

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES.....	1
LIST OF FIGURES	2
略語・用語の定義一覧.....	3
1. まとめ.....	4
1.1. 被験物質	7
1.2. 動物および投与経路	7
2. 単回投与毒性試験.....	7
3. 反復投与毒性試験.....	7
3.1. BNT162b2 (V8)の Wistar Han ラットを用いた筋肉内反復投与毒性試験.....	7
3.2. BNT162b2 (V9)の Wistar Han ラットを用いた筋肉内反復投与毒性試験.....	10
4. 遺伝毒性試験.....	12
5. がん原性試験.....	12
6. 生殖発生毒性試験.....	12
6.1. Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9)の筋肉内投与受胎能、催奇形性および出生後の発生に関する試験.....	12
7. 局所刺激性試験.....	13
8. その他の毒性試験.....	14
8.1. 抗原性試験	14
8.2. 免疫毒性試験	14
8.3. 新添加剤	14
8.3.1. 新添加剤の安全性評価.....	16
8.3.1.1. 新添加剤の遺伝毒性評価.....	16
9. 考察及び結論.....	22
10. 図表.....	22
参考文献.....	23

LIST OF TABLES

Table 1	毒性試験一覧.....	5
Table 2	本剤に含まれる成分および配合目的.....	14
Table 3	本剤の脂質成分の概要.....	15

LIST OF FIGURES

Figure 1	RNA 封入 LNP の模式図.....	15
Figure 2	投与期間の関数として表した 1 : 100,000 という理論上の発がんリスクに相当する量として算出した変異原性不純物の 1 日量と, ICH M7(R1)の 7.3 項で推奨している許容摂取量レベルとの比較 [ICH M7(R1)の図 1 を抜粋]	18
Figure 3	ALC-0315 およびその他のイオン化可能な陽イオン性脂質の典型例.....	19
Figure 4	ALC-0159 およびパチシラン-LNP に含有される PEG 脂質	20
Figure 5	イオン化可能な陽イオン性脂質を含有する LNP の細胞内での局在 : ALC-0315 と構造が類似する Lipid 5 および DLin-MC3-DMA.....	21

略語・用語の定義一覧

A:G	albumin:globulin ratios : アルブミン : グロブリン比
ALC-0159	本剤に添加される PEG 脂質
ALC-0315	本剤に添加されるアミノ脂質
ALP	alkaline phosphatase : アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase : アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research : 生物学的製剤評価研究センター
CoV	coronavirus : コロナウイルス
COVID-19	coronavirus disease 2019 : 新型コロナウイルス感染症
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
GGT	γ -glutamyl transpeptidase : γ -グルタミルトランスペプチダーゼ
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
IgG	immunoglobulin G : 免疫グロブリン G
IL	interleukin : インターロイキン
LNP	lipid nanoparticle : 脂質ナノ粒子
modRNA	nucleoside-modified mRNA : 修飾ヌクレオシド mRNA
mRNA	messenger RNA : メッセンジャー-RNA
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development : 経済協力開発機構
P2 S	stable prefusion S including two proline substitutions : 2つのプロリン置換を有するスパイク (S) タンパク質の安定的融合前構造体
RBD	receptor binding domain : 受容体結合ドメイン
RNA	ribonucleic acid : リボ核酸
S	SARS-CoV-2 spike glycoprotein : SARS-CoV-2 のスパイク糖タンパク質
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome : 重症急性呼吸器症候群
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 : 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2
TNF	tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子
V8	variant 8 : バリエント 8
V9	variant 9 : バリエント 9
WHO	World Health Organization : 世界保健機関

1. まとめ

BNT162b2 (BioNTech コード番号 : BNT162, Pfizer コード番号 : PF-07302048) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のスパイク糖タンパク質 (S タンパク質) 全長体をコードする修飾ヌクレオシド mRNA (modRNA) であり、これを本質とした SARS-CoV-2 による感染症に対する mRNA ワクチンの開発が進められている。コードする S タンパク質は 2 箇所のアミノ酸がプロリンに置換されており (P2S), これによって、抗原として最適な融合前構造に固定される。BNT162b2 の製剤化にあたっては、2 つの機能脂質である ALC-0159 (PEG 脂質) および ALC-0315 (アミノ脂質) ならびに 2 つの構造脂質として DSPC

(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) およびコレステロールと混合することで BNT162b2 を封入する脂質ナノ粒子 (LNP) が形成される。

BNT162b2 の非臨床毒性評価として、Wistar Han ラットの GLP 適合試験 3 試験 (反復投与毒性試験 2 試験, 生殖発生毒性試験 1 試験) を実施した (Table 1)。毒性試験では複数のワクチン候補が用いられているが、第 2/3 相臨床試験に進み、今回製造販売承認申請するワクチンの本質である BNT162b2 (V9) と、その類縁のバリエーションである BNT162b2 (V8) (臨床投与経験なし) の結果を中心に本概要文で述べる。2 つの反復投与毒性試験のうち 1 試験では BNT162b2 (V8) を用いたが、BNT162b2 (V9) との違いはコドン最適化のみであり、コードされたタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

反復投与毒性試験のデザインは、WHO, EMA および本邦におけるワクチン非臨床開発ガイドライン^{1,2,3}に基づいて設定した。また、本資料作成の際には、2020 年版 CBER ガイダンス「Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19」⁴ および「新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) ワクチンの評価に関する考え方」⁵ を参照した。すべての GLP 適合試験は、OECD のデータ相互受入れ制度に基づき、米国連邦規則集 (21 CFR Part 58) の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に従い実施した。

Table 1 毒性試験一覧

試験 ^a	試験番号 (委託者試験番号)	投与群 [投与量 (µg RNA)] ^b	投与容量 (µL) ^c	例数/群	概要表
反復投与毒性試験					
Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V8) の筋肉内反復投与毒性試験および 3 週間回復性試験 ^d	38166	対照物質 ^e (0)	200 ^g	雌雄各 15 匹	2.6.7.7A
		BNT162b2 (30)	60	雌雄各 15 匹	
		BNT162b2 (10)	20	雌雄各 15 匹	
		BNT162b2 (30)	60	雌雄各 15 匹	
		BNT162b2 (100)	200 ^g	雌雄各 15 匹	
		BNT162b2 (30)	70	雌雄各 15 匹	
		BNT162b2 (V8)^f (100)	200 ^g	雌雄各 15 匹	
Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9) の筋肉内反復投与毒性試験および 3 週間回復性試験 ^d	GR142	生理食塩液 ^h (0)	60	雌雄各 15 匹	2.6.7.7B
		BNT162b2 (V9)^f (30)	60	雌雄各 15 匹	
		BNT162b2 (30) ⁱ	60	雌雄各 15 匹	
生殖発生毒性試験					
Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9) の筋肉内投与受胎能、催奇形性および出生後の発生に関する試験 ^d	256434 (RN9391 R58)	生理食塩液 ^h (0)	60	雌 44 匹	2.6.7.12
		BNT162b2 (30)	60	雌 44 匹	
		BNT162b2 (V9)^f (30)	60	雌 44 匹	
		BNT162b2 (30)	60	雌 44 匹	

a. すべての試験は GLP 適合試験であり、OECD データ相互受入れ制度加入国（米国、ドイツおよびフランス）で実施された。

b. RNA としての投与量

c. 特記のない限り、1 回につき 1 箇所へ投与。

d. 反復投与毒性試験：週 1 回、計 3 回投与（BNT162b2 (30) のみ週 1 回、計 2 回投与）、生殖発生毒性試験：交配前後に 2 回ずつ、計 4 回投与

e. 300 mM 精製白糖含有リン酸緩衝生理食塩液

f. BNT162b2 ワクチン候補を太字で強調表示している。

g. 1 回につき 2 箇所（左右後肢に各 100 µL）へ投与。

h. 滅菌生理食塩液（0.9% NaCl）

i. BNT162b2 (30) は、試験報告書内では BNT162b2 (30) とも称される。

反復投与毒性試験において、ラットに BNT162b2 [BNT162b2 (V8) : 100 µg RNA/回, BNT162b2 (V9) : 30 µg RNA/回] を週 1 回, 計 3 回筋肉内に投与した際の忍容性は良好であった。BNT162b2 の投与に関連する一般状態の変化または死亡はみられなかった。BNT162b2 の投与によって炎症反応が誘導され、フィブリノゲン, 急性期タンパク質, 白血球数 (好中球, 好酸球, 好塩基球, 大型非染色球を含む) などの典型的な炎症性パラメータの増加, 投与部位の炎症, 一過性の体温上昇がみられ, 加えて, 病理組織学的検査では, 投与部位および一部の周囲組織 (坐骨神経の神経周囲組織, 大腿骨/膝周囲組織, 所属リンパ節を含む) で炎症がみられた。免疫活性化および炎症反応に伴う二次的影響として, BNT162b2 (V8) の投与翌日に一時的な体重減少が認められたが, 次回投与までの期間における体重増加量に対する影響はなかった。また, BNT162b2 の投与により一過性の網状赤血球数の減少, 軽微な赤血球系パラメータの減少, 軽度の血小板数の減少が認められた。抗原に対する IgG 産生および中和反応だけではなく, 所属リンパ節の胚中心の拡大および細胞充実性増加がみられ, 免疫反応が生じていることが確認された。炎症に対する反応として, 骨髓細胞充実性増加および脾臓髓外造血亢進が認められ, 剖検での脾臓の肥大ならびに脾臓重量 (絶対値および比体重値) の増加を伴っていた。

肝臓に関し, BNT162b2 の投与に関連する毒性学的意義の乏しい変化として, γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の上昇および肝細胞空胞化が認められた。BNT162b2 (V8) 投与群において GGT の上昇がみられたが, 胆汁うっ滞または肝胆道系障害を示すアルカリフォスファターゼ (ALP) または総ビリルビンの上昇, 剖検および病理組織学的所見は認められなかった。なお, BNT162b2 (V9) を用いた反復投与毒性試験では, GGT の上昇はみられなかった。また, BNT162b2 投与群において可逆的な肝門脈領域の肝細胞空胞化が認められたが, これに伴う肝機能の変化 [アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) またはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の上昇など] は認められなかった。肝細胞空胞化は, LNP の肝細胞への取り込みと関連すると考えられる⁶。

休薬期間に新たな所見は認められなかった。投与期間中の投与部位観察でみられた炎症, 一過性の体重低下および臨床病理検査値 [BNT162b2 (V9) を用いた反復投与試験での赤血球分布幅の増加, グロブリンの上昇および A:G 比の低下を除く] の変化は休薬期間終了までに回復した。休薬期間終了時の剖検および病理組織学的検査では, 一部の動物にみられた所属リンパ節の肥大および投与部位の軽微から軽度の炎症を除き, 概ね回復した。

生殖発生毒性試験において雌性ラットに BNT162b2 (V9) を 30 µg RNA/回の用量で計 4 回 (交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回) 筋肉内投与したところ, 母動物で各投与後に毒性学的意義に乏しい変化として一過性の体重および摂餌量の低下ならびに投与部位での炎症がみられた。BNT162b2 (V9) 投与による母動物の交尾能および受胎能, 胚・胎児または出生児の生存, 成長および発達への影響は認められなかった。

本剤に含まれる添加剤のうち, LNP を構成する脂質である ALC-0159, ALC-0315 および DSPC は本邦の医薬品における新添加剤に該当することから, これらの安全性について評価した。脂質の組成が製造販売承認申請製剤と同一である被験物質を用いた BNT162b2 の反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験において毒性は認められず, *in silico* 変異原性評価, 投与量の観点からの評価および文献調査等の結果, これらの新添加剤の遺伝毒性の懸念は示されなかった。以上のことから, 本剤の臨床使用により ALC-0159, ALC-0315 および DSPC の安全性への懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

1.1. 被験物質

BNT162b2 は SARS-CoV-2 の P2 S 全長体をコードする modRNA である。BNT162b2 の製剤化にあたっては、2つの機能脂質である ALC-0159 および ALC-0315 ならびに2つの構造脂質として DSPC およびコレステロールと混合することで BNT162b2 を封入する LNP が形成される。この BNT162b2 封入 LNP は、凍結保護剤を含む緩衝液（精製白糖，塩化ナトリウム，塩化カリウム，リン酸水素ナトリウム二水和物およびリン酸二水素カリウムを含有）に添加された状態で供給される。なお，本剤に防腐剤は含まれていない。

毒性試験においても BNT162b2 封入 LNP を被験物質として動物に投与した。LNP を構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一であった。なお，被験物質名を表記する場合は含有する RNA のコード番号（「BNT162b2 (V9)」等）のみを用いることとし，必要に応じて該当する項において LNP に関する説明を加えた。

2つの反復投与毒性試験のうち1試験では BNT162b2 (V8)を用いたが，BNT162b2 (V9)との違いはコドン最適化のみであり，コードされたタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

1.2. 動物および投与経路

BNT162b2 の毒性試験の動物種は，毒性試験によく使用され背景データが豊富な動物種である Wistar Han ラットを選択した。Wistar Han ラットは BNT162b2 がコードする P2 S 抗原に対する免疫応答を示すことが確認されている（M2.6.2.2.5 項）。毒性試験における投与経路は，臨床投与経路である筋肉内投与を選択した。

2. 単回投与毒性試験

BNT162b2 の単回投与毒性試験は実施していない。BNT162b2 (V8)および BNT162b2 (V9)の反復投与毒性試験の初回投与時に，毒性学的意義のある変化は認められず，概略の致死量はそれぞれ 100 µg RNA 超および 30 µg RNA 超と考えられた（M2.6.6.3 項）。

3. 反復投与毒性試験

3.1. BNT162b2 (V8)の Wistar Han ラットを用いた筋肉内反復投与毒性試験

報告書番号：38166，概要表：2.6.7.7A

SARS-CoV-2 の P2 S 全長体または S タンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) をコードする RNA (BNT162b2 (V8)，BNT162b2 (V9)，BNT162b2 (V8)または BNT162b2 (V9)) の LNP 封入体 (LNP を構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一) を，ラットに週1回筋肉内投与した際の毒性を評価し，3週間の休薬期間を設けて回復性を確認した。今回，BNT162b2 (V9)を製造販売承認申請することから，本試験で評価に用いた被験物質のうち，本項では，BNT162b2 (V9)の類縁のバリエーションである BNT162b2 (V8) (コドン最適化のみが異なり，コードするアミノ酸配列は同一) の結果について記載した。なお，各被験物質投与群の所見は概ね類似していた。BNT162b2 (V8)以外の投与群の詳細な試験成績は試験報告書に記載されている。

Wistar Han ラット (雌雄各 15 匹/群) に，BNT162b2 (V8)の LNP 封入体 (以下「BNT162b2 (V8)」と表記) を 0 (対照：300 mmol/L 精製白糖含有リン酸緩衝生理食塩液) または 100 µg RNA/回の用量で週1回，計3回 (試験1，8および15日) 筋肉内投与した。投与容量は1回につき 200 µL

