa in cynomolgus monkeys

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test article: concizumab

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation	Dose level (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum non-lethal Dose (mg/kg)	Approximate lethal dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Study ID
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)[a]	i.v.	2, 20	1M	20[d]	N/A	There were no findings of toxicological significance. Observations considered related to the pharmacological action of concizumab included increased concentration of D-dimers at 20 mg/kg and decreased fibrinogen concentration at 2 and 20 mg/kg. No adverse effects were observed after a single dose of up to 20 mg/kg, i.e. the highest dose level tested.	[redacted]081101 (part of pharmacokinetics study)
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)[b]	i.v.	0, 0.1, 0.5, 1	2M+2F	1[d]	N/A	There were no findings of toxicologically significance. Observations considered related to the pharmacological action of concizumab included increases in TAT (up to 5.4-fold of pre-dose) and D-dimers (up to 7.2-fold of pre-dose) at all dose levels. No changes were seen in concentrations of fibrinogen. No adverse effects were observed after a single dose of up to 1 mg/kg, i.e. the highest dose level tested.	210156 (part of pharmacokinetics study)

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation	Dose level (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum non-lethal Dose (mg/kg)	Approximate lethal dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Study ID
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)[c]	s.c.	2/20/80 20/80/160 80/160/200	1M+1F	200[d]	N/A	There were no findings of toxicologically significance. No adverse effect on immunophenotyping or cytokine measurements were observed. Increases in TAT (up to 142-fold) and D-dimers (up to 42-fold) at dose levels ≥ 160 and ≥ 20 mg/kg, respectively and a decrease in fibrinogen concentration, were considered related to the expected pharmacological action of concizumab. Free TFPI and TFPI functionality decreased upon concizumab treatment, while total TFPI increased (Study ID 210142). The NOAEL was 200 mg/kg, i.e. the highest dose level tested.	208250

[a]Animals were 101 and 108 weeks old, and the weight was 2.67 and 2.69 kg at the start of dosing. [b]Animals were 122 and 173 weeks old, and the weight was 3.21 and 4.12 kg at the start of dosing. [c]Animals were 112 and 127 weeks old, and weight range between 2.22 and 3.87 kg at the start of dosing. [d]Highest dose tested.

Abbreviations: N/A = not applicable.

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: concizumab

No studies performed.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Test article: concizumab

2.6.7.7.A カニクイザルを用いた 4 週間皮下投与及び静脈内投与毒性試験（210130）

Test article: concizumab

Report title: 4 week subcutaneous and intravenous administration toxicity study in the monkey		**Study ID:** 210130
Species/strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	**Duration of dosing:** 4 weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2-1
Initial age: 117-172 weeks at start of dosing	**Duration of recovery:** N/A	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: Males [redacted] Females [redacted]	**Method of administration:** s.c. (daily) and i.v. (once weekly)	
	Vehicle/formulation: 34 mM histidine, 251 mM sucrose, 0.03% polysorbate 80, pH 6.5	

Parameters collected:
Body weight, food consumption, clinical observations, haematology, coagulation (including TAT and D-dimers), clinical chemistry, organ weights, gross pathology, histopathology, toxicokinetics

Special features: Endogenous anticoagulants (antithrombin (AT) and protein C) were assessed using an exploratory assay (non-GLP) and were reported separately (Study ID 212058).

No Observed Adverse-Effect Level: 9 mg/kg/day s.c. and 30 mg/kg/once weekly i.v.

Brief conclusion:
The study showed no toxicologically significant findings. As expected from the intended pharmacology of concizumab, decreased fibrinogen concentrations (down to 0.59-fold of control) and increased concentration of TAT (up to 19-fold of control) and D-dimers (up to 14-fold of control) were observed at all dose levels with no clear dose-dependency. Plasma concentrations of protein C was not influenced by concizumab, whereas a significant decrease in AT (down to 0.85-fold of control) was not considered toxicological significant (Study ID 212058).
Microscopic examination of the s.c. injection sites showed an increase in local inflammatory reactions after administration of concizumab of slight to moderate severity. These changes are expected after s.c. administration of human proteins. There were no noteworthy findings at the i.v. injection sites.
The NOAEL for s.c. dosing was 9 mg/kg/day. The NOAEL for i.v. dosing was 30 mg/kg/once weekly.

Dose level	**0 mg/kg/once weekly (Control i.v.)**		**3 mg/kg/day (s.c.)**		**9 mg/kg/day (s.c.)**		**30 mg/kg/once weekly (i.v.)**	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics[a]:								
C_{max} (ng/mL) – C_{2h} for i.v.								
Day 1			6,360	7,230	48,600	34,500	657,000	684,000
Day 28 (Day 22 for i.v.)			733,000	542,000	1,870,000	1,580,000	1,310,000	1,250,000
AUC_{tau} (h*ng/mL)								
Day 1			83,400	106,000	685,000	408,000	65,800,000	53,900,000
Day 28			15,700,000	12,400,000	40,500,000	34,300,000	170,000,000	137,000,000
Ratio of accumulation								
Day 28 (Day 22 for i.v.)			201	122	61.8	83.9	2.74	2.55
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrinogen (g/L)								
Day 1 pre-dose								
Mean	2.03	1.97	1.64*	2.03	1.91	1.86	1.84	1.81
SD	0.107	0.139	0.185	0.236	0.155	0.212	0.035	0.167
Day 1 24 h post-dose								
Mean	2.38	2.07	1.88**	1.98	2.36	1.75	2.28	1.74
SD	0.202	0.087	0.061	0.160	0.282	0.075	0.036	0.253
Day 8 pre-dose								
Mean	2.25	2.02	1.57***	1.65	1.79*	1.42**	1.68**	1.52**
SD	0.207	0.289	0.136	0.095	0.186	0.066	0.115	0.214
Day 8 24 h post-dose								
Mean	2.25	1.99	1.43***	1.59*	1.72**	1.39**	1.60**	1.56*
SD	0.180	0.264	0.127	0.081	0.141	0.046	0.186	0.274

Dose level	0 mg/kg/once weekly (Control i.v.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 15 pre-dose								
Mean	2.40	1.81	1.42***	1.66	1.55***	1.42**	1.42***	1.46**
SD	0.213	0.107	0.125	0.035	0.029	0.032	0.130	0.071
Day 15 24 h post-dose								
Mean	2.25	1.86	1.42***	1.70	1.55***	1.49**	1.45***	1.43**
SD	0.179	0.161	0.131	0.119	0.014	0.015	0.121	0.065
Day 29								
Mean	2.10	1.97	1.52***	1.64*	1.75*	1.35***	1.46***	1.38***
SD	0.139	0.182	0.159	0.172	0.090	0.104	0.177	0.195
Thrombin Anti-Thrombin (TAT, µg/L)								
Day 1 pre-dose								
Mean	10.3	8.4	7.0	12.8	8.0	19.7*	30.4	8.2
SD	10.31	4.04	2.25	5.52	3.41	4.92	33.38	1.55
Day 1 24 h post-dose								
Mean	9.4	12.0	39.4	39.6	46.9	48.7	44.5	48.0
SD	6.43	6.30	20.18	19.28	6.86	9.12	6.68	10.39
Day 8 pre-dose								
Mean	16.3	7.3	36.8	69.1**	47.9	69.1**	47.0	44.8
SD	9.38	2.26	7.16	35.37	23.06	18.56	15.42	8.91
Day 8 24 h post-dose								
Mean	7.7	39.8	36.2	49.1	53.5*	65.0	58.5*	42.6
SD	2.26	54.53	3.78	5.04	9.84	6.20	11.06	8.66

Dose level	0 mg/kg/once weekly (Control i.v.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 15 pre-dose								
Mean	6.9	5.3	33.0	35.2	39.4	56.1**	53.9*	56.8**
SD	1.72	1.86	13.14	15.46	6.86	25.41	25.95	28.19
Day 15 24 h post-dose								
Mean	4.5	12.2	28.8	34.3	-	91.3	50.8	69.7
SD	0.40	11.14	4.57	11.26	-	85.14	30.75	45.71
Day 29								
Mean	7.1	5.0	57.9	92.2*	54.1	67.4	32.2	84.0*
SD	3.83	2.41	33.53	52.98	23.66	15.22	15.60	62.04
D-dimers (mg/L)								
Day 1 pre-dose								
Mean	0.6	0.4	0.6	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5
SD	0.12	0.06	0.21	0.06	0.59	0.06	0.12	0.10
Day 1 24 h post-dose								
Mean	0.6	0.4	1.7	1.5	4.0***	2.4**	3.1**	2.1*
SD	0.12	0.00	0.44	0.23	1.55	0.32	0.81	0.50
Day 8 pre-dose								
Mean	0.8	0.7	3.7**	6.7***	5.6***	5.6***	4.5**	4.9***
SD	0.15	0.23	0.31	1.30	1.27	0.70	0.80	1.95
Day 8 24 h post-dose								
Mean	0.9	0.6	4.5**	5.6***	7.8***	4.8***	6.4***	4.0**
SD	0.21	0.15	0.38	1.95	1.47	0.38	1.37	1.24

Dose level	0 mg/kg/once weekly (Control i.v.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 15 pre-dose								
Mean	1.2	0.4	4.6**	4.9***	6.8***	6.1***	5.2***	5.2***
SD	0.21	0.15	0.85	0.50	1.33	0.59	0.78	1.86
Day 15 24 h post-dose								
Mean	1.2	0.4	5.8***	3.9**	7.2***	4.9***	5.9***	4.5***
SD	0.26	0.06	0.70	0.57	0.98	0.96	1.13	1.95
Day 29								
Mean	0.9	0.5	3.9**	4.6***	6.0***	4.5***	3.7**	4.1***
SD	0.12	0.06	0.46	0.50	0.61	0.85	1.55	1.20
Injection sites								
Number of animals examined	0	0	3	3	3	3	0	0
Left anterior								
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing								
Minimal	-	-	2	3	1	2	-	-
Slight	-	-	0	0	2	1	-	-
Right anterior								
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing								
Minimal	-	-	2	3	1	1	-	-
Slight	-	-	0	0	2	2	-	-
Left mid								
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing								
Minimal	-	-	2	1	1	1	-	-
Slight	-	-	0	1	2	2	-	-

Dose level	0 mg/kg/once weekly (Control i.v.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Right mid								
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing								
Minimal	-	-	2	3	2	2	-	-
Slight	-	-	0	0	1	1	-	-
Left posterior								
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing								
Minimal	-	-	3	2	2	2	-	-
Slight	-	-	0	0	1	0	-	-
Moderate	-	-	0	0	0	1	-	-
Right posterior								
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing								
Minimal	-	-	2	2	2	2	-	-
Slight	-	-	0	1	1	1	-	-

Note: Statistical test used: Two-way analysis of variance (ANOVA) and Dunett´s test:* - P<0.05; ** - P<0.01; *** - P<0.001.

[a]Arithmetic mean values.

Abbreviations: - = no noteworthy findings.

2.6.7.7.B カニクイザルを用いた 13 週間皮下投与及び静脈内投与毒性／安全性薬理試験及び 11 週間回復性試験（209206）

Test article: concizumab

Report title: 13 week subcutaneous and i.v. administration toxicity and safety pharmacology study in the monkey followed by a 11 week recovery period		**Study ID:** 209206
Species/strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	**Duration of dosing:** 13 weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2-2
Initial age: 122-157 weeks at start of dosing	**Duration of recovery:** 11 weeks	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: Males [redacted] Females [redacted]	**Method of administration:** s.c. (daily) and i.v. (once weekly)	
	Vehicle/formulation: 34 mM histidine, 251 mM sucrose, 0.03% polysorbate 80, pH 6.5	

Parameters collected:
Body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmoscopy, electrocardiography, blood pressure, neurobehavioural observations, respiratory rate, haematology, coagulation (including TAT and D-dimers), clinical chemistry, urinalysis, organ weights, gross pathology, histopathology, immunophenotyping, cytokines, anti-drug antibodies (ADAs), toxicokinetics, TFPI functionality.

Special features: Endogenous anticoagulants (antithrombin (AT) and protein C) were measured using non-GLP assays and were reported separately (Study ID 212058).

No Observed Adverse-Effect Level: 1 mg/kg/day s.c.

Brief conclusion:
Body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmoscopy, electrocardiography, blood pressure, neurobehavioural observations, respiratory rate, haematology, PT, APTT, clinical chemistry, urinalysis, cytokines, macroscopic findings (systemic and local) and organ weights were all unaffected by treatment with concizumab. No toxicological significant effects were seen on immunophenotyping parameters. Plasma levels of AT and protein C assessed in some animals using non-GLP assays were not significantly influenced by concizumab (Study ID 212058).

There was one decedent during the study (animal 12M) from the 10 mg/kg/day dose group. The demise was caused by severe symptoms from the gastrointestinal tract and was considered unrelated to effects of concizumab. Microscopic examination disclosed a single early thrombus in the liver of this animal. Pre-dose clinical pathology samples revealed several changes in kidney and liver parameters, notably small elevations in plasma urea and creatinine. This liver thrombus was considered potentially related to treatment.

ADAs were detected in 2/10 animals in the low dose group (1 mg/kg/day; 4/4 in recovery) and in 1/3 animals in the intermediate recovery group (10 mg/kg/day). Toxicokinetic evaluation showed exposure in animals throughout the study, except for two animals from the low dose group (1 mg/kg/day) found positive for ADAs, that had no exposure from Day 58 onwards. Expected pharmacological effects of concizumab were seen in TAT and D-dimers (up to 28-fold and 10-fold increase compared to controls, respectively) and fibrinogen (decrease down to 0.67-fold of control) in all dose groups from Day 16 and onwards. TFPI functionality was inhibited in all treatment groups, and during the recovery period it returned toward baseline levels in the low dose group. TFPI functionality was restored in ADA-positive animals with reduced exposure to concizumab.

Findings of few thrombi in the heart (one animal at 50 mg/kg/day s.c.) and lungs (one animal at 50 mg/kg/day s.c. and one animal at 200 mg/kg/week i.v.) were considered related to an exaggerated pharmacological effect of concizumab. In addition, in the lungs, vascular changes, such as intimal proliferation was seen one animal given 50 mg/kg/day s.c. or two animals

given 200 mg/kg/week i.v. In the recovery groups, an early fibrin thrombus was present in a large artery in one of the posterior lung lobes of one female given 50 mg/kg/day s.c. This animal also had a mature thrombus in the left ventricle of the heart.
Microscopic examination of the s.c. injection sites showed inflammatory cell foci/perivascular accumulation of leukocytes in all dose groups. The overall incidence and severity were higher in males given 50 mg/kg/day and females given 1, 10 or 50 mg/kg/day, when compared with controls. In addition, the overall level of cellulitis/fibrosis was marginally higher in females given 1, 10 or 50 mg/kg/day, but with no clear dose-relationship. The local effects after s.c. dosing were similar to what has been observed after injection of other human proteins to monkeys. Almost complete reversal of the changes was found in the recovery animals. There were no microscopic findings considered related to concizumab at the i.v. injection sites.
The NOAEL was 1 mg/kg/day for s.c. dosing. No NOAEL for i.v. dosing was established due to one lung thrombus observed at the only tested dose-level.

