TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 3
LIST OF FIGURES 3
本項で使用する用語・略語 5
1. 非臨床試験計画概略 7
2. 薬理試験 9
2.1. 効力を裏付ける試験 11
2.1.1. In vitro 薬理試験 11
2.1.1.1. SPR 法を用いた複数の動物種由来の TFPI に対するマルスタシマブの結合性 11
2.1.1.2. SPR 法を用いたヒト TFPI の K1，K2 および K1K2 ドメインに対するマルスタシマブの結合性 11
2.1.1.3. 生化学的試験でのマルスタシマブの活性 11
2.1.1.4. 非血友病のヒト全血に対するマルスタシマブの活性 12
2.1.1.5. 非血友病血漿に対する活性 12
2.1.1.6. 血友病患者の血漿にマルスタシマブと rFVIIa を併用で添加した際の止血測定法による活性評価 14
2.1.1.7. 活性化プロトロンビン複合体製剤と併用したときのヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの活性 19
2.1.1.8. トロンビン生成試験においてバイクロット®と併用したときのヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの活性評価 20
2.1.2. In vivo 薬理試験 21
2.1.2.1. 血友病マウスモデルに対するマルスタシマブの活性 21
2.1.2.2. In vivo 併用投与試験 24
2.1.2.3. サルを用いたマルスタシマブの静脈内または皮下投与試験 28
2.2. 副次的薬理試験 29
2.3. 安全性薬理試験 29
2.4. 薬力学的薬物相互作用 29
3. 薬物動態試験 29
3.1. 分析法 30
3.2. 吸収 30
3.2.1. 単回投与時の薬物動態 30
3.2.2. 反復投与時の薬物動態 30

3.2.3. 反復投与時のトキシコキネティクス 31
3.3. 分布 32
3.4. 代謝 32
3.5. 排泄 32
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 33
4. 毒性試験 33
4.1. 単回投与毒性 35
4.2. 反復投与毒性 36
4.2.1. ラットを用いた反復投与毒性試験 36
4.2.1.1. ラットを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験 36
4.2.1.2. ラットを用いた 3 ヵ月間静脈内または皮下投与毒性試験および 6 週間回復性試験 36
4.2.1.3. ラットを用いた 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験および 6 週間回復性試験 37
4.2.2. サルを用いた反復投与毒性試験 38
4.2.2.1. サルを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験 38
4.2.2.2. サルを用いた 3 ヵ月間静脈内または皮下投与毒性試験および 6 週間回復性試験 38
4.3. 遺伝毒性試験 39
4.4. がん原性 39
4.4.1. 作用の特異性およびメカニズム 39
4.4.2. TFPI の腫瘍生物学的役割 40
4.4.3. 非臨床試験結果 40
4.4.4. まとめ 40
4.5. 生殖発生毒性 40
4.5.1. ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 41
4.6. 局所刺激性試験 41
4.7. その他の毒性試験 42
4.7.1. 光毒性試験 42
4.7.2. 抗原性試験 42
4.7.3. 免疫毒性試験 42
4.7.4. 毒性発現の機序に関する試験 42
4.7.5. 依存性試験 43

4.7.6. 代謝物の毒性試験 43
4.7.7. 不純物の毒性試験 43
4.7.8. その他の試験 43
4.7.8.1. 組織交差反応性試験 43
4.7.8.2. ラットを用いたファイバ®の 3 日間静脈内投与試験 43
4.7.8.3. ラットを用いた併用投与における探索的薬力学試験 44
4.7.9. 毒性所見と薬物動態の関係 44
4.7.10. 標的臓器毒性 45
4.7.10.1. 凝固カスケード 46
4.7.10.2. 皮下投与部位反応 47
4.7.10.3. その他の所見 47
5. 総括及び結論 48
6. 参考文献 48

LIST OF TABLES

Table 1. dPT 法で測定したヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの EC_{50} 値 14
Table 2. 最大トロンビン生成量（nmol/L） 18
Table 3. トロンビン生成開始までの時間（分） 20
Table 4. ラットにおけるマルスタシマブの反復投与後の TK パラメータ 31
Table 5. サルにおけるマルスタシマブの反復投与後の TK パラメータ 32
Table 6. 毒性試験の一覧 34
Table 7. 薬物動態と臨床曝露量の関係 45
Table 8. 主な所見および関連する曝露量比 46

LIST OF FIGURES

Figure 1. TFPI による FXa および FVIIa/TF 阻害メカニズムの模式図 7
Figure 2. 凝固カスケードの経路図 9
Figure 3. TFPI アイソフォームドメイン構造 10
Figure 4. 非血友病のヒト全血にマルスタシマブを添加した時の TEG 分析による凝固時間（R） 12
Figure 5. 非血友病ヒト乏血小板血漿の dPT および aPTT に対するマルスタシマブの影響 13

Figure 6. 非血友病の乏血小板血漿におけるトロンビン生成に対するマルスタシマブの影響 14
Figure 7. インヒビター保有血友病 A 血漿および血友病 B 血漿を用いたマルスタシマブのトロンビン生成試験 16
Figure 8. 重症血友病 A 血漿を用いたマルスタシマブと rFVIIa の併用によるトロンビン生成試験 17
Figure 9. 非血友病血漿およびインヒビター保有重症血友病 A 血漿（ロット番号：[redacted], [redacted], [redacted]）を用いてマルスタシマブおよびマルスタシマブ ＋rFVIIa を評価したトロンビン生成試験） 19
Figure 10. 血友病 A の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの用量依存的な作用 21
Figure 11. 血友病 A の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの作用持続時間 22
Figure 12. 血友病 B の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの作用持続期間 23
Figure 13. 血友病 A の尾部出血マウスモデルの出血開始 2 分後にマルスタシマブを投与したときの出血量に対するマルスタシマブの作用 24
Figure 14. サルにマルスタシマブを皮下投与した際の dPT 凝固時間に対する時間依存的な影響 28

本項で使用する用語・略語

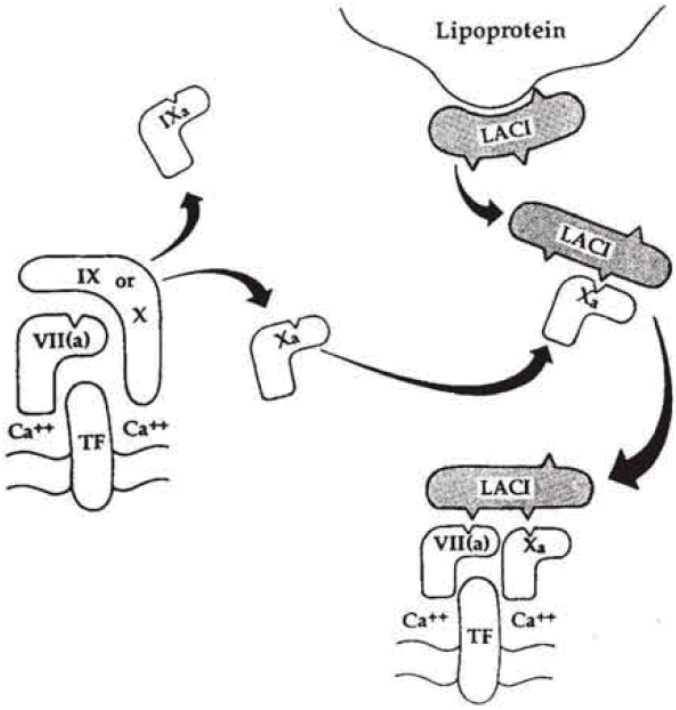
用語・略号	省略していない表現または定義
ADA	anti-drug antibody：抗薬物抗体
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害
aPCC	activated prothrombin complex concentrate：活性化プロトロンビン複合体製剤
aPTT	activated partial thrombin time：活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{48}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to 48 hours：0 時間から 48 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{168}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to 168 hours：0 時間から 168 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_t	area under the plasma concentration-time curve from time zero to t：0 時間から t 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{tau}	area under the plasma concentration-time curve over dosing interval τ：投与間隔の血漿中濃度 - 時間曲線下面積
BID	twice a day：1 日 2 回
BU	Bethesda Units：ベセスダ単位
C1q	complement component 1q：補体第一成分 q
CDC	complement dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害
CL	clearance：クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DNA	deoxyribonucleic acid：デオキシリボ核酸
dPT	dilute prothrombin Time：希釈プロトロンビン時間
EC_{50}	50% effective concentration：50%有効濃度
Fc	fragment crystallizable region of an antibody：フラグメント結晶化可能領域
FcγR	Fc gamma receptor：IgG に対する Fc 受容体
FIX	factor IX：血液凝固第 IX 因子
FVIIa	factor VII activated：活性型血液凝固第 VII 因子
FVIII	factor VIII：血液凝固第 VIII 因子
FX	factor X：血液凝固第 X 因子
FXa	factor X activated：活性型血液凝固第 X 因子
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEPES	N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)：N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon gamma：インターフェロンガンマ
IgG	immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IHC	immunohistochemical：免疫組織化学
IL-6	interleukin 6：インターロイキン 6
IV	intravenous：静脈内投与
K	clot formation time
K1	Kunitz domain 1：Kunitz ドメイン 1
K2	Kunitz domain 2：Kunitz ドメイン 2
K3	Kunitz domain 3：Kunitz ドメイン 3
KD	dissociation constant：解離定数