とした（両側後肢にそれぞれ 100 μ L 投与）。最終投与後 2 日に雌雄各 10 匹/群を剖検に供した。残る雌雄各 5 匹/群については 3 週間の休薬期間を設けて回復性を評価した。本試験群とは別にサテライト群（雌雄各 3 匹/群）を設け、採取した血液試料をサイトカイン分析に供した。

一般状態観察（1 日 2 回）、体重測定（投与期間：各投与前および投与翌日、休薬期間：週 2 回）、摂餌量測定（週 1 回）、投与部位観察（各投与後 4、24 および 48 時間、ただし投与後 48 時間に所見がみられた場合は消失するまで 48 時間ごとに観察）、体温測定（投与期間：各投与後 4 および 24 時間、休薬期間：最終投与後 1、2 および 3 週間）、血清中サイトカイン濃度（IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10）測定（各投与前および投与後 6 時間ならびに最終投与後 48 時間）、血液学的検査、血液生化学検査および急性期タンパク質測定（初回投与後 3 日ならびに投与期間および休薬期間の終了時）、聴覚および眼科学的検査（初回投与前ならびに投与期間および休薬期間の終了時）、ならびに尿検査、血液凝固検査、免疫原性評価、器官重量測定、剖検および病理組織学的検査（投与期間および休薬期間の終了時）を実施した。

その結果、全身性の毒性を示唆する変化は認められず、忍容性が示された。投与部位での炎症反応は予想されたものであった。

BNT162b2 (V8)投与に起因する早期安楽殺または死亡例はみられなかった。聴覚および眼科学的検査において変化は認められなかった。また、一般状態観察において、行動、外観または便の状態などに全身性の変化を示唆する所見はみられなかった。

体重は各投与前に比べて投与後に一時的に減少したが（0.92 倍）、次回投与前および休薬期間終了時までには対照群の体重付近まで回復した。体温は、各投与後 4 時間または 24 時間に対照群と比較して一時的に上昇した。休薬期間中、体重または体温への影響はみられなかった。

投与部位観察においては、投与部位の浮腫および紅斑が認められた。初回投与後、BNT162b2 (V8)投与群の 23/30 例に軽微な浮腫が発現し、まれに軽微な紅斑もみられた。初回投与後と比較して、2 回目および 3 回目投与後の所見の発現頻度は増加し、重症化した（浮腫：軽微～重度、紅斑：重度）が、すべての所見は次回投与前および休薬期間の終了時に回復した。2 回目および 3 回目の投与後に重症化した局所反応は、短期間での複数回接種および高い投与量（体重当たりの投与量として換算すると約 500 μ g RNA/kg）に起因すると考えられた（なお、ヒトに対しては 1 回 30 μ g RNA/回を 21 日間隔で計 2 回筋肉内投与される。被接種者を 50 kg と仮定した場合、体重当たりの 1 回投与量は 0.6 μ g RNA/kg である）。投与期間終了時の剖検では投与部位の硬結および肥厚が 16/20 例に認められた。この剖検所見は、投与期間終了時の病理組織学的検査で BNT162b2 (V8)投与群の全例でみられた軽度から重度の炎症性変化と関連するものであった。投与部位の炎症性変化として、線維化を伴う単球系の炎症細胞浸潤（マクロファージ、顆粒球およびリンパ球の投与部位筋肉、真皮および皮下組織への浸潤）、軽微から重度の浮腫、軽微から軽度の筋線維変性（ごく稀に軽微な壊死）が混在してみられ、投与部位の周囲組織〔坐骨神経周囲組織、大腿骨/膝周囲組織、所属リンパ節（腸骨リンパ節）を含む〕でも観察された。血液学的検査における白血球数〔白血球（最大 2.2 倍：比対照値、以下同様）、好中球（最大 7.8 倍）、好酸球（最大 6.1 倍）、好塩基球（最大 2.5 倍）、大型非染色球（最大 7.7 倍）〕および急性期タンパク質〔フィブリノゲン（最大 3.1 倍）、 α -2 マクログロブリン（最大 217 倍）および α -1 酸性糖タンパク質（最大 21 倍）〕の増加を伴った。その他の血液学的検査の変化として、急性期反応と考えられる⁷アルブミンの低下（最少 0.87 倍）、グロブリンの上昇（最大 1.2 倍）およびアルブミン：

グロブリン (A:G) 比の低下がみられた。これらの所見は BNT162b2 および産生された抗原に対する典型的な炎症反応と考えられた。全身性の毒性変化が発現しておらず、歩行障害などの一般状態変化が認められなかったことから、投与部位の所見は毒性学的意義が乏しいと判断された。

免疫活性化または急性期反応および投与部位の炎症による二次的影響として、網状赤血球の一過性の減少^{8,9} (最少 0.28 倍, 試験 4 日のみ), 赤血球系パラメータ (赤血球, ヘモグロビンおよびヘマトクリット値) の減少 (最少 0.87 倍, 試験 17 日のみ) および血小板数の散発的な減少 (最少 0.66 倍) が認められたが、いずれも軽度であった。網状赤血球数の減少は、既承認の LNP 封入低分子干渉 RNA (siRNA) 製剤であるオンパットロを投与したラットで認められたが、ヒトでは認められていない¹⁰。血小板数の減少は、炎症に起因する血小板の利用亢進によるものと考えられ、止血性への影響は伴わなかった¹¹。

休薬期間終了時、上述したすべての投与部位の所見、臨床病理検査値の変化および剖検所見は回復し、病理組織学的検査でも投与部位の炎症性変化の回復または回復傾向が認められた。

投与期間終了時の剖検により、BNT162b2 (V8)の投与に関連する所属リンパ節の肥大が 11/20 例で認められた。この所見は、所属リンパ節の病理組織学的所見としてみられた軽度から中等度の胚中心細胞充実性増加および形質細胞増加を伴うものであり、BNT162b2 (V8)および産生された抗原に対する免疫反応と考えられた。休薬期間終了時、4/10 例で所属リンパ節の軽度の肥大がみられたが、他の変化は回復した。

脾臓に関する変化として、剖検で脾臓の肥大がみられ、それに伴う脾臓重量 (絶対値および比体重値) の増加 (最大 1.6 倍) が認められた。病理組織学的検査では軽微から軽度の造血亢進が認められた。骨髄でも軽微な造血亢進が認められた。いずれの所見も休薬期間終了時には回復した。

投与期間終了時の病理組織学的検査において、BNT162b2 (V8)投与群の 19/20 例で、肝門脈領域の軽微から軽度の肝細胞空胞化が認められたが、肝機能検査値の変化 (ALT または AST の上昇など) を伴わず、休薬期間の終了時には回復していたため、毒性学的意義は乏しい変化と考えられた。

肝胆道系のバイオマーカーである GGT^{12,13}の上昇 (最大 4.6 倍) が、BNT162b2 (V8)投与群で試験 4 日および 17 日に認められたが、胆汁うっ滞または肝胆道系障害を示唆する他の肝胆道系マーカーの変化、剖検または病理組織学的検査における変化はみられなかった。また、GGT の上昇は休薬期間終了時には回復した。

血清中サイトカイン濃度測定および尿検査において、BNT162b2 (V8)の投与に関連する変化は認められなかった。

免疫原性評価により、BNT162b2 (V8)が SARS-CoV-2 S タンパク質の S1 および RBD に対する IgG 産生を誘導することが示された。また、疑似ウイルスに対する高い中和活性が認められた。詳細は M2.6.2.2.5.1 項に示した。

以上、雌雄 Wistar Han ラットに BNT162b2 (V8)を 100 µg RNA/回の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、全身性の一般状態変化はみられず忍容性を示し、著明な抗原特異的免疫反応が誘導された。投与部位および所属リンパ節の炎症性変化、骨髄および脾臓の造血亢進、ならびに

臨床病理検査値の変化が認められたが、いずれも免疫活性化または急性期反応による変化、もしくは炎症による二次的变化と考えられた。肝門脈領域の軽微から軽度の肝細胞空胞化が認められたが、これはLNPの肝細胞への取り込みを表す変化と考えられた⁶。以上のように、本試験で認められた変化はいずれも毒性学的意義に乏しいものであり、休薬により回復性が示された。なお、これらの変化は他のLNP封入mRNAワクチンの筋肉内投与で典型的に発現する所見と合致するものであった¹⁴。

3.2. BNT162b2 (V9)の Wistar Han ラットを用いた筋肉内反復投与毒性試験

報告書番号：■■GR142, 概要表：2.6.7.7B

2種類のRNA (BNT162b2 (V9)またはBNT162■■)のLNP封入体 (LNPを構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一)を、ラットに週1回筋肉内投与した際の毒性を評価し、3週間の休薬期間を設けて回復性を確認した。今回、BNT162b2 (V9)を製造販売承認申請することから、本試験で評価に用いた被験物質のうち、本項ではBNT162b2 (V9)の試験結果について記載した。なお、各被験物質投与群の所見は概ね類似していた。BNT162■■投与群の詳細な試験成績は試験報告書に記載されている。

Wistar Han ラット (雌雄各15匹/群)にBNT162b2 (V9)のLNP封入体 (以下「BNT162b2 (V9)」と表記)を0 (対照：生理食塩液)または30 µg RNA/回の用量で週1回、計3回 (試験1日、8日および15日)筋肉内投与した。投与容量は1回につき60 µLとした (左側後肢に投与)。最終投与後2日に雌雄各10匹/群を剖検に供した。残る雌雄各5匹/群については3週間の休薬期間を設けて回復性を評価した。

一般状態観察 (1日2または3回)、体重 (週2回)、摂餌量 (週1または2回)、投与部位観察 (投与期間：各投与前、各投与後4時間および24時間、ただし投与後24時間の所見の程度が軽度を上回った動物は投与後48時間および72時間にも観察し、さらに投与後72時間の所見が軽度を上回った動物は投与後120および144時間にも観察、休薬期間：最終投与後72時間)、体温測定 (各投与前ならびに投与後4および24時間)、血液学的検査、血液生化学検査および急性期タンパク質測定 (試験4日ならびに投与期間および休薬期間の終了時)、眼科学的検査 (試験15日または16日)、免疫原性評価 (投与期間および休薬期間の終了時)、尿検査、血液凝固検査、器官重量測定、剖検および病理組織学的検査 (投与期間および休薬期間の終了時)を実施した。

BNT162b2 (V9)の投与に起因する早期安楽殺または死亡例はみられなかった。一般状態観察、尿検査ならびに眼科学的検査において変化は認められなかった。

BNT162b2 (V9)投与群で、摂餌量の減少 (最少0.83倍：比対照値、以下同様)が試験4日および11日に認められた。一方、休薬期間において摂餌量は増加した (雄：最大1.35倍)。体重については、投与期間中に変化はみられず、休薬期間において雄で軽微な体重増加 (最大1.06倍)がみられた。

体温は対照群と比較して試験1日、8日および15日の投与後24時間でそれぞれ0.54°C、0.98°Cおよび1.03°C高かったが、40°Cを超えた個体はなかった。

投与部位観察において、投与部位の浮腫および紅斑が認められた。初回投与後、軽微な紅斑または軽度の浮腫がみられた。2回目または3回目投与後、紅斑は軽微だったが、浮腫は中等度に重症化した。これらの浮腫および紅斑は次回投与前には回復した。

BNT162b2 (V9)の投与期間中に、血液学的検査において、白血球数 [白血球 (最大 2.64 倍 : 比対照値, 以下同様), 好中球 (最大 6.60 倍), 単球 (最大 3.30 倍) および大型非染色球 (最大 13.2 倍), 好酸球 (最大 3.17 倍) および好塩基球 (最大 8.00 倍)] の増加および総タンパク質の低下 (最少 0.90 倍) ならびにアルブミンの低下 (最少 0.85 倍) およびグロブリンの上昇 (最大 1.10 倍) に伴う A:G 比の低下 (最少 0.82 倍) がみられた。急性期反応として、フィブリノゲン (最大 2.49 倍, 試験 17 日のみ), α -1 酸性糖タンパク質 (最大 39 倍) および α -2 マクログロブリン (最大 71 倍) の増加 (全般的に雄で高値) がみられた。一過性の網状赤血球数の減少 (最少 0.27 倍, 試験 4 日) がみられたが, 試験 17 日では雌で増加 (最大 1.31 倍) した。また, 赤血球系パラメータ (赤血球, ヘモグロビンおよびヘマトクリット値) の減少 (それぞれ最少 0.93 倍, 0.90 倍および 0.90 倍) がみられた。休薬期間終了時, 臨床病理検査では赤血球分布幅の増加 (最大 1.21 倍), グロブリンの上昇 (最大 1.08 倍) に伴う A:G 比の低下 (最少 0.91 倍) が認められたのみであり回復性が示された。赤血球分布幅の増加は, 一過性に減少した網状赤血球数の回復に起因するものと考えられた。

BNT162b2 (V9)の投与に関連する脾臓重量 (絶対値, 比体重値および比脳重量値) の増加 (雄 : 最大 1.42 倍, 雌 : 最大 1.62 倍) がみられ, 剖検では所属リンパ節の肥大 (雄 1/10 例, 雌 1/10 例), 投与部位の蒼白/暗色化または硬化 (蒼白/暗色化 : 雄 2/10 例, 雌 3/10 例, 硬化 : 雄 2/10 例, 雌 4/10 例) がみられた。休薬期間終了時, BNT162b2 (V9)の投与に関連する器官重量の変化はみられず, 剖検所見として所属リンパ節の肥大が雄 1/5 例にみられたのみであり回復性が示された。

病理組織学的検査において, 投与期間終了時に投与部位での軽度から中等度の混合細胞性炎症 (20/20 例) および軽度から中等度の浮腫 (19/20 例) (剖検所見でみられた蒼白/暗色化または硬化と関連), 所属リンパ節および鼠径リンパ節での軽微から軽度の胚中心細胞充実性増加 (11/20 例, 11/20 例) および軽微から中等度の形質細胞増加 (16/20 例, 3/20 例) (剖検所見での所属リンパ節の肥大と関連), 脾臓での軽微な造血細胞の増加 (19/20 例) および軽微な胚中心細胞充実性増加 (11/20 例) (剖検所見でみられた肥大化および脾臓重量の増加と関連) ならびに骨髄での軽微な造血細胞の増加 (20/20 例) がみられたが, これらの変化は免疫活性化および炎症反応と符合するものであり, 毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの所見のうち休薬期間終了時に認められたのは所属リンパ節での軽微から軽度の胚中心細胞充実性増加 (7/10 例) および軽微な形質細胞増加 (8/10 例) ならびに脾臓での軽微な胚中心細胞充実性増加 (3/10 例) のみであり, 回復性が示された。

BNT162b2 (V9)投与群の 15/20 例で, 肝門脈領域の軽微な肝細胞空胞化が認められたが, 肝傷害を示唆する肝機能検査値の変化はみられず, 休薬期間終了時には回復していたため, 毒性学的意義は乏しい変化と考えられた。

免疫原性評価では, BNT162b2 (V9)投与群で投与期間および休薬期間の終了時に雌雄ともに SARS-CoV-2 中和抗体応答の誘導が確認された。一方, BNT162b2 (V9)投与群の初回投与前および対照群の動物からは中和抗体は検出されなかった。詳細は [2.6.2.2.5.2](#) 項に示した。

