

TK13152

Page: 18

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

Mid-High TM5509 80 mg/kg/day	Thymus (%)	Lung Right (g)	Lung Right (%)	Lung Left (g)	Lung Left (%)	Lung Total (g)	Lung Total (%)	Heart (g)	Heart (%)	Liver (g)	Liver (%)	Spleen (g)	Spleen (%)	Pancreas (g)
	RP5F01	0.0188	8.72	0.258	7.41	0.219	16.13	0.477	11.20	0.331	88.0	2.60	4.197	0.124
RP5F02	0.0204	6.43	0.234	5.02	0.183	11.45	0.416	9.44	0.343	62.8	2.28	1.922	0.070	3.66
RP5F03	0.0193	8.93	0.307	7.26	0.249	16.19	0.556	8.64	0.297	81.2	2.79	2.514	0.086	4.39
RP5F04	0.0191	6.25	0.253	5.05	0.204	11.30	0.457	8.87	0.359	55.6	2.25	1.880	0.076	4.51
Mean	0.0194	.	.	.	.	13.77	0.477	9.54	0.333	71.9	2.48	2.628	0.089	4.29
S.D.	0.0007	.	.	.	.	2.76	0.059	1.16	0.026	15.2	0.26	1.085	0.024	0.42
N	4	.	.	.	.	4	4	4	4	4	4	4	4	4

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

Mid-High TM5509 80 mg/kg/day	Pancreas (%)	Adrenal Right (mg)	Adrenal Right (mg%)	Adrenal Left (mg)	Adrenal Left (mg%)	Adrenal Total (mg)	Adrenal Total (mg%)	Kidney Right (g)	Kidney Right (%)	Kidney Left (g)	Kidney Left (%)	Kidney Total (g)	Kidney Total (%)	Ovary Right (mg)
RP5F01	0.136	271	8.02	339	10.03	610	18.05	5.48	0.162	5.93	0.175	11.41	0.338	76
RP5F02	0.133	205	7.45	238	8.65	443	16.11	4.71	0.171	4.84	0.176	9.55	0.347	137
RP5F03	0.151	228	7.84	278	9.55	506	17.39	5.71	0.196	5.67	0.195	11.38	0.391	54
RP5F04	0.183	214	8.66	246	9.96	460	18.62	4.87	0.197	4.60	0.186	9.47	0.383	101
Mean	0.151	.	.	.	.	505	17.54	.	.	.	.	10.45	0.365	.
S.D.	0.023	.	.	.	.	75	1.08	.	.	.	.	1.09	0.026	.
N	4	.	.	.	.	4	4	.	.	.	.	4	4	.

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

TK13152

Page: 20

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

Mid-High TM5509 80 mg/kg/day	Ovary Right (mg%)	Ovary Left (mg)	Ovary Left (mg%)	Ovary Total (mg)	Ovary Total (mg%)	Uterus (g)	Uterus (%)
RP5F01	2.25	144	4.26	220	6.51	7.76	0.230
RP5F02	4.98	133	4.84	270	9.82	6.05	0.220
RP5F03	1.86	260	8.93	314	10.79	4.91	0.169
RP5F04	4.09	114	4.62	215	8.70	4.17	0.169
Mean	.	.	.	255	8.96	5.72	0.197
S.D.	.	.	.	47	1.84	1.56	0.033
N	.	.	.	4	4	4	4

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

High TM5509 300 mg/kg/day	Final Bodyweight (kg)	Brain (g)	Brain (%)	Pituitary (mg)	Pituitary (mg%)	Thyroid Right (mg)	Thyroid Right (mg%)	Thyroid Left (mg)	Thyroid Left (mg%)	Thyroid Total (mg)	Thyroid Total (mg%)	Submandib ul ar gland (g)	Submandib ul ar gland (%)	Thymus (g)
RP6F02	2.72	64.3	2.36	40	1.47	149	5.48	144	5.29	293	10.77	1.71	0.0629	0.515
Mean	2.72	64.3	2.36	40	1.47	.	.	.	.	293	10.77	1.71	0.0629	0.515
S.D.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
N	1	1	1	1	1	.	.	.	.	1	1	1	1	1