LACI	lipoprotein-associated coagulation inhibitor：リポタンパク質関連凝固インヒビター
LOEL	lowest observed effect level：最小影響量
MTD	maximum tolerated dose：最大耐量
N	number：例数
NOAEL	no observed adverse effect level：無毒性量
NOEL	no observed effect level：無影響量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
P450	cytochrome P450：シトクロム P450
PBS	phosphate buffered saline：リン酸緩衝生理食塩液
PD	pharmacodynamics：薬力学
PK	pharmacokinetics：薬物動態
PK/PD	pharmacokinetics/pharmacodynamics：薬物動態/薬力学
PT	prothrombin time：プロトロンビン時間
QW	once a week：週 1 回
R	reaction time
rFVIIa	recombinant Factor VII activated：遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子
rFVIII	recombinant Factor VIII：遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子
SC	subcutaneous：皮下投与
SE	standard error：標準誤差
SPR	surface plasmon resonance：表面プラズモン共鳴
$t_{½}$	half-life：終末相の見かけの消失半減期
TAT	thrombin-antithrombin complexes：トロンビン・アンチトロンビン複合体
TEG	thromboelastography：トロンボエラストグラフィ
TF	tissue factor：組織因子
TFPI	tissue factor pathway inhibitor：組織因子経路インヒビター
TGA	thrombin generation assay：トロンビン生成試験
TK	toxicokinetic：トキシコキネティクス
T_{max}	time of occurrence of C_{max}：最高血漿中濃度到達時間
TMDD	target mediated drug disposition：標的分子を介した薬物消失
TNF-α	tumor necrosis factor alpha：腫瘍壊死因子アルファ
V_{ss}	steady-state volume of distribution：定常状態時の分布容積

1. 非臨床試験計画概略

マルスタシマブ（PF-06741086）は血液凝固因子の内因性阻害物質である TFPI と結合することで TFPI を阻害するヒトモノクローナル抗体である。TFPI は Kunitz 型のプロテアーゼインヒビターであり，外因系経路において FXa と FVIIa/TF の複合体である FXa/FVIIa/TF のプロテアーゼ機能を速やかに不活化し，トロンビン生成を阻害する[1,2]。TFPI は最初に K2 ドメインを介して FXa の活性部位に結合し，FXa を阻害する。次に，この複合体は，K1 ドメインを介して FVIIa の活性部位に結合し，FVIIa を阻害する（Figure 1）。このように TFPI は 4 つのタンパク質による複合体を形成し十分な阻害活性を示す[3]。血友病では，TFPI による外因系経路の負の制御が強力であるため，外因系経路による FXa とトロンビンの生成では，内因系経路の第 VIII 因子欠損（血友病 A）および第 IX 因子欠損（血友病 B）を克服するには不十分である。TFPI 活性を阻害することで外因系経路を増強し，内因系経路の障害を克服できる可能性がある。マルスタシマブは抗 TFPI 抗体であり，血友病 A および血友病 B 患者に定期的に投与することで出血を抑制する治療薬として開発されている。

Figure 1.　TFPI による FXa および FVIIa/TF 阻害メカニズムの模式図



LACI（TFPI）の K2 ドメインを介して FXa の活性部位に結合し，FXa を阻害する。次に TFPI の K1 ドメインを介して FVIIa の活性部位に結合し，FVIIa を阻害する [2]。

分子レベルの分析により，マルスタシマブは K2 ドメインのエピトープに結合することが示された。ヒト，カニクイザル，ウサギ，ラットおよびマウスの TFPI に対するマルスタシマブの結合親和性および結合動態を SPR 法により評価したところ，結合親和性は数 nmol/L 以下であった。マルスタシマブの TFPI K1 ドメインへの結合はみられなかった。マルスタシマブによる TFPI 阻

害を多くの in vitro 機能試験により評価した。FXa を検出する酵素発色法により，純化系における TFPI の FXa および FXa/FVIIa/TF 複合体阻害に対するマルスタシマブの阻害活性を評価した。また，血友病 A，血友病 B およびインヒビター保有血友病血漿ならびに非血友病血漿に対するマルスタシマブの止血作用を TGA および dPT 法で評価したところ，止血作用の促進が示された。非血友病全血を用いた TEG においてもマルスタシマブの TFPI 阻害活性が示された。rFVIIa 存在下の重症血友病血漿にマルスタシマブを添加したところ，トロンビン生成反応が改善した。インヒビター保有血友病血漿にマルスタシマブと活性化プロトロンビン複合製剤またはバイクロット®を添加したところ最大トロンビン生成量の増加を含むトロンビン生成の増加がみられたが，その程度は非血友病の正常血漿で報告された範囲内であった。FVIII 欠損マウス（血友病 A）および FIX 欠損マウス（血友病 B）の出血モデルで止血作用を評価したところ，マルスタシマブの有効性が示された。血友病の出血マウスモデルの尾部切断前後にマルスタシマブを投与したところ，止血作用が回復した。雄ラットを用いて，マルスタシマブとノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®との反復併用投与による薬理作用の相加作用の可能性についても評価した。マルスタシマブの薬力学的プロファイルは TFPI 阻害活性と一致していた。

マルスタシマブの非臨床 PK 試験を，非臨床薬理試験および安全性試験の評価を裏付けるために実施した。マルスタシマブを Wistar Han ラットまたはカニクイザルに静脈内または皮下に単回または反復投与した際の薬物動態を評価した。マルスタシマブとノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®と併用で反復投与した際の薬物動態についても評価した。ラットを用いた最長 6 ヵ月までの反復投与毒性試験またはサルを用いた最長 3 ヵ月までの反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクスおよび ADA の評価には，バリデートされたリガンド結合アッセイを用いた。

マルスタシマブの毒性については，ラットを用いた最長 6 ヵ月までの反復投与毒性試験およびカニクイザルを用いた最長 3 ヵ月までの反復投与毒性試験により評価した。サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験では，心血管系，中枢神経系および呼吸系に及ぼす影響についても評価した。また，雄ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験，ラットを用いた単回皮下投与による局所刺激性試験を実施した。これらの試験は，臨床開発期間中に用いられた投与ルートである皮下投与または静脈内投与により実施した。

毒性試験の動物種として，以下の理由から，ラットおよびサルを選択した。

- マルスタシマブは組換えヒト，ラットおよびサルの TFPI K1K2 ドメインに結合すること。
- ヒト乏血小板血漿でみられた濃度依存的な dPT 短縮（EC_{50} 値：406 ng/mL）がサル乏血小板血漿（EC_{50} 値：273 ng/mL）でもみられたこと。
- ラットおよびサルにおいて，マルスタシマブ投与に関連する凝固パラメータの変化がみられたことから in vivo での薬理作用が確認されたと考えられること（2.4.4.7.10.1 項）。

マルスタシマブの非臨床毒性試験では，組織交差反応性試験，ヒト C1q および FcγR との結合試験およびサイトカイン放出試験についても実施した。

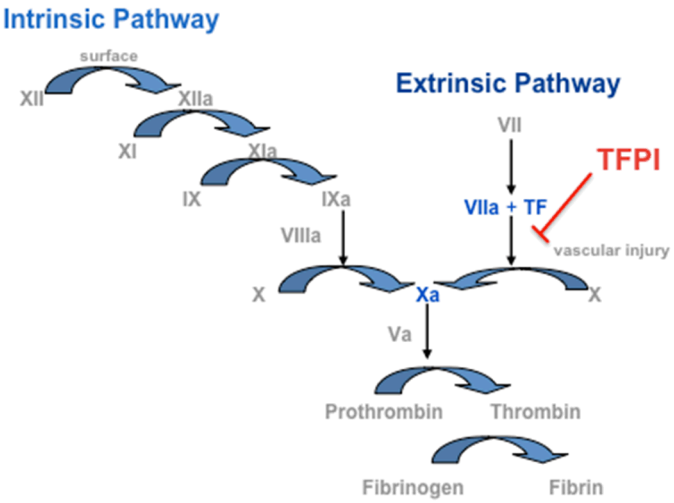
本非臨床試験プログラムは，マルスタシマブの皮下または静脈内への長期間投与が可能であることを裏付けることを目的とした。

2. 薬理試験

血友病 A および血友病 B は，それぞれ内因系の血漿タンパク質である FVIII および FIX の欠損または機能不全に起因する X 染色体連鎖性を示す疾患である。血友病の臨床的重症度は残存する凝固因子活性と相関しており，凝固因子活性が 1%未満で重症，1%以上 5%以下で中等症，5%超 40%未満で軽症となる[4]。これらの疾患の標準治療は，不足した血液凝固因子の静脈内投与による補充療法である。凝固因子補充療法には，出血時に必要に応じて処置する出血時補充療法と，凝固因子活性を正常範囲内に維持することにより出血を予防する定期補充療法がある[5,6]。これらの遺伝子変異を有する患者の多くで，投与した凝固因子が免疫系により異種タンパク質と認識され，中和抗体（インヒビター）が発生している[7]。これらの患者の外因系経路は障害されていないため，FVIIa（rFVIIa，エプタコグアルファ，ノボセブン®）や aPCC の血漿分画製剤である乾燥人血液凝固因子抗体迂回活性複合体（ファイバ®）などの代替治療により外因系経路を増強することで，凝固因子補充療法が不要となる可能性がある。

その他の手法として，外因系凝固経路を強力に阻害する TFPI を標的とし，TFPI を不活化するモノクローナル抗体の開発により外因系凝固カスケードを増強することで薬理学的な止血効果が得られる可能性がある（Figure 2）。マルスタシマブはヒト TFPI に対するヒトモノクローナル抗体であり，血友病 A および血友病 B 患者に定期的に投与することにより出血を抑制する治療薬として開発されている。TFPI は，凝固系が正常なヒトにおいては過剰な凝固反応を抑制する重要な役割を果たすが，内因系経路が障害された血友病患者では，外因系経路の機能を抑制し出血の原因となる。