以上、雌雄 Wistar Han ラットに BNT162b2 (V9) を 30 µg RNA/回の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、全身性の一般状態の変化はみられず忍容性を示し、SARS-CoV-2 中和抗体応答が誘導された。免疫活性化または炎症反応に伴う変化がみられたが、休薬期間終了時に回復または回復傾向を示した。その他の変化として LNP 脂質の肝細胞への取り込みによると考えられる肝細胞の空胞化がみられたが、休薬期間終了時に回復した。本試験で認められた所見は、他の LNP 封入 mRNA ワクチンを筋肉内投与した際の所見と一致し¹⁴、さらに BNT162b2 (V8) の筋肉内投与試験 (M2.6.6.3.1 項) のものと同様であった。以上のことから、本試験で認められた変化はいずれも毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

4. 遺伝毒性試験

BNT162b2 の遺伝毒性試験は実施していない。本剤は RNA である BNT162b2 と溶解された脂質を混合した LNP 封入 RNA 製剤であり、本剤の各構成成分が遺伝毒性を示す可能性は予想されない。なお、新添加剤の遺伝毒性評価について M2.6.6.8.3.1.1 項に記載した。

5. がん原性試験

BNT162b2 のがん原性試験は実施していない。本剤は RNA である BNT162b2 と溶解された脂質を混合した LNP 封入 RNA 製剤であり、本剤の各構成成分ががん原性を示す可能性は予想されない。一般的に、感染症に対するワクチン製品の開発および販売承認申請にがん原性試験を実施する必要はないと考えられている^{1,3}。

6. 生殖発生毒性試験

以下に示す生殖発生毒性試験において、BNT162b2 (V9) の筋肉内投与による雌の受胎能、妊娠、胚・胎児または出生児の発達への影響は認められなかった。また、BNT162b2 (V8) および BNT162b2 (V9) の反復投与毒性試験の剖検および病理組織学的検査において、雌雄生殖組織の毒性はみられなかった (M2.6.6.3.1 項および M2.6.6.3.2)。

6.1. Wistar Han ラットを用いた BNT162b2 (V9) の筋肉内投与受胎能、催奇形性および出生後の発生に関する試験

報告書番号 : ■■■256434, 概要表 : 2.6.7.12

3 種類の RNA (BNT162■■■, BNT162b2 (V9) または BNT162■■■) の LNP 封入体 (LNP を構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一) を、ラットに筋肉内投与した際の生殖発生毒性について評価した。今回、BNT162b2 (V9) を製造販売承認申請することから、本試験で評価に用いた被験物質のうち、本項では BNT162b2 (V9) の試験結果について記載した。なお、各被験物質投与群の所見は概ね類似していた。BNT162■■■ および BNT162■■■ 投与群の詳細な試験成績は試験報告書に記載されている。

Wistar Han ラット (雌 44 匹/群) に BNT162b2 (V9) の LNP 封入体 (以下「BNT162b2 (V9)」と表記) を 0 (対照 : 生理食塩液) または 30 µg RNA/回の用量で交配前に 2 回 (交配の 21 日前および 14 日前) ならびに妊娠 9 日および妊娠 20 日の計 4 回、筋肉内に投与し、受胎能、胚・胎児および出生後の発達について評価した。投与容量は 1 回につき 60 µL とした (右または左側後肢に交互に投与)。

交配期間終了後、雌 22 匹/群については妊娠 21 日に帝王切開し、胚・胎児発生を評価した（帝王切開サブグループ）。残りの 22 匹/群は自然分娩させ、分娩後 21 日まで母動物の哺育状態および出生児の発達の影響を評価した（自然分娩サブグループ）。

すべての母動物について、一般状態（1 日 1 回以上）、体重（週 2～3 回）、性周期、交配成績および受胎能を評価し、剖検を実施した。帝王切開サブグループについて妊娠 21 日に帝王切開し、卵巣および子宮内検査、妊娠子宮重量に加え、胎児の生存率、性別、体重ならびに外表、内臓および骨格の奇形、異常および変異を評価した。自然分娩サブグループの母動物では分娩、授乳および哺育行動を分娩後 21 日まで評価した。出生児については、生存率、体重、身体的発達（耳介展開および眼瞼開裂）、行動および感覚機能発達（聴覚および視覚機能検査）を評価し、出生後 21 日に剖検した。また、BNT162b2 (V9)の初回投与前、交配直前、交配後 21 日（帝王切開サブグループ）および分娩後 21 日（自然分娩サブグループ）における母動物、妊娠 21 日の胎児、および分娩後 21 日の出生児からそれぞれ採血し、血清中の SARS-CoV-2 の中和抗体価を測定した。

BNT162b2 (V9)投与に起因する死亡例はみられなかった。母動物において、各投与後の体重および摂餌量の一過性の低下、ならびに投与部位の一般状態の変化（主には腫脹）および剖検所見が認められたが、いずれも BNT162b2 の反復投与毒性試験でみられた炎症反応または免疫反応に起因すると考えられた変化と一致し、毒性学的意義の低い変化と考えられた。

母動物において BNT162b2 (V9)投与による性周期、交尾までの期間、交尾率、受胎率および妊娠率への影響はなかった。また、卵巣および子宮内着床データ、胚・胎児の生存および成長への影響ならびに外表、内臓および骨格の奇形、異常および変異はみられなかった。加えて、出生児の生存および成長、身体的発達（耳介展開および眼瞼開裂）、感覚機能発達（聴覚および視覚機能検査）に対する BNT162b2 投与の影響はみられず、剖検所見も認められなかった。

BNT162b2 (V9)を投与後のすべての母動物ならびにその胎児および出生児から採取した血清において SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答がみられた。一方、BNT162b2 (V9)投与群の初回投与前および対照群では中和抗体応答は認められなかった。詳細は 2.6.2.2.5.3 項に示した。

以上、雌性ラットに BNT162b2 (V9)を臨床用量である 30 µg RNA/回の用量で計 4 回（交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回）筋肉内投与したところ、各投与後に体重および摂餌量の一過性の低下ならびに投与部位の剖検所見が認められたが、いずれも毒性学的意義の乏しい変化であった。また、BNT162b2 投与による母動物の交配成績、受胎能パラメータ、卵巣および子宮内着床データ、ならびに胚・胎児および出生児の生存、成長および発達に対する影響はみられなかった。母動物で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答が認められ、胎児および出生児でも検出された。

7. 局所刺激性試験

BNT162b2 の筋肉内投与による局所刺激性は、反復投与毒性試験の中で投与部位観察、剖検および病理組織学的検査によって評価しており、結果は M2.6.6.3.1 項および M2.6.6.3.2 項に記載した。

8. その他の毒性試験

8.1. 抗原性試験

マウスおよびサルを用いた効力を裏付ける試験において免疫原性を評価した (M2.6.2.2.3 項および 2.6.2.2.4 項)。マウスおよびサルに BNT162b2 (V9) を投与したところ、著明な免疫反応が誘導された。また、ラットを用いた反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験での免疫原性評価の結果から、BNT162b2 (V8) および BNT162b2 (V9) が顕著な抗原特異的免疫反応を誘発することが示された (M2.6.2.2.5 項)。

8.2. 免疫毒性試験

BNT162b2 の免疫毒性試験は実施していない。反復投与毒性試験において免疫毒性を示唆する変化はみられず、BNT162b2 (V8) の投与に関連する血清サイトカイン濃度の変化も認められなかった (M2.6.6.3.1 項)。

8.3. 新添加剤

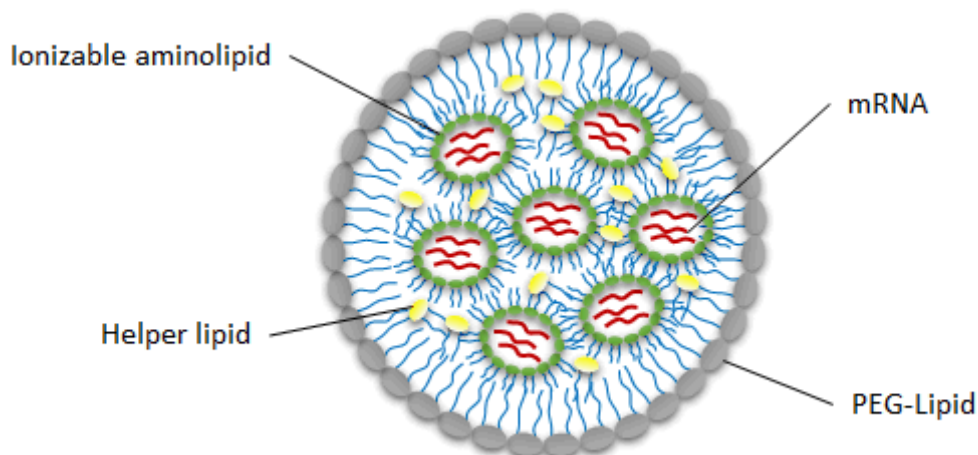
本剤に含まれる成分および各成分の配合目的を Table 2 に示す。

Table 2 本剤に含まれる成分および配合目的

成分名	配合目的
BNT162b2 原薬 (トジナメラン)	有効成分
ALC-0159	安定剤
ALC-0315	安定剤
DSPC	安定剤
コレステロール	安定剤
精製白糖	安定剤
塩化ナトリウム	等張化剤
塩化カリウム	等張化剤
リン酸水素ナトリウム二水和物	緩衝剤
リン酸二水素カリウム	緩衝剤
注射用水	溶剤
ALC-0315: [(4-hydroxybutyl)azanediyl]bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate)	
ALC-0159: 2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide	
DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	

本剤は、SARS-CoV-2 の S タンパク質全長体をコードする modRNA である BNT162b2 (V9) を本質としており、製剤化の過程で脂質溶液と混合することにより、脂質成分が BNT162b2 (V9) を封入する脂質ナノ粒子 (LNP) を形成する (Figure 1)。

Figure 1 RNA 封入 LNP の模式図



本剤の LNP は、機能脂質である ALC-0159 および ALC-0315 ならびに構造脂質である DSPC およびコレステロールの 4 つの脂質で構成される。PEG 脂質である ALC-0159 は、粒子の安定化および粒子径の均一化の機能を有し、投与後の血漿蛋白質との相互作用を最小限に抑えるための一過性の立体バリアとしても働く。イオン化可能なアミノ脂質である ALC-0315 は、粒子形成、宿主細胞への取り込みおよび RNA のエンドソーム放出を調節する物理化学的特性を有する、本剤の主要な脂質成分である。DSPC およびコレステロールは、哺乳類の細胞膜に存在する天然型の脂質であり、構造脂質として本剤に含有される。

本剤に含有する脂質成分の概要を Table 3 に示す。本剤は臨床において、1 回当たり RNA 量として 30 μg の投与量で筋肉内に接種され、そのときのこれら脂質の総量は 763 μg または 15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (50 kg のヒトに投与した場合) である。

Table 3 本剤の脂質成分の概要

脂質 (CAS 番号)	化学名	化学構造	理論濃度 (管理幅)	1 日 投与量 (μg)	1 日 投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ALC-0159 (1849616-42-7)	2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide		() mg/mL () mg/mL	53.4	1.1
ALC-0315 (2036272-55-4)	[(4-hydroxybutyl)azanediyl]bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate)		() mg/mL () mg/mL	430	8.6
DSPC (816-94-4)	1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine		() mg/mL () mg/mL	93.6	1.9
コレステロール (57-88-5)	cholesterol		() mg/mL () mg/mL	186	3.7

CAS = Chemical Abstracts Service

1 日投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) は、50 kg のヒトに本剤を投与した場合の各脂質成分の投与量を示す

本剤に含まれる成分のうち、ALC-0159、ALC-0315 および DSPC が本邦における医薬品の新添加剤に該当することから、各成分の安全性を評価した。

8.3.1. 新添加剤の安全性評価

本剤に含まれる成分のうち、ALC-0159、ALC-0315 および DSPC が本邦における医薬品の新添加剤に該当することから、各成分の安全性を評価した。

新添加剤に該当する ALC-0159、ALC-0315 および DSPC の毒性プロファイルについては、ラットを用いた BNT162b2 の反復投与毒性試験 (M2.6.6.3 項) および生殖発生毒性試験 (M2.6.6.6 項) において評価されている。すなわち、脂質の組成が製造販売承認申請製剤と同一である LNP に封入した BNT162b2 (V8) または BNT162b2 (V9) を雌雄ラットにそれぞれ 100 µg RNA/回または 30 µg RNA/回の用量で 1 週間に 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、単回および反復投与毒性ならびに局所刺激性を示唆する毒性学的意義のある変化は認められず、雌雄生殖器への影響はみられなかった。また、雌性ラットに BNT162b2 (V9) を 30 µg RNA/回の用量で計 4 回 (交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回) 筋肉内投与した生殖発生毒性試験において、雌の受胎能、妊娠、胚・胎児または出生児の発達への影響は認められなかった。このことから、これら試験において、本剤に含有する ALC-0159、ALC-0315 および DSPC に起因する安全性への懸念は示唆されなかった。本剤は臨床において 1 回当たり 30 µg RNA の投与量で筋肉内に接種され、そのときの脂質の総量は 763 µg または 15.3 µg/kg (50 kg のヒトに投与した場合) である。一方、BNT162b2 (V8) の反復投与試験における被験物質の 1 回投与量は 100 µg RNA であり、そのときの脂質の総量は 2543 µg となる。BNT162b2 (V8) を用いた反復投与試験における投与開始時の雄ラットおよび雌ラットの平均体重がそれぞれ 305.63 g および 218.14 g であったことに基づくと、脂質の体重換算の投与量はそれぞれ 8,300 µg/kg および 11,700 µg/kg であり、50 kg のヒトを想定した本剤に含まれる脂質の投与量 (15.3 µg/kg) の約 500~800 倍である。ALC-0159、ALC-0315 および DSPC の遺伝毒性については M2.6.6.8.3.1.1 項に述べるとおり、その評価の結果から遺伝毒性の懸念は示されなかった。本剤は臨床において頻繁に投与されず、曝露が長期間に及ぶことは想定されないことから、DSPC、ALC-0159 および ALC-0315 のがん原性評価は必要とされないと考えられた¹⁵。

以上のことから、ALC-0159、ALC-0315 および DSPC に起因する安全性への懸念は示されず、本剤の臨床使用によりこれら新添加剤の安全性への懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

8.3.1.1. 新添加剤の遺伝毒性評価

8.3.1.1.1. ALC-0159 および ALC-0315

ALC-0159 および ALC-0315 の遺伝毒性評価として、Derek (Derek Nexus 6.0.1, Derek Knowledgebase 2018 Version 1.1) および Sarah (Sarah Nexus 3.0.0, Sarah Model 2.0 Version 2.0) を用いた *in silico* 変異原性評価を実施した。その結果、両脂質とも変異原性の警告構造を有さないことが確認された。また、M2.6.4.5 項に示した ALC-0159 および ALC-0315 の代謝物についても、Derek (Derek Nexus 6.1.0, Derek Knowledgebase 2020 Version 1.0) および Sarah (Sarah Nexus 3.1.0, Sarah Model 2020.1 Version 1.8) を用いて *in silico* 変異原性評価を実施したところ、いずれの代謝物も変異原性の警告構造を有さないことが確認された。