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

High TM5509 300 mg/kg/day	Thymus (%)	Lung Right (g)	Lung Right (%)	Lung Left (g)	Lung Left (%)	Lung Total (g)	Lung Total (%)	Heart (g)	Heart (%)	Liver (g)	Liver (%)	Spleen (g)	Spleen (%)	Pancreas (g)
RP6F02	0.0189	7.33	0.269	6.01	0.221	13.34	0.490	8.81	0.324	69.2	2.54	3.114	0.114	4.12
Mean	0.0189	.	.	.	.	13.34	0.490	8.81	0.324	69.2	2.54	3.114	0.114	4.12
S.D.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
N	1	.	.	.	.	1	1	1	1	1	1	1	1	1

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

High TM5509 300 mg/kg/day	Pancreas (%)	Adrenal Right (mg)	Adrenal Right (mg%)	Adrenal Left (mg)	Adrenal Left (mg%)	Adrenal Total (mg)	Adrenal Total (mg%)	Kidney Right (g)	Kidney Right (%)	Kidney Left (g)	Kidney Left (%)	Kidney Total (g)	Kidney Total (%)	Ovary Right (mg)
	RP6F02	0.151	152	5.59	169	6.21	321	11.80	4.64	0.171	4.93	0.181	9.57	0.352
Mean	0.151	.	.	.	.	321	11.80	.	.	.	.	9.57	0.352	.
S.D.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
N	1	.	.	.	.	1	1	.	.	.	.	1	1	.

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

TK13152

Page: 24

## A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

## Appendix 10 Absolute and relative organ weights (females)

Sex: Female Day(s): 29 Relative to Start Date

High TM5509 300 mg/kg/day	Ovary Right (mg%)	Ovary Left (mg)	Ovary Left (mg%)	Ovary Total (mg)	Ovary Total (mg%)	Uterus (g)	Uterus (%)
RP6F02	2.83	78	2.87	155	5.70	7.26	0.267
Mean	.	.	.	155	5.70	7.26	0.267
S.D.	.	.	.	.	.	.	.
N	.	.	.	1	1	1	1

General Footnote: [Relative organ weights: Organ to final body weight ratios]

No. TK13148-SPS1-1  
(REISSUE 1)

## ANALYSIS OF TM5509 FOR CHARACTERISTICS

Study No.: TK13148  
 Test article: TM5509 (Lot No. TMC-001)  
 Testing facility: Ina Research Inc.  
 Regulatory compliance: GLP Standards for Non-Clinical Safety Studies on Drugs (Ministry of Health and Welfare Ordinance No. 21, Mar. 26, 1997, Japan, partially revised on Jun. 13, 2008 by the Ministry of Health, Labour and Welfare Ordinance No. 114)  
 Date of analysis: August 9, 2013 (Description and confirmation test)  
 August 15, 2013 (Content)

### Results:

Test items	Specifications	Results
		Characteristics
Description	None	White powder
Confirmation test	Confirmation of absorption of similar intensity at the same wavelength as the reference spectrum.	Confirmation of absorption of similar intensity at the same wavelength as the reference spectrum.
Content	97.0%-103.0%	100.23% (mean value)
Judgment	-	Conformed

### (Confirmation test)

Analytical conditions by spectrophotometer: Wavelength: 210-400 nm

### (Content)

Analytical conditions by HPLC:

Column: YMC Pack ODS-A, 5 $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm (YMC Co., Ltd.)  
 Column temperature: 35°C  
 Sample room temperature: 10°C  
 Mobile phase: Acetonitrile containing 0.1% formic acid / 0.1% formic acid (3/2, v/v)  
 Needle wash solution: Acetonitrile / ultrapure water (3/2, v/v)  
 Flow rate: 0.8 mL/min  
 Wavelength: UV 233 nm

QAU - audited

Yoshikazu Nagai  
 Yoshikazu Nagai, M.T.

October 25, 2013  
 Date

Study Director  
 Ina Research Inc.