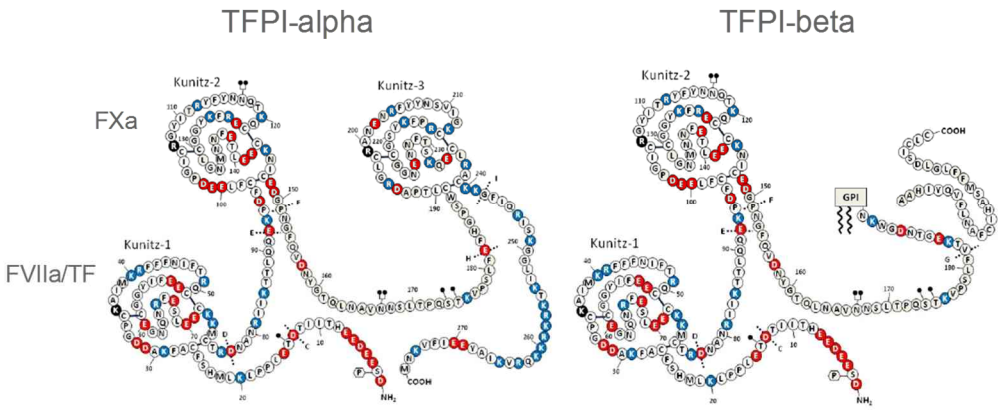
Figure 2.　凝固カスケードの経路図



TF が損傷部位に流入すると凝固反応が開始する。TF は FVIIa と複合体を形成し，この複合体が FX を FXa に変換する。TFPI は TF/FVIIa 経路を強力に阻害するため，この経路を介した initiation phase の FXa 生成量ではトロンビン生成量を維持できない[3]。TFPI の K2 ドメインが FXa に結合すると，K1 ドメインが TF/FVIIa の結合位置に配置され，FVIIa の酵素機能を阻害すると考えられている[1,3]。このように，TFPI は血友病 A および血友病 B 患者で機能する唯一の経路である外因系メディエータを阻害する。

マルスタシマブは TFPI の K2 ドメインを阻害する IgG1 モノクローナル抗体である（Figure 3）。ヒト，サル，ウサギ，ラットおよびマウスの TFPI に対するマルスタシマブの結合親和性および結合動態を SPR 法により評価した。TFPI に対するマルスタシマブの結合親和性は，いずれの動物種でも数 nmol/L 以下であった。マルスタシマブによる TFPI 阻害活性を，多くの in vitro 機能試験で評価した。純化系での FXa の発色法を用いて，TFPI の FXa および FXa/FVIIa/TF 複合体阻害に対するマルスタシマブの阻害活性を評価した。TGA，aPTT 法および dPT 法を用いて血友病 A，血友病 B およびインヒビター保有血友病血漿ならびに非血友病血漿に対するマルスタシマブの止血促進作用を評価した。血漿のほかに，非血友病全血に対するマルスタシマブの阻害活性を TEG により評価した。FVIII 欠損マウス（血友病 A）および FIX 欠損マウス（血友病 B）の出血モデルで止血作用を評価したところ，マルスタシマブの有効性が示された。マルスタシマブの薬力学的プロファイルは，その TFPI 阻害活性と一致していた。

Figure 3.　TFPI アイソフォームドメイン構造



マルスタシマブは FXa と相互作用する TFPI の K2 を標的としており，低ナノモルの濃度で K2 に結合する。TFPI には複数のアイソフォームが存在する。TFPI-αは血漿中に分布し[3,8]，活性化血小板から放出される[9,10]。選択的スプライシングによるアイソフォームである TFPI-βは TFPI-αの一部（K3 以降の C 末端領域を欠く構造）として存在し，グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーを介して内皮細胞表面に局在する[11]。また，TFPI の切断型は脂質粒子と複合体を形成して血中に分布する[12]。K2 エピトープはいずれのアイソフォームにも存在するため，マルスタシマブはすべてのアイソフォームの FXa 中和作用を阻害する可能性がある。TFPI が FVIIa と結合するには最初に FXa と高い親和性で結合する必要があると考えられるため，マルスタシマブは TFPI と FVIIa の結合も生理的条件下で間接的に阻害する可能性がある[1]。図中の赤は正に荷電したアミノ酸，青は負に荷電したアミノ酸，白は中性アミノ酸を示している。

雄ラットにマルスタシマブと止血のためのバイパス製剤（ノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®）を併用で反復投与したところ，ノボセブン®との併用投与では，肺および投与部位（尾部）で急性血栓・塞栓の発現頻度および重症度の増加がみられた。ファイバ®との併用投与では，トロンビン・アンチトロンビン複合体濃度および血小板容積の増加がみられた。バイクロット®との併用投与では，バイクロット®単独投与時と同様の影響がみられ，凝固パラメータに対する影響のみがみられた。これらの変化は，いずれも薬理作用に伴う変化と考えられた。また，マルスタシマブの曝露量はノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®との併用投与による影響を受けなかった。

マルスタシマブの副次的薬理試験は実施していないが，組織交差反応性試験（M2.6.6.8.8.1）の結果から，マルスタシマブではオフターゲットの影響は予測されない。

安全性薬理試験の評価項目をサルを用いた 3 ヵ月間投与毒性試験で評価した。本試験では，中枢神経系，呼吸系および心血管系に対する影響は認められなかった。

2.1. 効力を裏付ける試験

2.1.1. In vitro 薬理試験

2.1.1.1. SPR 法を用いた複数の動物種由来の TFPI に対するマルスタシマブの結合性

組換え型ヒト TFPI K1K2 タンパク質（K1 および K2 の両ドメインを発現する TFPI）および非臨床試験動物種（マウス，ラット，ウサギおよびサル）由来の TFPI K1K2 タンパク質に対するマルスタシマブの結合親和性および結合動態について SPR 法を用いて評価した（PF-06741086_[redacted]_072904 試験）。ヒト TFPI K1K2 に対するマルスタシマブの結合親和性（KD）は 3.7 nmol/L であった。試験動物種由来の TFPI に対するマルスタシマブの KD は，すべての動物種で数 nmol/L 以下であった（マウス：0.575，ラット：1.57，ウサギ：4.25，サル：1.22 nmol/L）。本試験で用いた動物種では，マルスタシマブは広範な交差反応性を示した。

2.1.1.2. SPR 法を用いたヒト TFPI の K1，K2 および K1K2 ドメインに対するマルスタシマブの結合性

ヒト TFPI K1，K2 および K1K2 に対するマルスタシマブの結合親和性および結合動態について SPR 法を用いて評価した（PF-06741086_[redacted]_121926 試験）。ヒト TFPI K2 および TFPI K1K2 に対するマルスタシマブの結合親和性はそれぞれ 2.63 および 7.91 nmol/L と同様な値を示した。本試験での TFPI K1K2 に対するマルスタシマブの結合親和性は前項で得られた値（3.7 nmol/L）と同様な値を示した。ヒト TFPI K1（1.6～50 nmol/L）に対するマルスタシマブの結合はみられなかった。

2.1.1.3. 生化学的試験でのマルスタシマブの活性

マルスタシマブによる TFPI 阻害活性を，2 種類の酵素発色法（直接 FXa 活性測定法および FVIIa/TF/FX 測定法）を用いて測定した（PF-06741086_[redacted]_085202 試験）。

直接 FXa 活性測定法では，組換え型ヒト TFPI K1K2 存在下でマルスタシマブ（0～80,000 ng/mL）の FXa 活性に対する作用を評価した。TFPI を反応液に添加したときの FXa 活性化に対する阻害作用を低分子の発色基質を用いて測定した。FXa 活性の上昇を TFPI 阻害活性の指標とした。マルスタシマブの添加により濃度依存的に FXa 活性が上昇し，算出された EC_{50} は 1,312 ng/mL であった。

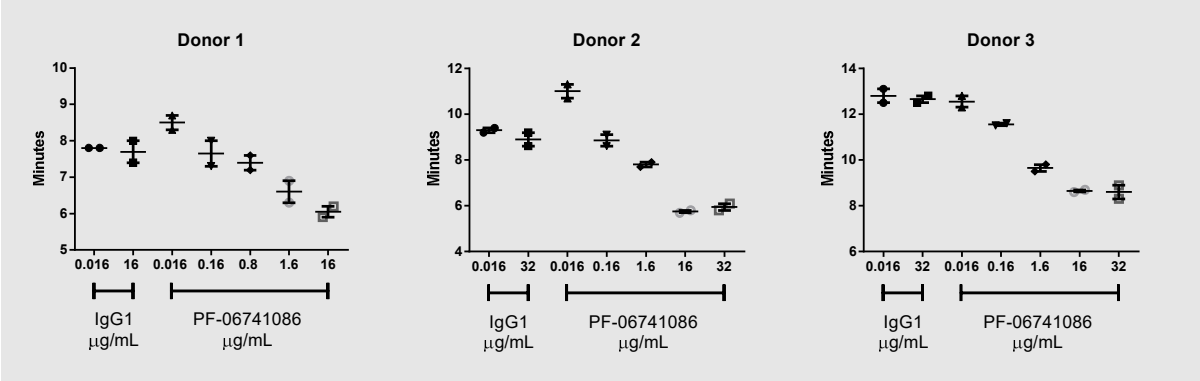
FVIIa/TF/FX 測定法は，TF/FVIIa 複合体による FX から FXa への活性化と，生成された FXa の活性（低分子の発色基質を用いて測定）の 2 段階を評価する。TFPI の FXa および FVIIa/TF/FXa の両方に対する阻害作用を中和する組み合わせた効果がみられ，マルスタシマブ（0～32,000 ng/mL）の濃度依存的な TFPI K1K2 阻害活性が観察された（EC_{50}：1,985 ng/mL）。この結果は，外因系経路の機能成分に対する TFPI の阻害機序と一致している。

2.1.1.4. 非血友病のヒト全血に対するマルスタシマブの活性

非血友病ドナーから採取した全血に対するマルスタシマブの TFPI 阻害作用および血餅形成促進作用を TEG を用いて評価した（PF-06741086_[redacted]_142056 試験）。投与が予定される患者集団は血友病患者であるが，血液および血漿における TF 依存性の凝固経路および TFPI による制御は血友病の有無に関わらず同じである。全血でのアッセイでは，血漿の測定では捉えられない血小板に存在する TFPI を測定可能である。TEG は全血での血餅形成動態を測定する包括的な止血評価法であり，フィブリン重合過程のグラフ化および定量測定により，全血における凝固開始，血餅形成および安定化に至るプロセスの完全な評価が可能である[13]。