Dose level	**0 mg/kg/day s.c. (Control)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**10 mg/kg/day (s.c.)**		**50 mg/kg/day (s.c.)**		**200 mg/kg/once weekly (i.v.)**	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics[a]:										
C_{max} (ng/mL)										
Day 1	-	-	1,280	1,340	44,500	69,500	365,000	444,000	4,580,000	5,040,000
Day 91 (Day 85 for i.v.)	-	-	291,000	273,000	4,060,000	4,340,000	15,800,000	13,500,000	11,300,000	12,200,000
AUC_{tau} (h*ng/mL)										
Day 1	-	-	20,100	17,500	695,000	967,000	5,610,000	5,840,000	446,000,000	451,000,000
Day 91 (Day 85 for i.v.)	-	-	5,900,000	5,950,000	88,200,000	79,000,000	354,000,000	297,000,000	1,520,000,000	1,630,000,000
Rate of accumulation										
Day 91 (Day 85 for i.v.)	-	-	380	390	130	86	63	52	2.7	2.8
Noteworthy findings										
Died or sacrificed moribund	1#	0	0	0	1	0	0	0	0	0
# animal sacrificed and replaced on Day 2										
Fibrinogen (g/L)										
Day -7										
Mean	1.94	1.80	1.78	1.96	2.06	1.82	2.31	1.58	2.00	1.83
SD	0.280	0.219	0.132	0.422	0.364	0.127	0.381	0.560	0.293	0.247
Day 16										
Mean	1.86	2.14	1.50	1.62*	1.48	1.50**	1.51	1.55**	1.41	1.61
SD	0.489	0.264	0.208	0.154	0.214	0.055	0.393	0.171	0.133	0.183
Day 30										
Mean	2.15	1.99	1.59**	1.57*	1.50***	1.37***	1.61**	1.44**	1.61	1.46
SD	0.414	0.222	0.221	0.212	0.128	0.057	0.180	0.182	0.261	0.145

Dose level	**0 mg/kg/day s.c. (Control)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**10 mg/kg/day (s.c.)**		**50 mg/kg/day (s.c.)**		**200 mg/kg/once weekly (i.v.)**	
Number of animals **Main study** **Recovery**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**
Day 58										
Mean	2.00	1.68	1.66	1.44	1.35***	1.21**	1.64*	1.27*	1.56	1.18
SD	0.325	0.206	0.241	0.297	0.190	0.133	0.166	0.155	0.295	0.083
Day 86										
Mean	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1.19	1.21
SD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.158	0.065
Day 92										
Mean	1.47	1.61	1.21	1.51	1.14	1.18*	1.25	1.17*	N/A	1.20
SD	0.304	0.144	0.208	0.353	0.232	0.137	0.104	0.069	N/A	0.129
Day 93										
Mean	1.61	N/A	1.43	N/A	1.28	N/A	1.40	N/A	1.22	N/A
SD	0.388	N/A	0.230	N/A	0.200	N/A	0.110	N/A	0.252	N/A
Recovery groups:										
<u>Fibrinogen (g/L)</u>										
Day 140										
Mean	1.65	1.18	1.76	1.27	1.54	0.79	1.06	1.01	1.13	1.07
SD	0.354	0.007	0.042	0.099	N/A	0.071	0.191	0.028	0.057	0.028
Day 169										
Mean	1.98	1.71	2.28	1.66	2.08	1.28	1.62	1.55	1.92	1.51
SD	0.346	0.156	0.071	0.000	N/A	0.085	0.099	0.000	0.078	0.057

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Thrombin Anti-Thrombin (TAT) (µg/L)										
Day-7										
Mean	767.3	1969.5	4443.1	1678.0	12.2	11.2	11.7	376.2	212.6	10.8
SD	737.65	2776.72	9904.60	1382.40	4.92	5.85	2.73	801.28	456.92	4.58
Day 16										
Mean	347.6	40.3	526.2*	60.6	988.2**	46.7	1122.1**	52.4	860.5	91.8
SD	758.77	72.43	553.24	47.63	964.58	16.02	794.35	42.43	799.89	53.63
Day 30										
Mean	16.6	22.9	25.7	44.8	47.8	56.2	44.7	57.6	47.0	57.8
SD	24.29	21.34	5.71	20.96	14.41	5.35	14.30	3.14	12.13	4.96
Day 58										
Mean	33.0	42.2	35.1	60.0	57.1	60.0	57.4	58.1	55.9	58.6
SD	26.21	24.72	13.60	0.00	5.80	0.00	3.60	4.29	5.99	2.37
Day 86										
Mean	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	585.1	129.9
SD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	173.69	83.70
Day 92										
Mean	9.7	49.4	31.3	114.6	95.7	138.3	56.6	1354.8	N/A	147.2
SD	8.04	60.54	19.24	76.94	49.50	77.91	8.38	2620.76	N/A	56.61
Day 93										
Mean	6.3	N/A	34.5	N/A	59.0	N/A	60.0	N/A	48.5	N/A
SD	3.55	N/A	24.35	N/A	1.54	N/A	0.00	N/A	13.44	N/A

Dose level	**0 mg/kg/day s.c. (Control)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**10 mg/kg/day (s.c.)**		**50 mg/kg/day (s.c.)**		**200 mg/kg/once weekly (i.v.)**	
Number of animals **Main study** **Recovery**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**
Recovery groups:										
Thrombin Anti-Thrombin (TAT) (µg/L)										
Day 140										
Mean	6.5	32.8	8.3	19.6	18.8	101.3	41.4	63.6	42.7	61.1
SD	2.47	33.02	2.19	6.58	N/A	38.18	14.07	15.13	10.96	27.29
Day 169										
Mean	5.7	21.1	15.5	7.4	6.4	48.0	53.9	44.8	37.8	48.2
SD	0.07	22.06	2.76	1.63	N/A	13.79	8.70	1.84	31.47	11.74
D-dimers (ng/mL) [mg/L]										
Day -7										
Mean	39657.6 [39.7]	1208.8 [1.21]	3050.9 [3.05]	817.9 [0.82]	39796.2 [39.8]	2246.8 [2.25]	1641.4 [1.64]	1061.9 [1.06]	772.4 [0.77]	997.0 [1.00]
SD	53259.1 [53.3]	1029.65 [1.03]	2505.03 [2.51]	137.45 [0.14]	53133.2 [53.1]	3111.95 [3.11]	1373.09 [1.37]	629.88 [0.63]	311.87 [0.31]	630.10 [0.63]
Day 16										
Mean	2685.7 [2.69]	1001.5 [1.00]	7439.7 [7.44]	4376.1*** [4.38***]	7698.3 [7.70]	4981.9*** [4.98***]	6136.7 [6.14]	5848.7*** [5.85***]	8160.3 [8.16]	7371.6 [7.37]
SD	4005.17 [4.01]	566.69 [0.57]	2507.08 [2.51]	1106.33 [1.11]	2099.19 [2.10]	1011.09 [1.01]	1762.32 [1.76]	1409.01 [1.41]	2554.02 [2.55]	2990.64 [2.99]
Day 30										
Mean	1200.8 [1.20]	691.2 [0.69]	4038.3* [4.04*]	3759.2 [3.76]	6448.4*** [6.45***]	4297.9 [4.30]	6785.1*** [6.79***]	5542.9 [5.54]	5566.7 [5.57]	6918.5 [6.92]
SD	530.32 [0.53]	333.71 [0.33]	1713.27 [1.71]	2009.36 [2.01]	1783.16 [1.78]	401.31 [0.40]	2042.72 [2.04]	1314.74 [1.31]	854.84 [0.85]	2225.90 [2.23]

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Day 58										
Mean	1003.5 [1.00]	809.4 [0.81]	4124.6 [4.12]	3979.1 [3.98]	5427.5 [5.43]	5039.2* [5.04*]	7166.4 [7.17]	5880.5** [5.88**]	7704.2 [7.70]	7581.4 [7.58]
SD	212.82 [0.21]	452.21 [0.45]	1922.38 [1.92]	2004.54 [2.00]	1664.93 [1.66]	1202.44 [1.20]	2165.38 [2.17]	2456.01 [2.46]	2739.12 [2.74]	1944.59 [1.94]
Day 86										
Mean	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	11746.2 [11.7]	6650.3 [6.65]
SD	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	6881.98 [6.88]	1993.37 [1.99]
Day 92										
Mean	895.0 [0.90]	1029.0 [1.03]	2861.3 [2.86]	3476.2 [3.48]	7389.4*** [7.39***]	5702.8*** [5.70***]	6599.2*** [6.60***]	5471.8*** [5.47***]	N/A	6554.1 [6.55]
SD	585.73 [0.59]	449.32 [0.45]	2168.63 [2.17]	1938.60 [1.94]	834.38 [0.83]	1186.10 [1.19]	1137.66 [1.14]	2334.63 [2.33]	N/A	2072.75 [2.07]
Day 93										
Mean	906.8 [0.91]	N/A	3414.8 [3.41]	N/A	8445.9 [8.45]	N/A	6930.1 [6.93]	N/A	6861.2 [6.86]	N/A
SD	644.77 [0.64]	N/A	2869.24 [2.87]	N/A	1284.57 [1.28]	N/A	1741.73 [1.74]	N/A	2933.96 [2.93]	N/A
Recovery groups:										
<u>D-dimers (ng/mL)</u>										
Day 140										
Mean	0.7 [0.0007]	913.0 [0.91]	1.1 [0.0011]	540.2 [0.54]	2.6 [0.0026]	3969.9 [3.97]	5.6 [0.0056]	4949.4 [4.95]	4.4 [0.0044]	5121.7 [5.12]
SD	0.14 [0.00014]	615.68 [0.62]	0.28 [0.0003]	34.44 [0.034]	N/A	1328.58 [1.33]	1.7 [0.0017]	2518.22 [2.52]	1.48 [0.0015]	1181.93 [1.18]

Dose level	**0 mg/kg/day s.c. (Control)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**10 mg/kg/day (s.c.)**		**50 mg/kg/day (s.c.)**		**200 mg/kg/once weekly (i.v.)**	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Day 169										
Mean	1011.5 [1.01]	0.7 [0.0007]	887.2 [0.89]	0.6 [0.0006]	1004.4 [1.00]	2.6 [0.0026]	14044.5 [14.0]	3.0 [0.0030]	3508.3 [3.51]	4.1 [0.0041]
SD	830.14 [0.83]	0.42 [0.0004]	199.47 [0.20]	0.07 [0.00007]	N/A	0.99 [0.001]	2833.38 [2.83]	0.21 [0.0002]	4065.72 [4.07]	0.64 [0.0006]
Histopathology										
Terminal kill										
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Lung										
Inflammation-chronic										
Not remarkable	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Vascular intimal proliferation										
Not remarkable	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Thrombus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Heart										
Thrombus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Recovery study:										
Number of animals examined	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
Lung										
Thrombus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Heart										
Thrombus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Injection sites										
Terminal kill										
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3	-	-
Left anterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing										
Not remarkable	2	1	3	2	1	0	0	0	-	-
Minimal	1	2	0	0	2	0	3	0	-	-
Slight	0	0	0	1	0	2	0	3	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Cellulitis/fibrosis										
Not remarkable	2	2	3	3	3	1	3	3	-	-
Minimal	1	1	0	0	0	1	0	0	-	-
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Right anterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing										
Not remarkable	1	2	3	2	1	0	0	0	-	-
Minimal	2	1	0	1	2	1	1	1	-	-
Slight	0	0	0	0	0	1	2	1	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	-	-

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Cellulitis/fibrosis										
Not remarkable	3	2	3	3	2	1	2	3	-	-
Minimal	0	1	0	0	0	0	1	0	-	-
Slight	0	0	0	0	1	2	0	0	-	-
Left mid										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing										
Not remarkable	1	3	0	0	1	0	0	0	-	-
Minimal	1	0	3	1	2	0	1	0	-	-
Slight	1	0	0	2	0	2	2	2	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	-	-
Cellulitis/fibrosis										
Not remarkable	2	1	3	3	2	0	3	2	-	-
Minimal	1	2	0	0	1	1	0	1	-	-
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Right mid										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing										
Not remarkable	2	2	0	1	0	0	0	0	-	-
Minimal	1	1	2	0	3	0	0	0	-	-
Slight	0	0	1	2	0	2	3	2	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	-	-

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals **Main study** **Recovery**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**	**M: 3** **M: 2**	**F: 3** **F: 2**
Cellulitis/fibrosis										
Not remarkable	3	3	2	2	2	2	2	2	-	-
Minimal	0	0	1	1	1	0	1	1	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Left posterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing										
Not remarkable	3	3	3	0	3	0	2	0	-	-
Minimal	0	0	0	2	0	1	1	0	-	-
Slight	0	0	0	0	0	1	0	2	-	-
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	1	-	-
Moderately severe	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Cellulitis/fibrosis										
Not remarkable	3	2	3	0	3	0	2	1	-	-
Minimal	0	1	0	3	0	1	1	1	-	-
Slight	0	0	0	0	0	1	0	1	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-
Number of animals examined	3	2	3	3	3	3	3	3	-	-
Right posterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing										
Not remarkable	2	2	1	1	1	0	0	0	-	-
Minimal	1	0	0	1	2	0	0	1	-	-
Slight	0	0	2	1	0	2	3	1	-	-
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	-	-

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Cellulitis/fibrosis										
Not remarkable	2	2	3	3	2	1	1	3	-	-
Minimal	1	0	0	0	1	0	2	0	-	-
Slight	0	0	0	0	0	2	0	0	-	-
Recovery kill:										
Number of animals examined	2	2	2	2	1	2	2	2	-	-
Right anterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing	0	0	0	0	0	0	0	1	-	-
Left mid										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing	0	0	0	0	1	0	0	1	-	-
Right mid										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing	1	0	1	0	1	0	1	0	-	-
Left posterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing	0	0	0	0	1	1	0	1	-	-
Right posterior										
Inflammatory cell foci / perivascular cuffing	0	0	0	0	0	1	1	0	-	-

Dose level	**0 mg/kg/day s.c. (Control)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**10 mg/kg/day (s.c.)**		**50 mg/kg/day (s.c.)**		**200 mg/kg/once weekly (i.v.)**	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
ADAs (incidence)[b]										
Day 92/93	5/5[c]	4/5[c]	1/4[d]	1/5	0/4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Recovery study:										
Day 169	2/2[c]	2/2[c]	2/2	2/2	1/1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Findings in decedent male animal (12M) from intermediate dose group, death considered not treatment-related[e]										
Histopathology										
Liver										
Thrombus										
Present	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Bodyweight (kg)										
Day -7	-	-	-	-	2.61	-	-	-	-	-
Day 1	-	-	-	-	2.41	-	-	-	-	-
Day 29	-	-	-	-	2.31	-	-	-	-	-
Alanine aminotransferase (IU/L)										
Day -7	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	9.9	-	-	-	-	-

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Alkaline phosphatase (IU/L)										
Day -7	-	-	-	-	431	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	299	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	574	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	118.6	-	-	-	-	-
Gamma glutamyltransferase (IU/L)										
Day -7	-	-	-	-	75	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	48	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	152	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	60.2	-	-	-	-	-
Na (mmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	135	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	143	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	146	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	6.7	-	-	-	-	-
K (mmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	2.6	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	3.2	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	0.82	-	-	-	-	-

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Inorganic phosphorous (mmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-
Cl (mmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	90	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	102	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	7.0	-	-	-	-	-
Albumin (g/L)										
Day -7	-	-	-	-	46	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	41	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	47	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	3.0	-	-	-	-	-
Glucose (mmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	4.6	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	6.6	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	1.64	-	-	-	-	-

Dose level	0 mg/kg/day s.c. (Control)		1 mg/kg/day (s.c.)		10 mg/kg/day (s.c.)		50 mg/kg/day (s.c.)		200 mg/kg/once weekly (i.v.)	
Number of animals										
Main study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Urea (mmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	13.1	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	8.2	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	7.3	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	3.29	-	-	-	-	-
Total bilirubin (µmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	4.3	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	2.4	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	2.6	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	0.97	-	-	-	-	-
Creatinine (µmol/L)										
Day -7	-	-	-	-	124	-	-	-	-	-
Day 35	-	-	-	-	75	-	-	-	-	-
Group mean Day -7	-	-	-	-	73	-	-	-	-	-
SD	-	-	-	-	28.6	-	-	-	-	-

Note: Statistical test used: Two-way analysis of variance (ANOVA) and Dunett´s test: * - P<0.05; ** - P<0.01; ** - P<0.001; *** - P<0.001.