Note: For this reissue, the following amendment was made:

1. The results of the content was corrected to the second decimal place.  
 (No. TK13148-SPS1-1, date of issue: August 28, 2013)



No. TK13148-SPS1-2

## ANALYSIS OF TM5509 FOR CHARACTERISTICS AND STABILITY

Study No.: TK13148  
 Test article: TM5509 (Lot No. TMC-001)  
 Testing facility: Ina Research Inc.  
 Regulatory compliance: GLP Standards for Non-Clinical Safety Studies on Drugs (Ministry of Health and Welfare Ordinance No. 21, Mar. 26, 1997, Japan, partially revised on Jun. 13, 2008 by the Ministry of Health, Labour and Welfare Ordinance No. 114)  
 Storage condition: In tight, light-resistant under refrigeration (2-8°C)  
 Date of analysis: Characteristics: August 9, 2013 (Description and confirmation test)  
 August 15, 2013 (Content)  
 Stability: October 21, 2013

## Results:

Test items	Specifications	Results	
		Characteristics	Stability
Description	None	White powder	White powder
Confirmation test	Confirmation of absorption of similar intensity at the same wavelength as the reference spectrum.	Confirmation of absorption of similar intensity at the same wavelength as the reference spectrum.	Confirmation of absorption of similar intensity at the same wavelength as the reference spectrum.
Content	97.0%-103.0%	100.23% (mean value)	99.82% (mean value)
Judgment	-	Conformed	Conformed

(Confirmation test)

Analytical conditions by spectrophotometer: Wavelength: 210-400 nm

(Content)

Analytical conditions by HPLC:

Column: YMC Pack ODS-A, 5µm, 4.6 mm I.D. × 150 mm (YMC Co., Ltd.)  
 Column temperature: 35°C  
 Sample room temperature: 10°C  
 Mobile phase: Acetonitrile containing 0.1% formic acid / 0.1% formic acid (3/2, v/v)  
 Needle wash solution: Acetonitrile / ultrapure water (3/2, v/v)  
 Flow rate: 0.8 mL/min  
 Wavelength: UV 233 nm

QAU - audited

Yoshikazu Nagai  
 Yoshikazu Nagai, M.T.  
 Study Director  
 Ina Research Inc.

October 25, 2013  
 Date

B-7235  
添付資料 3  
A-2479

Study number: A-2479

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**  
(Stability and homogeneity of TM5509 in Dosing Formulations)

Test article: TM5509 (Lot number; TMC-001)  
Form (Vehicle): Suspension  
(0.5 w/v% carboxymethylcellulose sodium solution)  
Storage conditions: Put into a brown glass bottle and stored in a cold place  
(in a refrigerator, acceptable temperature: 1 to 10°C)  
and then at room temperature  
Storage period: After 7 days in a cold place and then 24 hours at room  
temperature  
Acceptance criteria  
Stability: Remaining rate [the percentage of the mean measured  
concentration after storage to that immediately after  
preparation (100)] is within 100.0 ± 10.0%.  
Homogeneity: The coefficient of variation (CV) of immediately after  
preparation and after storage are not more than 10.0%.

**Results:**

Prepared concentration (mg/mL)	Layer	Measured concentration (mg/mL)	
		Immediately after preparation	After storage
0.100	Upper	0.0928	0.0930
	Middle	0.0928	0.0968
	Lower	0.0983	0.0973
	Mean	0.0946	0.0957
	SD	0.0032	0.0023
	Remaining rate (%)	100	101.2
	CV (%)	3.4	2.4
200	Upper	194	190
	Middle	198	189
	Lower	195	188
	Mean	196	189
	SD	2	1
	Remaining rate (%)	100	96.4
	CV (%)	1.0	0.5

SD: Standard deviation

Judgment: Passed

**Regulation:**

"The Ordinance on Standard for Conduct of Non-Clinical Studies on Safety of Drugs",  
Ordinance No. 21 of the Ministry of Health and Welfare, Japan, March 26, 1997,  
Partially Revised by Ordinance No. 114 of the Ministry of Health, Labour and  
Welfare, Japan, June 13, 2008

*Hirohisa Murofushi*  
Hirohisa Murofushi

*May 2, 2012*  
Date

Study director  
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

20

51

610

## 投与液の分析（濃度及び均一性確認）

## 1. 標準物質

本試験の被験物質を使用した。

## 2. 測定対象

TM5509

## 3. バリデーション概要

以下に記載する項目については、「TM5509 調製液の濃度分析法バリデーション試験」（株式会社イナリサーチ，試験番号: TK13149）<sup>1)</sup>にて確認されている。

媒体: 0.5 w/v%カルメロースナトリウム溶液  
検量線範囲: 1~4 µg/mL  
検量線の種類: 絶対検量線法（次数: 直線，重み付け: なし）  
オートサンブラ内安定性: 10°C設定で約 24 時間安定

## 4. 分析装置

HPLC システム（Waters Corporation）:

複合型モジュール: 2695 セパレーションモジュール  
検出器: 2487 デュアルλ UV/VIS 検出器  
データ管理: Empower（Waters Corporation）

## 5. 試薬及び試液の調製

## 5.1 試薬

ジメチルスルホキシド（以下 DMSO）:

試薬特級（和光純薬工業株式会社）

ギ酸アンモニウム:

和光特級（和光純薬工業株式会社）

ギ酸:

試薬特級（和光純薬工業株式会社）

メタノール:

HPLC 用（和光純薬工業株式会社）

超純水:

水道水を蒸留水製造装置（オートスチル WG25，ヤマト科学株式会社）及び超純水製造装置（Autopure WT100，ヤマト科学株式会社）で精製した水

## 5.2 試液の調製

希釈液:

DMSO 550 mL と超純水 550 mL を混和した。

保存条件: 気密，室温（許容範囲: 1~30°C）

使用期限: 調製日を含め 10 日間

## 6 mmol/L ギ酸アンモニウム-3 mmol/mL ギ酸溶液:

ギ酸アンモニウム 0.190 g 及びギ酸 0.06 mL に超純水を加え 500 mL とした。

保存条件: 気密, 室温 (許容範囲: 1~30°C)

使用期限: 調製日を含め 10 日間

## 移動相:

メタノール 420 mL と 6 mmol/L ギ酸アンモニウム-3 mmol/mL ギ酸溶液 280 mL を混和した。調製後, 超音波照射しながら, アスピレーターで減圧にし, 小さな気泡が勢いよく出なくなるまで脱気した。

保存条件: 気密, 室温 (許容範囲: 1~30°C)

使用期限: 調製日を含め 10 日間

## ニードル洗浄液:

メタノール 60 mL と超純水 40 mL を混和した。調製後, 超音波照射しながら, アスピレーターで減圧にし, 小さな気泡が勢いよく出なくなるまで脱気した。

保存条件: 気密, 室温 (許容範囲: 1~30°C)

使用期限: 調製日を含め 10 日間

## 6. 標準溶液の調製

## 標準原液:

TM5509 の 0.01000 g を秤量し, DMSO を加えて溶解した。さらに DMSO を加えて正確に 100 mL とした。この液 4 mL を正確に取り; 希釈液を加えて正確に 20 mL とした (用時調製, 0.02000 mg/mL)。

## 標準溶液 (以下, STD) :

標準原液 2 mL を正確に取り, 希釈液を加えて正確に 20 mL とした (用時調製, 0.002000 mg/mL)。

## 7. 試料溶液の調製

## 0.4 mg/mL:

マグネチックスターラーで攪拌しながら 0.4 mg/mL 投与液の上層, 中層及び下層からそれぞれ 1 mL を正確にとり, DMSO を加えて溶解し, 正確に 4 mL とした。この液から 1 mL を正確にとり, 希釈液を加えて正確に 50 mL とした (各層 n = 1 で調製, 希釈率 200)。

## 1.2 mg/mL:

マグネチックスターラーで攪拌しながら 1.2 mg/mL 投与液の上層, 中層及び下層からそれぞれ 1 mL を正確にとり, DMSO を加えて溶解し, 正確に 10 mL とした。この液から 1 mL を正確にとり, 希釈液を加えて正確に 60 mL とした (各層 n = 1 で調製, 希釈率 600)。

## 4.0 mg/mL:

マグネチックスターラーで攪拌しながら 4.0 mg/mL 投与液の上層, 中層及び下層からそれぞれ 1 mL を正確にとり, DMSO を加えて溶解し, 正確に 40 mL とした。この液から 1 mL を正確にとり, 希釈液を加えて正確に 50 mL とした (各層 n = 1 で調製, 希釈率 2000)。

## 16 mg/mL:

マグネチックスターラーで攪拌しながら 16 mg/mL 投与液の上層, 中層及び下層からそれぞれ 1 mL を正確にとり, DMSO を加えて溶解し, 正確に 100 mL とした。この液から 1 mL を正確にとり, 希釈液を加えて正確に 80 mL とした (各層 n = 1 で調製, 希釈率 8000)。