非血友病ドナー3 例から採取した全血にマルスタシマブ（16～32,000 ng/mL）を添加した際の凝固時間（R）（Figure 4）および血餅形成時間（K）は，対照物質である IgG1 を添加した場合よりも濃度依存的に短縮した。マルスタシマブを添加した際に血餅強度の指標である最大振幅の変化は認められず，全血を TFPI 阻害薬で処理した報告[14]と一致した。これらの結果は，正常な凝固機能におけるマルスタシマブの止血促進作用と一致している。

Figure 4.　非血友病のヒト全血にマルスタシマブを添加した時の TEG 分析による凝固時間（R）



非血友病ドナー3 例から採取した全血にマルスタシマブ（PF-06741086）または対照物質である IgG1 を添加した際の凝固時間（R）を TEG を用いて測定した。マルスタシマブの添加により，全 3 例の血液で濃度依存的な凝固時間（分）の短縮が認められ，検討した最高濃度である 16 µg/mL（16,000 ng/mL）または 32 µg/mL（32,000 ng/mL）で最も短縮した。R 値は，測定開始から血液中での最初のフィブリン形成までの時間である。測定値を平均値 ± SE で示す。TEG のベースライン値にはドナー間でばらつきが認められた。

2.1.1.5. 非血友病血漿に対する活性

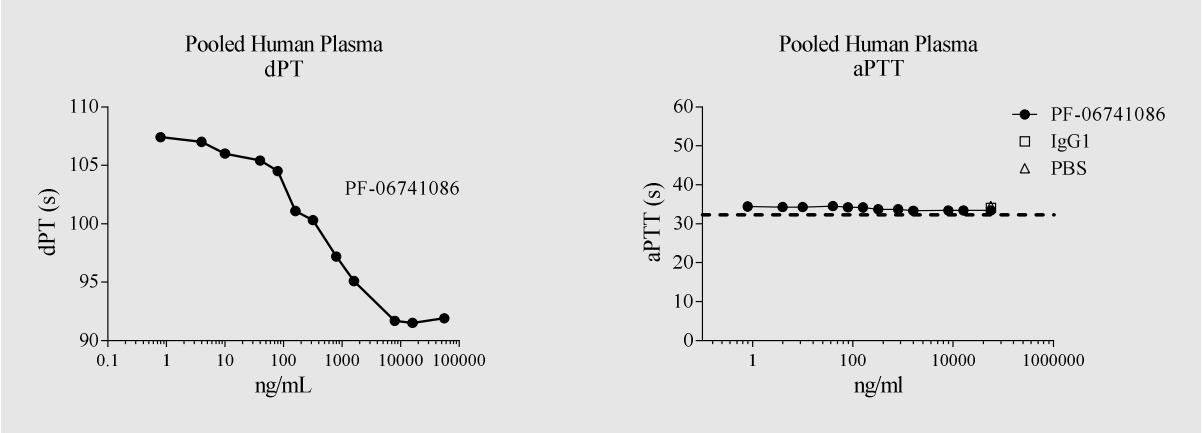
十分な凝固因子を含む非血友病のヒト血漿に対するマルスタシマブの阻害活性を，TGA，aPTT および dPT 法（PT 法の標準試薬を希釈して用いる改良法）による in vitro 濃度反応性試験で評価した（PF-06741086_[redacted]_123404 試験）。dPT 法では，外因系経路の活性化後における血漿凝固時間を測定し，TFPI の機能と強い相関が示されている[15,16]。

インキュベーションによりマルスタシマブを血漿中 TFPI に結合させて，dPT に対するマルスタシマブの影響を評価した。dPT は濃度依存的に短縮し（Figure 5），非血友病のヒト血漿におけるマルスタシマブの EC_{50} 値は 406 ng/mL であった。対照物質である IgG1 または溶媒を添加した場合，dPT に影響はみられなかった。

マルスタシマブの活性を aPTT 法でも評価した。PT および dPT 法とは対照的に，aPTT 法では内因系経路を介した凝固開始を測定する[17]。非血友病ドナーから採取した血漿にマルスタシマブを添加したところ，aPTT への著しい影響はみられなかった（Figure 5）。この結果は，内因系経路ではなく外因系経路の成分を阻害する TFPI の機序と一致している。

複数の非臨床動物種を用いてマルスタシマブを評価した。非血友病のウサギおよびサルから分離したクエン酸血漿に対するマルスタシマブの活性を dPT 法を用いて評価したところ，ヒト血漿と同様に濃度依存的な dPT 短縮が認められた。マルスタシマブによる dPT 短縮に基づいて算出された EC_{50} 値は，ウサギおよびサルの血漿でそれぞれ 629 および 273 ng/mL であった。

Figure 5.　非血友病ヒト乏血小板血漿の dPT および aPTT に対するマルスタシマブの影響

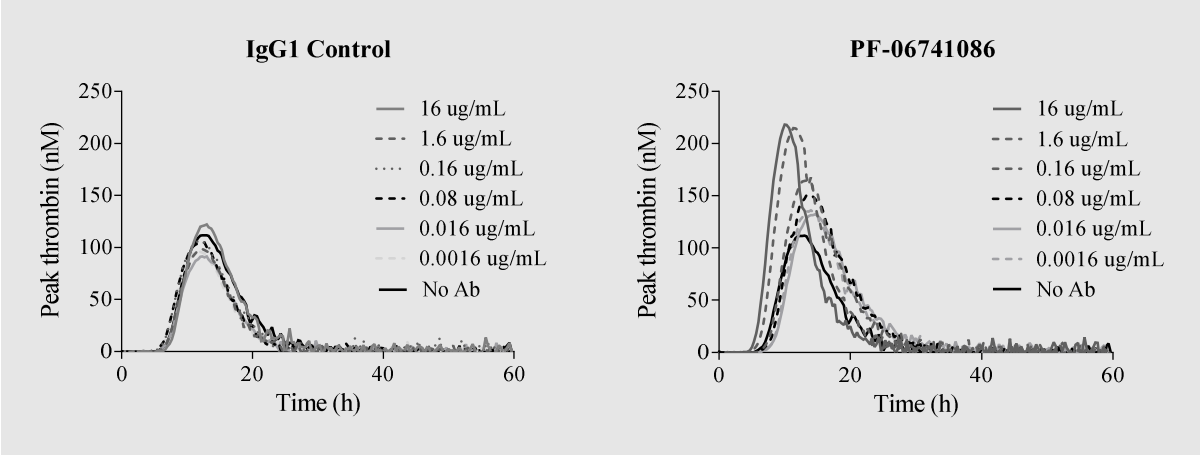


非血友病ドナーから採取したクエン酸加乏血小板血漿にマルスタシマブ（PF-06741086）または対照物質の IgG1 を各濃度で添加した際の dPT および aPTT（秒）に対する影響を評価した。マルスタシマブの濃度増加に伴い，dPT の濃度依存的な反応が認められた。マルスタシマブの濃度増加による aPTT の変化は認められず，これは外因系経路を標的とするマルスタシマブの機序と一致していた。対照物質である IgG1 または PBS の添加による dPT および aPTT の変化は認められなかった。非血友病のヒト血漿における正常な aPTT を（----）で示す。

TGA は生成開始までの時間，活性期および不活性化期を含むトロンビン生成の複数のフェーズを測定する[18]。非血友病のヒト乏血小板血漿にマルスタシマブを添加したところ，対照物質である IgG1 と比較してトロンビン生成量が濃度依存的に増加し，これはマルスタシマブの TFPI 阻害活性と一致していた（Figure 6）。非血友病血漿でのトロンビン生成量は，抗体非存在下で 112.4 nmol/L であったが，マルスタシマブ 16,000 ng/mL（16 µg/mL）添加時で 217.7 nmol/L まで増加した。マルスタシマブを各濃度で添加した血漿では，トロンビン生成開始までの時間の短縮および速度指数[a]の増加（IgG1 およびマルスタシマブにおいて 0.0016～16 µg/mL の濃度範囲でそれぞれ 17.7 から 24.5 nmol/L/min および 23.3 から 50.2 nmol/L/min への増加）が認められた。

[a] 速度指数＝最大トロンビン濃度/（ピークまでの時間－ラグタイム）

Figure 6.　非血友病の乏血小板血漿におけるトロンビン生成に対するマルスタシマブの影響



Ab：抗体

非血友病ドナーから採取したクエン酸加乏血小板血漿にマルスタシマブ（PF-06741086）または対照物である IgG1 を各濃度で添加した際のトロンビン生成量を TF（1 pmol/L）およびリン脂質（4 µg/mL）の存在下で測定した。非抗体対照（No Ab）では血漿に溶媒を添加した。

2.1.1.6. 血友病患者の血漿にマルスタシマブと rFⅦa を併用で添加した際の止血測定法による活性評価

血友病 A および血友病 B 患者から採取した血漿に対するマルスタシマブの止血の正常化作用を，dPT，TGA および aPTT を指標として評価した。FVIII および FIX は単一の酵素複合体を形成するため，いずれの因子が欠損しても同様の凝固障害が引き起こされる。マルスタシマブの凝固パラメータに対する効果を重症血友病 A ドナー4 例，高力価のインヒビター（176 BU）を保有する重症血友病 A ドナー1 例および重症血友病 B ドナー1 例から採取したクエン酸加乏血小板血漿を用いて評価した。凝固因子活性はいずれのドナーでも 1%未満であった。

マルスタシマブの外因系経路に対する効果を dPT 法により評価した（PF-06741086_[redacted]_135025 試験）。マルスタシマブを各濃度（0.8～56,000 ng/mL）で添加したところ，いずれの血友病血漿でも dPT が濃度依存的に短縮し，EC_{50} 値はドナー間で同程度であった（Table 1）。これらの結果は，血友病血漿の外因系経路を調節するマルスタシマブの止血作用と一致している。

Table 1.　dPT 法で測定したヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの EC_{50} 値

血漿	マルスタシマブ dPT EC_{50} (ng/mL)
血友病 A（GK-897-3292）	385.7
血友病 A（GK-895-3332）	450.1
血友病 A（GK-894-3414）	349.0
血友病 A（GK-899-3394）	434.9
インヒビター保有血友病 A（GK-1838-3068）176 BU	380.5
血友病 B（GK-929-3407）	471.4