ICH M7(R1) の変異原性物質の評価および管理の考え方を ALC-0159 および ALC-0315 に当てはめた場合、両脂質は変異原性の警告構造を有さなかったことから、ICH M7(R1) で毒性学的懸念の関

値 (TTC) による管理が提案されている物質の定義に該当しない¹⁶。しかしながら、両脂質の投与量の観点からも遺伝毒性を起因とするリスクを評価することとした。

ALC-0159 の 1 日最大投与量は 53.4 µg であり、ICH M7(R1)で規定される、TTC [警告構造を有する不純物または発がん性が不明の既知の変異原性物質は許容限度値 (適切な TTC) 以下で管理することを推奨] に基づく許容摂取量を用いて考えると、投与期間が 1 ヶ月以下の場合の変異原性発がん物質の許容摂取量である 120 µg/日を下回る。

一方、ALC-0315 の 1 日最大投与量は 430 µg となり、ICH M7(R1)で規定される、投与期間が 1 ヶ月以下の場合の変異原性発がん物質の許容摂取量である 120 µg/日を上回る。しかしながら、発がん性は投与量および曝露期間の両方に基づいている。Figure 2 [ICH M7(R1)の図 1 を抜粋] の実線は、 10^{-5} という発がんリスクに相当する変異原性不純物の 1 日摂取量と投与日数との直線関係を表す。この計算は、一生涯の投与に対して適用される TTC レベル、すなわち 1.5 µg/person/day というレベルに基づいており、以下の式を用いている。

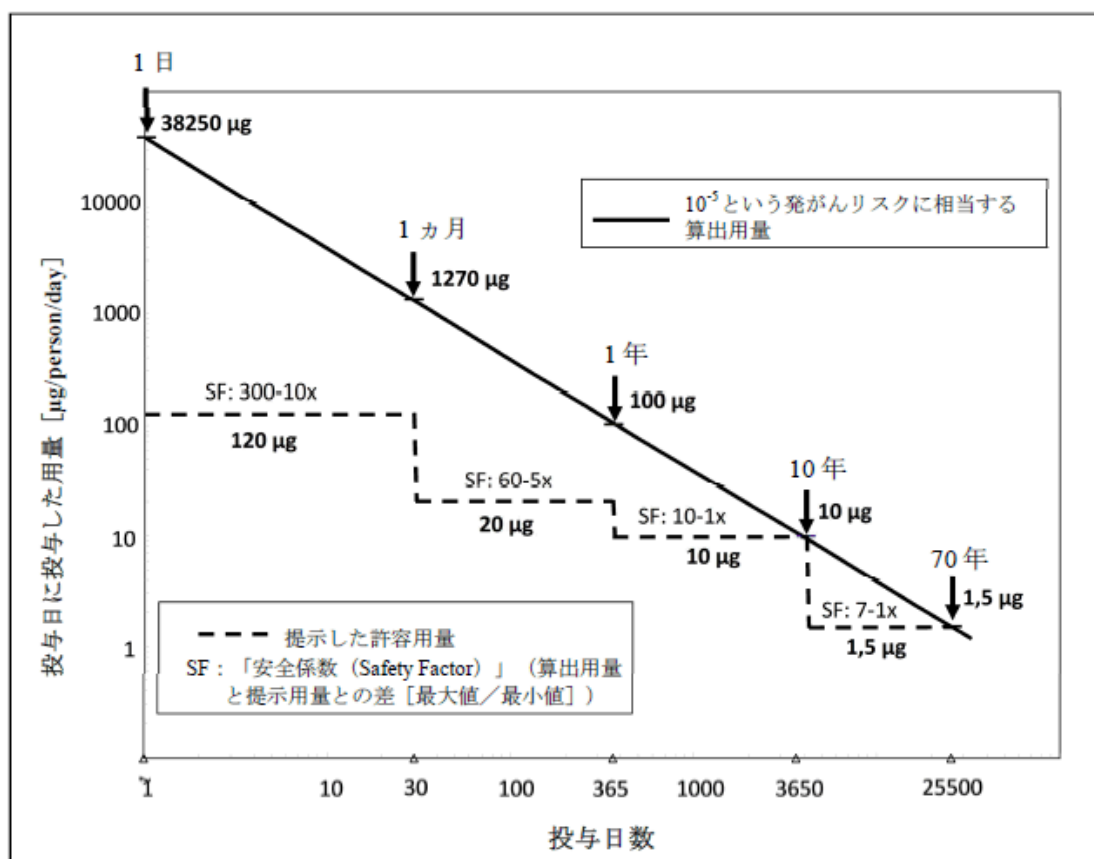
$$\text{一生涯より短い期間の AI} = \frac{1.5 \mu\text{g} \times (365 \text{日} \times \text{一生涯} 70 \text{年} = 25,550)}{\text{総投与日数}}$$

(AI : 許容摂取量)

一方、Figure 2 の階段状の破線は、ICH M7(R1)で推奨したとおりに一生涯より短い期間の曝露に補正した、実際の 1 日摂取量レベルを表す。提示したこれらのレベルは一般に算出値 (10^{-5} という発がんリスクに相当する変異原性不純物の 1 日摂取量) より著しく低いため、これによって得られる安全係数 (SF) は投与期間が短くなるほど大きくなる。上記の式および本剤の予定用法 (21 日間隔で計 2 回接種 : M1.8.1 項) に基づくと、変異原性発がん物質を 2 日間投与する場合の 1 日許容摂取量は 19,162.5 µg ($1.5 \mu\text{g} \times 365 \text{日} \times \text{一生涯} 70 \text{年} / 2 \text{日}$) となり、ALC-0315 の 1 日最大投与量である 430 µg を大きく上回る。

以上より、BNT162b2 の予定される臨床での用法・用量において、投与量の観点から ALC-0159 および ALC-0315 の遺伝毒性を起因とするリスクは示唆されなかった。

Figure 2 投与期間の関数として表した 1 : 100,000 という理論上の発がんリスクに相当する量として算出した変異原性不純物の 1 日量と、ICH M7(R1)の 7.3 項で推奨している許容摂取量レベルとの比較 [ICH M7(R1)の図 1 を抜粋]

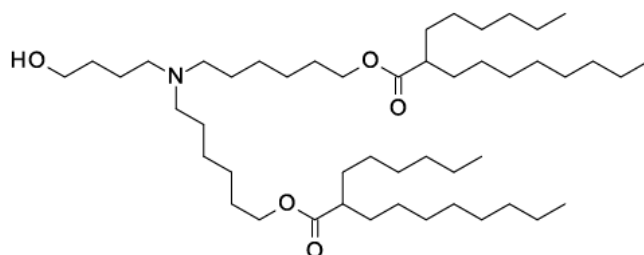
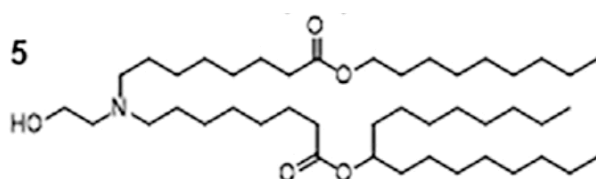


次に、ALC-0159 および ALC-0315 に類似した化合物の遺伝毒性に関する情報に基づき、ALC-0159 および ALC-0315 の遺伝毒性について考察した。

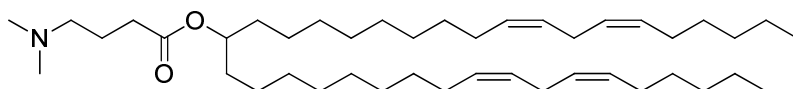
ALC-0315 はイオン化可能な陽イオン性の膜脂質類に分類される。このような脂質類は核酸封入 LNP の成分として幅広く、20 年以上にわたって用いられており、特にここ 10 年ほどの間で、イオン化可能な陽イオン性脂質を含有する様々な核酸封入 LNP 医薬品の臨床試験が実施されている。その中で最も開発が先行しているのが、イオン化可能な陽イオン性脂質である DLin-MC3-DMA を含有する siRNA-LNP 製剤のオンパットロ (パチシラン-LNP) であり¹⁷、本邦においては 2019 年に製造販売承認を取得している¹⁸。ALC-0315 や DLin-MC3-DMA などのイオン化可能な脂質類は、いずれも薬物活性に関与する共通の構造を示す^{19,20,21,22} (Figure 3)。すなわち、1 つ目の特徴として、この脂質類は親水性の頭部が疎水性炭素鎖に結合した両親媒性脂質であり、この疎水性炭素鎖が脂質の膜構造への固定を強固なものとする。2 つ目の特徴として、親水性の頭部をイオン化する pKa の範囲が非常に狭いことから、この脂質類の構造的多様性は制限される。このように、DLin-MC3-DMA と ALC-0315 の構造は類似している。

Figure 3 ALC-0315 およびその他のイオン化可能な陽イオン性脂質の典型例

(A) ALC-0315

(B) Sabnis らの論文¹⁹に示される Lipid 5 (後述)

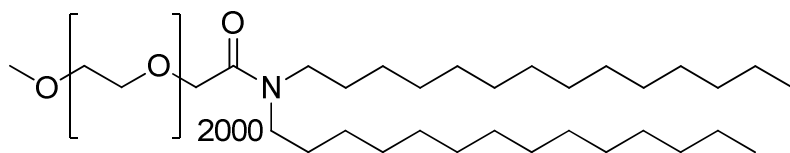
(C) オンパットロ (パチシラン-LNP) に含有される DLin-MC3-DMA



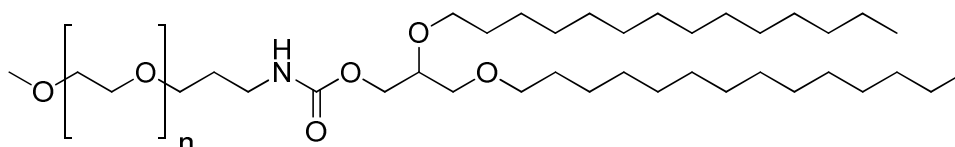
陽イオン性脂質類の構造的類似性と同様に、PEG 脂質に分類される脂質の構造もまた互いに類似している。オンパットロ (パチシラン-LNP) に含有される PEG 脂質である PEG₂₀₀₀-C-DMG は、製造過程で脂質が LNP 構造に固定されるのに十分な疎水性を有する炭素鎖に PEG 頭部が結合した構造をとる。PEG₂₀₀₀-C-DMG と ALC-0159 は、頭部と炭化水素鎖の結合様式がわずかな構造的な違いを示しているものの (Figure 4) , その他の構造はほぼ同一であることから、生体内での LNP の働きに影響するほどの物理的特性の差異がみられる可能性は低いと考えられる。

Figure 4 ALC-0159 およびパチシラン-LNP に含有される PEG 脂質

(A) ALC-0159



(B) オンパットロ (パチシラン-LNP) に含有される PEG₂₀₀₀-C-DMG²³

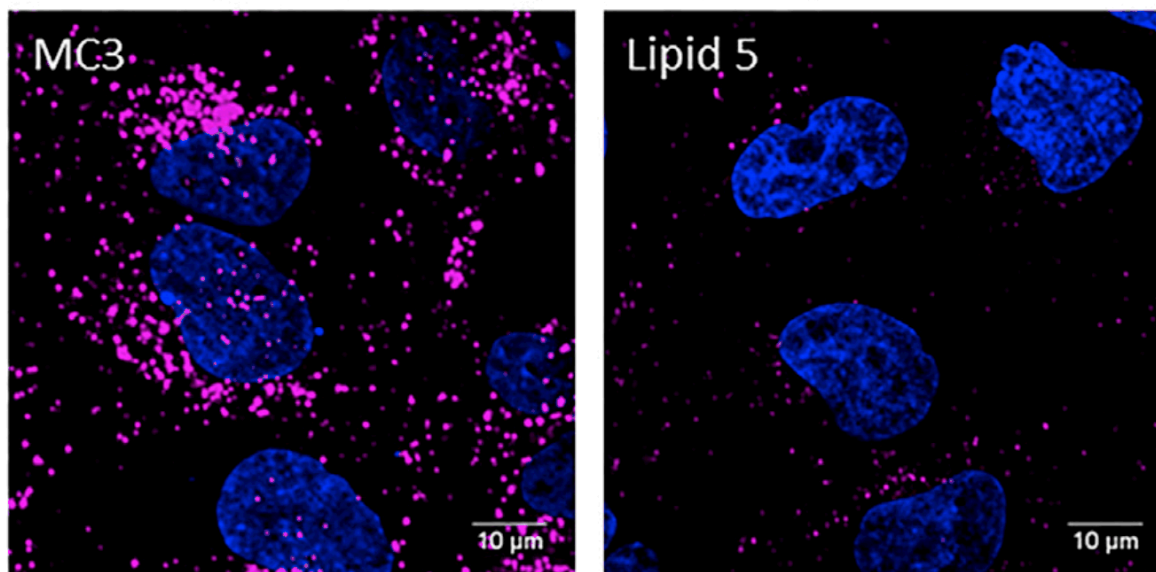


オンパットロ点滴静注 2mg/mL の開発に際して、その製剤であるパチシラン-LNP, DLin-MC3-DMA および PEG₂₀₀₀-C-DMG の遺伝毒性試験が実施され [細菌を用いた復帰突然変異試験およびヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験 (パチシラン-LNP については加えてマウスを用いた骨髄小核試験も実施)] , 結果はいずれも陰性であった¹⁸。

PEG 脂質は、Figure 1 で示したように LNP の外径を形成することで粒子の安定化および粒子径の均一化の機能を有し、投与後の血漿蛋白質との相互作用を最小限に抑えるための一過性の立体バリアとしても働く (M2.6.6.8.3 項)。LNP は標的細胞内に侵入する前に、ほとんどの PEG 脂質成分を失う²⁴。一方、陽イオン性脂質は細胞内に移行し、RNA のエンドソーム放出を調節する。陽イオン性脂質が細胞内に到達すると、リソソームと相互作用しながらリソソームコンパートメントへと移行すること^{21,25,26,27,28,29}、陽イオン性脂質または LNP 脂質マーカが核内に移行せずに核周囲に留まること^{21,25,26}を示す *in vitro* および *in vivo* 試験結果が報告されている (細胞内に取り込まれた LNP が核に移行せずに核周囲に留まることを示す実験結果の一例として、陽イオン性脂質である DLin-MC3-DMA や Lipid 5 等を含有する LNP を用いた Sabnis らの論文¹⁹より図を抜粋して Figure 5 に示した。Lipid 5 はその研究で用いられた陽イオン性脂質の一つであり、構造については Figure 3 に示した。)。リソソームコンパートメントが成熟化すると、リソソーム内に局在した脂質は代謝され、排泄される²⁹。したがって、PEG 脂質および陽イオン性脂質が核内に移行して DNA および染色体に直接作用する可能性は低いと考えられ、このことから、ALC-0159 および ALC-0315 が核内に移行して DNA 変異や染色体異常を誘発する可能性は示唆されなかった。