## 60 mg/mL:

マグネチックスターラーで攪拌しながら 60 mg/mL 投与液の上層, 中層及び下層からそれぞれ 1 mL を正確にとり, DMSO を加えて溶

解し、正確に 100 mL とした。この液から 1 mL を正確にとり、希釈液を加えて正確に 30 mL とした。さらに、この液 1 mL を正確に取り、希釈液を加えて正確に 10 mL とした（各層  $n=1$  で調製、希釈率 30000）。

## 8. HPLC分析条件

カラム:	Synergi Fusion-RP 80, 4 $\mu\text{m}$ , 2 mm i.d. $\times$ 50 mm (Phenomenex)
カラム温度:	40°C
移動相:	メタノール / 6 mmol/L ギ酸アンモニウム-3 mmol/mL ギ酸溶液 (6:4, v/v)
流量:	0.5 mL/min
オートサンブラ温度:	10°C
注入量:	10 $\mu\text{L}$
測定波長:	UV 233 nm
測定時間:	8 min
ニードル洗浄液:	メタノール / 超純水 (6:4, v/v)
測定順序:	STD ( $n=6$ , システム再現性), STD, 試料溶液, STD

## 9. 算出方法

システム再現性:	Empower を用いて、STD を 6 回測定したときの、TM5509 のピーク面積の相対標準偏差 (RSD 値) を求めた。 判定基準: RSD 値 2.0%以下 (実際は 0.2 又は 0.3%)
測定濃度:	Empower を用いて、試料溶液の前後に測定した STD における TM5509 の平均ピーク面積及び調製濃度から一点検量線 (次数: 直線, 重み付け: なし) を作成した。得られた検量線を用いて各試料溶液における TM5509 のピーク面積及び希釈率から測定濃度 (mg/mL) を求めた。
対表示濃度:	各投与液の測定濃度及び表示濃度から次式を用いて対表示濃度 (%) を求めた。 対表示濃度 (%) = 測定濃度平均 / 表示濃度 $\times$ 100
均一性:	上層, 中層及び下層の各試料溶液の測定濃度平均値と標準偏差から相対標準偏差 (RSD 値) を求めた。 RSD 値 (%) = [各測定濃度の標準偏差 ( $\sigma_{n-1}$ ) / 各測定濃度平均] $\times$ 100

## 10. 数値の取扱い

調製濃度, 測定濃度及び測定濃度平均値 (mg/mL):	有効数字 4 桁 (5 桁目を四捨五入)
RSD 値, 対表示濃度 (%) :	小数点以下 1 桁 (2 桁目を四捨五入)
標準偏差:	平均値と同じ桁数に四捨五入

## 11. 文献

- 1) 永井 良和. TM5509 調製液の濃度分析法バリデーション試験. 株式会社イナリサーチ. 試験番号 TK13149. 試験委託者 東北大学大学院 医学系研究科 附属創生応用医学研究センター.

No.TK13152-CU1-1  
(1 of 2)

## ANALYSIS OF THE DOSING FORMULATION(S) FOR CONCENTRATIONS AND HOMOGENEITY

Study No.: TK13152  
 Test article: TM5509 (Lot No. TMC-001)  
 Vehicle: 0.5 w/v% carmellose sodium aqueous solution  
 Testing facility: Ina Research Inc.  
 Regulatory compliance: GLP Standards for Non-Clinical Safety Studies on Drugs (Ministry of Health and Welfare Ordinance No. 21, Mar. 26, 1997, Japan, partially revised on Jun. 13, 2008 by the Ministry of Health, Labour and Welfare Ordinance No. 114)  
 Date of preparation: September 6, 2013  
 Date of analysis: September 6, 2013

## Results:

Nominal conc. (mg/mL)	Layer	Measured conc. (mg/mL)	Mean conc. (mg/mL)	SD	RSD (%)	Percentage to the nominal conc. (%)	Result
0.4	Top	0.3807	0.3867	0.0061	1.6	96.7	Conformed
	Middle	0.3867					
	Bottom	0.3928					
1.2	Top	1.199	1.192	0.006	0.5	99.3	Conformed
	Middle	1.190					
	Bottom	1.187					
4.0	Top	3.998	4.014	0.014	0.3	100.4	Conformed
	Middle	4.019					
	Bottom	4.025					
16	Top	15.90	15.74	0.14	0.9	98.4	Conformed
	Middle	15.64					
	Bottom	15.67					
60	Top	57.10	57.47	0.56	1.0	95.8	Conformed
	Middle	57.19					
	Bottom	58.11					