Table 1.　dPT 法で測定したヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの EC_{50} 値

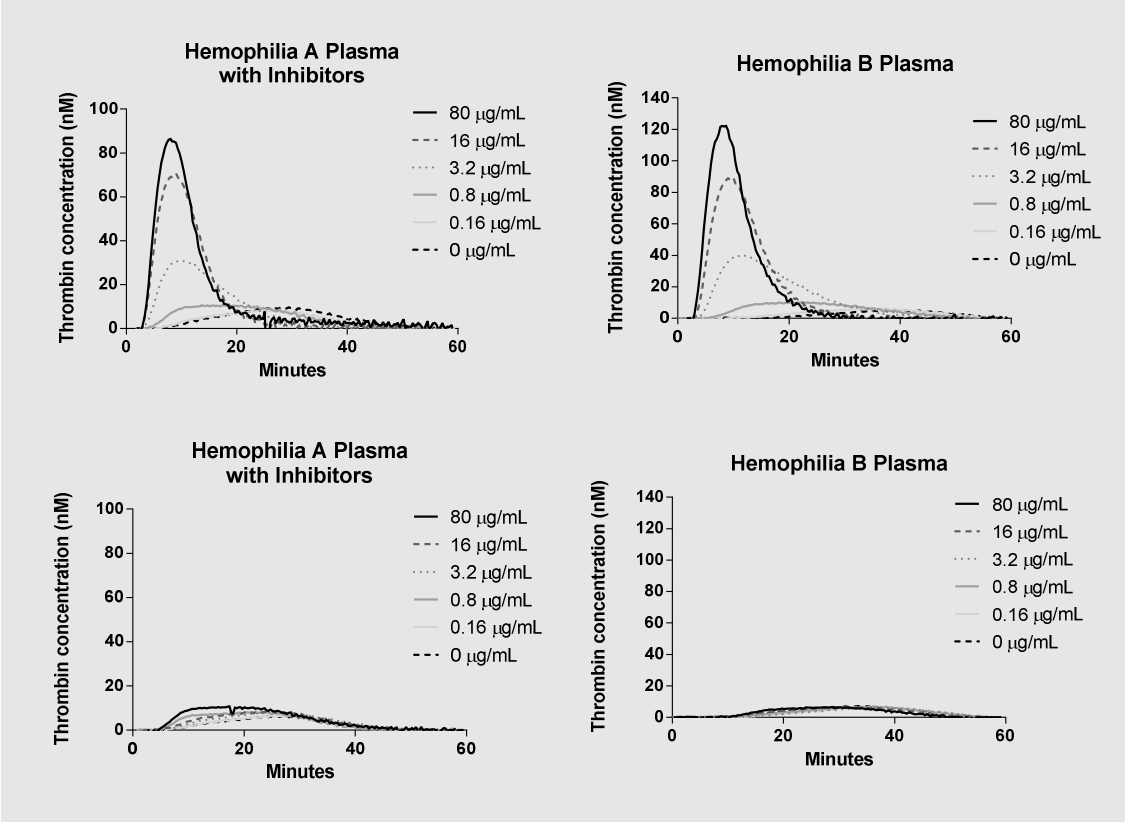
血漿	マルスタシマブ dPT EC_{50} (ng/mL)

ヒト血友病血漿（凝固因子活性が 1%未満）にマルスタシマブを各濃度で添加し，dPT 法を用いて活性を測定した。

マルスタシマブの内因系経路に対する効果を，aPTT 法を用いて検討した（PF-06741086_[redacted]_135025 試験）。血漿にマルスタシマブ （0.8～56,000 ng/mL）を添加したところ，高濃度でわずかな aPTT 短縮（IgG1 添加時と比較して 2.3～18 秒の短縮）が認められたが，凝固時間は依然として正常範囲（30～40 秒）[19]から大きく乖離していた（マルスタシマブを 56,000 ng/mL 添加時の aPTT 値は 69.5～110.6 秒）。aPTT 法でマルスタシマブの効果がみられなかったことは，マルスタシマブの機序と一致している。

2 つの主要な凝固経路（内因系および外因系経路）は最終的に FX を活性化し，これによりトロンビンが生成される。安定化血栓が形成されるためには，フィブリノゲンをフィブリンに変換するトロンビンの十分な生成量が必要であるが，血液凝固因子の欠乏（血友病 A では FVIII，血友病 B では FIX）により，このトロンビン生成が妨げられる。マルスタシマブが乏血小板血漿のトロンビン生成を回復させる作用を TGA により評価した（PF-06741086_[redacted]_135025 試験）。高力価インヒビター保有患者を含む血友病 A 患者 5 例および血友病 B 患者 1 例から採取した血漿にマルスタシマブを添加したところ，いずれの血漿でもトロンビン生成が濃度依存的に回復し，最大トロンビン生成量の増加および生成開始までの時間の短縮が認められた（Figure 7）。マルスタシマブによりトロンビン生成が回復したことから，血友病血漿に対するマルスタシマブの止血作用が示された。

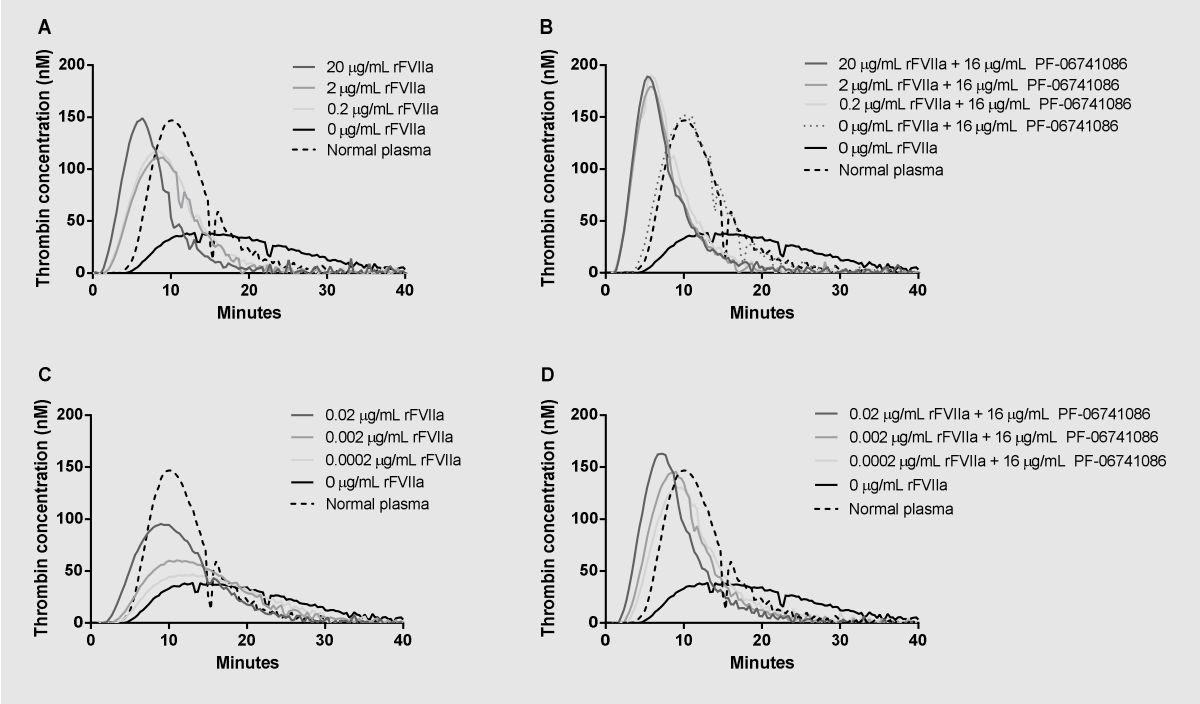
Figure 7.　インヒビター保有血友病 A 血漿および血友病 B 血漿を用いたマルスタシマブのトロンビン生成試験



インヒビター（176 BU）を保有する重症血友病 A のクエン酸加乏血小板血漿および重症血友病 B のクエン酸加乏血小板血漿にマルスタシマブまたは対照物質の IgG1 を各濃度で添加した。TF（1 pmol/L）およびリン脂質（4 µmol/L）の存在下でトロンビン生成が開始した。血漿にマルスタシマブを添加したところ，トロンビン生成量が濃度依存的に増加した（上図）が，対照物質の IgG1 を同濃度で添加したときに効果は認められなかった（下図）。

現在のインヒビター保有患者の治療法は，rFVIIa などの市販中のバイパス製剤によるものである。各濃度の rFVIIa（ノボセブン®，0.0002～20 µg/mL）存在下で，マルスタシマブ（16 µg/mL）のトロンビン生成に対する影響について，重症血友病 A 血漿を用いて評価した（PF-06741086_[redacted]_135025 試験）。血友病血漿に rFVIIa を添加したときのトロンビン生成量は，溶媒対照と比較して濃度依存的に増加した（Figure 8）。rFVIIa とマルスタシマブを併用で添加したとき，rFVIIa 単独添加時と比較して最大トロンビン生成量の増加および生成開始までの時間の短縮が認められ，トロンビン生成が促進された。マルスタシマブと rFVIIa（0.2，2 および 20 µg/mL）を併用したときの TGA プロファイルは類似していた（Figure 8）。マルスタシマブと rFVIIa を併用したときの血漿中のトロンビン生成量は，rFVIIa 濃度にかかわらず正常値まで増加した。

Figure 8.　重症血友病 A 血漿を用いたマルスタシマブと rFVIIa の併用によるトロンビン生成試験



rFVIIa 存在下でのマルスタシマブ（PF-06741086）の影響を TGA を用いて評価した。重症血友病血漿に rFVIIa を 0.2～20 µg/mL（A および B）または 0.02～0.0002 µg/mL（C および D）の濃度で添加した。対照は，溶媒（rFVIIa 0 µg/mL）および正常血漿とした。rFVIIa 存在下で血漿に 16 µg/mL（16,000 ng/mL）のマルスタシマブを添加したときのトロンビン生成量を測定した（B および D）。すべての反応は TF（1 pmol/L）およびリン脂質（4 µmol/L）の存在下で測定した。