Figure 5 イオン化可能な陽イオン性脂質を含有する LNP の細胞内での局在 : ALC-0315 と構造が類似する Lipid 5 および DLin-MC3-DMA

B LNP uptake (Atto 647) Nuclei (DAPI)



イオン化可能な陽イオン性脂質である DLin-MC3-DMA (左図) または Lipid 5 (右図) を含む LNP (ATTO 647 で標識) を HeLa 細胞にトランスフェクトした。LNP の脂質構成比は、イオン化可能な陽イオン性脂質 : DSPC : コレステロール : PEG 脂質を 50 : 10 : 38.5 : 1.5 (mol 比) とした。また、0.1% ATTO 647 DOPE を脂質マーカーとして含有した。ATTO 647 はピンクで、DAPI による核染色は青で示されており、脂質マーカーが核内に移行せずに核周囲に留まることが確認された。Sabnis らの論文²¹ から抜粋した。

以上をまとめると、ALC-0159 および ALC-0315 ならびにそれらの代謝物の *in silico* 変異原性評価は陰性であったことに加え、ALC-0159 および ALC-0315 の 1 日当たりの投与量は、それぞれ ICH M7(R1) の推奨する 1 日許容摂取量および 10^{-5} という発がんリスクに相当する変異原性不純物の 1 日摂取量を下回ることから、本剤の臨床使用において、ALC-0159 および ALC-0315 に起因する遺伝毒性リスクが生じる可能性は低い。加えて、ALC-0159 および ALC-0315 の構造に類似している PEG₂₀₀₀-C-DMG および DLin-MC3-DMA、これらの脂質を含有するパチシラン-LNP の遺伝毒性試験結果はいずれも陰性であった。さらに、ALC-0159 などの PEG 脂質および ALC-0315 などのイオン化可能な陽イオン性脂質の細胞核内への移行は示唆されていない。これらのことは、ALC-0159 および ALC-0315 が遺伝毒性を示す懸念がないことをさらに支持するものと考えられた。

8.3.1.1.2. DSPC

DSPC はほ乳類の細胞膜に存在する天然型の脂質であり、遺伝毒性を有する可能性は低い。実際、DSPC を含有するオンパットロ点滴静注 2mg/mL の開発に際してその製剤であるパチシラン-LNP を用いた遺伝毒性試験 (細菌を用いた復帰突然変異試験およびヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験およびマウスを用いた骨髄小核試験) が実施されており、結果はいずれも陰性であった¹⁸。

9. 考察及び結論

BNT162b2 (V8) (100 RNA µg/回) または BNT162b2 (V9) (30 RNA µg/回) を用いた 2 つの反復投与毒性試験において、雌雄 Wistar Han ラットに週 1 回、計 3 回筋肉内投与したところ、いずれの試験においても全身性の一般状態の変化はみられず忍容性を示した。BNT162b2 の筋肉内投与により予想された炎症反応に伴う投与部位の浮腫および紅斑、一過性の体温上昇、白血球数および急性期タンパク質の増加および A:G 比の低下がみられた。BNT162b2 (V8) を投与した 38166 試験において GGT の上昇がみられたものの他の肝胆管系の障害を示唆する臨床病理検査値の変化ならびに肝臓および胆道系に障害を示唆する病理組織学的所見もみられなかった。また、BNT162b2 (V9) を投与した GR142 試験で GGT の上昇はみられなかった。投与部位観察では浮腫および紅斑がみられ、2 回目および 3 回目投与後で発現頻度が増加し、重症化した。次回投与前には回復した。炎症反応の二次的影響として軽微で一過性の体重減少ならびに網状赤血球数、血小板数および赤血球系パラメータの一過性の減少がみられた。休薬期間終了時、臨床病理検査では赤血球分布幅の増加、グロブリンの上昇および A:G 比の低下が認められたのみであり、回復性が示された。

剖検所見および器官重量の変化として、所属リンパ節および脾臓の肥大ならびに脾臓重量の増加が認められ、病理組織学的検査では、投与部位およびその周辺組織での浮腫および炎症、所属リンパ節での胚中心性細胞充実性増加および形質細胞増加、脾臓での造血細胞の増加および胚中心細胞充実性増加、骨髄での造血細胞の増加がみられた。これらはいずれも免疫活性化または炎症反応に伴う変化と考えられた。肝門脈域における肝細胞の空胞化は、肝細胞傷害性を示唆する病理組織学的所見および肝機能障害を示唆する臨床病理検査値の変化もみられず回復性もあることから毒性学的意義に乏しい変化であり、肝細胞における LNP 脂質の取り込みが関連していると考えられた⁶。投与期間終了時に病理組織学的検査でみられた所見は休薬期間終了時に回復または回復傾向を示した。また、免疫原性評価の結果、抗原に対する著明な免疫応答が示された。

雌性ラットに BNT162b2 (V9) を臨床用量である 30 µg RNA/回の用量で計 4 回 (交配前に 2 回および妊娠期間に 2 回) 筋肉内投与したところ、母動物において反復投与毒性試験でみられた所見 (投与部位の炎症、一過性の体重および摂餌量の低下) が認められたが、受胎能、妊娠、胚・胎児および出生児の生存、成長および発達に対する影響はみられなかった。BNT162b2 (V9) を投与したすべての母動物、ならびにその胎児および出生児で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答がみられた。BNT162b2 (V8) および BNT162b2 (V9) の反復投与毒性試験の剖検および病理組織学的検査において、雌雄生殖組織の毒性は認められなかった。

以上のように、ラットを用いた毒性試験および生殖発生毒性試験において BNT162b2 投与による毒性変化は認められなかった。この結果は、ヒトに BNT162b2 を 30 µg RNA の用量で筋肉内投与することを支持するものと考えられた。また、本剤に含有する新添加剤である ALC-0159、ALC-0315 および DSPC に起因する安全性への懸念は示されず、本剤の臨床使用によりこれら新添加剤の安全性への懸念が生じる可能性は低いと考えられた。

10. 図表

図表は本文中および概要表に示した。

参考文献

- 1 World Health Organization. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Annex 1. In: World Health Organization. WHO technical report series, no. 927. Geneva, Switzerland; World Health Organization; 2005:31-63.
- 2 EMA Note for Guidance on the Development of Vaccinia Virus Based Vaccines Against Smallpox: CPMP; .2002: 20 pages.
- 3 感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン(薬食審査発 0527 第1号 平成22年5月27日)
- 4 US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Development and licensure of vaccines to prevent COVID-19. In: Guidance for industry. Rockville, MD: Food and Drug Administration; .2020: 21 pages.
- 5 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) ワクチンの評価に関する考え方 (医薬品医療機器総合機構 ワクチン等審査部, 令和2年9月2日)
- 6 Sedic M, Senn J, Lynn A, et al. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague- Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet Pathol* 2018;55(2):341-54.
- 7 Sellers RS, Nelson K, Bindu B, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee Points to Consider: Approaches to the Conduct and Interpretation of Vaccine Safety Studies for Clinical and Anatomic Pathologists. *Toxicol Pathol* 2020;48(2):257-76.
- 8 Kim A, Fung E, Parikh SG, et al. A mouse model of anemia of inflammation: complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin. *Blood* 2014;123(8):1129-36.
- 9 Kim A, Fung E, Parikh SG, et al. Isocitrate treatment of acute anemia of inflammation in a mouse model. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2016;56(1):31-6.
- 10 Kozauer NA, Dunn WH, Unger EF, et al. CBER multi-discipline review of Onpatro. NDA 210922. 10 Aug 2018.
- 11 Brooks MB, Turk JR, Guerrero A, et al. Non-Lethal Endotoxin Injection: A Rat Model of Hypercoagulability *PLoS ONE* 2017;12(1):e0169976.
- 12 Boone L, Meyer D, Cusick P, et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet Clin Pathol* 2005;34(3):182-8.
- 13 Ennulat D, Magid-Slav M, Rehm S, et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. *Toxicol Sci* 2010;116(2):397-412.
- 14 Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;15:1-11.

- 15 International Council for Harmonisation (ICH). ICH harmonised guideline S1A: 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス（薬審第 315 号 平成 9 年 4 月 14 日）.
- 16 International Council for Harmonisation (ICH). ICH harmonised guideline M7 (R1): 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺（薬生薬審発 0627 第 1 号 平成 30 年 6 月 27 日）.
- 17 Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol* 2019;14(12):1084-7.
- 18 オンパットロ点滴静注 2mg/mL 申請資料概要
- 19 Semple SC, Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* 2010;28(2):172-6.
- 20 Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(34):8529-33.
- 21 Sabnis S, Kumarasinghe E, Salerno T, et al. A novel amino lipid series for mRNA delivery: improved endosomal escape and sustained pharmacology and safety in non-human primates. *Mol Ther* 2018;26(6):1509-19.
- 22 Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;15:1-11.
- 23 EMA 2018 patisiran European-public-assessment-report
- 24 Mui BL, Tam YK, Jayaraman M, et al. Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2(12):e139
- 25 Marcusson EG, Bhat B, Manoharan M et al. Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(8):2016-23.
- 26 Song LY, Ahkong QF, Rong Q, et al. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558(1):1-13.
- 27 Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol.* 2013;31(7):638-46.
- 28 Sahay G, Querbes W, Alabi C, et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol.* 2013;31(7):653-8.

- ²⁹ Maier MA, Jayaraman M, Matsuda S, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther.* 2013;21(8):1570-8.

Test Article: BNT162b2

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg RNA/animal)	Total Volume (µL) ^a	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number (Sponsor Reference Number)
Single-Dose Toxicity								
Not conducted								
Repeat-Dose Toxicity								
17-Day, 2- or 3-Dose (1 Dose/Week) Toxicity With a 3-Week Recovery Phase	Rat/ Wistar Han	IM Injection	17 Days (Dose days 1, 8, 15) or 10 Days (Dose days 1, 8) ^b	0 (Control Buffer ^e)	200 ^d	Yes	█ ^e	38166 (NA)
				30 (BNT162█)	60			
				10 (BNT162█)	20			
				30 (BNT162█)	60			
				100 (BNT162█)	200 ^d			
				30 (BNT162█)	70			
17-Day, 3-Dose (1 Dose/Week) Toxicity With a 3-Week Recovery Phase	Rat/ Wistar Han	IM Injection	17 Days (Dose days 1, 8, 15)	0 (Saline) ^f	60	Yes	PWRD ^g	█GR142 (NA)
				30 (BNT162b2 [V9])	60			
				30 (BNT162█)	60			
Genotoxicity								
Not conducted								
Carcinogenicity								
Not conducted								

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: BNT162b2 (continued)

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg RNA/animal)	Total Volume (µL) ^a	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number (Sponsor Reference Number)
Reproductive and Developmental Toxicity								
Combined Fertility and Developmental (Including Teratogenicity and Postnatal Investigations)	Rat/ Wistar Han	IM Injection	21 and 14 days prior to mating, GD 9, GD 20	0 (Saline) ^f 30 (BNT162) 30 (BNT162b2 [V9]), 30 (BNT162)	60 60 60 60	Yes	█ ^h	█256434 (RN9391 R58)
Local Tolerance								
Not conducted								
Other Toxicity Studies								
Not conducted								

GD = Gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IM = Intramuscular; █ = █; NA = Not applicable; PWRD = Pfizer Worldwide Research & Development; QW = Once weekly.

- a. Doses were administered as 1 application at 1 site unless otherwise indicated.
- b. QWx3 (Days 1, 8, 15) for BNT162█, BNT162█, and BNT162b2 (V8); QWx2 (Days 1, 8) for BNT162█.
- c. Phosphate buffered saline, 300 mM sucrose.
- d. One application (100 µL) at 2 sites for a total dose volume of 200 µL.
- e. █, Germany.
- f. Sterile saline (0.9% NaCl).
- g. Groton, CT, US.
- h. █, France.

2.6.7.7A REPEAT-DOSE TOXICITY

Report Title: Repeat-Dose Toxicity Study of Three LNP-Formulated RNA Platforms Encoding for Viral Proteins by Repeated Intramuscular Administration to Wistar Han Rats

Test Article: BNT162b2

Species/Strain: Rat/Wistar Han

Duration of Dosing: QWx3 (Days 1, 8, 15) for BNT162 (), BNT162 (), or BNT162b2 [V8] (modRNA-LNP SP2); QWx2 (Days 1, 8) for BNT162 ()

Study Number: 38166^a

Lot Numbers: CoVVAC/0903 (BNT162), CoVVAC/1003 (BNT162), CoVVAC/1303 (BNT162), CoVVAC/1603 (BNT162b2 [V8])

Age at First Dose: 8-9 Weeks

Duration of Postdose: 3 Weeks

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose:

Method of Administration: Intramuscular injection; 20 to 100 µL/administration site/dose^b

Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, 300 mM sucrose/Solution

Special Features: Cytokine analysis (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10)

No Observed Adverse Effect Level: 30 µg (BNT162), 100 µg (BNT162b2)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of Animals ^c	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Noteworthy Findings Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g) ^d														
Prior to Initiation of Dosing	257.6	213.8	1.0	1.0	1.0	0.89	1.0	1.0	1.0	0.90	1.0	0.91	1.0	0.90
Day 1	263.5	212.3	0.99	0.99	1.2†	1.0	1.0	1.0	1.2†	1.0	1.2†	1.0	1.2†	1.0
Day 2	268.9	215.1	0.93†	0.95	1.1†	0.98	0.95†	1.0	1.0	0.95	1.1†	0.98	1.0	0.96
Day 8	310.9	231.7	0.94†	0.99	1.1†	1.0	0.98	1.0	1.0	1.0	1.0	0.99	1.0	0.98
Day 9	319.8	237.0	0.87†	0.93*	1.0	0.95	0.93*	0.99	0.93†	0.94*	0.96	0.93†	0.92†	0.93*
Day 15	356.3	249.8	0.88†	0.97	1.0	0.98	0.95*	1.0	0.98	0.99	0.98 ^c	0.95 ^c	0.96	0.95