Acceptance criteria: Concentrations: Percentages to the nominal conc.: 90.0-110.0%  
 Homogeneity: RSD is not greater than 10.0%

No.TK13152-CU1-1  
(2 of 2)

## ANALYSIS OF THE DOSING FORMULATION(S) FOR CONCENTRATIONS AND HOMOGENEITY

Analytical conditions by HPLC:

Column: Synergi Fusion-RP80, 4  $\mu$ m, 2 mm i.d.  $\times$  50 mm (Phenomenex)  
Column temperature: 40°C  
Sample room temperature: 10°C  
Mobile phase: Methanol / 6 mmol/L ammonium formate-3 mmol/mL formic acid solution (6/4, v/v)  
Needle wash solution: Methanol / ultrapure water (6/4, v/v)  
Flow rate: 0.5 mL/min  
Wavelength: UV 233 nm

Stirring conditions for the dosing formulations:

The dosing formulations were collected while being stirred using a magnetic stirrer.

Key personnel:

Akane Suzuki  
Akane Suzuki, B.Sc., M.T.  
Ina Research Inc.

September 10, 2013  
Date



No.TK13152-CU1-2  
(1 of 2)

## ANALYSIS OF THE DOSING FORMULATION(S) FOR CONCENTRATIONS AND HOMOGENEITY

Study No.: TK13152  
 Test article: TM5509 (Lot No. TMC-001)  
 Vehicle: 0.5 w/v% carmellose sodium aqueous solution  
 Testing facility: Ina Research Inc.  
 Regulatory compliance: GLP Standards for Non-Clinical Safety Studies on Drugs (Ministry of Health and Welfare Ordinance No. 21, Mar. 26, 1997, Japan, partially revised on Jun. 13, 2008 by the Ministry of Health, Labour and Welfare Ordinance No. 114)  
 Date of preparation: October 3, 2013  
 Date of analysis: October 3, 2013

### Results:

Nominal conc. (mg/mL)	Layer	Measured conc. (mg/mL)	Mean conc. (mg/mL)	SD	RSD (%)	Percentage to the nominal conc. (%)	Result
0.4	Top	0.3789	0.3769	0.0019	0.5	94.2	Conformed
	Middle	0.3766					
	Bottom	0.3751					
1.2	Top	1.155	1.154	0.006	0.5	96.2	Conformed
	Middle	1.159					
	Bottom	1.147					
4.0	Top	3.822	3.860	0.042	1.1	96.5	Conformed
	Middle	3.853					
	Bottom	3.906					
16	Top	15.68	15.69	0.04	0.3	98.1	Conformed
	Middle	15.74					
	Bottom	15.66					
60	Top	58.38	58.40	0.13	0.2	97.3	Conformed
	Middle	58.54					
	Bottom	58.28					

Acceptance criteria: Concentrations: Percentages to the nominal conc.: 90.0-110.0%  
 Homogeneity: RSD is not greater than 10.0%

No.TK13152-CU1-2  
(2 of 2)

## ANALYSIS OF THE DOSING FORMULATION(S) FOR CONCENTRATIONS AND HOMOGENEITY

### Analytical conditions by HPLC:

Column: Synergi Fusion-RP80, 4  $\mu$ m, 2 mm i.d.  $\times$  50 mm (Phenomenex)  
Column temperature: 40°C  
Sample room temperature: 10°C  
Mobile phase: Methanol / 6 mmol/L ammonium formate-3 mmol/mL formic acid solution (6/4, v/v)  
Needle wash solution: Methanol / ultrapure water (6/4, v/v)  
Flow rate: 0.5 mL/min  
Wavelength: UV 233 nm

### Stirring conditions for the dosing formulations:

The dosing formulations were collected while being stirred using a magnetic stirrer.

### Key personnel:

Akane Suzuki

Akane Suzuki, B.Sc., M.T.  
Ina Research Inc.