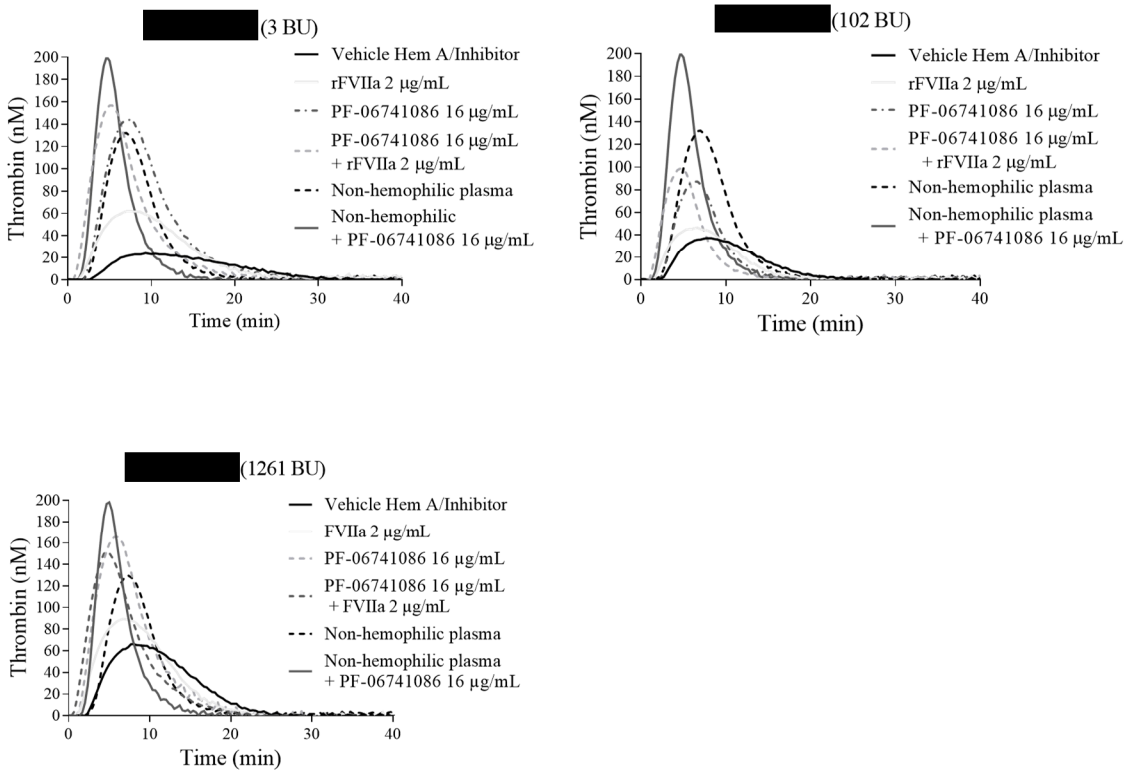
別の試験（PF-06741086_[redacted]_122443 試験）では，異なる血友病 A 患者（インヒビター保有患者を含む）および血友病 B 患者から採取した血漿を用いて，トロンビン生成におけるマルスタシマブ（16 µg/mL）の TFPI 阻害活性を rFVIIa（2 µg/mL）の存在下および非存在下で評価した（Table 2）。凝固因子活性は，いずれのドナーでも 1%未満であった。これらの試験で用いた rFVIIa 濃度（2 µg/mL）は，rFVIIa 投与後の血漿中濃度に相当し[20]，血友病 A 血漿に 0.2，2 または 20 µg/mL の rFVIIa を添加したときのトロンビン生成反応が同程度であったことから設定した（Figure 8）。マルスタシマブ濃度は，ヒトに 300 mg を単回皮下投与したときのおおよその C_{max} に相当する 16,000 ng/mL（16 µg/mL）とした。トロンビン生成に対するマルスタシマブの作用を，十分な凝固因子活性を有する非血友病血漿でも測定した。血友病 A および血友病 B の血漿にマルスタシマブを単独または rFVIIa と併用で添加したところ，rFVIIa 単独と比較して最大トロンビン生成量の増加および生成開始までの時間の短縮が認められ，トロンビン生成が促進された。インヒビター保有（3～1261 BU）血友病血漿では，マルスタシマブ単独でもトロンビン生成が促進された。マルスタシマブと rFVIIa の併用では，最大トロンビン生成量に対するわずかな相加作用が認められた（Figure 8，Figure 9 および Table 2）。マルスタシマブ単独または rFVIIa との併用で得られた中程度の最大トロンビン生成量は，非血友病血漿と同程度であり，マルスタシマブを添加した非血友病血漿を下回った。

Table 2.　最大トロンビン生成量（nmol/L）

群	溶媒	rFVIIa (2 µg/mL)	マルスタシマブ (16 µg/mL)	マルスタシマブ (16 µg/mL) rFVIIa (2 µg/mL)	非血友病血漿	非血友病血漿 + マルスタシマブ（16 µg/mL）
血友病 A（n = 6）	26–76	45–113	82–172	102–178	128–135	198 (n = 1)
インヒビター保有血友病 A（n = 3）	24–66	46–89	88–166	99–157	130–132	198–199
血友病 B（n = 1）	81	131	174	167	143	171

トロンビン生成量は TF（1 pmol/L）およびリン脂質（4 µmol/L）の存在下で測定した。
各血漿の最大トロンビン生成量の範囲を示す。
rFVIIa はノボセブン®，溶媒は 50% PBS/50% HEPES 緩衝液を使用した。
非血友病血漿および非血友病血漿＋マルスタシマブ：血友病患者から採取した各血漿についてトロンビン生成量を評価する際に，対照として非血友病血漿および非血友病血漿＋マルスタシマブについて評価した。血友病 A 患者の血漿（n=6）の評価では，対照として非血友病血漿＋マルスタシマブを評価したのは 1 例であった。

Figure 9.　非血友病血漿およびインヒビター保有重症血友病 A 血漿（ロット番号：[redacted]，[redacted]，[redacted]）を用いてマルスタシマブおよびマルスタシマブ ＋ rFVIIa を評価したトロンビン生成試験）



Hem A/Inhibitor：インヒビター保有血友病 A 血漿（インヒビター力価はそれぞれ 3BU，102 BU および 1261 BU）
トロンビン生成量は TF（1 pmol/L）およびリン脂質（4 µmol/L）存在下で測定した。トロンボグラムによる各血漿の測定結果を示す。インヒビター保有血友病血漿にマルスタシマブ（PF-06741086）（16 µg/mL），rFVIIa（2 µg/mL，ノボセブン®），溶媒（50% PBS/50% HEPES 緩衝液）またはマルスタシマブ（16 µg/mL）＋rFVIIa（2 µg/mL）を添加した。非血友病血漿のみの場合と非血友病血漿 ＋ マルスタシマブ（16 µg/mL）の 2 種類でのトロンビン生成量を測定した。

2.1.1.7. 活性化プロトロンビン複合体製剤と併用したときのヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの活性

インヒビター保有血友病 A 血漿および血友病 B 血漿（FIX 中和抗体をスパイクした血漿）を用いて，マルスタシマブと aPCC（ファイバ®）を併用したときの相加作用を TGA により in vitro で評価した（PF-06741086_[redacted]_045123 試験）。0.063，0.125，0.5 もしくは 1 U/mL のファイバ®または 0.5，1，2，4，8 もしくは 16 µg/mL（500～16,000 ng/mL）のマルスタシマブを単独で添加したところ，いずれの血友病血漿でも最大トロンビン生成量は濃度依存的に増加した。マルスタシマブの添加により，いずれのインヒビター保有血友病血漿でもトロンビン生成パラメータが改善した。

併用試験では，単独試験で用いた最高濃度のファイバ®（1 U/mL，ヒトに投与したときの血漿中濃度に相当）およびマルスタシマブ（最高 16 µg/mL，300 mg を単回皮下投与したときのおおよその C_{max} に相当）を選択した。TGA の結果，マルスタシマブ（16 µg/mL）およびファイバ®（1 U/mL）はいずれもトロンビンの生成開始までの時間を短縮させたが，併用では生成開始までの時間に対する相加作用は認められなかった（Table 3）。また，ファイバ®（1 U/mL）とマルスタシマブ（0.5 µg/mL）を併用したところ，すべての血友病血漿で最大トロンビン生成量の増加に対する相加作用が認められた。ファイバ®（1 U/mL）と 0.5 µg/mL 以上の濃度のマルスタシマブ（0.5，1，2，4，8 および 16 µg/mL）との併用で最大トロンビン生成量は頭打ちとなった。血友病血漿にマルスタシマブを単独またはファイバ®と併用で添加した結果，最大トロンビン生成量の増加を含むトロンビン生成の促進が認められ，各被験物質の単独添加時より併用時でさらに改善し，それは非血友病の正常血漿を用いた試験で報告されている結果の範囲内であった[21]。マルスタシマブによるトロンビン生成反応はインヒビター保有血友病 A および血友病 B の血漿で同程度であった。

Table 3.　トロンビン生成開始までの時間（分）

	溶媒	非血友病血漿	ファイバ®（1 U/mL）	非血友病血漿＋マルスタシマブ（16 µg/mL）	マルスタシマブ（16 µg/mL）	ファイバ®（1 U/mL）＋マルスタシマブ（16 µg/mL）
インヒビター保有血友病 A（n=4, 88 – 160 BU）	3.5 – 5.18	4 – 4.85	2.17 – 2.51	3 – 3.51	3.67 – 4.35	2 – 2.34
インヒビター保有血友病 B（n=1, 14BU）	4.67	4	2.17	3	3.83	2.17