[a]Arithmetic mean values. [b]Due to drug interference the antibodies may be present but not detectable. [c]No explanation for detection anti-concizumab antibodies in the control group was found. Toxicokinetic data did not reveal concizumab exposure and all animals (except one animal dosed 50 mg/kg/day s.c.) were anti-concizumab antibody negative at pre-dose Day -7. Reviewing the dosing and sample processing procedures did not identify the procedural deficiencies resulting in accidental exposure to concizumab. [d]No data from one male due to no sample in the tube. [e]Intermediate dose animal sacrificed due to gastrointestinal tract lesion on Day 35. This animal was not dosed Days 5-8 and Day 27-necropsy.

Abbreviations: - = No noteworthy findings; N/A = not applicable.

2.6.7.7.C カニクイザルを用いた 26 週間皮下投与及び静脈内投与毒性・安全性薬理試験及び 13 週間回復性試験（211087）

Test article: concizumab

Report title: A 26 week toxicity study by the subcutaneous and intravenous routes in cynomolgus monkeys with a 13 week recovery period		**Study ID:** 211087
Species/strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	**Duration of dosing:** 26 weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2-3
Initial age: 3.5 – 5.6 years	**Duration of post dose:** 13 weeks	
Date of first dose: [redacted]	**Method of administration:** Once daily s.c. injection at a volume of 0.3 mL/kg (Groups 1 to 3) and once weekly i.v. bolus injection at a volume of 1 mL/kg (Group 4)	**GLP compliance:** Yes; except determination of endotoxin levels in bulk vehicle formulation
	Vehicle/formulation: 33 mM (5.12 mg/mL) L-histidine, 150 mM (51.3 mg/mL) sucrose, 0.01 mg/mL Tween 80, 25 mM (5.27 mg/mL) arginine HCl and 25 mM (1.46 mg/mL) sodium chloride, pH 6.0	
Parameters collected: Body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmoscopy, haematology, coagulation (including TAT and D-dimers), clinical chemistry, urinalysis, organ weights, gross pathology, histopathology, anti-drug antibodies (ADAs), bioanalysis, TFPI functionality (see also M 2.6.5.4.E, 211087), toxicokinetic evaluation, reproductive endpoints (menstrual cycle duration, testicular size measurements, sperm analysis).		
Special features: The following analyses were performed to non-GLP and reported separately: Antithrombin (AT) and protein C (Study ID 212391), total TFPI and free TFPI (Study ID 213391, see also M 2.6.5.4.E, 211087), cytokines (Serum IL-6, IL-1β, IFN-γ, TNF-α, E-Selectin and ICAM-1) (Study ID 213528), immunohistochemistry on selected tissues in selected animals (Study ID 214391), and ADA/concizumab ICs using a combination of size exclusion chromatography and an immune complex assay specific for concizumab-ADAs (Study ID 214449).		
No Observed Adverse-Effect Level: NOAEL was not identified in this study.		
Brief conclusion: Body weight, food consumption, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, urinalysis, reproductive endpoints and organ weights were all unaffected by treatment with concizumab (except animal 34F – see below). There were no treatment-related clinical signs associated with concizumab other than in one female (34F) receiving 9 mg/kg/day s.c., which was killed prematurely in Week 18 due to an adverse reaction immediately after dosing. This animal had experienced an extensive menstrual cycle for nine days and showed changes in haematology and clinical chemistry. The animal had regular cycles, but the duration of menses was longer and with more heavy blood flow than other females, also before dosing with concizumab started. Histopathology of this animal identified pulmonary thrombosis with massive lobar lung necrosis. A small prolongation in PT was seen in the 30 mg/kg/week males (up to 1.29-fold of control), however, several of these males had slightly prolonged PT levels already before dosing commenced (up to 1.1-fold of control). A small prolongation was also seen in APTT (up to 1.17-fold of control) in some treated groups at some time-points, however, no clear pattern or dose-response was observed. A decrease in fibrinogen concentrations was observed in all treatment groups (down to 0.5-fold of control). During the recovery period, PT, APTT and fibrinogen concentrations returned towards pre-trial values. D-dimers and TAT concentrations increased in all treatment groups (up to 14-fold and 19-fold of control, respectively), and generally returned towards pre-trial levels during the recovery period. Free TFPI decreased upon dosing with concizumab, whereas a dose-independent increase in total TFPI, including		

both free and concizumab-bound TFPI, was observed (see also M 2.6.5.4.E, 211087). No treatment-related changes in serum E-Selectin, ICAM-1, IL-6, IL-1β, IFN-λ or TNF-α were observed. ADAs were observed in seven concizumab-dosed animals involving all dose levels, with reduced exposure in five animals.

Histopathology showed thrombi in a total of nine animals representing all groups (including control group), primarily in the lungs but single thrombi in were also seen in epididymis, thymus, liver, heart or injection sites in single animals, across all treatment groups. These thrombi, including 3 thrombi observed in the recovery animals, were considered treatment-related consistent with the expected pharmacological effect of concizumab. In or immediately adjacent to the choroid plexus in the brain vascular/perivascular changes (inflammation, endothelial hypertrophy/hyperplasia and smooth muscle hypertrophy and medial thickening) were observed in animals given 3 or 9 mg/kg/day s.c. or 30 mg/kg/week i.v. In the lungs, treatment-related vascular changes (subendothelial or intimal thickening, endothelial hypertrophy and hyperplasia) were observed in animals given 30 mg/kg/week i.v. or 3 or 9 mg/kg/day s.c. (including the descendant animal, 34F). The prematurely sacrificed female showed more widespread distribution of these findings. No animal in any treatment group showed aberrant choroid plexus or lung vasculature findings after 13 weeks of recovery. At the s.c. injection sites, perivascular cellular infiltrates were observed.

Based on detailed mechanistic investigations (Study IDs 214449 and 214391) the subendothelial thickening in lungs, endothelial hyperplasia and hypertrophy in lungs and choroid plexus as well as the inflammatory changes in the choroid plexus were considered related to deposition of ICs in the tissues, secondary to development of ADAs. Thus, ICs were found in plasma of all animals with these lesions, and immunohistochemical examinations revealed presence of IC in the vascular lesions in choroid plexus and/or lungs.

Based on the thrombotic changes observed at all dose levels a NOAEL was not identified in this study.

Dose level (mg/kg):	**0 mg/kg/day (s.c.)**		**3 mg/kg/day (s.c.)**		**9 mg/kg/day (s.c.)**		**30 mg/kg once weekly (i.v.)**	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics[a]:								
s.c. $AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL) i.v. $AUC_{0\text{-}168h}$ (h*ng/mL) Day 1	N/A	N/A	219,000	180,000	1,640,000	1,220,000	92,100,000	76,000,000
Week 26	N/A	N/A	23,500,000	19,200,000	86,000,000	67,000,000	238,000,000	376,000,000
C_{max} (ng/mL) Day 1	N/A	N/A	13,500	10,500	102,000	79,600	1,050,000	883,000
Week 26	N/A	N/A	1,070,000	914,000	3,730,000	2,890,000	2,270,000	3,030,000
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	1 (Animal 34F)	0	0
Coagulation[b]								
PT (s)								
Pre-trial	13.9±0.7	13.6±2.1	13.4±0.3	13.3±0.6	13.6±1.0	13.3±1.1	15.3±1.3	13.5±1.0
Day 1 (Pre-dose)	14.4±1.3	13.6±0.4	13.9±0.5	14.2±0.5	14.0±1.0	13.9±0.8	15.6±1.3	13.9±0.5
Week 6 (Pre-dose)	13.8±0.8	13.4±0.5	14.5±1.0	14.4±0.5	14.2±0.9	14.6±1.0	17.7±1.1***	14.3±0.5
Week 6 (2 h)	13.9±0.9	13.6±0.4	14.7±0.8	14.5±0.5	14.5±0.9	14.8±1.0	17.7±1.2***	14.5±0.6
Week 6 (8 h)	13.9±0.9	13.8±3.6	15.2±2.4	16.8±2.8	13.7±2.7	12.6±2.2	16.5±3.7	13.9±2.5
Week 13 (Pre-dose)	12.8±0.4	12.3±0.5	13.7±0.6	13.4±0.6	13.3±0.9	13.7±0.9	15.3±0.5***	13.2±0.8
Week 13 (2 h)	13.0±0.7	12.6±0.7	14.2±0.4[n=4]	13.4±0.3	13.7±0.9	13.8±0.9	15.3±0.5***	13.4±0.8
Week 13 (8 h)	13.9±0.7	13.8±0.4	14.4±1.4	15.2±0.9	14.7±1.0	14.4±2.2	16.3±0.8**	14.5±0.6
Week 26 (Pre-dose)	13.3±0.6[n=4]	12.6±0.3	14.2±1.0	13.9±0.5	13.7±0.7	14.0±1.5[n=4]	15.4±1.4*	13.5±0.4
Week 26 (2 h)	13.2±0.9	12.9±0.6	13.8±0.9	14.0±0.4	13.7±0.7	14.1±1.2[n=4]	16.1±1.5**	13.9±0.5
Week 26 (8 h)	15.0±0.9	14.3±0.8	15.1±2.1	15.7±0.8	14.5±1.1	15.0±1.7[n=4]	16.4±2.3	14.9±0.6
Recovery Week 13[c]	13.4; 13.4	13.1; 12.8	14.9; 14.4	12.6; 13.8	12.7;15.2	13.2	14.2;16.3	12.5; 13.5
APTT (s)								
Pre-trial	20.1±1.1	19.9±1.2	19.4±0.8	21.1±1.5	20.3±1.0	21.0±0.7	20.8±1.9	20.4±1.1
Day 1 (Pre-dose)	21.4±1.4	19.8±1.1	19.7±0.7	21.2±2.1	20.0±1.3	20.0±1.4	20.5±1.8	20.4±0.7

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Week 6 (Pre-dose)	19.2±0.5	19.0±0.6	19.9±0.7	21.0±1.6*	19.7±1.0	20.5±0.8	22.4±1.4***	19.7±0.8
Week 6 (2 h)	19.7±0.6	19.1±1.2	20.0±0.6	21.0±1.4	20.1±1.0	21.1±1.4	21.8±1.3**	20.0±0.6
Week 6 (8 h)	21.7±0.5	20.9±1.0	22.1±1.0	24.0±2.3*	21.9±0.9	22.2±1.4	23.1±1.9	21.7±0.9
Week 13 (Pre-dose)	19.6±0.8	19.0±1.0	20.4±0.7	21.3±1.8*	20.3±1.3	20.8±1.3	20.8±0.8	20.1±0.4
Week 13 (2 h)	19.6±0.8	18.7±0.8	19.7±0.5[n=4]	20.5±1.2	19.7±1.3	19.9±1.0	20.4±0.7	19.7±0.9
Week 13 (8 h)	21.8±0.9	20.6±1.0	22.2±1.0	23.0±1.8	22.5±1.0	21.3±1.6	22.7±0.9	21.9±0.8
Week 26 (Pre-dose)	19.8±1.6[n=4]	19.2±1.3	21.0±0.7	21.5±2.0	21.0±0.9	21.0±0.8[n=4]	21.7±2.9	19.8±0.8
Week 26 (2 h)	19.4±2.0	18.7±1.0	20.4±0.7	21.1±1.6*	20.6±0.7	20.4±1.2[n=4]	22.1±1.8	20.0±1.0
Week 26 (8 h)	21.3±1.8	20.2±1.1	22.3±0.6	22.6±1.8*	22.2±0.8	22.7±0.5*, [n=4]	23.1±1.7	21.5±0.7
Recovery Week 13[c]	22.4; 19.2	20.2; 21.3	22.5; 22.7	21.7; 19.8	20.2; 23.3	21.6	20.3; 20.9	20.7; 20.9
Fibrinogen (PT-derived) (mg/dL) [g/L]								
Pre-trial	332±27 [3.32±0.27]	298±58 [2.98±0.58]	313±59 [3.13±0.59]	283±56 [2.83±0.56]	330±47 [3.30±0.47]	287±34 [2.87±0.34]	316±60 [3.16±0.6]	257±34 [2.57±0.34]
Day 1 (Pre-dose)	311±27 [3.11±0.27]	334±83 [3.34±0.83]	386±151 [3.86±1.51]	294±47 [2.94±0.47]	332±34 [3.32±0.34]	335±30 [3.35±0.30]	301±50 [3.01±0.50]	277±41 [2.77±0.41]
Week 6 (Pre-dose)	378±72 [3.78±0.72]	350±65 [3.50±0.65]	275±64* [2.75±0.64*]	259±46 [2.59±0.46]	284±37* [2.84±0.37*]	262±66 [2.62±0.66]	214±39*** [2.14±0.39***]	249±59 [2.49±0.59]
Week 6 (2 h)	381±91 [3.81±0.91]	338±55 [3.38±0.55]	274±65* [2.74±0.65*]	248±35* [2.48±0.35*]	279±37 [2.79±0.37]	263±47 [2.63±0.47]	216±51** [2.16±0.51**]	244±56* [2.44±0.56*]
Week 6 (8 h)	391±110 [3.91±1.10]	315±39 [3.15±0.39]	250±58* [2.50±0.58*]	248±23 [2.48±0.23]	239±48* [2.39±0.48*]	231±59 [2.31±0.59]	195±52** [1.95±0.52**]	228±83 [2.28±0.83]
Week 13 (Pre-dose)	311±35 [3.11±0.35]	307±62 [3.07±0.62]	204±51** [2.04±0.51**]	202±22* [2.02±0.22*]	278±33 [2.78±0.33]	213±30* [2.13±0.30*]	178±40*** [1.78±0.40***]	200±69** [2.00±0.69**]
Week 13 (2 h)	303±35 [3.03±0.35]	295±73 [2.95±0.73]	177±31***, [n=4] [1.77±0.31***, [n=4]]	195±31* [1.95±0.31*]	257±39 [2.57±0.39]	209±23 [2.09±0.23]	181±33*** [1.81±0.33***]	201±69* [2.01±0.69*]
Week 13 (8 h)	294±37 [2.94±0.37]	285±52 [2.85±0.52]	210±44** [2.10±0.44**]	191±26* [1.91±0.26*]	254±24 [2.54±0.24]	187±47* [1.87±0.47*]	184±38*** [1.84±0.38***]	205±68 [2.05±0.68]