October 4, 2013

Date

## ELISA 法による Interleukin-6 測定法

### 1. 装置

インキュベータ:	IS42 (ヤマト科学株式会社)
マイクロプレートリーダー:	SH-1100R Lab (コロナ電気株式会社)
データ管理:	SF6 (コロナ電気株式会社)

### 2. 試薬及び試液の調製

#### 2.1 試薬 (ELISA Kit)

名称:	Monkey IL-6 ELISA Kit
製造会社:	Cell Sciences, Inc.
ロット番号:	5600133
キット構成:	<ul style="list-style-type: none"> <li>2) Coating antibody</li> <li>2) Standard</li> <li>2) Biotinylated detection antibody</li> <li>3) SPP conjugate (Streptavidin-HRP polymer)</li> <li>2) BSA Stock solution (10%)</li> <li>2) Cytokine stabilization buffer (CSB) <ul style="list-style-type: none"> <li>1) Tween-20</li> <li>2) TMB substrate solution</li> </ul> </li> <li>2) Stop solution (0.175 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</li> <li>2) ELISA plates (not pre-coated) <ul style="list-style-type: none"> <li>1) Adhesive cover slips</li> </ul> </li> </ul>
保存条件:	<ul style="list-style-type: none"> <li>1) 室温・遮光</li> <li>2) 冷蔵・遮光</li> <li>3) 冷凍 (許容範囲: -20°C~-80°C) ・遮光</li> </ul>
保存場所:	<ul style="list-style-type: none"> <li>1) 臨床検査室</li> <li>2) 臨床検査室の保冷库</li> <li>3) 第2フリーザー室のメディカルフリーザー</li> </ul>

#### 2.2 その他の試薬

PBS pH 7.4 (1×) :	gibco (Life technologies)
-------------------	---------------------------

## 2.3 試液の調製

注意事項:	キットは測定開始前に室温に戻して使用した。 STD1～STD7は調製後1時間以内に使用した。 以下の割合で使用した。
Wash Buffer:	PBS 1 L に Tween-20 を 0.5 mL 加え混和した。(用時調製)
Blocking buffer:	PBS 18 mL に BSA Stock solution を 2 mL 加え、穏やかに混和した。(用時調製)
Dilution buffer:	PBS 250 mL に BSA Stock solution 12.5 mL と Tween-20 を 125 $\mu$ L 加え穏やかに混和した。 (保存条件: 2～8°C, 調製後 1 ヶ月)
Coating antibody:	Coating antibody 1 バイアルに蒸留水 250 $\mu$ L 加えた。 約 15 秒間穏やかに混和後、5 分間室温に静置した。 (保存条件: 2～8°C, 調製後 12 ヶ月)
Coating antibody solution:	PBS 5 mL に Coating antibody を 50 $\mu$ L 加え、穏やかに混和した。(用時調製, 1 プレート分)
Biotinylated detection antibody:	Biotinylated detection antibody 1 バイアルに蒸留水 500 $\mu$ L を加え約 15 秒間穏やかに混和後室温で 5 分静置した。 (保存条件: 2～8°C, 調製後 12 ヶ月)
Biotinylated detection antibody solution:	Dilution buffer 10 mL に Biotinylated detection antibody を 100 $\mu$ L 加え、穏やかに混和した。(用時調製, 1 プレート分)
SPP conjugate:	SPP conjugate 1 バイアルに蒸留水 500 $\mu$ L 加えた。 約 15 秒間穏やかに混和後、冷蔵、遮光条件下にて 5 分間静置した。(保存条件: 2～8°C・遮光, 調製後 2 ヶ月)
SPP conjugate solution:	Dilution buffer 10 mL に SPP conjugate を 100 $\mu$ L 加え、穏やかに混和した。(用時調製, 1 プレート分)
標準原液 (15.8 ng/mL) :	Standard 1 バイアルに蒸留水 500 $\mu$ L を加え約 15 秒間穏やかに混和後室温で 1 分静置して標準原液とした。調製後は氷上で 1 時間以内に使用した。濃度はラベルに記載されており、溶解後はラベルの量の 2 倍の濃度を表示濃度とした(ラベル表示が 7.9 ng/vial の場合、溶解後は 15.8 ng/mL となる)。 標準原液を下表に従い Diluent で希釈した(調製後 1 時間)。

溶液名	採取物質	採取量 ( $\mu$ L)	溶媒	添加量 ( $\mu$ L)	調製濃度 (pg/mL)
STD 7	標準原液	4	Dilution buffer	983.5	64
STD 6	STD 7	400	Dilution buffer	400	32
STD 5	STD 6	400	Dilution buffer	400	16
STD 4	STD 5	400	Dilution buffer	400	8
STD 3	STD 4	400	Dilution buffer	400	4
STD 2	STD 3	400	Dilution buffer	400	2
STD 1	STD 2	400	Dilution buffer	400	1