トロンビン生成量は TF（1 pmol/L）およびリン脂質（4 µmol/L）の存在下で測定した。
各血漿のトロンビン生成開始までの時間の範囲を示す。
溶媒は 50% PBS/50%ファイバ®希釈液（13.6 mmol/L 三ナトリウムチトラート 二水和物および 136.9 mmol/L の NaCl を含む pH 7.4 の溶液）を使用した。
非血友病血漿および非血友病血漿＋マルスタシマブ（16 µg/mL）：血友病患者から採取した各血漿についてトロンビン生成開始までの時間を評価する際に，対照として非血友病血漿および非血友病血漿＋マルスタシマブについて評価した。

2.1.1.8. トロンビン生成試験においてバイクロット®と併用したときのヒト血友病血漿に対するマルスタシマブの活性評価

インヒビター保有血友病 A および血友病 B（FIX 中和抗体をスパイクした血漿）の乏血小板血友病血漿を用いて，マルスタシマブとバイクロット®を併用した際の相加作用を TGA により評価した（PF-06741086_[redacted]_103228 試験）。血友病血漿において，マルスタシマブおよびバイクロット®のそれぞれの単独処理によりトロンビン生成開始までの時間の短縮がみられたが，マルスタシマブ（16 µg/mL）およびバイクロット®（FVIIa/ FX 比：2/20，1/10 または 0.5/5 µg/mL）を併用した際に，生成開始までの時間に相加的な短縮はみられなかった。また，マルスタシマブおよびバイクロット®を併用した際，単独で処理した場合と比較して最大トロン

ビン濃度の増加を含むトロンビン生成量の増加がみられ，その程度は非血友病の正常血漿を用いた試験で報告されている結果の範囲内であった[21]。

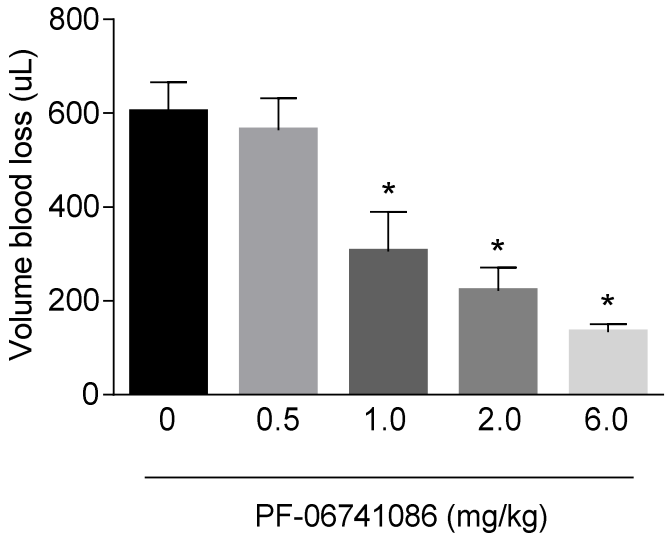
2.1.2. In vivo 薬理試験

2.1.2.1. 血友病マウスモデルに対するマルスタシマブの活性

雄の血友病 A（FVIII 欠損）および血友病 B（FIX 欠損）マウス（5 匹/群）を用いた，重度の尾部出血マウスモデルによりマルスタシマブの止血作用を評価した（PF-06741086_[redacted]_135244 試験）。この尾部出血マウスモデルでは，尾部のごく一部（3 mm）の切断により多量出血する。雄の血友病 A マウスに 0（溶媒），0.5，1，2 または 6 mg/kg，雄の血友病 B マウスに 6 mg/kg のマルスタシマブを出血の 30 分前に単回静脈内投与し，定期補充療法を再現した。血友病 A マウスに各用量のマルスタシマブを投与したときの出血量は用量依存的に減少し，溶媒対照群と比較してそれぞれ 6.1%（0.5 mg/kg），51%（1 mg/kg），63.2%（2 mg/kg）および 77.7%（6 mg/kg）減少した（Figure 10）。血友病 B マウスにマルスタシマブ（6 mg/kg）を投与したときの出血量も，溶媒対照群と比較して減少した（74%）。

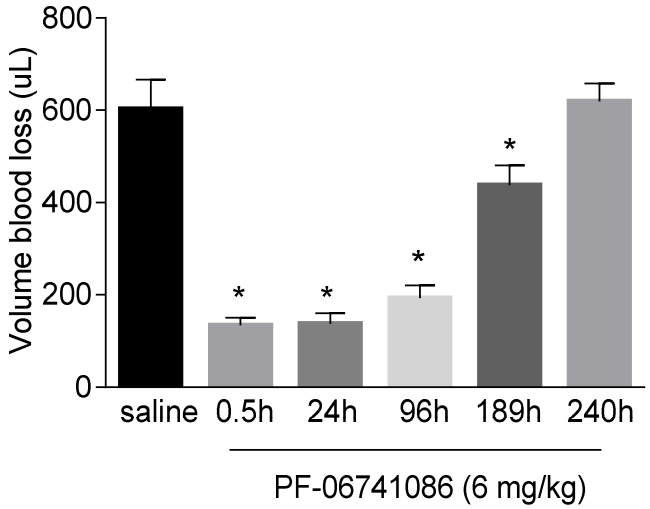
雄の血友病 A マウス（5 匹/群）を用いて，重度の尾部出血に対するマルスタシマブの出血抑制作用の持続時間を測定した（PF-06741086_[redacted]_135244 試験）。マウスの尾部切断前の規定された時点に，固定用量のマルスタシマブ（6 mg/kg）または溶媒を静脈内投与した（Figure 11）。作用の持続時間は，溶媒対照群と比較して出血量が減少した時間と定義した。マルスタシマブの投与後 0.5 時間の出血量は溶媒対照群と比較して減少し（77.9%），出血後の抑制作用は投与後 189 時間持続した（27.3%）。出血量は投与 240 時間後に溶媒対照群と同程度となった。

Figure 10.　血友病 A の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの用量依存的な作用



*p < 0.05：分散分析後の Dunnett 多重比較検定
血友病 A マウスの 3 mm 尾部切断の 30 分前にマルスタシマブ（PF-06741086）（図中の投与量）を静脈内投与した。尾部切断後に出血量（µL）を測定した。対照群（0）の血友病 A マウスには溶媒を投与した。動物数は 5 匹/群。図中の棒は平均値 ± SE を示す。

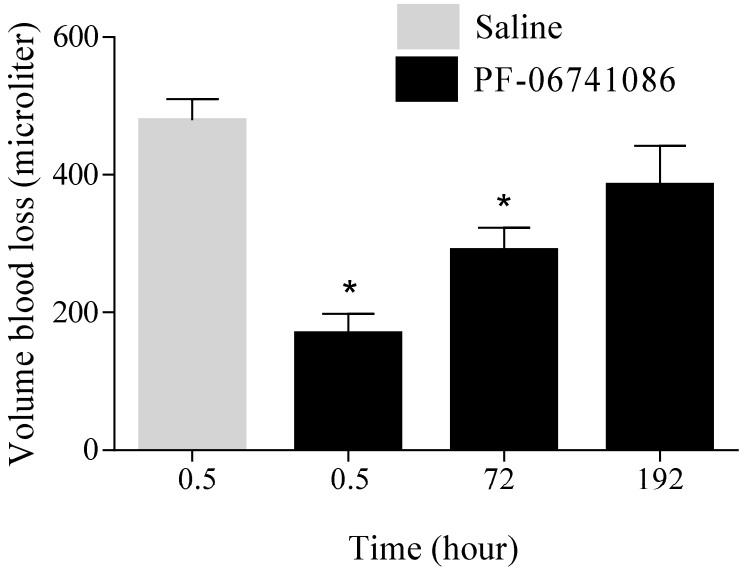
Figure 11.　血友病 A の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの作用持続時間



*p < 0.05：分散分析後の Dunnett 多重比較検定
血友病 A マウスの 3 mm 尾部切断前の規定時点に，マルスタシマブ（PF-06741086）を 6 mg/kg 静脈内投与した。尾部切断後に出血量（µL）を測定した。対照群の血友病 A マウスには生理食塩液を投与した。動物数は 5 匹/群。図中の棒は平均値 ± SE を示す。

雄の血友病 B マウス（5 匹/群）を用いて，重度の尾部出血に対するマルスタシマブの出血抑制作用の持続時間を測定した（PF-06741086_[redacted]_121321 試験）。マウスの尾部（3 mm）切断前の規定時点に，固定用量のマルスタシマブ（6 mg/kg）または溶媒を静脈内投与した。マルスタシマブの投与後 0.5 時間の出血量は溶媒対照群と比較して減少し（65%，Figure 12），出血後の抑制作用は投与後 72 時間以上持続した。投与後 192 時間の出血量について，溶媒対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

Figure 12.　血友病 B の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの作用持続期間



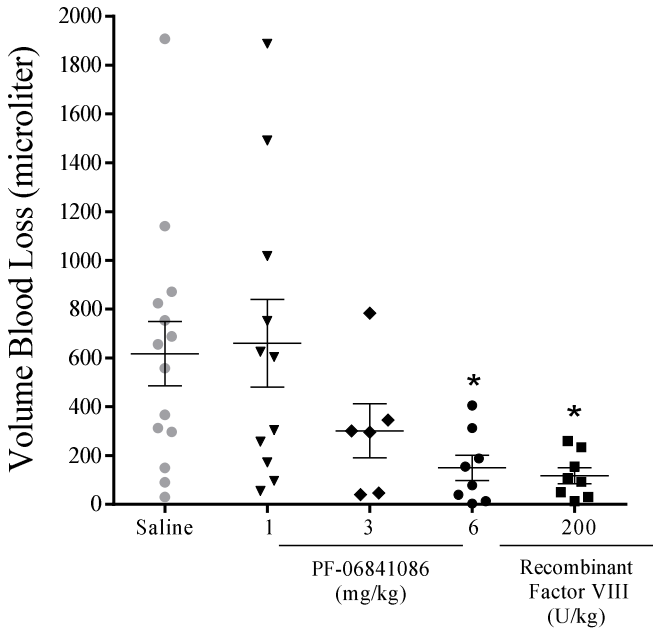
*p < 0.05，分散分析後の Dunnett 多重比較検定
血友病 B マウスにマルスタシマブ（PF-06741086）（6 mg/kg）を静脈内投与後，規定時点に尾部を切断した。尾部切断後の総出血量を測定した。対照群の血友病 B マウスには生理食塩液を投与した。動物数は 5 匹/群。図中の棒は平均値 ± SE を示す。