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Week 26 (Pre-dose)	300±35[n=4] [3.00±0.35[n=4]]	334±100 [3.34±1.00]	241±87 [2.41±0.87]	273±59 [2.73±0.59]	239±30 [2.39±0.30]	260±51[n=4] [2.60±0.51[n=4]]	202±54 [2.02±0.54]	237±40 [2.37±0.40]
Week 26 (2 h)	287±30 [2.87±0.30]	320±82 [3.20±0.82]	244±76 [2.44±0.76]	259±69 [2.59±0.69]	230±26 [2.30±0.26]	253±41[n=4] [2.53±0.41[n=4]]	202±74 [2.02±0.74]	222±28 [2.22±0.28]
Week 26 (8 h)	291±31 [2.91±0.31]	311±82 [3.11±0.82]	227±67 [2.27±0.67]	236±90 [2.36±0.90]	218±27 [2.18±0.27]	244±44[n=4] [2.44±0.44[n=4]]	181±45** [1.81±0.45**]	215±37 [2.15±0.37]
Recovery Week 13[c]	258; 312 [2.58; 3.12]	333; 276 [3.33; 2.76]	211; 197 [2.11; 1.97]	335; 267 [3.35; 2.67]	241; 256 [2.41; 2.56]	321 [3.21]	172; 293 [1.72; 2.93]	241; 246 [2.41; 2.46]
Fibrinogen (Clauss) (mg/dL) [g/L]								
Pre-trial	263±34 [2.63±0.34]	290±43 [2.90±0.43]	284±45 [2.84±0.45]	226±30 [2.26±0.30]	266±23 [2.66±0.23]	248±42 [2.48±0.42]	254±41 [2.54±0.41]	247±27 [2.47±0.27]
Day 1 (Pre-dose)	240±27 [2.40±0.27]	268±50 [2.68±0.50]	288±92 [2.88±0.92]	229±36 [2.29±0.36]	264±27 [2.64±0.27]	256±87 [2.56±0.87]	231±31 [2.31±0.31]	230±20 [2.30±0.20]
Week 6 (Pre-dose)	252±71 [2.52±0.71]	287±32 [2.87±0.32]	227±66 [2.27±0.66]	219±75 [2.19±0.75]	247±85 [2.47±0.85]	225±57 [2.25±0.57]	159±43 [1.59±0.43]	203±64 [2.03±0.64]
Week 6 (2 h)	249±87 [2.49±0.87]	290±45 [2.90±0.45]	209±51 [2.09±0.51]	225±67 [2.25±0.67]	262±92 [2.62±0.92]	253±52 [2.53±0.52]	149±38 [1.49±0.38]	235±77 [2.35±0.77]
Week 6 (8 h)	237±77 [2.37±0.77]	285±31 [2.85±0.31]	206±69 [2.06±0.69]	230±49 [2.30±0.49]	235±50 [2.35±0.50]	259±55 [2.59±0.55]	170±47 [1.70±0.47]	267±50 [2.67±0.50]
Week 13 (Pre-dose)	261±31 [2.61±0.31]	295±59 [2.95±0.59]	171±49* [1.71±0.49*]	213±65 [2.13±0.65]	241±69 [2.41±0.69]	224±82 [2.24±0.82]	165±32* [1.65±0.32*]	214±73 [2.14±0.73]
Week 13 (2 h)	253±30 [2.53±0.30]	272±54 [2.72±0.54]	166±50 [1.66±0.50]	196±58[n=4] [1.96±0.58[n=4]]	260±78 [2.60±0.78]	206±88 [2.06±0.88]	165±54 [1.65±0.54]	220±76 [2.20±0.76]
Week 13 (8 h)	258±38 [2.58±0.38]	269±49 [2.69±0.49]	194±33* [1.94±0.33*]	208±41 [2.08±0.41]	239±41 [2.39±0.41]	233±99 [2.33±0.99]	156±34** [1.56±0.34**]	263±57 [2.63±0.57]
Week 26 (Pre-dose)	208±41 [2.08±0.41]	267±53 [2.67±0.53]	206±37 [2.06±0.37]	214±45 [2.14±0.45]	189±29 [1.89±0.29]	217±63[n=4] [2.17±0.63[n=4]]	140±45* [1.40±0.45*]	199±30 [1.99±0.30]
Week 26 (2 h)	214±19[n=4] [2.14±0.19[n=4]]	242±50 [2.42±0.50]	197±40 [1.97±0.40]	202±39 [2.02±0.39]	183±32 [1.83±0.32]	202±43[n=4] [2.02±0.43[n=4]]	155±47 [1.55±0.47]	195±20 [1.95±0.20]

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Week 26 (8 h)	236±44 [2.36±0.44]	249±47 [2.49±0.47]	206±36 [2.06±0.36]	212±42 [2.12±0.42]	181±23 [1.81±0.23]	216±49[n=4] [2.16±0.49[n=4]]	163±54 [1.63±0.54]	206±24 [2.06±0.24]
Recovery Week 13[c]	197; 218 [1.97; 2.18]	242; 203 [2.42; 2.03]	158; 159 [1.58; 1.59]	253; 198 [2.53; 1.98]	195; 182 [1.95; 1.82]	248 [2.48]	141; 224 [1.41; 2.24]	194; 223 [1.94; 2.23]
D-Dimers (ng/mL) [mg/L]								
Pre-trial	827±575 [0.83±0.58]	825±585 [0.83±0.59]	625±273 [0.63±0.27]	660±403 [0.66±0.40]	520±278 [0.52±0.28]	506±184 [0.51±0.18]	641±583 [0.64±0.58]	920±1032 [0.92±1.03]
Day 1 (Pre-dose)	603±67 [0.60±0.07]	948±671 [0.95±0.67]	1997±1372 [2.00±1.37]	433±199 [0.43±0.20]	1595±1502 [1.60±1.50]	8025±16905 [8.03±16.9]	510±267 [0.51±0.27]	589±319 [0.59±0.32]
Week 6 (Pre-dose)	694±240 [0.69±0.24]	637±176 [0.64±0.18]	5004±4273* [5.00±4.27*]	4017±1441* [4.02±1.44*]	5311±1872* [5.31±1.87*]	4085±1247 [4.09±1.25]	4994±2359* [4.99±2.36*]	3075±2409 [3.08±2.41]
Week 6 (2 h)	756±256 [0.76±0.26]	721±237 [0.72±0.24]	5184±4326 [5.18±4.33]	3845±1493* [3.85±1.49*]	5560±2421* [5.56±2.42*]	4953±2671** [4.95±2.67**]	4968±2537 [4.97±2.54]	4336±1929* [4.34±1.93*]
Week 6 (8 h)	760±167 [0.76±0.17]	731±248 [0.73±0.25]	5031±4346 [5.03±4.35]	3493±1406* [3.49±1.41*]	5118±1799 [5.12±1.80]	4096±1317** [4.10±1.32**]	5437±2514* [5.44±2.51*]	4666±1728*** [4.67±1.73***]
Week 13 (Pre-dose)	534±237 [0.53±0.24]	2553±4459 [2.55±4.46]	5644±1533*** [5.64±1.53***]	3502±1327 [3.50±1.33]	7405±1250*** [7.41±1.25***]	4071±1238 [4.07±1.24]	7566±2385*** [7.57±2.39***]	4047±2039 [4.05±2.04]
Week 13 (2 h)	593±271 [0.59±0.27]	670±153 [0.67±0.15]	5385±1670*** [5.39±1.67***]	3394±1188** [3.39±1.19**]	8227±1856*** [8.23±1.86***]	4225±1243*** [4.23±1.24***]	6484±2575*** [6.48±2.58***]	3932±1619** [3.93±1.62**]
Week 13 (8 h)	615±396 [0.62±0.40]	758±138 [0.76±0.14]	5959±2721*** [5.96±2.72***]	3630±982** [3.63±0.98**]	7486±1085*** [7.49±1.09***]	4273±1625** [4.27±1.63**]	6020±2050*** [6.02±2.05***]	3977±1772** [3.98±1.77**]
Week 26 (Pre-dose)	1754±2676 [1.75±2.68]	813±561 [0.81±0.56]	7049±7626 [7.05±7.63]	6201±3310** [6.20±3.31**]	5337±1588 [5.34±1.59]	5400±1560*, [n=4] [5.4±1.56*, [n=4]]	5143±811[n=4] [5.14±0.81[n=4]]	4452±2187* [4.45±2.19*]
Week 26 (2 h)	877±664 [0.88±0.66]	927±345 [0.93±0.35]	7182±8379*** [7.18±8.38***]	5702±3211* [5.70±3.21*]	5198±1651*** [5.20±1.65***]	4868±1191[n=4] [4.87±1.19[n=4]]	5316±610*** [5.32±0.61***]	5087±3095* [5.09±3.10*]
Week 26 (8 h)	1182±814 [1.18±0.81]	1099±536 [1.10±0.54]	5585±5167 [5.59±5.17]	5837±3358** [5.84±3.36**]	4952±1314 [4.95±1.31]	5626±1770*, [n=4] [5.63±1.77*, [n=4]]	5878±839 [5.88±0.84]	4404±1400 [4.40±1.40]
Recovery Week 13[c]	457; 406 [0.46; 0.41]	498; 193 [0.50; 0.19]	2592; 3008 [2.59; 3.01]	430; 314 [0.43; 0.31]	3801; 4433 [3.80; 4.43]	3488 [3.50]	2570; 405 [2.57; 0.41]	399; 791 [0.40; 0.79]

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Thrombin Anti-Thrombin (TAT) (ng/mL = µg/L)								
Pre-trial	5.84±4.09	33.20±67.53	9.25±6.29	6.91±5.13	3.00±0.00	3.10±0.13	5.30±4.16	18.51±24.35$^{n=4}$
Day 1 (Pre-dose)	14.60±18.58	19.49±20.77$^{n=4}$	8.07±5.51	13.83±11.94	11.03±9.82$^{n=4}$	4.76±2.28$^{n=4}$	5.22±4.96	3.78±1.74
Week 6 (Pre-dose)	3.05±0.12	3.69±1.53	23.84±17.69$^{n=4}$	12.64±4.63	34.96±22.44**	14.51±7.88	28.46±21.23	19.23±11.51*$^{n=4}$
Week 6 (2 h)	3.00±0.00	7.71±3.35	23.58±18.76$^{n=4}$	13.46±5.48	38.66±18.20**	17.92±10.03	32.34±18.08*	26.48±18.11$^{n=4}$
Week 6 (8 h)	5.56±5.72	5.38±4.99	17.74±14.15$^{n=4}$	35.36±33.63	24.78±7.24	15.48±8.95	36.92±38.87	25.48±13.96$^{n=4}$
Week 13 (Pre-dose)	3.00±0.00$^{n=3}$	59.75±65.54$^{n=4}$	34.32±23.62*	91.64±65.70	31.54±8.67*	76.18±59.60	44.28±11.59**	68.83±52.91$^{n=4}$
Week 13 (2 h)	3.00±0.00	59.40±65.72	28.22±16.31***	50.99±56.36	56.26±70.12***	119.13±52.80$^{n=4}$	33.38±7.30***	49.48±26.94
Week 13 (8 h)	3.00±0.00	4.37±1.30	19.98±7.39***$^{n=4}$	41.42±40.24	22.22±7.92***	65.78±48.99	30.44±9.48***	38.62±21.56
Week 26 (Pre-dose)	60.46±101.77	24.93±39.45	23.46±7.58	36.94±21.46$^{n=4}$	31.37±13.97$^{n=3}$	46.23±8.10$^{n=3}$	84.85±104.01$^{n=4}$	50.14±28.30
Week 26 (2 h)	14.40±25.49	9.01±8.60	41.58±20.93	26.35±13.35	47.55±24.36$^{n=4}$	42.35±14.50**$^{,n=4}$	31.85±6.81$^{n=4}$	44.13±9.03**$^{n=3}$
Week 26 (8 h)	21.44±41.23	5.00±4.20	13.94±4.59	16.13±7.42$^{n=4}$	29.74±15.03	36.43±16.08**$^{n=4}$	38.34±11.65	30.33±8.82*$^{n=3}$
Recovery Week 13[c]	51.4; 17.1	3.0; 3.0	27.1; 11.6	3.0; 3.0	19.9; 25.7	N/A	6.0; N/A	23.6; 3.0
ADAs (incidence)[d]								
Day -14	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Day 1	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Week 5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5
Week 9	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Week 13	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Week 17	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Week 21	0/5	0/5	1/5	1/5	1/5	0/4	0/5	1/5
Week 25	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/4	0/5	1/5
Recovery Week 5	2/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/1	0/2	0/2
Recovery Week 7	2/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/1	0/2	0/2

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Recovery Week 11	2/2	0/2	0/2	2/2	0/2	0/1	0/2	0/2
Macroscopic findings								
Main study (Day 183)								
Lung, adhesions	0	0	0	1	1	0	0	0
Recovery (Day 274)								
Lung adhesions	0	0	1	0	0	0	0	0
Microscopic pathology								
Main study (Day 183)								
Brain								
Choroid plexus: Endothelial cell hypertrophy, focal, minimal/mild	0	0	2	1	0	1	1	0
Choroid plexus: Endothelial cell hyperplasia, focal, minimal/mild	0	0	1	1	0	0	1	0
Choroid plexus: Inflammation, plasmacytic, lymphocytic, minimal/mild/moderate	0	0	2	1	0	0	1	0
Choroid plexus: Perivascular oedema, minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Choroid plexus: Lymphoid foci, multifocal, minimal	0	0	2	0	0	0	0	0
Epididymis								
Thrombus, organised	0	0	0	0	1	0	0	0
Injection site 1								

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Hypertrophy, endothelial cell, minimal/mild	0	0	2	0	0	1	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, minimal/mild	0	0	1	1	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, eosinophil, minimal	1	0	0	0	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, mild	0	1	0	0	0	2	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, eosinophil, minimal/mild	0	0	1	0	2	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, plasma cell, eosinophil, minimal	0	0	0	1	0	0	-	-
Injection site 2								
Hypertrophy, endothelial cell, minimal	1	0	1	1	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, minimal/mild	0	0	0	1	0	2	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, eosinophil, minimal	0	0	0	1	0	1	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, mild	0	0	0	0	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, neutrophil, minimal/mild	1	1	1	0	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, eosinophil, neutrophils, minimal	1	0	0	0	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, eosinophil, mild	0	0	1	1	1	0	-	-

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, eosinophil, neutrophil, mild	0	0	0	0	1	0	-	-
Injection site 3								
Hypertrophy, endothelial cell, minimal/mild	0	1	2	0	1	1	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, minimal/mild	0	0	1	0	1	2	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, plasma cell, minimal	0	0	0	1	1	1	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, eosinophil, minimal	1	0	0	1	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, neutrophil, minimal	0	1	0	0	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, eosinophil, plasma cell, mild	0	0	1	0	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, eosinophil, mild	0	0	1	0	1	0	-	-
Injection site 4								
Hypertrophy, endothelial cell, minimal/mild	0	0	1	2	0	1	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, minimal	0	0	0	1	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, eosinophil, minimal/mild	0	0	1	1	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytes, neutrophil, minimal	0	1	0	0	0	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, mild	0	0	0	0	0	1	-	-