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Body Weight Gain (%) ^f														
Day 9	21.3	11.7	6.3	5.8	2.9	4.3	13.6	9.5	-3.5	3.6	-0.77	1.5	-4.1	1.2
Day 16	37.1	16.7	15.1	10.0	11.9	11.0	25.2	17.1	6.0	10.3	NA	NA	4.8	6.4
Food Consumption ^d – Relative (g/kg of body weight/day)														
Week 1	95.0	98.3	0.94*	0.97	0.83†	0.93*	0.96	0.98	0.77†	0.87†	0.81†	0.90†	0.78†	0.86†
Week 2	89.4	94.3	0.93†	0.96	0.90†	0.99	0.98	1.0	0.88†	0.98	0.86† ^c	0.98 ^c	0.89†	0.98
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Local Tolerance ^e														
Day 1 – Edema														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	6	1	9	6	6	5	4	9	11	10	12	11
Edema, slight	0	0	2	0	0	0	2	6	0	0	0	0	0	0
48 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	4	7	13	9	8	6	7	6	10	10	8	2
Edema, slight	0	0	3	5	0	0	2	6	0	0	3	1	0	0
96 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	3	3	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
144 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 8 – Edema														
4 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
24 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	3	2	3	5	11	13	7	6	4	9	7	8
Edema, slight	0	0	7	9	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0
Edema, moderate	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
48 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	3	0	0	0	8	9	1	0	0	0	0	3
Edema, slight	0	0	7	7	6	8	2	0	8	5	0	1	6	6
Edema, moderate	1	1	4	7	9	7	2	1	6	10	3	4	9	6
Edema, severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
96 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	8	9	4	1	4	0	0	0	0	3	0	0
Edema, slight	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192 Hours Postdose														
Edema, slight	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
240 Hours Postdose	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
Day 15 – Edema														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
24 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	3	6	10	8	10	7	0	0	NA	NA	0	0
Edema, slight	0	0	12	9	3	7	5	8	9	12	NA	NA	1	2
Edema, moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	6	3	NA	NA	12	12
Edema, severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2	1
48 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	1	1	1	1	2	3	0	0	NA	NA	0	1
Edema, slight	0	0	3	4	2	4	3	2	1	4	NA	NA	1	3
Edema, moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	NA	NA	4	1
96 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	1	2	1	0	0	0	3	2	NA	NA	3	1
Edema, slight	0	0	2	3	1	0	0	0	0	0	NA	NA	2	3

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
144 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	1	0	1	0	0	0	3	2	NA	NA	3	2
Edema, slight	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	NA	NA	2	2
192 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
240 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	1	2	3	2	2	3	4	NA	NA	1	3
Edema, slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	NA	NA	4	2
288 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	1	2	0	2	1	4	5	NA	NA	3	4
Edema, slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	2	1
336 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	NA	NA	0	0
384 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	NA	NA	0	0
432 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0	0
480 Hours Postdose														
Edema, very slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	NA	NA	0	0
528 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
Day 1 – Erythema														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
96 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	9	7	1	0	0	0	0	2	3	4	0	2
144 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Day 8 – Erythema														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	6	5	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
48 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	7	9	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Erythema, well defined	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144 Hours Postdose														
Erythema, severe	0	0	0	0	5	4	0	0	0	3	4	2	3	5
192 Hours Postdose	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA
240 Hours Postdose														
Erythema, severe	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
288 Hours Postdose														
Erythema, severe	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
336 Hours Postdose														
Erythema, severe	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
384 Hours Postdose														
Erythema, severe	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
432 Hours Postdose														
Erythema, very slight	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
480 Hours Postdose														
Erythema, very slight	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA
528 Hours Postdose														
Erythema, very slight	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	0	NA	NA

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Day 15 – Erythema														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
24 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	1	2	1	1	1	2	0	1	NA	NA	0	0
48 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	2	1	3	1	1	0	0	0	NA	NA	1	2
96 Hours Postdose														
Erythema, severe	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
144 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
Erythema, well-defined			0	3	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
192 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
Erythema, severe			2	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
240 Hours Postdose														
Erythema, severe	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
288 Hours Postdose														
Erythema, severe	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
336 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
Erythema, severe	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
384 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
Erythema, severe	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
432 Hours Postdose														
Erythema, very slight	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
Erythema, well-defined	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
480 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Day 1 – I/H ^h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 8 – I/H														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144 Hours Postdose														
I/H, slight	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 15 – I/H ^h														
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
24 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
48 Hours Postdose														
I/H, very slight	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
96 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
144 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
192 Hours Postdose														
I/H, moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0
240 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
288 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
336 Hours Postdose														
I/H, slight	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NA	NA	0	0
384 Hours Postdose														
I/H, very slight	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NA	NA	0	0
432 Hours Postdose														
I/H, very slight	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NA	NA	0	0
480 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Auditory	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Body temperature (°C)														
Day 1														
4 Hours Postdose	37.4	37.4	37.9†	38.3†	37.7*	38.2†	37.6	37.7	38.7†	38.4†	38.3†	38.7†	38.5†	38.5†
24 Hours Postdose	37.5	38.3	38.5†	38.6	37.0	38.4	37.8	38.5	36.7†	38.3	36.6†	38.1	37.5	39.1†
Day 8														
4 Hours Postdose	37.3	37.6	37.9†	38.4†	37.6	38.0	37.5	38.2	38.0†	38.2*	38.0†	38.4†	38.1†	38.4†
24 Hours Postdose	37.3	38.4	39.0†	39.0	38.0	38.8	38.2†	38.7	39.0†	39.0	39.0†	39.0	38.9†	39.3†
Day 15														
4 Hours Postdose	38.3	38.9	38.2	38.7	37.6†	38.9	37.4†	37.6†	38.7*	39.2	38.6 ^c	38.7 ^c	38.6	39.1
24 Hours Postdose	38.0	39.0	38.9†	39.2	38.2	39.1	38.0	39.0	39.1†	39.4	NA	NA	39.1†	39.5*
Hematology/Coagulation ⁱ														
Red Blood Cell (10 ⁶ /µL)														
Day 4	7.270	7.654	7.218	7.295	7.754†	7.807	7.126	7.506	7.784†	7.589	7.796†	7.576	7.848†	7.578
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.708	7.419	NA	NA
Day 17	7.956	7.892	7.723	7.546	7.844	7.465*	7.751	7.248†	7.511	7.145†	NA	NA	7.670	7.115†
Hemoglobin (mmol/L)														
Day 4	8.60	8.87	8.43	8.57	8.99*	9.12	8.21*	8.70	8.93*	8.62	8.95*	8.78	9.11†	8.74
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8.75	8.43	NA	NA
Day 17	9.14	9.08	8.67†	8.66	8.69†	8.38†	8.62†	8.13†	8.14†	7.85†	NA	NA	8.31†	7.93†
Hematocrit (%)														
Day 4	41.92	41.87	40.58	40.41	42.77	42.23	40.39*	41.39	42.53	40.49	42.66	40.31	42.88	40.15
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	41.46	38.86	NA	NA
Day 17	45.03	43.45	42.43†	41.74	41.10†	39.24†	42.66†	39.50†	38.79†	37.06†	NA	NA	39.65†	37.59†
Reticulocytes (10 ³ /µL)														
Day 4	307.0	195.7	74.9†	69.8†	116.3†	94.9†	171.1†	143.9*	112.5†	112.3†	77.1†	79.6†	85.5†	101.3†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	192.7	184.4	NA	NA
Day 17	234.6	201.0	174.8†	199.8	190.4*	225.5	188.6*	209.9	223.3	226.7	NA	NA	172.9†	198.0

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Platelets (10 ³ /µL)														
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	708.8	570.4	NA	NA
Day 17	1089.2	1068.1	804.7†	622.9†	805.1†	698.1†	930.6	876.8*	817.2†	702.2†	NA	NA	771.4†	704.4†
White blood cells (10 ³ /µL)														
Day 4	9.37	8.42	11.75	12.89†	10.57	8.72	10.00	8.31	10.91	9.05	12.89†	10.03	12.83†	10.40
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	20.12	15.27	NA	NA
Day 17	9.09	7.11	16.28†	14.50†	14.76†	11.02*	14.61†	12.74†	16.56†	14.41†	NA	NA	19.88†	15.00†
Neutrophils (10 ³ /µL)														
Day 4	1.50	1.11	3.43†	3.84†	1.41	1.11	1.46	1.13	1.32	1.73	2.52†	2.28†	2.00	2.52†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8.79	6.55	NA	NA
Day 17	1.46	0.95	7.74†	6.52†	5.35†	4.14†	5.89†	5.54†	7.98†	6.96†	NA	NA	10.29†	7.37†
Monocytes (10 ³ /µL)														
Day 4	0.29	0.19	0.41	0.44†	0.30	0.23	0.26	0.18	0.21	0.20	0.41	0.37†	0.27	0.22
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.63	0.39	NA	NA
Day 17	0.31	0.19	0.57*	0.37*	0.63†	0.44†	0.62†	0.44†	0.55*	0.40†	NA	NA	0.50	0.31
Eosinophils (10 ³ /µL)														
Day 4	0.121	0.134	0.121	0.175	0.119	0.104	0.124	0.158	0.119	0.107	0.097	0.137	0.110	0.162
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.094	0.092	NA	NA
Day 17	0.109	0.094	0.101	0.099	0.106	0.152*	0.231†	0.308†	0.360†	0.508†	NA	NA	0.566†	0.573†
Basophils (10 ³ /µL)														
Day 4	0.026	0.026	0.038	0.057†	0.047*	0.036	0.035	0.030	0.042	0.033	0.060†	0.047†	0.065†	0.043*
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.102	0.055	NA	NA
Day 17	0.030	0.019	0.063†	0.060†	0.069†	0.039*	0.060†	0.042†	0.063†	0.043†	NA	NA	0.074†	0.039*
Large unstained cells (10 ³ /µL)														
Day 4	0.09	0.09	0.66†	0.59†	0.22†	0.19†	0.15	0.11	0.22†	0.31†	0.41†	0.33†	0.35†	0.37†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.38	0.87	NA	NA

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Day 17 Fibrinogen (mg/dL)	0.09	0.08	1.17†	0.86†	0.49†	0.48†	0.24†	0.43†	0.59†	0.63†	NA	NA	0.69†	0.54†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	298.2	267.3	NA	NA
Day 17	106.1	114.4	309.1†	314.0†	271.0†	279.8*	271.4†	281.8†	310.0†	299.1†	NA	NA	323.9†	297.8†
Clinical Chemistry ⁱ														
Albumin (g/L)														
Day 4	29.48	31.61	26.70†	27.15†	27.48†	28.03†	28.27†	28.97†	27.41†	28.21†	27.22†	27.92†	26.79†	27.62†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	27.32	27.35	NA	NA
Day 17	28.34	30.36	26.78†	27.68†	26.67†	27.69†	27.23†	27.38†	27.26†	27.17†	NA	NA	26.68†	27.03†
Globulin (g/L)														
Day 4	27.12	27.69	29.70†	28.95	27.62	25.67	31.43†	30.33*	29.59†	29.89	28.88*	27.28	29.11*	28.68
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	28.08	26.15	NA	NA
Day 17	25.36	25.54	27.82†	29.02†	27.03	25.81	30.07†	30.12†	32.04†	29.23†	NA	NA	31.22†	30.07†
Albumin/Globulin Ratio														
Day 4	1.087	1.144	0.901†	0.938†	0.996†	1.095	0.902†	0.958†	0.929†	0.950†	0.944†	1.028†	0.923†	0.964†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.975	1.049	NA	NA
Day 17	1.119	1.192	0.963†	0.962†	0.988†	1.076	0.908†	0.910†	0.853†	0.933†	NA	NA	0.856†	0.901†
Gamma glutamyl transferase (U/L)														
Day 4	0.95	0.88	4.21†	3.67†	2.93†	2.75†	2.52†	2.32	3.32†	3.72†	3.60†	3.77†	3.25†	4.01†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.98	4.26	NA	NA
Day 17	1.62	1.21	4.43†	3.97†	3.04†	3.32†	3.59†	3.94†	4.18†	4.40†	NA	NA	4.83†	5.05†
Acute Phase Proteins														
α1-Acid Glycoprotein (µg/mL)														
Day 4	64.7	79.8	465.0†	401.4†	304.7†	323.6†	381.9†	378.9†	454.9†	445.0†	431.1†	390.6†	446.8†	445.6†
Day 10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	416.3	409.7	NA	NA
Day 17	50.3	52.0	429.6†	467.7†	737.0†	649.4†	437.6†	463.0†	970.9†	980.9†	NA	NA	1043.6†	826.1†

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
α2-Macroglobulin (µg/mL)														
Day 4	39.8	18.1	727.0†	126.2†	223.0†	57.1†	1434.6†	330.4†	2143.1†	1639.4†	685.5†	169.6†	2159.0	1362.6
Day 17	21.2	16.1	551.7†	269.3†	394.3†	102.5†	930.4†	724.0†	5927.3	2692.2	NA	NA	4604.5	1937.5
									†	†			†	†
Urinalysis (Day 17)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunogenicity	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
Cytokines ^j	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights ^d														
Spleen														
Absolute (g)	0.838	0.595	1.2	1.6†	1.3†	1.2	1.1	1.3*	1.2†	1.6†	1.2	1.3	1.3†	1.6†
Relative (g/1000 g body weight)	2.568	2.701	1.4†	1.7†	1.3†	1.3	1.2†	1.2	1.3†	1.5†	1.5	1.4	1.4†	1.6†
Gross Pathology														
Number Examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Injection site														
Indurated ^k	0	0	10	10	7	7	7	6	6	6	10	10	7	9
Incrusted	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Lymph node, iliac														
Enlarged	0	0	1	1	4	3	6	4	7	8	1	2	5	6
Spleen														
Enlarged	0	0	2	4	5	2	1	1	5	7	5	1	2	7

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Histopathology (Day 17 ¹)														
Number Examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Injection site ^b														
Fibrosis intramuscular/interstitial														
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Mild	0	0	8	10	10	10	9	10	8	9	8	10	10	10
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Fibrosis inter-/perimuscular														
Mild	0	0	10	10	10	10	9	10	10	10	8	10	10	10
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Inflammation, mixed, subcutis (Injection site 1)														
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	9	10	10	10	7	10	8	10	9	10	9	10
Marked	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, mixed, intramuscular/interstitial (Injection site 1)														
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	4	8	8	4	1	4	3	8	4	3	4	9
Moderate	0	0	4	2	2	6	9	5	1	0	0	0	1	0