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, plasma cell, eosinophils, minimal/mild	0	0	1	1	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, neutrophil, mild	0	0	0	0	0	1	-	-
Lung								
Thickening, intimal, subendothelial with normal endothelium present, minimal/mild	0	0	0	0	0	1	2	0
Hypertrophy, endothelial cell, focal, minimal/mild	0	0	1	0	0	0	1	0
Thrombus	1	0	0	2	1	0	1	1
Liver								
Thrombus, organised	0	0	0	0	1	0	0	0
Thymus								
Thrombus, organised	0	0	0	0	1	0	0	0
Microscopic pathology Recovery (Day 274)								
Brain								
Granuloma, focal, minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Choroid plexus Lymphocytic infiltration, Minimal	0	0	0	1	1	0	0	0
Medulla oblongata Perivascular, Lymphocytic infiltration	0	0	0	0	1	0	0	0
Heart								
Thrombus, organised, mural, minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Injection site 3								

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, plasma cell, minimal	0	0	0	0	1	0	-	-
Inflammatory cell infiltration, lymphocytic, plasma cell, neutrophil, minimal	0	0	0	1	0	0	-	-
Injection site 5								
Thrombi, organised, mural, mild	-	-	-	-	-	-	0	1
Lung								
Thrombus, canalised, mild/moderate	0	0	1	0	0	0	1	0
Premature decedent – Animal 34 killed on Day 121 (Week 18)[d]								
Haematology								
Haemoglobin (g/dL)								
Pre-trial						11.1		
Day 1 (Pre-dose)						11.1		
Week 6 (Pre-dose)						12.1		
Week 13 (Pre-dose)						8.9		
Week 18						2.5		
Red blood cell counts ($x10^{12}$/L)								
Pre-trial						5.03		
Day 1 (Pre-dose)						5.12		
Week 6 (Pre-dose)						5.61		
Week 13 (Pre-dose)						4.18		
Week 18						1.32		

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Haematocrit (L/L)								
Pre-trial						0.392		
Day 1 (Pre-dose)						0.381		
Week 6 (Pre-dose)						0.423		
Week 13 (Pre-dose)						0.300		
Week 18						0.100		
Reticulocyte counts (x10^9/L)								
Pre-trial						102		
Day 1 (Pre-dose)						97		
Week 6 (Pre-dose)						32		
Week 13 (Pre-dose)						66		
Week 18						225		
Total white blood cell count (x10^9/L)								
Pre-trial						9.55		
Day 1 (Pre-dose)						17.70		
Week 6 (Pre-dose)						7.81		
Week 13 (Pre-dose)						12.22		
Week 18						26.84		
Neutrophil count (x10^9/L)								
Pre-trial						6.86		
Day 1 (Pre-dose)						15.10		
Week 6 (Pre-dose)						6.48		
Week 13 (Pre-dose)						9.75		
Week 18						21.85		

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Clinical Chemistry								
Creatine phosphokinase (U/L)								
Pre-trial						349		
Day 1 (Pre-dose)						245		
Week 6 (Pre-dose)						311		
Week 13 (Pre-dose)						238		
Week 18						1290		
Sodium (mmol/L)								
Pre-trial						153		
Day 1 (Pre-dose)						146		
Week 6 (Pre-dose)						148		
Week 13 (Pre-dose)						145		
Week 18						143		
Chloride (mmol/L)								
Pre-trial						112		
Day 1 (Pre-dose)						109		
Week 6 (Pre-dose)						113		
Week 13 (Pre-dose)						109		
Week 18						101		
Total protein (g/L)								
Pre-trial						80		
Day 1 (Pre-dose)						78		
Week 6 (Pre-dose)						83		
Week 13 (Pre-dose)						71		
Week 18						52		

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Albumin (g/L)								
Pre-trial						46		
Day 1 (Pre-dose)						42		
Week 6 (pre-dose)						47		
Week 13 (pre-dose)						41		
Week 18						28		
Globulin (g/L)								
Pre-trial						34		
Day 1 (Pre-dose)						36		
Week 6 (Pre-dose)						36		
Week 13 (Pre-dose)						31		
Week 18						24		
Creatinine (µmol/L)								
Pre-trial						92		
Day 1 (Pre-dose)						85		
Week 6 (Pre-dose)						83		
Week 13 (Pre-dose)						86		
Week 18						130		
Phosphate (mmol/L)								
Pre-trial						1.45		
Day 1 (Pre-dose)						1.11		
Week 6 (Pre-dose)						1.05		
Week 13 (Pre-dose)						1.30		
Week 18						3.10		

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		3 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)		30 mg/kg once weekly (i.v.)	
Number of animals (3/sex for main study groups; 2/sex for recovery groups)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Macroscopic findings								
Lung								
Irregular mass, right and left caudal lobe						1		
Microscopic pathology								
Lung								
Necrosis, coagulative, inflammation, endothelial hypertrophy and hyperplasia, subendothelial intimal thickening						1		

[a]Arithmetic mean values. [b]Coagulation parameters presented as mean ± standard deviation. [c]Individual values presented for recovery animals in Recovery Week 13. [d]Due to drug interference ADAs may be present but not detectable. [e]Individual values presented for Animal 34F killed prematurely on Day 121 (Week 18).

Abbreviations: *, **, *** = significantly different from Group 1 $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, respectively; - = no noteworthy findings; F = females; M = males; N/A = not applicable.

2.6.7.7.D　カニクイザルを用いた 52 週間皮下投与毒性試験（213542）

Test article: concizumab

Report title: A 52 week toxicity study by the subcutaneous route in cynomolgus monkeys		**Study ID:** 213542
Species/Strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	**Duration of dosing:** 52 weeks with interim kills after 13 and 26 weeks of treatment	**Location in CTD:** 4.2.3.2-4
Initial age: 4-6 years	**Duration of postdose:** N/A	
Date of first dose: [redacted]	**Method of administration:** Daily subcutaneous injection at a volume of 0.3 mL/kg	**GLP compliance:** Yes
	Vehicle/formulation: 33 mM L-histidine, 150 mM sucrose, 0.01 mg/mL Tween 80, 25 mM arginine HCl and 25 mM sodium chloride, pH 6.0	

Parameters collected: Body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmoscopy, electrocardiography, haematology, coagulation (including D-dimers), free TFPI (see also M 2.6.5.4.F, 213542), endogenous anticoagulants (antithrombin (AT), protein C and protein S), clinical chemistry, urinalysis, organ weights, gross pathology, histopathology, anti-drug antibodies (ADAs), bioanalysis (ELISA and TFPI functionality), toxicokinetics.

Special features: The following analyses were performed to non-GLP and reported separately: total TFPI (Study ID [redacted]141003, see also M 2.6.5.4.F, 213542), circulating immune complexes (CIC), C3a and total classical complement pathway activity (CH_{50}) (Study ID 214471), immunohistochemistry on selected tissues in selected animals (Study ID 214400) and ADA/concizumab ICs using a combination of size exclusion chromatography and an immune complex assay specific for concizumab-ADA (Study ID 214449).

No Observed Adverse-Effect Level: A NOAEL for thrombosis was 0.5 mg/kg/day.

Brief conclusion: Body weight, food consumption ophthalmoscopy, electrocardiography, haematology, clinical chemistry, urinalysis, organ weights were all unaffected by treatment with concizumab after 13, 26 and 52 weeks. There were no treatment-related clinical signs associated with concizumab.

One male was killed prematurely in Week 20 due to complications after fighting. This decedent was not considered to be treatment-related.

Slightly prolonged PT (up to 1.17-fold of control) and APTT (up to 1.16-fold of control) were observed at 9 mg/kg/day. A decrease in fibrinogen concentrations was observed in all treatment groups (down to 0.41-fold of control). Platelet counts decreased at 9 mg/kg/day (down to 0.44-fold of control) and occasionally at lower doses. D-dimers increased dose-dependently after concizumab dosing (up to 13-fold of control). Minor decreases in Protein C (down to 0.84-fold of control) or antithrombin (down to 0.73-fold of control) was observed on a few occasions. No treatment-related changes were observed in Protein S. TFPI functionality and free TFPI concentration generally decreased in animals with measured concizumab exposure. Total TFPI, including both free and concizumab-bound TFPI, increased in a dose-dependent manner, reaching steady state around 20 nM in animals receiving 9 mg/kg/day (Study ID [redacted]141003; see also M 2.6.5.4.F, 213542). ADAs were observed on at least one occasion in 17/18 and 5/18 animals at 0.5 or 1 mg/kg/day, respectively, in some cases correlating with normalisation of changes in coagulation markers.

Histopathological changes included thrombosis 12 of 26 animals at 9 mg/kg/day after 13, 26 and 52 weeks and in 3 of 8 animals at 1 mg/kg/day after 52 weeks, involving lung, liver, heart, spleen, axillary and mesenteric lymph nodes and epididymis. Thrombosis was considered an exaggerated pharmacological effect. Vascular findings in the form of intimal thickening in lung and liver or lymphoplasmacytic infiltrations at the administration site and in choroid plexus were considered to be due to immune complex deposition in tissues secondary to formation of ADAs. Thus, subendothelial intimal thickening was observed in the lung at 1 and 9 mg/kg/day after 13, 26 and/or 52 weeks and in the liver after 26 weeks at 9 mg/kg/day, lymphoplasmacytic infiltration was observed at the subcutaneous administration sites at 9 mg/kg/day after 13 weeks and at all dose levels after 26 and 52 weeks, and lymphoplasmacytic infiltration, occasionally accompanied by macrophages and eosinophils, were observed in the choroid plexus at 13 weeks in one male at 9 mg/kg/day and at all dose levels after 26 and 52 weeks. Based on the detailed mechanistic investigations (Study IDs 214449, 214471 and 214400) the vascular changes in lungs and choroid plexus were considered to be related to

deposition of immune complexes (ICs) in the tissues, secondary to development of ADAs, exceeding the physiological clearance capacity of the ICs. Thus, ICs were found in plasma of all animals with these lesions, and immunohistochemical examinations revealed presence of IC in the vascular lesions in choroid plexus and/or lungs.
A NOAEL for thrombosis was determined to be 1 mg/kg/day after 26 weeks of daily dosing and 0.5 mg/kg/day after 52 weeks of daily dosing.

Dose level (mg/kg):	**0 mg/kg/day (s.c.)**		**0.5 mg/kg/day (s.c.)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**9 mg/kg/day (s.c.)**	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Toxicokinetics[b]:								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*ng/mL)								
Day 1	N/A	N/A	5,400[n=1]	416[AUC0-6h, n=1]	40,000	32,100	1,140,000	1,140,000
Week 13	N/A	N/A	2,040,000[n=2]	NC	5,590,000[n=6]	4,980,000[n=7]	71,900,000	63,800,000
Week 26	N/A	N/A	1,900,000[n=2]	NC	6,040,000[n=6]	5,290,000[n=7]	82,500,000	74,300,000
Week 52	N/A	N/A	2,160,000[n=1, c]	1,660,000[n=1]	6,790,000[n=4]	6,990,000[n=4]	101,000,000[n=5]	97,500,000[n=4]
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	N/A	N/A	207[n=4]	139[n=1]	2290	2000	78,500	79,400
Week 13	N/A	N/A	94,500[n=2]	NC	257,000[n=6]	231,000[n=7]	3,280,000	2,980,000
Week 26	N/A	N/A	83,100[n=2]	NC	280,000[n=6]	252,000[n=7]	4,120,000	3,790,000
Week 52	N/A	N/A	89,900[n=1, c]	75,300[n=1]	303,000[n=4]	314,000[n=4]	5,550,000[n=5]	4,590,000[n=4]
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund	0	0	1	0	0	0	0	0

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Haematology[d]								
Platelet counts (10^9/L)								
Pre-treatment	376±65	444±106	342±87	336±86	371±71	412±98	343±83	363±74
Week 1	351±66	392±62	328±81	328±68	368±67	344±57	354±99	362±68
Week 6	378±68	431±62	291±127	348±76	352±67	360±53	297±65	369±84
Week 9	311±59	346±62	259±72	314±69	295±61	334±85	238±40*	307±76
Week 13	348±72	424±71	334±69	356±79	340±60	360±69	298±86	346±92
Week 17	351±53	410±115	307±70	355±77	326±58	396±57	251±65*	334±114
Week 21	358±44	401±97	337±73[n=8]	342±81	326±47	370±70	247±74**	301±115
Week 26	369±59	430±131	336±62[n=8]	375±70	351±74	374±112	261±75*	351±92
Week 30	316±29	389±100	233±37[n=4]	321±87	321±89	350±42	190±65*	289±45
Week 34	479±46	458±133	324±39**[n=4]	317±95	326±54**	373±54	212±72***	282±64
Week 39	457±11	451±96	310±44**[n=4]	328±85	345±60*	423±59	221±66***	321±43
Week 44	394±34	455±94	274±48*[n=4]	315±94*	295±53	379±32	199±64***	273±42**
Week 48	403±43	471±114	283±62[n=4]	315±73*	292±69	391±63	204±57**	290±65*
Week 52	397±28	476±107	275±64*[n=4]	333±92*	314±78	388±49	189±46***	275±27**
Coagulation[d]								
PT (s)								
Pre-treatment	13.7±0.9	13.9±0.8	13.6±0.5	13.8±0.9	13.4±0.9	14.0±0.8	13.8±1.1	14.0±1.4
Week 1	14.7±0.5	13.6±0.6	14.6±0.5	13.4±0.3	14.3±0.8	13.3±0.9	15.4±0.8	13.8±0.9
Week 6	13.8±0.8	13.5±0.6	14.3±0.7	13.4±0.7	14.2±0.7	13.8±0.8	15.2±0.6***	14.3±0.8*