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Inflammation, mixed, intramuscular/interstitial, multifocal (Injection site 1)														
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	4	2	5	7	5	1
Inflammation, mixed, inter-/perimuscular (Injection site 1)														
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	7	10	10	7	6	9	8	10	9	8	9	10
Marked	0	0	0	0	0	3	3	1	0	0	0	2	1	0
Inflammation, mixed, subcutis (Injection site 2)														
Mild	0	0	0 ^m	0 ^m	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Moderate	0	0	3 ^m	0 ^m	0	0	0	0	9	9	0	0	10	8
Inflammation, mixed, intramuscular/interstitial (Injection site 2)														
Mild	0	0	2 ^m	0 ^m	0	0	0	0	5	6	0	0	4	9
Moderate	0	0	1 ^m	0 ^m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Inflammation, mixed, intramuscular/interstitial, multifocal (Injection site 2)														
Minimal	0	0	1 ^m	0 ^m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0 ^m	0 ^m	0	0	0	0	5	4	0	0	6	1
Inflammation, mixed, inter-/perimuscular (Injection site 2)														
Minimal	0	0	1 ^m	0 ^m	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	2 ^m	0 ^m	0	0	0	0	10	10	0	0	10	10
Myofiber degeneration														
Minimal	0	0	2	0	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0
Mild	0	0	7	9	9	9	8	8	9	8	7	4	10	10
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0
Edema, subcutis														
Mild	0	0	1	0	1	1	4	4	1	2	0	0	1	2
Moderate	0	0	5	10	9	6	4	6	7	8	6	5	7	7
Marked	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3	5	2	1
Oedema intramuscular/interstitial														
Minimal	0	0	1	8	6	1	2	2	1	1	1	1	0	0
Mild	0	0	1	2	1	7	6	7	7	9	8	9	10	10
Oedema inter-/perimuscular														
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Mild	0	0	2	1	5	0	3	1	0	2	2	1	0	0
Moderate	0	0	4	9	5	8	6	8	8	6	6	8	6	6
Marked	0	0	1	0	0	1	1	1	0	2	2	1	4	5
Hyperplasia, epidermis, widespread														
Mild	0	0	0	0	2	3	5	7	3	1	0	0	2	1
Moderate	0	0	4	9	7	4	4	1	7	9	9	10	7	9
Sciatic nerve, perineural Inflammation														
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	3	1	0	0	1	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	0	0	2	3
Moderate	0	0	2	0	0	0	1	0	2	7	0	0	5	5
Marked	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Bone femur Inflammation														
Minimal	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	2	7
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Mammary gland Inflammation, mixed; interstitium; focal														
Mild	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	2	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0
Lymph node iliac Plasmacytosis														
Minimal	0	0	2	2	1	1	0	0	1	0	4	1	0	0
Mild	0	0	3	1	6	6	2	1	4	4	1	6	9	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	7	7	2	5	1	0	1	8

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Marked Inflammation	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Minimal Inflammation	0	0	4	1	0	1	0	0	0	2	1	2	1	1
Mild Inflammation	0	0	1	5	0	2	0	0	3	3	1	3	7	5
Moderate Inflammation	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	1	0
Increased cellularity, germinal center														
Minimal	4	3	3	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0
Mild	4	0	5	6	6	7	9	4	7	6	8	10	8	6
Moderate	0	0	1	1	3	2	0	2	2	3	2	0	2	4
Skeletal muscle Infiltration, mixed (focal, multifocal)														
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	0	5	0
Spleen Increased haematopoiesis														
Minimal	0	0	0	0	3	2	0	0	0	4	0	0	2	6
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	2
Liver Vacuolation, hepatocellular, periportal														
Minimal	0	0	1	4	1	5	0	2	5	1	1	6	5	2
Mild	0	0	0	6	0	1	0	8	3	9	0	4	4	8

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Recovery Evaluation														
Number Evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body Temperature (°C) Day 36	36.8	38.3	37.4	38.8	37.6	38.8	38.2*	38.7	37.5	39.1	NA	NA	37.0	39.2
Histopathologyⁿ														
Number Examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Injection site														
Fibrosis intramuscular/ interstitial														
Minimal	0	0	1	3	3	1	4	4	4	1	0	0	4	4
Fibrosis inter-/perimuscular														
Minimal	0	0	1	1	1	4	0	1	2	4	1	4	1	0
Mild	0	0	4	4	4	1	5	4	3	0	0	0	4	4
Inflammation, inter-/ perimuscular														
Minimal	0	0	3	2	4	3	1	1	3	2	1	3	1	0
Mild	0	0	2	2	0	0	4	4	2	2	0	0	4	4
Lymph node iliac														
Plasmacytosis														
Minimal	0	0	0	2	0	2	2	3	2	2	0	1	1	1
Mild	0	0	0	1	0	1	0	0	1	3	0	0	0	3
Increased cellularity, germinal center														
Minimal	1	2	3	2	1	1	3	1	1	0	4	3	1	0
Mild	4	2	1	3	4	3	1	4	4	3	1	1	4	3
Moderate	0	0	1	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1
Skeletal muscle														

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

Dose (µg RNA/animal)	Control (0)		BNT162 (30)		BNT162 (10)		BNT162 (30)		BNT162 (100)		BNT162 (30)		BNT162b2 (V8) (100)	
Dosing Frequency	QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx3		QWx2		QWx3	
Administration Sites/Dosing Day	2		1		1		1		2		1		2	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Infiltration, lymphocytic Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver Vacuolation, hepatocellular, periportal Minimal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

* $p \leq 0.05$; † $p \leq 0.01$, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

- = No noteworthy findings; F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; IFN = Interferon; I/H = Induration/Hardening; IL = Interleukin; LNP = Lipid Nanoparticle; M = Male; modRNA = Nucleoside-modified mRNA; NA = Not applicable, Not available; Neg = Negative; Pos = Positive; QW = Once weekly; [REDACTED]; [REDACTED]; SP2 = Spike protein P2 mutant; TNF = Tumor necrosis factor; [REDACTED].

a. Final, audited study report.

b. Groups 1, 5, and 7 each received 100 µL/administration site at 2 sites for a total dose volume of 200 µL. The remaining groups each received an administration at only 1 site for a total dose volume of 60 µL (Groups 2 and 4), 20 µL (Group 3), and 70 µL (Group 6).

c. Ten (10) animals/sex/group for the dosing phase (main study animals), and 5 animals/sex/group for the recovery phase. Additional satellite animals (3/sex/group) were used only for blood sampling for cytokine analysis.

d. Group means are shown for controls. Changes from controls, expressed as multiples, are shown for groups administered test article. Statistical significance is based on actual data and not on the multiples.

e. Values represent data obtained from recovery animals (5/sex).

f. Percent differences from Day 1 are shown.

g. For local tolerance, when animals received the test article over 2 injection sites (Groups 1, 5, and 7), only the highest severity score from either injection site was used to calculate incidence.

h. No noteworthy findings were observed at all time points on Day 1 (4, 24, 48, 96, and 144 hours postdose) and Day 15 (4 and 24 hours post dose).

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 38166 (continued)

i. Day 4 values represent data obtained from the first 5 main study animals/sex/group and all recovery animals (5/sex/group). Day 10 and 17 values represent data obtained at the end of the dosing phase from the main study animals only (10/sex/group).

j. Data obtained from all satellites animals (3/sex/group). Cytokine parameters evaluated were IFN- γ , TNF- α , IL-1- β , IL-6, and IL-10.

k. Observation of “indurated” includes observations of thickened injection site and/or muscle.

l. Day 10 for Group 6.

m. On Day 15, 6 animals (males 32, 34, 37, 39 and 42; female 60) were administered their third dose of BNT162 (Group 2) in the contralateral limb (Site II) due to local tolerance findings at the original injection site (Site I).

n. Day 31 for group 6; Day 38 for all other groups.

**2.6.7.7B REPEAT-DOSE
TOXICITY****Report Title: 17-Day Intramuscular
Toxicity Study of BNT162b2
(V9) and BNT162b2 in Wistar
Han Rats With a 3-Week
Recovery****Test Article: BNT162b2****Species/Strain:** Rat/Wistar Han**Age at First Dose:** 9 Weeks**Duration of Dosing:** 17 Days (Dose days 1, 8, 15)**Duration of Postdose:** 3 Weeks**Study Number:** GR142**Lot Numbers:** COVVAC/2703 (BNT162b2
[V9]), BCV/0406 (BNT162b2)**Date of First Dose:** [REDACTED]**Method of Administration:** Intramuscular injection,
QD, 60 µL/injection^a**GLP Compliance:** Yes**Vehicle/Formulation:** 0.9% sterile saline/Suspension**Special Features:** None**No Observed Adverse Effect Level:** NA

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162b2 [REDACTED] (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Number of Animals ^b	15	15	15	15	15	15
Noteworthy Findings						
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0
Body Weight (g) ^c						
Prior to Initiation of Dosing (Day 6)	225.28	-	-	-	1.0	-
Day 11	295.83	-	-	-	0.93†	-
Day 15	311.47	-	-	-	0.94*	-
Body Weight Change (g)						
Days 1-4	-12.64	-11.61	-19.57†	-14.21	-20.92†	-15.75
Days 4-8	+28.44	+23.34	+36.01	+25.19	+33.75	+21.98
Days 8-11	+15.23	+3.71	+0.10†	+1.37	-1.71†	+3.92
Days 11-15	+15.64	+4.06	+18.82*	+10.14†	+18.71	+11.09†
Days 1-15	+46.67	+19.50	+35.35†	+22.49	+29.83†	+21.25
Food Consumption (g) ^c						
Days 1-4	50.88	37.79	0.84†	0.87†	0.76†	0.92†
Days 4-8	90.87	74.46	1.06	0.95	1.01	0.96
Days 8-11	64.77	48.27	0.83†	0.87†	0.78†	0.84†
Days 11-15	89.35	65.27	1.03	1.02	0.99	1.05
Days 1-15	295.87	225.80	0.97	0.94	0.91*	0.95
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Local Tolerance ^d						
Day 1 – Edema						
Predose	-	-	-	-	-	-
4 Hours Postdose						
Edema, very slight	0	0	0	0	0	1
24 Hours Postdose						
Edema, very slight	0	0	5	5	7	8
Edema, slight	0	0	6	10	6	7
48 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	1 (6)	0 (10)	0 (6)	0 (7)
Edema, slight	NA	NA	5 (6)	10 (10)	6 (6)	7 (7)
72 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	5 (6)	0 (10)	2 (6)	0 (7)
Edema, slight	NA	NA	0 (6)	10 (10)	4 (6)	7 (7)
120 Hours Postdose						
Edema, slight	NA	NA	NA	10 (10)	4 (4)	7 (7)
144 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	NA	0 (10)	4 (4)	0 (7)
Edema, slight	NA	NA	NA	10 (10)	0 (4)	7 (7)
Day 8 – Edema						
Predose	-	-	-	-	-	-
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose						
Edema, slight	0	0	6	6	4	6
Edema, moderate	0	0	7	9	11	9
48 Hours Postdose						
Edema, slight	NA	NA	6 (13)	6	3	4
Edema, moderate	NA	NA	7 (13)	9	12	11
72 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	2 (13)	1	2	0
Edema, slight	NA	NA	11 (13)	8	13	8
Edema, moderate	NA	NA	0 (13)	6	0	7

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
120 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	11 (11)	14 (14)	13 (13)	8
Edema, slight	NA	NA	0 (11)	0 (14)	0 (13)	3
144 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	1 (11)	0 (14)	0 (13)	1
Day 15 – Edema						
Predose						
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-
Edema, very slight	0	0	2	0	5	0
24 Hours Postdose						
Edema, very slight	0	0	1	0	1	0
Edema, slight	0	0	11	6	11	4
Edema, moderate	0	0	2	9	3	11
48 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	0 (13)	1	0 (14)	0
Edema, slight	NA	NA	11 (13)	8	10 (14)	6
Edema, moderate	NA	NA	2 (13)	6	4 (14)	9
72 Hours Postdose						
Edema, very slight	NA	NA	2 (4)	0 (5)	1 (5)	0 (5)
Edema, slight	NA	NA	2 (4)	3 (5)	4 (5)	2 (5)
Edema, moderate	NA	NA	0 (4)	2 (5)	0 (5)	3 (5)
Day 1 – Erythema						
Predose	-	-	-	-	-	-
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose						
Erythema, very slight	0	0	1	11	1	15
48 Hours Postdose						
Erythema, very slight	NA	NA	0 (6)	10 (10)	1 (6)	7 (7)
72 Hours Postdose						
Erythema, very slight	NA	NA	0 (6)	9 (10)	0 (6)	7 (7)
120 Hours Postdose						
Erythema, very slight	NA	NA	NA	9 (10)	0 (4)	7 (7)

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
144 Hours Postdose Erythema, very slight	NA	NA	NA	9 (10)	0 (4)	7 (7)
Day 8 – Erythema						
Predose	-	-	-	-	-	-
4 Hours Postdose	-	-	-	-	-	-
24 Hours Postdose Erythema, very slight	0	0	7	15	12	15
48 Hours Postdose Erythema, very slight	NA	NA	7 (13)	15	14	15
72 Hours Postdose Erythema, very slight	NA	NA	5 (13)	12	10	14
120 Hours Postdose Erythema, very slight	NA	NA	2 (11)	2 (14)	0 (13)	8
144 Hours Postdose	NA	NA	- (11)	- (14)	- (13)	-
Day 15 – Erythema						
Predose	-	-	-	-	-	-
4 Hours Postdose Erythema, very slight	0	0	0	0	1	0
24 Hours Postdose Erythema, very slight	0	0	0	12	0	15
48 Hours Postdose Erythema, very slight	NA	NA	0 (13)	3	3 (14)	12
72 Hours Postdose Erythema, very slight	NA	NA	0 (4)	2 (5)	0 (5)	4 (5)
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-
Body temperature (°C) ^e						
Day 1	38.31	38.08	38.85†	38.50*	39.02†	38.58†
Day 8	37.07	37.81	38.05†	38.47†	38.33†	38.73†
Day 15	37.34	38.02	38.37†	38.15	38.43†	38.35
Hematology/Coagulation ^f						
Red Blood Cells (10 ⁶ /µL)						
Day 4	8.117	7.903	7.774*	7.381*	7.596†	7.470*
Day 17	7.584	7.423	7.169	6.872†	7.113	6.836†

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Hemoglobin (g/dL)						
Day 4	15.01	14.53	14.16*	13.56*	14.01†	13.56*
Day 17	13.82	13.83	12.53†	12.38†	12.81†	12.24†
Hematocrit (%)						
Day 4	48.04	44.91	43.37†	41.79*	43.79†	41.81*
Day 17	42.61	41.67	38.40†	38.09†	39.29*	37.21†
Mean Cell Hemoglobin (pg)						
Day 4	18.51	18.37	18.20	18.39	18.50	18.16
Day 17	18.27	18.62	17.48†	17.99†	18.01	17.89†
Mean Cell Hemoglobin Concentration (g/dL)						
Day 4	31.24	32.34	32.64†	32.49	32.04†	32.41
Day 17	32.46	33.18	32.65	32.50†	32.61	32.84
Red Cell Distribution Width (%)						
Day 4	12.27	11.11	12.83	11.39	12.44	11.97†
Day 17	11.63	11.33	14.12†	13.34†	13.73†	13.38†
Reticulocytes (10 ³ /µL)						
Day 4	392.1	301.7	107.4†	129.7†	104.6†	133.6†
Day 17	178.8	168.9	185.4	222.1*	194.0	203.3
White Blood Cells (10 ³ /µL)						
Day 4	7.60	6.01	10.70*	7.84	9.70	8.57*
Day 17	3.84	2.16	8.83†	5.70†	8.60†	6.37†
Neutrophils (10 ³ /µL)						
Day 4	1.083	0.920	2.470†	2.306	2.161*	2.879†
Day 17	0.674	0.409	4.449†	2.469†	4.351†	2.879†
Monocytes (10 ³ /µL)						
Day 4	0.109	0.093	0.199*	0.176	0.214†	0.234†
Day 17	0.071	0.056	0.234†	0.154†	0.254†	0.176†
Eosinophils (10 ³ /µL)						
Day 4	0.081	0.057	0.086	0.087*	0.091	0.123†
Day 17	0.056	0.029	0.141†	0.092†	0.122†	0.097†
Basophils (10 ³ /µL)						
Day 4	0.016	0.009	0.030*	0.017	0.037†	0.024†
Day 17	0.003	0.001	0.017†	0.008†	0.019†	0.010†