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Week 9	13.3±0.5	12.8±0.7	13.7±0.5	13.0±0.4	13.4±0.8	13.5±0.9	14.5±0.6***	14.0±0.6***
Week 13	13.6±0.6	12.9±0.5	14.1±0.6	13.2±0.6	13.6±0.8	13.4±0.9	15.1±0.7***	14.1±0.9**
Week 17	13.3±0.6	13.0±0.6	14.1±0.5	12.9±0.4	13.8±1.0	13.4±1.0	14.8±0.8**	13.6±0.7
Week 21	12.9±0.7	12.6±0.4	13.7±0.5$^{n=8}$	12.8±0.5	13.3±0.6	13.5±0.9*	14.9±0.6***	13.7±0.6**
Week 26	13.9±0.8	13.6±1.3	14.8±0.7$^{n=8}$	13.2±0.6	14.1±0.9	13.1±1.0	15.2±0.9*	13.6±1.1
Week 30	13.3±0.8	12.9±0.2	13.4±0.4$^{n=4}$	12.6±0.3	13.5±1.0	13.3±1.1	14.9±0.8	13.9±0.7
Week 34	13.2±0.6	13.6±0.3	13.5±0.7$^{n=4}$	13.2±0.5	13.9±1.1	14.0±0.9	14.8±0.6	13.9±0.7
Week 39	13.3±1.0	12.8±1.0	14.0±0.4$^{n=4}$	13.5±0.5	14.1±1.0	13.6±1.0	15.5±0.7**	14.3±0.6
Week 44	11.2±0.9	12.0±0.4	12.3±0.8$^{n=4}$	11.3±0.4	11.8±0.2	11.5±0.7	12.6±0.4*	12.3±0.4
Week 48	10.8±0.4	10.8±0.1	11.5±0.6$^{n=4}$	10.9±0.4	11.1±0.2	11.0±0.7	11.7±0.5	11.4±0.3
Week 52	11.1±0.3	10.9±0.1	11.7±0.7$^{n=4}$	10.8±0.5	11.2±0.6	10.5±0.6	11.6±0.6	12.0±0.6*
APTT (s)								
Pre-treatment	19.8±2.2	19.8±0.9	20.7±0.5	19.3±1.3	20.9±1.0	20.7±1.4	20.8±3.0	19.4±1.9
Week 1	21.6±0.8	20.4±1.2	22.1±0.8	21.2±1.0	21.5±1.1	20.2±1.1	21.9±0.9	20.0±1.1
Week 6	20.8±1.2	20.7±1.2	21.2±0.5	21.7±1.3	21.3±0.9	21.4±0.9	21.4±1.1	21.2±0.9
Week 9	21.2±1.0	21.2±1.1	21.7±0.7	23.2±2.1**	21.8±1.2	21.7±0.5	22.5±0.6**	22.0±1.0
Week 13	20.5±1.6	19.5±2.1	20.9±1.0	21.2±1.4	20.7±1.7	20.4±0.8	21.9±0.8	20.7±1.1
Week 17	21.1±1.2	20.7±0.5	22.0±1.1	22.2±1.3*	21.8±1.2	22.4±1.2*	22.6±0.5	22.1±0.9*
Week 21	20.8±1.0	21.0±1.0	21.8±0.7$^{n=8}$	21.9±1.1	21.6±1.0	22.0±0.8	22.8±0.8***	21.6±1.1
Week 26	20.7±1.3	20.9±2.2	21.7±1.4$^{n=8}$	20.8±1.0	21.2±1.0	20.1±1.6	21.6±1.8	20.6±1.4
Week 30	21.6±1.3	22.3±1.0	21.8±0.3$^{n=4}$	21.9±1.5	21.8±1.1	22.7± 0.7	24.1±0.8**	22.4±0.4

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Week 34	21.9±1.6	22.6±1.3	21.9±0.4$^{n=4}$	22.0±1.6	22.3±1.0	23.7±0.7	23.2±0.9	22.4±0.5
Week 39	20.2±0.5	19.6±2.8	21.2±0.3$^{n=4}$	20.4±0.9	20.6±0.9	20.6±0.7	22.1±0.5**	20.8±0.7
Week 44	21.1±0.8	23.0±0.5	22.5±1.4$^{n=4}$	21.5±1.2	22.1±1.3	22.7±1.1	24.5±0.9**	23.6±1.3
Week 48	20.0±1.9	20.2±0.6	20.0±1.0$^{n=4}$	19.9±1.0	20.4±1.3	21.2±2.1	23.2±0.8**	21.4±0.7
Week 52	19.9±1.2	19.4±0.6	20.8±1.7$^{n=4}$	19.4±0.9	20.2±1.1	19.8±1.9	21.7±0.7	21.9±1.1
Fibrinogen (PT-derived) (mg/dL) [g/L]								
Pre-treatment	368±91 [3.68±0.91]	277±29 [2.77±0.29]	385±106 [3.85±1.06]	287±47 [2.87±0.47]	387±98 [3.87±0.98]	311±60 [3.11±0.60]	400±142 [4.0±1.42]	287±67 [2.87±0.67]
Week 1	423±69 [4.23±0.69]	362±49 [3.62±0.49]	353±49 [3.53±0.49]	293±38 [2.93±0.38]	393±91 [3.93±0.91]	369±75 [3.69±0.75]	427±116 [4.27±1.16]	361±151 [3.61±1.51]
Week 6	360±53 [3.60±0.53]	344±70 [3.44±0.70]	253±38** [2.53±0.38**]	262±53** [2.62±0.53**]	295±78 [2.95±0.78]	240±32*** [2.40±0.32***]	257±58*** [2.57±0.58***]	206±54*** [2.06±0.54***]
Week 9	341±62 [3.41±0.62]	270±45 [2.70±0.45]	267±46* [2.67±0.46*]	225±37 [2.25±0.37]	259±70** [2.59±0.70**]	205±37** [2.05±0.37**]	235±42*** [2.35±0.42***]	166±52*** [1.66±0.52***]
Week 13	353±51 [3.53±0.51]	286±98 [2.86±0.98]	312±57 [3.12±0.57]	259±50 [2.59±0.50]	323±72 [3.23±0.72]	276±58 [2.76±0.58]	297±101 [2.97±1.01]	239±65 [2.39±0.65]
Week 17	288±49 [2.88±0.49]	247±52 [2.47±0.52]	228±43 [2.28±0.43]	223±29 [2.23±0.29]	253±84 [2.53±0.84]	207±52 [2.07±0.52]	225±48 [2.25±0.48]	178±35* [1.78±0.35*]
Week 21	338±71 [3.38±0.71]	279±52 [2.79±0.52]	279±66$^{n=8}$ [2.79±0.66$^{n=8}$]	229±40* [2.29±0.40*]	298±174 [2.98±1.74]	213±33** [2.13±0.33**]	222±50 [2.22±0.50]	192±29*** [1.92±0.29***]
Week 26	345±54 [3.45±0.54]	302±52 [3.02±0.52]	329±115$^{n=8}$ [3.29±1.15$^{n=8}$]	272±27 [2.72±0.27]	350±115 [3.50±1.15]	259±51 [2.59±0.51]	278±51 [2.78±0.51]	227±64 [2.27±0.64]
Week 30	356±96 [3.56±0.96]	220±21 [2.20±0.21]	246±28$^{n=4}$ [2.46±0.28$^{n=4}$]	241±21 [2.41±0.21]	301±124 [3.01±1.24]	208±21 [2.08±0.21]	198±65 [1.98±0.65]	174±38 [1.74±0.38]

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Week 34	468±145 [4.68±1.45]	225±35 [2.25±0.35]	219±12**$^{n=4}$ [2.19±0.12**$^{n=4}$]	226±34 [2.26±0.34]	262±95* [2.62±0.95*]	185±34 [1.85±0.34]	193±62** [1.93±0.62**]	172±35 [1.72±0.35]
Week 39	305±58 [3.05±0.58]	256±8 [2.56±0.08]	248±16$^{n=4}$ [2.48±0.16$^{n=4}$]	240±27 [2.40±0.27]	289±73 [2.89±0.73]	224±27 [2.24±0.27]	224±64 [2.24±0.64]	187±36* [1.87±0.36*]
Week 44	153±27 [1.53±0.27]	116±7 [1.16±0.07]	108±21$^{n=4}$ [1.08±0.21$^{n=4}$]	119±6 [1.19±0.06]	120±39 [1.20±0.39]	96±17 [0.96±0.17]	91±24 [0.91±0.24]	84±13** [0.84±0.13**]
Week 48	137±23 [1.37±0.23]	118±10 [1.18±0.10]	104±17$^{n=4}$ [1.04±0.17$^{n=4}$]	124±14 [1.24±0.14]	129±41 [1.29±0.41]	106±10 [1.06±0.10]	117±35 [1.17±0.35]	95±22 [0.95±0.22]
Week 52	176±8 [1.76±0.08]	156±14 [1.56±0.14]	140±24$^{n=4}$ [1.40±0.24$^{n=4}$]	143±18 [1.43±0.18]	160±24 [1.60±0.24]	146±18 [1.46±0.18]	157±72 [1.57±0.72]	104±14** [1.04±0.14**]
D-Dimers (µg/mL = mg/L)								
Pre-treatment	1.0±0.7	0.7±0.3	1.3±1.7	1.1±1.6	0.9±0.5	0.6±0.1	1.3±1.2	1.2±1.8
Day 1	1.1±0.4	0.7±0.3	1.0±0.9	0.5±0.1	0.8±0.1	0.6±0.2	2.4±3.1	0.8±0.8
Week 13	1.4±0.9	1.2±0.8	2.0±2.0	0.9±1.2	5.0±3.2	2.9±2.4	8.3±5.7***	5.3±3.2***
Week 26	0.7±0.2	0.7±0.4	1.7±1.0$^{n=8}$	0.7±0.3	4.3±2.9***	2.9±1.5***	8.2±4.2***	4.9±1.5***
Week 39	0.8 ±0.6	0.6±0.2$^{n=3}$	0.9±0.8$^{n=4}$	0.7±0.2	3.6 ±2.5	3.2 ±1.9*	6.0±1.9**	3.3±1.4*
Week 52	0.7±0.2	0.9±0.2$^{n=3}$	1.6±1.6$^{n=4}$	1.7±1.3	4.6 ±2.5	5.5 ±5.4	9.0±3.6**	5.0±1.7
ADAs (Incidence)[e]								
Pre-treatment	N/A	N/A	0/9	0/9	1/9	0/9	0/13	1/13
Day 1	N/A	N/A	0/9	0/9	1/9	0/9	0/13	0/13
Week 6	N/A	N/A	6/9	6/9	2/9	1/9	0/13	0/13
Week 13	N/A	N/A	7/9	9/9	3/9	2/9	0/13	0/13
Week 21	N/A	N/A	7/8	9/9	3/9	2/9	0/9	0/9

Dose level (mg/kg):	**0 mg/kg/day (s.c.)**		**0.5 mg/kg/day (s.c.)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**9 mg/kg/day (s.c.)**	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Week 26	N/A	N/A	7/8	9/9	3/9	2/9	0/9	0/9
Week 34	N/A	N/A	4/4	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5
Week 39	N/A	N/A	4/4	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5
Week 44	N/A	N/A	3/4	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5
Week 52	N/A	N/A	3/4	5/5	1/5	1/5	0/5	0/5
Macroscopic findings 13-week animals (Day 92)								
Lung, dark focus	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1
26week animals (Day 183/184)	0	0	0	0	0	0	0	0
52week animals (Days 365-368)								
Heart, mass	0	0	0	0	0	0	0	1
Lung, mass	0	0	0	0	0	1	0	0
Microscopic pathology 13-week animals (Day 92)								
Heart								
Thrombosis, moderate	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0
Liver								
Thrombosis, moderate	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0
Lung								
Thrombosis, minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1
Subendothelial intimal thickening, minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Subendothelial intimal thickening, marked	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1
Axillary lymph node								
Thrombosis, mild	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0
Brain								
Choroid plexus: infiltration, lymphocytic/plasmacytic, minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0
Injection site 1								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue, minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	2	2
Injection site 2								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue, minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1
Injection site 3								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	3	2
Mild	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1
Injection site 4								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	4
Mild	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Microscopic pathology **26-week animals (Day 183/184)**								
Liver								
Thrombosis, mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Subendothelial intimal thickening, moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Lung								
Thrombosis, minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Thrombosis, moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Subendothelial intimal thickening, moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Spleen								
Thrombosis, mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Brain								
Choroid plexus: Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Choroid plexus: Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Choroid plexus: Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, marked	0	0	0	0	1	0	0	0
Injection site 1								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	3	3	3	1	1	3
Mild	0	0	1	1	1	0	1	1

Dose level (mg/kg):	**0 mg/kg/day (s.c.)**		**0.5 mg/kg/day (s.c.)**		**1 mg/kg/day (s.c.)**		**9 mg/kg/day (s.c.)**	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Injection site 2								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	0	2	2	0	0	1
Mild	0	0	1	2	2	0	1	1
Injection site 3								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	2	2	1	2	2	3
Mild	0	0	1	1	2	0	0	1
Injection site 4								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	3	2	3	2	3	2
Mild	0	0	1	1	1	0	0	1
Microscopic pathology 52-week animals (Days 365-368)								
Epididymis								
Thrombosis, minimal	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A
Heart								
Thrombosis, marked	0	0	0	0	1	1	1	1

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Liver								
Thrombosis, Mild	0	0	0	0	0	0	2	0
Thrombosis, Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Lung								
Thrombosis, Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Thrombosis, Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Thrombosis, Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Thrombosis, Marked	0	0	0	0	0	1	0	0
Subendothelial intimal thickening, Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Subendothelial intimal thickening, Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0
Mesenteric lymph node								
Thrombosis, moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Brain								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, choroid plexus, minimal	0	0	1	1	0	1	1	3
Injection site 1								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	3	3	3	2	3	5
Mild	0	0	0	1	1	1	0	0

Dose level (mg/kg):	0 mg/kg/day (s.c.)		0.5 mg/kg/day (s.c.)		1 mg/kg/day (s.c.)		9 mg/kg/day (s.c.)	
Number of animals (3/sex for control interim groups; 4/sex at 9 mg/kg/day after 13 weeks (Day 92); 4/sex for treated groups after 26 weeks (Day 183/184); 5M+5Ffor treated groups for 52 weeks[a]	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 13**	**F: 13**
Injection site 2								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	2	3	1	2	0	4
Mild	0	0	2	2	2	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0
Injection site 3								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	4	4	4	2	5	4
Mild	0	0	0	0	1	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Injection site 4								
Infiltration, lymphocytic, plasmacytic, perivascular, subcutaneous tissue								
Minimal	0	0	2	3	3	3	2	3
Mild	0	0	1	1	1	0	1	1
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0

[a]One male (2009M), allocated to the 52-week treatment group 2, was taken down after fighting with cage mates in Week 20 of the study. [b]Arithmetic mean values. [c]The AUC was based on the concentration in the pre-dose sample, i.e. calculated as 89,900 ng/mL * 24 h = 2,160,00 h*ng/mL (M 2.6.5.4.F, 213542). [d]Haematology and Coagulation parameters presented as mean ± standard deviation. [e]Due to drug interference antibodies may be present but not detectable in animals dosed with 1 and 9 mg/kg/day.

Abbreviations: *, **, *** = significantly different from Group 1 p<0.05, p<0.01, p<0.001, respectively; - = no noteworthy findings; F = female; M = males; N/A = not applicable; NC Not calculable due to lack of exposure.

2.6.7.8 遺伝毒性試験：*in vitro*

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.6.4.

2.6.7.9 遺伝毒性試験：*in vivo*

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.6.4.

2.6.7.10 がん原性試験

Test article: concizumab

A weight of evidence evaluation is provided in the carcinogenicity assessment (Study 321420 [M 4.2.3.4.3-1]).

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.6.6.

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test article: concizumab

Fertility parameters were included in the 26-week chronic toxicity study in sexually mature cynomolgus monkeys (Study 211087 [M 4.2.3.2-3]). There was no effect of treatment on menstrual cycle duration, length, width and volume of each testis, total sperm count, sperm motility and sperm morphology. The histopathological investigation of the reproductive organs from the conducted toxicity studies in non-mature and mature monkeys of up to 52 weeks duration did not indicate any adverse effect on the reproductive system.

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.6.6.2.

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験

Test article: concizumab

No studies performed – rationale provided in M 2.6.6.6.3.

2.6.7.15　幼若動物を用いた試験

Test article: concizumab

No dedicated studies performed. Repeat-dose toxicity studies performed in juvenile and sexually mature animals – rationale provided in M 2.6.6.6.4.

2.6.7.16 局所刺激性

Test article: concizumab

Species/ strain	Method of administration	Dose levels (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID[a]
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v. weekly for 4 weeks	0, 30	M/3+F/3	No microscopic findings at the i.v. injection sites considered related to effects of concizumab.	210130
	s.c. weekly for 4 weeks	3, 9	M/3+F/3	Generally minor inflammatory cell foci/perivascular cuffing was recorded at the s.c. injection sites for animals given 3 or 9 mg/kg/day of concizumab with marginally higher severity in animals given 9 mg/kg/day.	
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	i.v. weekly for 13 weeks	200	M/5+F/5	No microscopic findings at the i.v. injection sites considered related to effects of concizumab.	209206
	s.c. weekly for 13 weeks	0, 1, 10, 50	M/5+F/5	Inflammatory cell foci/perivascular cuffing were recorded at the s.c. injection sites in all groups including controls. The overall incidence and severity of these changes was higher in males given 50 mg/kg/day and females given 1, 10 or 50 mg/kg/day, when compared to controls. The overall level of cellulitis/fibrosis was marginally higher in females given 1, 10 or 50 mg/kg/day, compared to controls but with no clear dose relationship. The incidence and severity of cellulitis/fibrosis in treated males was comparable to controls. At the s.c. injection sites, the changes were almost completely reversible after 11 weeks of recovery, and only a minimal incidence of inflammatory cell foci/perivascular cuffing was recorded for individual animals previously given 10 or 50 mg/kg/day.	

Species/ strain	Method of administration	Dose levels (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID[a]
Cynomolgus monkey (M*acaca fascicularis)*	i.v. weekly for 26 weeks	30	M/3+F/3	There were no microscopic findings at the i.v. injection sites considered related to effects of concizumab except for a thrombus observed in a single animal.	211087
	s.c. weekly for 26 weeks	0, 3, 9	M/3+F/3	At the s.c. injection sites perivascular infiltrates of leukocytes (including plasma cells, neutrophils, eosinophils and giant cells) were recorded. These changes were almost completely reversible after 13 weeks of recovery.	
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. daily for 13, 26 and 52 weeks	0, 0.5, 1, 9	M/9+F/9 (0, 0.5 and 1 mg/kg) M/13+F/13 (9 mg/kg)	Perivascular infiltrates, including plasma cells, were seen at the s.c. administration sites in all treated groups after 13, 26 and 52 weeks of dosing.	213542
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	Concizumab: s.c. (once daily for 4 weeks)	Day 1-4: 0, 9 Day 5-28: 0, 1	M/9 and F/9 in total (concizumab)	No microscopic findings at the s.c. and i.v. injection sites considered related to effects of concizumab or rFVIIa, respectively.	215431
	rFVIIa: i.v. (Day 28; three administrations with two-hour intervals)	1 0.25 0.5 1	M/3+F/3 M/3+F/3 M/3+F/3 M/3+F/3		

[a]No dedicated studies performed. Local tolerance assessment was integrated in the 4-, 13-, 26- and 52- week repeat-dose toxicity studies and the 4-week drug-drug interaction study with rFVIIa.

2.6.7.17　その他の毒性試験

Test article: concizumab

2.6.7.17.A　交差反応性

Test article: concizumab

Species/strain	Method of administration	Duration of dosing	Dose levels (mg/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study ID
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human	*Ex vivo*, tissue cross-reactivity	N/A	Concentration: 1 and 10 µg/ml	3 tissue donors	Staining was observed in the cytoplasm and cytoplasmic granules of endothelium, spindle cells and mononuclear leucocytes in both the human and cynomolgus monkey tissue panels examined. Staining was also observed in extracellular proteinaceous material in both the human and cynomolgus monkey tissue panels examined. Staining of cytoplasm and cytoplasmic granules was observed in cerebrum (endothelial cells, spindle cells and extracellular proteinaceous material), in pancreas (islet cells and acinar epithelial cells) and in spleen (mesothelial cells) in the cynomolgus monkey tissue panel only.	209125
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human	*Ex vivo*, tissue cross-reactivity	N/A	Concentration: 1 and 10 µg/ml	3 tissue donors	Throughout the human tissues examined, binding was present in the cytoplasm in endothelial cells of small to medium sized vessels, in haematopoietic precursor cells and mononuclear leucocytes, in spindle cells, in placental decidual cells, and in extracellular proteinaceous material. In cynomolgus monkey tissues, cytoplasmic binding of the same cell types was present with exception of placental decidual cells. Furthermore, cytoplasmic binding in testicular spermatogenic cells, as well as placental macrophages (Hofbauer cells) and trophoblastic epithelium was observed in the cynomolgus monkey tissue panel, but not in the human tissue panel.	209280

2.6.7.17.B　コンシズマブモノマー及びマルチマー型の特性解析

Test article: concizumab

Species/strain	Method of administration	Duration of dosing	Dose levels (mg/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study ID
N/A (separation of concizumab [redacted] by SEC)	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	Individual [redacted] components from the material used in the 26-week toxicity study were isolated, concentrated and characterised. Characterisation of isolated fractions confirmed the non-reversible and non-covalent nature of the [redacted].	215027
N/A (functional characterisation of [redacted] and [redacted] forms of concizumab)	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The functional activity of a [redacted] and [redacted] forms of concizumab were tested in thrombin generation in plasma, thromboelastography in blood and in a FXa generation assay in the presence and absence of endothelial cells expressing TFPI. Overall, the [redacted] forms of concizumab were fully active with respect to TFPI inhibition under all conditions tested, with higher activity of the [redacted] forms compared to the [redacted] forms in some assays, but comparable or slightly lower activity in other assays.	[redacted]130901
Recombinant human and cynomolgus monkey proteins	*In vitro*, binding of concizumab batches with different [redacted] content to Fcγ receptors by SPR	N/A	N/A	N/A	The binding affinity human and cynomolgus monkey Fcγ-receptors (FcγR) to concizumab [redacted] and [redacted], determined by SPR, was comparable. In contrast, [redacted] forms of concizumab showed slower dissociation from captured cynomolgus FcγRs compared to [redacted] forms, consistent with the [redacted] characteristics of [redacted], potentially leading to avidity.	215094

Species/strain	Method of administration	Duration of dosing	Dose levels (mg/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study ID
EA hy926WT and human blood cells	*In vitro*, Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of concizumab batches with different [redacted] content	N/A	N/A	N/A	*In vitro* cytotoxicity was investigated by testing the ability of different batches of concizumab containing different amounts of [redacted] to induce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of TFPI-expressing target cells (endothelial cell line; EA hy926WT). None of the batches of concizumab induced ADCC by target mediated binding.	214488
EAHY926 cells and HUVECs	*In vitro*, binding and internalisation of concizumab batches with different [redacted] content	N/A	Binding: 0.01-6.5 µg/ml for 3 hours Internalisation: 0.01-5 µg/ml for 1-3 hours	N/A	The uptake and internalisation of radio-labelled [redacted] and [redacted] forms of concizumab in endothelial cell culture was measured as specific radioactivity associated with cell membrane or cytoplasm. For [redacted] forms, only small fractions were taken up and no difference between [redacted] and [redacted] was observed.	[redacted] 131001
HUVECs	*In vitro*, endothelial activation by concizumab batches with different [redacted] content	N/A	0.3 or 3 µg/ml for 1-7 days	N/A	Concizumab [redacted] and [redacted] did not induce the cell surface expression of endothelial activation markers E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 as measured by flow cytometry. In addition, concizumab [redacted] or [redacted] did not induce endothelial surface expression of FcγRI, FcγRII or FcγRIII.	[redacted] 130901

2.6.7.17.C　免疫複合体介在性の病理所見に関する作用機序検討試験

Test article: concizumab

Species/strain	Method of administration	Duration of dosing	Dose levels (mg/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study ID
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	Biodistribution and IHC of concizumab and TFPI in cynomolgus monkey choroid plexus treated for 26 weeks (Study ID 211087)	N/A	N/A	N/A	There was a dose-dependent increase in intensity of the IHC stain for concizumab. IHC reactivity for concizumab was primarily seen in plasma and to a lesser extent associated with the endothelium. IHC reactivity for endogenous TFPI was primarily associated with the endothelium. The intensity of the endothelial TFPI stain was stronger in the three concizumab treatment groups compared to the vehicle group.	[redacted]130402
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	*In vitro*, SEC followed by ADA analysis and IC ELISA in plasma samples from cynomolgus monkey treated for 13, 26 and 52 weeks (Study IDs 211087 and 213542)	N/A	N/A	26-week study (Study ID 211087): M/1 (gr. 1), M/3+F/1 (gr. 2), F/3 (gr. 3), M/3 (gr. 4) 13-week interim of 52-week study (Study ID 213542): M/1 (gr. 1), M/3+F/2 (gr. 4) 26-week interim of 52-week study (Study ID 213542): M/1 (gr. 2), M/1 (gr. 3), M/1+F/2 (gr. 4) 52-week terminal group (Study ID 213542): M/1+F/1 (gr. 1); M/1+F/1 (gr. 2); F/1 (gr. 3); M/2+F/3 (gr. 4)	Detection of ADA/concizumab ICs without interference from free concizumab was achieved by separation of the complexes from the free drug by SEC followed by an ELISA that is specific for complexes of ADA/concizumab. Only animals with vascular changes were tested. In all tested animals from the dosed groups ADA/concizumab ICs of different sizes were detected. No ADA/concizumab ICs were detected in the pre-dose samples from the tested animals or in control animals.	214449

<table>
<tr>
<td>Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)</td>
<td>In vitro, complement activation and CIC in serum samples from cynomolgus monkey treated for 26 and 52 weeks (Study ID 213542)</td>
<td>N/A</td>
<td>N/A</td>
<td><u>26-week</u>:
M/6+F/6 (control group)
M/8+F/9 (gr. 2)
M/9+F/9 (gr. 3 and 4)
<u>52-week:</u>
M/3+F/3 (control group),
M/4+F/5 (gr. 2)
M/5+F/5 (gr. 3 and 4)</td>
<td>Complement activation was measured in samples from the 52-week toxicity study (Study ID 213542) using three different assays. Analysis of CIC, classical complement pathway activity (50% Haemolytic Complement equivalent (CH50)) and complement fragment C3a analysis was performed on samples taken pre-dose, 4 h, 8 h and 24h after s.c. dosing in Week 26 and 52 of dosing. In the samples taken in Week 26 the pre-dose levels of CIC were higher in the dosed groups compared to the control group, reaching statistical significance in the high dose group 4. Furthermore, significant increases in CIC levels were observed 4 hours after dosing in all dosed animals.
Summary of Week 26 data from the CIC assay (Mean ± SD in µg Eq/ml)
<table>
<tr><th></th><th>Gr. 1</th><th>Gr. 2</th><th>Gr. 3</th><th>Gr. 4</th></tr>
<tr><td></td><td colspan="4">mg/kg/day</td></tr>
<tr><td></td><td>0</td><td>0.5</td><td>1</td><td>9</td></tr>
<tr><td>Pre-dose</td><td>4.4 ±1.5</td><td>5.8 ±3.5</td><td>5.9 ±3.1</td><td>11.1 ±2.8[B]</td></tr>
<tr><td>4 hours postdose</td><td>4.4 ±1.0</td><td>7.4 ± 3.9[A]</td><td>7.7 ±3.2[A]</td><td>14.9 ±3.0[A]</td></tr>
<tr><td>8 hours postdose</td><td>3.7 ±0.8</td><td>6.0 ± 3.9</td><td>6.3 ±2.9</td><td>13.3 ± 3.3</td></tr>
<tr><td>24 hours postdose</td><td>3.6 ±1.2</td><td>5.9 ±3.4</td><td>5.5 ±2.1</td><td>13.1 ± 2.8</td></tr>
</table>
[A]p<0.01 vs pre-dose (paired t-test)
[B]p<0.001 vs group 1, 2 and 3

In Week 52, there was a non-significant trend to higher CIC levels in the dosed groups, with no noteworthy changes after dosing.
No significant changes were observed in the C3a and CH50 levels in Weeks 26 and 52.</td>
<td>214471</td>
</tr>
</table>

Species/strain	Method of administration	Duration of dosing	Dose levels (mg/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study ID
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	*Ex vivo*, immunohisto-chemical study to investigate immune complexes in tissues of selected animals from study 211087	N/A	N/A	Lung tissue from M/1+F/1 (gr. 1), M/1 (gr. 2), F/2 (gr. 3), M/2 (gr. 4). Brain-choroid plexus tissue from M/1+F/1 (gr. 1), M/3+F/1 (gr. 2), M/2 (gr. 4).	Deposited immune complexes were found in affected blood vessels in lung of three animals (dosed at 3 mg/kg/day or 30 mg/kg/week) and in choroid plexus of two animals (dosed at 3 mg/kg/day or 30 mg/kg/week) with inflammation and/or vascular changes (endothelial hyperplasia/hypertrophy or subendothelial thickening) in the respective tissues.	214391
Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	*Ex vivo*, immunohisto-chemical study to investigate immune complexes in tissues of selected animals from study 213542	N/A	N/A	Lung tissue from M/1+F/1 (13-week interim gr. 1), M/2+F/2 (13-week interim gr. 4), M/1 (26-week interim gr. 1), M/1 (26-week interim gr. 4), M/1+F/1 (52-week terminal sacrifice, gr. 1), F/1 (52-week terminal sacrifice, gr. 3) M/1 (52-week terminal sacrifice, gr. 4) Brain-choroid plexus tissue from M/1+F/1 (13-week interim gr. 4), M/1+F/1 (26-week interim gr. 1), M/1 (26-week interim gr. 2), M/1 (26-week interim gr. 3), F/2 (26-week interim gr. 4). M/1+F/1 (52-week terminal sacrifice, gr 1), M/1+F/1 (52-week terminal sacrifice, gr 2), F/1 (52-week terminal sacrifice, gr. 3) and M/1+F/3 (52-week terminal sacrifice, gr. 4) Colon tissue from F/1 (13-week interim gr. 1), F/1 (13-week interim gr. 4) Liver tissue from M/1 (13-week interim gr. 1), M/2 (from 13-week interim gr. 4),M/1 (26-week interim gr. 1), M/1 (from 26-week interim gr. 4)	Deposited immune complexes were found in affected blood vessels in lung of one animal with vascular changes (subendothelial thickening) at 13 weeks (9 mg/kg/day). After 26 weeks of dosing, deposited immune complexes were found in choroid plexus of two animals with inflammatory cell infiltrations dosed at 1 mg/kg/day and 9 mg/kg/day, respectively. In the 52 weeks terminal sacrifice animals deposited immune complexes were found in choroid plexus with inflammatory changes of four animals (2 animals dosed with 0.5 mg/kg/day, 1 animal dose with 1 mg/kg/day and 1 animal dosed with 9 mg/kg/day) and in the lung with vascular changes of two animals (1 and 9 mg/kg/day).	214400

Abbreviations: N/A = not applicable.