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Large Unstained Cells (10 ³ /µL)						
Day 4	0.046	0.030	0.187†	0.126†	0.183†	0.133†
Day 17	0.026	0.010	0.209†	0.132†	0.323†	0.190†
Fibrinogen (mg/dL)						
Day 17	253.1	217.2	596.7†	541.9†	606.1†	563.1†
Clinical Chemistry^g						
Albumin/Globulin Ratio						
Day 4	1.88	1.98	1.70†	1.71†	1.69†	1.69†
Day 17	1.85	1.96	1.65†	1.61†	1.65†	1.66†
Total Protein (g/dL)						
Day 4	6.10	6.26	5.90	5.65†	5.85	5.94
Day 17	5.39	5.44	5.51	4.98†	5.41	4.96†
Albumin (g/dL)						
Day 4	3.98	4.16	3.71†	3.56†	3.68†	3.73†
Day 17	3.50	3.60	3.43	3.07†	3.38	3.09†
Globulin (g/dL)						
Day 4	2.13	2.10	2.19	2.09	2.18	2.21
Day 17	1.89	1.84	2.08*	1.91	2.03	1.88
Acute Phase Proteins^g						
α2-Macroglobulin (µg/mL)						
Day 4	113.4	212.1	2318.1†	703.8†	3911.6†	887.1†
Day 17	14.0	33.1	990.6†	521.0†	1794.2†	592.0†
α1-Acid Glycoprotein (µg/mL)						
Day 4	174.358	239.774	1642.265†	1906.314†	2351.791†	1677.103†
Day 17	47.672	95.959	1835.986†	1491.849†	2021.083†	1651.071†
Urinalysis (Day 17)	-	-	-	-	-	-
Immunogenicity (Day 17)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Organ Weights (Day 17)^c						
Spleen						
Absolute (g)	0.5951	0.4382	1.29†	1.55†	1.34†	1.41†
Relative (g/100 g body weight)	0.2008	0.2202	1.42†	1.59†	1.52†	1.47†
Relative (g/g brain weight)	0.3120	0.2353	1.29†	1.62†	1.34†	1.43†

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■■■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■■■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Gross Pathology (Day 17)						
Number Examined	10	10	10	10	10	10
Injection site						
Abnormal color, pale/dark	0	1	2	3	1	0
Abnormal consistency, firm	0	0	2	4	2	7
Lymph node, draining						
Abnormal size, enlarged	0	0	1	1	0	4
Spleen						
Abnormal size, enlarged	0	0	0	0	0	1
Histopathology (Day 17)						
Number Examined ^h	10	10	10	10	10	10
Injection site						
Inflammation						
Minimal	4	5	0	0	0	0
Mild	0	0	7	7	5	9
Moderate	0	0	3	3	5	1
Edema						
Mild	0	0	8	9	8	9
Moderate	0	0	1	1	1	1
Lymph Node Iliac, Draining						
Increased cellularity, Plasma cell						
Minimal	0	0	1 (9)	1	4	1
Mild	0	0	4 (9)	1	3	5
Moderate	0	0	2 (9)	7	1	1
Increased cellularity, Germinal center						
Minimal	1	1	2 (9)	3	2	4
Mild	1	1	4 (9)	2	6	2
Lymph Node, Inguinal						
Increased cellularity, Plasma cell						
Minimal	0 (9)	0	1	2	1	4
Increased cellularity, Germinal center						
Minimal	0 (9)	1	1	3	1	6
Mild	1 (9)	0	4	3	5	3

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Liver						
Vacuolation, Hepatocyte; Periportal						
Minimal	0	0	5	10	7	7
Spleen						
Increased cellularity, hematopoietic cell						
Minimal	0	0	10	9	10	10
Increased cellularity, Germinal center						
Minimal	0	0	5	6	5	5
Bone marrow, Sternum						
Increased cellularity, hematopoietic cell						
Minimal	0	0	10	10	10	10
Postdose Evaluation						
Number of Animals	5	5	5	5	5	5
Body Weight (g) ^c						
Day 11	330.74	-	1.05	-	1.00	-
Day 15	333.60	-	1.06	-	1.00	-
Day 18	341.42	-	1.05	-	1.01	-
Day 21	347.88	-	1.06	-	1.02	-
Food Consumption (g) ^c						
Days 1-21	383.66	-	1.15	-	1.08	-
Hematology/Coagulation						
Red Cell Distribution Width (%)						
Day 22	11.93	10.80	13.48†	13.04†	13.33*	13.32†
Clinical Chemistry						
Albumin/Globulin Ratio						
Day 22	1.76	1.90	1.72	1.72*	1.70	1.80
Globulin (g/dL)						
Day 22	2.10	2.26	2.26†	2.40	2.18	2.42
Local Tolerance						
Recovery Day 1 – Edema						
72 Hours Postdose						
Edema, slight	NA	NA	2	3	4	2
Edema, moderate	NA	NA	0	2	0	3

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162■ (30)	
	M	F	M	F	M	F
Sex						
Immunogenicity	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive
Gross Pathology (Day 22)						
Number Examined	5	5	5	5	5	5
Lymph Node, Draining						
Abnormal size, enlarged	0	0	1	0	0	1
Lymph Node, Inguinal						
Abnormal size, enlarged	0	0	0	0	0	1
Histopathology (Day 22)						
Number Examined ⁱ	5	5	5	5	5	5
Injection site						
Inflammation						
Minimal	0	0	5	5	5	5
Lymph Node, Draining						
Increased cellularity, Plasma cell						
Minimal	0 (4)	0	4	4	5	3
Increased cellularity, Germinal center						
Minimal	0 (4)	1	3	2	2	4
Mild	0 (4)	0	1	1	2	1
Infiltration, Macrophage						
Minimal	0 (4)	0	2	1	2	1
Mild	0 (4)	0	1	2	2	3
Lymph Node, Inguinal						
Increased cellularity, Plasma cell						
Minimal	0	0	0	0	0	1
Increased cellularity, Germinal center						
Minimal	2	2	3	1	2	3
Infiltration, Macrophage						
Minimal	0	0	0	0	1	1
Spleen						
Increased cellularity, Germinal center						
Minimal	0	0	1	2	1	2

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: ■ GR142 (continued)

Dose (µg RNA)	Saline Control (0)		BNT162b2 (V9) (30)		BNT162 ■ (30)	
Sex	M	F	M	F	M	F

* $p \leq 0.05$; † $p \leq 0.01$, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

- = No noteworthy findings; F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; NA = Not applicable, results not yet available; QD = Once daily.

- a. Each animal received a single intramuscular injection on each dose day.
- b. Ten (10) animals/sex/group for the dosing phase (main study animals), and 5 animals/sex/group for the recovery phase.
- c. Group means are shown for controls. Changes from controls, expressed as multiples, are shown for groups administered test article. Statistical significance is based on actual data and not on the multiples.
- d. Fifteen (15) animals/sex/group examined unless otherwise indicated in ().
- e. Values represent the highest group mean postdose body temperature after each dose.
- f. Day 4 mean values for 7 animals/sex/group.; Day 17 mean values for 9 or 10 animals/sex/group.
- g. Day 4 mean values for 8 animals/sex/group.; Day 17 mean values for 8, 9 or 10 animals/sex/group.
- h. Ten (10) animals/sex/group examined unless otherwise indicated in ().
- i. Five (5) animals/sex/group examined unless otherwise indicated in ().

2.6.7.12 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – FERTILITY AND DEVELOPMENT

Report Title: A Combined Fertility and Developmental Study (Including Teratogenicity and Postnatal Investigations) of BNT162, BNT162b2 and BNT162 by Intramuscular Administration in the Wistar Rat

Test Article: BNT162b2

Design Similar to ICH 4.1.1, 4.1.2 and 4.1.3: Yes
Species/Strain: Rat/Wistar Han
Age at First Dose (F): 11 weeks
Date of First Dose: [REDACTED]

Duration of Dosing (F): 4 Days (21 and 14 days prior to mating, GD 9, GD 20)
Day of Mating (F): GD 0
Day of Cesarean Section: GD 21
Day of Dams and Pups Necropsy: PND 21

Study Number: [REDACTED]256434
Sponsor Reference Number: RN9391R58
Lot Numbers: CoVVAC/1003 [REDACTED] (BNT162 [REDACTED]), CoVVAC/2703 [REDACTED] (BNT162b2), BCV/0406 [REDACTED] (BNT162 [REDACTED])
GLP Compliance: Yes

Special Features: None

Method of Administration: Intramuscular injection, 0.06 mL/injection

No Observed Adverse Effect Level: Not reported

Vehicle/Formulation: 0.9% sterile saline/Suspension

Control Article: Sterile physiological saline (0.9 % NaCl)

Dose ($\mu\text{g mRNA}$)^a	Saline Control (0)	BNT162 [REDACTED] (30)	BNT162b2 (30)	BNT162 [REDACTED] (30)
Dams				
Number of Females				
Caesarean Subgroup	22	22	22	22
Littering Subgroup	22	22	22	22
Clinical Observations				
Injection site				
Premating swelling ^b	0	43	44	43
Gestation swelling ^b	0	5	10	20
Lactation swelling ^b	1	0	3	2
Premating Body Weight (g) ^c				
Prior to Initiation of Dosing (Day 1)	216.49	1.00	1.01	1.02
Prior to Initiation of Mating (Day 22)	240.13	0.99	1.00	1.01

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Development

Study Number: ■ 256434 (continued)

Dose (µg mRNA) ^a	Saline Control (0)	BNT162 (30) ■	BNT162b2 (30)	BNT162 (30) ■
Premating Body Weight Change (g)				
Days 1-4	4.85	-0.55§	-0.64§	-0.17§
Days 1-22	23.64	20.00	20.39	20.94
Gestation Body Weight (g) ^c				
End of Gestation (GD 21)	365.98	0.98	0.96*	0.96*
Gestation Body Weight Change (g)				
GD 9-12	13.55	7.48§	5.70§	5.73§
GD 18-21	34.10	29.33§	24.82§	29.24§
Lactation Body Weight	-	-	-	-
Premating Food Consumption (g) ^c				
Days 1-8	18.49	0.90§	0.91§	0.91§
Days 1-22	18.43	0.97§	0.98	0.98
Gestation Food Consumption (g) ^c				
GD 9-12	22.95	0.87§	0.84§	0.83§
GD 18-21	23.41	0.98	0.97	0.99
Lactation Food Consumption	-	-	-	-
Number of Females Paired	44	44	44	44
Number of Females Failed to Mate	0	1	0	0
Number of Females Inseminated	44	43	44	44
Number of Pregnant Females	43	41	42	44
Number of Mistimed Pregnancy Females	0	0	0	1
Number of Not Pregnant Females	1	2	2	0
Number Euthanized Moribund Post-partum (Littering subgroup)	0	0	0	1 ^d
Number Total Litter Death Post-partum (Littering subgroup)	0	1	0	1
Necropsy Observations (Macroscopic)				
Injection site				
Firm area	0	7	9	14
Enlarged	0	7	8	14
Oedematous area	0	0	1	0
Pale	0	2	4	10

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Development

Study Number: ■ 256434 (continued)

Dose (µg mRNA) ^a	Saline Control (0)	BNT162 (30) ■	BNT162b2 (30)	BNT162 (30) ■
Cesarean Subgroup				
Cesarean Section Observations				
Number Evaluated	21	20	21	22
Mean Number Corpora Lutea	14.7	15.3	15.5	15.0
Mean Number Implantations	14.1	14.6	14.0	13.8
Mean % Preimplantation Loss	4.09	4.77	9.77*	7.96
Mean % Postimplantation Loss	6.10	3.36	5.85	8.64
Mean Number Early Resorptions	0.8	0.5	0.7	1.0
Mean Number Late Resorptions	0.1	0.0	0.2	0.2
Fetuses				
Number Fetuses /Litters Evaluated	277/21	282/20	276/21	275/22
Mean Number Live Fetuses	13.2	14.1	13.1	12.5
Mean Number Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean Fetal Body Weight (both sex) (g)	4.89	4.86	4.90	4.84
Sex Ratios (% males)	46.96	48.09	50.66	49.84
Fetal Observations				
External Malformations	-	-	-	-
External Variations/Abnormalities	-	-	-	-
Number Fetuses/Litters Evaluated	277/21	282/20	276/21	275/22
Visceral Malformations	-	-	-	-
Visceral Variations/Abnormalities	-	-	-	-
Number Fetuses/Litters Evaluated	133/21	135/20	132/21	132/22
Skeletal Malformations	-	-	-	-
Skeletal Variations/Abnormalities	-	-	-	-
Number Fetuses/Litters Evaluated	144/21	147/20	144/21	143/22
Littering Subgroup				
Number with Mistimed Pregnancy	0	0	0	1
Number with Total Litter Death	0	1	0	1
No. of Natural Deliveries	22	21	21	20
Number Euthanized Moribund Post-Partum	0	0	0	1 ^d
No. of Litters with Stillborn Pups	3	4	2	2

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Development

Study Number: ■ 256434 (continued)

Dose (µg mRNA) ^a	Saline Control (0)	BNT162 (30)	BNT162b2 (30)	BNT162 (30)
No. of litters with All Stillborn Pups	0	0	0	1
Mean No. Pups/Litter	13.3	11.9	13.1	11.4*
Mean No. Liveborn Pups	13.0	11.0	13.0	11.3*
No. of Total Litters Losses	0	1	0	1
Pre-Birth Loss (%)	6.80	12.22	8.22	13.76*
No. of viable litters at Weaning (PND 21)	22	20	21	19
Gestation Index (%)	100	100	100	95
Live Birth Index (%)	98.0	93.2	99.3	94.7
Postnatal Survival to Day 4 (%)	99.0	98.3	98.9	99.1
Postnatal Survival to Weaning (No. of pups)	175	154	163	152
Lactation Index (PND 4-PND 21) (%)	99.4	100.0	100.0	100.0
Sex ratio at Weaning (PND 21) (Males %)	49.7	50.6	47.6	49.3
Change in Pup Body Weight (g)	-	-	-	-
Pup Clinical Signs	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations	-	-	-	-
Immunogenicity				
Dams	Neg	Pos	Pos	Pos
Fetuses	Neg	Pos	Pos	Pos
Pups	Neg	Pos	Pos	Pos

* p<0.05, § p<0.001; Dunnett Non-Parametric 2-Sided. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

- = No noteworthy findings; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Conference on Harmonisation; mRNA = messenger RNA; Neg = negative; PND = postnatal day; Pos = positive.

a. Each dose consisted of a 0.06 mL intramuscular injection in alternating quadriceps muscles.

b. Complete recovery was noted between each of the dose administrations. Swelling (associated or not with limping and/or piloerection for 1 or 2 days after the second dose only) was noted at the injection site.

c. Group means are shown for controls. Changes from controls, expressed as multiples, are shown for groups administered test article. Statistical significance is based on actual data and not on the multiples.

d. Difficulties during parturition.