2.6.7.17.D　カニクイザルを用いた rFVIIa との併用投与による薬物相互作用試験

Test article: concizumab and rFVIIa

Report Title: A 28 day drug-drug interaction toxicity study in cynomolgus monkeys		**Study ID:** 215431
Species/Strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	**Duration of Dosing:** 28 Days	**Location in CTD:** 4.2.3.7.7
Initial Age: 111-132 weeks	**Duration of Postdose:** N/A	
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** NNC0172-0000-2021 or vehicle: s.c.daily[b] rFVIIa: Three i.v. (bolus) injections at two-hour intervals on Day 28[c]	**GLP Compliance:** Yes[a]
	Vehicle/Formulation: NNC0172-0000-2021: Solution in 5.12 mg/mL L-histidine, 51.3 mg/mL sucrose, 0.01 mg/mL Polysorbate 80, 5.27 mg/mL arginine HCl, 1.46 mg/mL NaCl, pH 6.0 rFVIIa: Solution in Histidine 5.2 mL (histidine solvent)	

Parameters collected:
Body weight, clinical observations, haematology, coagulation (including TAT and D-dimers), clinical chemistry, biomarkers (anti-thrombin, protein C, protein S), free TFPI and TFPI functionality (see also M 2.6.5.15.A, 215431), bioanalysis (NNC0172-0000-2021: ELISA; rFVIIa: rFVIIa clot activity), toxicokinetics, anti-drug antibodies (ADAs), organ weights, macroscopic and microscopic pathology

Special Features: N/A

No Observed Adverse-Effect Level: 1 mg/kg rFVIIa in the presence of a steady state concentration of concizumab

Brief summary: Clinical observations, body weight, food consumption, haematology, clinical chemistry, protein C, protein S and organ weights were all unaffected by treatment with concizumab, rFVIIa or rFVIIa in the presence of a steady-state concentration of concizumab. Free TFPI decreased to below the lower limit of quantification for all except one animal dosed with concizumab (M 2.6.5.15.A, 215431). The presence free TFPI in this animal correlated with ADA-development and reduced exposure to concizumab uniquely in this animal. There was no observed effect of rFVIIa on free TFPI levels regardless of the presence of concizumab. TFPI functionality decreased in all animals dosed with concizumab with no effect of rFVIIa administration. The fibrinogen concentration in concizumab treated animals decreased to 0.61-fold of pre-treatment concentration on Day 26, with no significant effect of rFVIIa administration either alone or in the presence of concizumab. PT was shortened to a similar extent in all groups after treatment with rFVIIa on Day 28, with or without preceding concizumab treatment and returned to pre-rFVIIa-levels on Day 29. Concentration of TAT and D-dimers increased in response to administration of concizumab as well as rFVIIa, and this effect tended to be additive when both FVIIa and concizumab were present. Anti-thrombin levels in animals dosed with rFVIIa in the presence of steady state concizumab concentrations decreased after rFVIIa-dosing on Day 28 (down to 0.8-fold of pre-treatment), with no clear effect on AT after rFVIIa or concizumab alone. Macroscopic and microscopic pathological examination did not reveal any treatment related findings, whereas s.c. and i.v. dosing and sampling sites showed minor changes considered to be related to procedures.

Administration of rFVIIa to cynomolgus monkeys at doses of 0.25, 0.5 or 1 mg/kg/dose (i.v.) three times, two hours apart, on Day 28, in the presence of a steady state concentration of concizumab was well tolerated. There were no adverse findings and no evidence of any adverse impact of a steady state concentration of concizumab on the safety profile of rFVIIa. The NOAEL for rFVIIa in the presence of a steady state concentration of concizumab was 1 mg/kg rFVIIa, i.e. the highest dose level tested.

Dose level (mg/kg/occasion)	**Group 1: Control**		**Group 2: Low**		**Group 3: Intermediate**		**Group 4: High**	
NNC0172-0000-2021	**0**		**9/1[b]**		**9/1[b]**		**9/1[b]**	
rFVIIa	**1**		**0.25**		**0.5**		**1**	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics[d]:								
NNC0172-0000-2021 $AUC_{0\text{-}24h}$ (hr*ng/mL)								
Day 1	N/A	N/A	823,000	740,000	931,000	820,000	786,000	739,000
Day 27	N/A	N/A	4,670,000	4,840,000	4,590,000	3,720,000	5,350,000	4,380,000
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	N/A	N/A	49,600	48,100	59,600	56,200	50,700	41,300
Day 27	N/A	N/A	206,000	222,000	244,000	169,000	236,000	197,000
rFVIIa								
AUC (hr*IU/mL)								
Day 28 (post 3rd rFVIIa dose)	1,340	1,390	442	275	622	735	1,430	14,10
C_{max} (IU/mL)								
Day 28 (post 3rd rFVIIa dose)	632	634	190	162	321	349	743	692
ADAs (incidence):								
Pre-treatment	N/A	N/A	0	0	1	1	0	0
Day 29 (at necropsy)[e]	N/A	N/A	0	0	2[e]	0	0	0
Noteworthy findings[k]:								
Haematology								
Prothrombin time (s)								
Pre-treatment	13.1±1.1	13.2±0.3	13.4±0.8	13.4±0.5	14.1±0.9	13.1±0.2	13.6±0.8	13.1±0.4
Day 26	13.2±0.4	13.6±0.5	13.7±0.4	14.3±0.4	14.7±1.9	14.2±0.4	14.4±0.9	15.3±0.3
Day 28 (2 hours post 1st rFVIIa dose)[f]	12.9±0.2	12.9±0.4	10.6±0.1	10.4±0.6	10.0±0.5	10.5±0.1	9.6±0.1	10.0±0.7
Day 28 (2 hours post 3rd rFVIIa dose)	9.7±0.5	10.9±1.3	11.7±0.7	15.3±4.1	14.2±1.5	12.7±3.7	11.4±0.8	10.7±0.6
Day 29 (at necropsy)	13.6±0.4	14.9±2.2	16.9[g]	15.0±0.7	15.2±1.5	15.5±0.4	15.6±1.3	14.6±1.5

Dose level (mg/kg/occasion)	**Group 1: Control**		**Group 2: Low**		**Group 3: Intermediate**		**Group 4: High**	
NNC0172-0000-2021	**0**		**9/1[b]**		**9/1[b]**		**9/1[b]**	
rFVIIa	**1**		**0.25**		**0.5**		**1**	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Noteworthy findings (continued)[k]:								
Haematology								
Fibrinogen (g/L)								
Pre-treatment	1.8±0.3	1.6±0.0	1.6±0.2	1.5±0.3	1.6±0.1	1.6±0.0	1.6±0.2	1.5±0.0
Day 26	1.6±0.0	1.5±0.1	1.0±0.0	0.9±0.2	1.1±0.6	1.1±0.1	1.1±0.2	1.1±0.1
Day 28 (2 hours post 1st rFVIIa dose)[f]	1.7±0.0	1.7±0.1	1.1±0.1	1.0±0.2	1.2±0.6	1.1±0.1	1.3±0.1	1.3±0.2
Day 28 (2 hours post 3rd rFVIIa dose)	1.7±0.0	1.5±0.2	1.1±0.1	0.9±0.3	1.1±0.4	1.0±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2
Day 29 (at necropsy)	1.6±0.0	1.5±0.1	0.9[g]	1.0±0.1	1.3±0.4	1.1±0.2	1.4±0.3	1.2±0.1
TAT (µg/L)[h]								
Pre-treatment	89.1±89.3[i]	4.9±2.0	6.1±3.0	29.1±42.3	66.3±108.9[i]	4.8±1.4	20.4±27.9	8.6±4.6
Day 26	10.2±4.9	5.7±1.8	37.7±6.4	36.1±5.8	32.6±20.7	35.6±3.7	27.9±8.2	34.9±3.7
Day 28 (2 hours post 1st rFVIIa dose)[f]	15.3±3.7	7.9±3.8	46.6±18.2	46.7±18.4	63.3±47.5	50.1±6.9	58.0±33.2	69.6±10.0
Day 28 (2 hours post 3rd rFVIIa dose)	84.2±93.3[i]	15.0±1.4	42.9±4.2	37.3±6.7	64.2±36.3	47.6±0.6[i]	47.0±16.4	99.2±62.5
Day 29 (at necropsy)	12.7±9.4	14.4±12.8	137.5±94.4[i]	23.6±0.8	26.9±14.5	28.3±4.8	21.0±5.2	27.4±7.3
D-dimers (mg/L)								
Pre-treatment	3.6±4.1	0.7±0.3[j]	0.7±0.1	0.7±0.2	1.2±0.7[j]	1.0±0.6	0.7±0.2[j]	0.6±0.1[j]
Day 26	0.8±0.3	0.6±0.2[j]	4.4±0.9	3.5±0.2	4.6±3.2	5.1±1.7	3.8±0.8	3.7±0.9
Day 28 (2 hours post 1st rFVIIa dose)[f]	1.0±0.3	1.1±0.6	5.9±1.2	4.3±0.5	6.5±3.9	6.7±1.2	5.6±1.9	6.7±1.3
Day 28 (2 hours post 3rd rFVIIa dose)	2.7±0.2	1.8±0.4	6.5±1.6	4.3±0.9	8.4±5.6	6.6±1.7	6.9±2.9	7.1±1.3
Day 29 (at necropsy)	1.4±0.3	1.1±0.3	4.5±1.1	3.6±1.1	5.5±3.3	5.4±1.7	4.7±1.8	4.7±0.3

Dose level (mg/kg/occasion)	**Group 1: Control**		**Group 2: Low**		**Group 3: Intermediate**		**Group 4: High**	
NNC0172-0000-2021	**0**		**9/1[b]**		**9/1[b]**		**9/1[b]**	
rFVIIa	**1**		**0.25**		**0.5**		**1**	
Number of animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Noteworthy findings (continued)[k]:								
Anti-thrombin (%)								
Pre-treatment	95±15.9	93±11.8	95±10.8	104±16.7	93±19.0	111±8.7	91±8.5	104±10.0
Day 26	119±6.1	108±10.8	91±2.6	98±7.5	92±21.5	108±7.8	89±4.0	103±10.0
Day 28 (2 hours post 1st rFVIIa dose)[f]	119±11.5	114±11.6	87±8.1	105±7.8	90±18.5	112±4.2	85±5.5	103±12.5
Day 28 (2 hours post 3rd rFVIIa dose)	103±10.0	93±6.1	85±9.2	94±2.6	85±14.4	100±6.7	78±5.7	90±8.7
Day 29 (at necropsy)	105±5.9	89±8.1	79±11.0	83±10.1	83±15.0	89±2.1	73±7.5	85±10.4

[a]Formulations analysis (rFVIIa) was performed to GMP and is excluded from the claim of GLP compliance. [b]An initial loading dose of 9 mg/kg/day of NNC0172-0000-2021 was applied on Days 1-4 and steady state established with a dose of 1 mg/kg/day over Days 5-28. [c]In error 1st scheduled dose administered to the control group was the vehicle only. 2nd and 3rd scheduled doses were corrected and a final dose was added after a further 2-hour interval, to complete the required three administrations of rFVIIa. Subsequent procedures were rescheduled to adapt to this timing, with the exception of blood sampling that had already been performed at 2-hours after the first dosing event. Due to the available blood volume and logistics at the time, these samples could not be repeated after the next dosing occasion (i.e. actual first administration of rFVIIa). [d]Geometric mean values. AUC for rFVIIa is $AUC_{0-\infty}$. [e]Due to drug interference anti-NNC0172-0000-2021 antibodies may be present, but not detectable. Low levels of ADA, close to the assay limit, were detected pre-treatment in one male and one female and again on Day 29 for the male. ADA in these two animals and were considered not to be related to treatment with NNC0172-2021. Only ADA detected in a second male on Day 29, were considered treatment-related. [f]Group 1 dosed with vehicle only at this occasion (values therefore indicate untreated baseline). [g]Standard deviation not calculated. [h]Individual TAT levels were highly variable both pre-treatment and after dosing with the test items in both sexes and should be interpreted with caution. [i] Some values were greater than the upper limit of detection. [j]Some values were below the lower limit of detection. [k]data presented as mean +/- SD.

Abbreviations: N/A = Not applicable.

2.6.7.17.E　毒性試験で評価されたバイオマーカー

Test article: concizumab

Study type	**Species** **Method of administration**	**Duration of dosing**	**Dose levels (mg/kg)**	**Gender and No. per group**	**Noteworthy findings**	**Study ID**
Free TFPI, Total TFPI and TFPI functionality measurement in repeated single-dose escalation toxicity study (Study ID 208250)	Cynomolgus monkey s.c.	Three single escalating doses, 14 days apart	2/20/80 20/80/160 80/160/200	1M + 1F	Free TFPI and TFPI functionality decreased upon concizumab treatment, while total TFPI, including both free and concizumab-bound TFPI, increased.	210142
Antithrombin and Protein C measurement in 4- and 13-week repeat-dose toxicity studies (Study IDs 210130 and 209206, respectively)	Cynomolgus monkey s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	4 weeks 13 weeks + 11 weeks recovery	3, 9 (s.c.), 0, 30 (i.v.) 0, 1, 10, 50 (s.c.) 200 (i.v.)	3M + 3F 5M + 5F	In the two studies, plasma concentrations of protein C was not influenced by concizumab. For antithrombin a significant decrease down to 0.85-fold of control was observed. This minimal change was not considered of toxicological significant.	212058
Antithrombin and Protein C measurement in 26-week repeat-dose toxicity study (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 (s.c.) 30 (i.v.)	5M + 5F	Concizumab caused minor decreases in plasma antithrombin levels (down to 0.81-fold of control) at all dose levels and decreases in protein C levels (down to 0.79-fold of control) in the 30 mg/kg/week i.v. dosed males. The decreases were not considered to be of toxicological relevance and did not appear to be correlated with histopathological findings of thrombi.	212391
Total TFPI and free TFPI measurement in 26-week repeat-dose toxicity study (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 (s.c.) 30 (i.v.)	5M + 5F	Free TFPI decreased upon dosing with concizumab, whereas a dose-independent increase in total TFPI, including both free and concizumab-bound TFPI, was observed (see also M 2.6.5.4.E, 211087).	213391

Study type	Species Method of administration	Duration of dosing	Dose levels (mg/kg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study ID
IL-6, IL-1β, IFN-γ, TNF-α, E-Selectin and ICAM-1 in 26-week repeat-dose toxicity study (Study ID 211087)	Cynomolgus monkey s.c. (once daily) i.v. (once weekly)	26 weeks + 13 weeks recovery	0, 3, 9 (s.c.) 30 (i.v.)	5M + 5F	No treatment-related changes in serum E-Selectin, ICAM-1, IL-6, IL-1β, IFN-λ or TNF-α were observed.	213528
Biomarker Analysis of Total-TFPI in 52-week repeat-dose toxicity study (Study ID 213542)	Cynomolgus monkey s.c. (once daily)	52 weeks	0, 0.5, 1, 9	9M + 9F 9M + 9F 9M + 9F 13M + 13F	Total-TFPI in plasma increased dose-dependently and reached a steady state level around 10 or 20 nM in the mid- and high-dose groups, respectively, after 6 weeks of dosing. In most animals in the low dose group (0.5 mg/kg/day), the increase in Total TFPI was modest or even absent and dropped after week 6 in agreement with appearance of anti-drug-antibodies (see also M 2.6.5.4.F, 213542).	[redacted]141003