生体顕微鏡検査イメージングを用いることで，血管壁をレーザーで傷害することにより開始されるレーザー誘導血管傷害血栓形成（精巣挙筋微小血管レーザー傷害）マウスモデルの微小循環でも，マルスタシマブ投与による止血作用が認められた。レーザー照射で血管傷害を誘発することで，止血における血液凝固過程の最終生成物である血栓が形成される。雄の血友病 A マウス（3 匹/群）へのマルスタシマブ（6 mg/kg，レーザー照射後 0.5 時間および 168 時間に評価するそれぞれの群），rFVIII（200 IU/kg）または生理食塩液（溶媒）の静脈内投与後 0.5 時間にレーザー照射し，照射後 0.5 時間または 168 時間（マルスタシマブのみ）から 90 分間，血小板抗原およびフィブリンに対する蛍光標識抗体を用いてフィブリン沈着および血小板蓄積のリアルタイム画像および定量的測定値を評価した（PF-06741086_[redacted]_135244 試験）。マルスタシマブ群で傷害部位（精巣挙筋の細動脈内皮，7～12 カ所/匹）の血小板蓄積量およびフィブリン沈着量が増加し，止血作用は投与後 168 時間まで持続した。マルスタシマブ群の照射後 0.5 時間のフィブリン沈着量および血小板蓄積量は，rFVIII 群の血友病 A マウスと同程度であった。

出血時補充療法モデルとして，重度の出血を誘発した血友病 A マウスに対するマルスタシマブの止血促進作用を評価した（PF-06741086_[redacted]_121321 試験）。マウス（5～11 匹/群）の 3 mm 尾部切断による出血開始直後にマルスタシマブ（6 mg/kg），rFVIII（200 U/mg）または溶媒を投与した。溶媒対照群と比較して，マルスタシマブ群（60%）および rFVIII 群（84%）で出血量が減少した。また，マウス（5～13 匹/群）の 3 mm 尾部切断による活動性出血開始 2 分後にマルスタシマブ（1，3 または 6 mg/kg），rFVIII（200 U/mg）または溶媒を投与した。溶媒対照群と比較して，マルスタシマブの 3 mg/kg 群（51%）および 6 mg/kg 群（76%）で出血量が用

量依存的に減少した（Figure 13）。rFVIII 群でも溶媒対照群と比較して出血量が減少した（81%）。出血開始 2 分後の止血作用は，マルスタシマブ群（6 mg/kg）と rFVIII 群で同程度であった。いずれの試験でも，急性出血後のマルスタシマブ投与により出血量が減少した。

Figure 13.　血友病 A の尾部出血マウスモデルの出血開始 2 分後にマルスタシマブを投与したときの出血量に対するマルスタシマブの作用



*p < 0.05，Mann-Whitney 検定
血友病 A マウスの 3 mm 尾部切断による出血開始 2 分後にマルスタシマブ（PF-06741086）（1，3 または 6 mg/kg）または rFVIII（200 U/kg）を投与した。血液を 10 分間採取し，総出血量を測定した。対照群の血友病 A マウスには生理食塩液を投与した。動物数は 5～13 匹/群。すべての測定値は平均値 ± SE で示す。

血友病 A の精巣挙筋微小血管レーザー傷害マウスモデル（18 匹/群）を用いて，血管傷害誘発後におけるマルスタシマブの止血作用を評価した（PF-06741086_[redacted]_121321 試験）。各個体で傷害を誘発後，マルスタシマブを投与せずに血小板蓄積量およびフィブリン沈着量を血小板抗原およびフィブリンに対する蛍光標識抗体を用いて測定した。同個体に 2 回目のレーザー照射を行い，その直後に 6 mg/kg のマルスタシマブを単回静脈内投与し，傷害データとして，血小板蓄積およびフィブリン沈着を測定した。レーザー照射で出血させた血友病 A マウスにマルスタシマブを投与したときの傷害部位における血小板蓄積およびフィブリン沈着は，未処置群と比較してそれぞれ 1.8 倍および 6 倍増加した。

2.1.2.2. In vivo 併用投与試験

ラットを用いたマルスタシマブとノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®との併用投与による薬効評価試験を実施し，薬理作用の相加効果について検討した。ラットはマルスタシマブの毒性プロファイルを検討した動物種であり薬理学的にも適切な動物種であることから，併用

投与による薬理作用についてもラットを用いて検討した。これらの併用投与試験は日本，米国または欧州規制当局との相談を基に実施された[a]。

2.1.2.2.1. 雄 Wistar Han ラットを用いたマルスタシマブおよびノボセブン®の 10 日間静脈内投与試験

マルスタシマブおよびノボセブン®（rFVIIa）を併用で静脈内投与した際の効果を検討するために，雄 Wistar Han ラット（各群 5 匹）にマルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 50 mg/kg を 1 日 1 回）およびノボセブン®［試験 8 日～10 日に 3 mg/kg（1 日 1 回）または 0.8 mg/kg（0.4 mg/kg を 1 日 2 回）］を併用投与した（[redacted]MA086 試験）。また，マルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 50 mg/kg を 1 日 1 回）またはノボセブン®［試験 8 日～10 日に 0.4，1 または 3 mg/kg（1 日 1 回）または 0.8 mg/kg（0.4 mg/kg を 1 日 2 回）］を単独投与した。

マルスタシマブおよびノボセブン®（3 mg/kg）を反復併用投与したところ，肺および投与部位（尾部）での急性血栓・塞栓の発現頻度が増加し，重症度が悪化した。マルスタシマブおよびノボセブン®の曝露量は，それぞれ併用投与による影響を受けなかった。

試験 8 日にマルスタシマブ（50 mg/kg）およびノボセブン®（3 mg/kg）の併用投与の PK サテライト群の 1 例において，被験物質投与と関連する瀕死状態がみられたため安楽殺した。この 1 例は，試験 8 日にノボセブン®の初回投与後 2 時間以内に両後肢の麻痺がみられたことから安楽殺した。この個体では，複数の組織（肺，心臓，腎臓，投与部位および両腸骨動脈）で軽微から軽度の急性血栓・塞栓を示す病理組織学的所見が認められた。両腸骨動脈の血栓・塞栓は一般状態の変化である両後肢麻痺との関連が，また，腎臓の血栓・塞栓は軽微かつ多巣性の尿細管上皮の変性・壊死との関連がみられた。複数の組織で急性血栓・塞栓が認められたことは，2 つの被験物質の薬理作用と一致している。しかし，この個体では回腸と盲腸の粘膜に血栓・塞栓と関連のない原因不明のびらんも認められ，この所見が過剰な血液凝固の一因となった可能性がある。その他の全例は計画剖検時まで生存した。

ラットにマルスタシマブ（50 mg/kg）およびノボセブン®（3 mg/kg）を反復併用投与したところ，溶媒対照群と比較して肺および投与部位（尾部）での急性血栓・塞栓の発現頻度が増加し，重症度が悪化した。同用量の被験物質をそれぞれ単独投与またはマルスタシマブ（50 mg/kg）とノボセブン®［0.8 mg/kg（0.4 mg/kg BID）］を併用投与した際には，これらの所見が同程度の発現頻度または重症度で認められなかった。血栓・塞栓は軽微から軽度であり，二次的な組織損傷を示す病理組織学的所見や一般状態への影響は認められなかった。血栓・塞栓を示す病理組織学的所見の増加はマルスタシマブおよびノボセブン®の薬理作用と一致している。

---

[a] ノボセブン®：FDA Written Response dated [redacted] 20[redacted]（M4.3.1），FDA response to Pfizer [redacted] dated [redacted] 20[redacted]（M4.3.2），PF-06741086 [redacted]，[redacted]，[redacted] 20[redacted]（PF-06741086_[redacted]-1-20[redacted]）（M4.3.3），ファイバ®：[redacted] Meeting Written Responses [redacted] 20[redacted]（M4.3.4），PF-06741086 [redacted]，[redacted]，[redacted] 20[redacted]（PF-06741086_[redacted]-3-20[redacted]-[redacted]）（M4.3.5），バイクロット®：医薬品[redacted]相談記録（実施日：平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日）（M1.13）

ノボセブン®を投与したすべての群（単独投与またはマルスタシマブとの併用投与）において，病理組織学的所見に加えて被験物質に関連する PT の短縮が認められた（各溶媒対照群の平均値の 0.47～0.51 倍）。この所見はノボセブン®の薬理作用と一致しており，マルスタシマブの併用による顕著な程度の変化はなかった。

ノボセブン®［0.8 mg/kg（0.4 mg/kg BID）］群ならびにマルスタシマブ（50 mg/kg）およびノボセブン®［0.8 mg/kg（0.4 mg/kg BID）］の併用群を除くすべての投与群で，被験物質に関連するグルコース値のわずかな上昇が認められた（各溶媒対照群の平均値の 1.17～1.28 倍）。この所見はいずれの被験物質の薬理作用とも関連しないものの，急性のストレスが一過性のグルコース上昇の一因となった可能性がある。

マルスタシマブの単独投与とノボセブン®との併用投与で，試験 8 日のマルスタシマブの曝露量（C_{max} および AUC_t）に意味のある差は認められなかった。マルスタシマブ単独投与における T_{max}（0.083 時間）はノボセブン®との併用投与により遅れ（併用投与時の T_{max}=1 時間）がみられた。

ノボセブン®の曝露量（C_{max} および AUC_t）は投与量の増加に伴い増加し，試験 10 日には 1 mg/kg 群および 3 mg/kg 群で蓄積が認められたが，0.4 mg/kg/日群では認められなかった。3 mg/kg 群のノボセブン®の T_{max}，C_{max} および AUC_t はマルスタシマブ併用投与時と同程度であったため，マルスタシマブはノボセブン®の PK に影響を及ぼさなかった。0.8 mg/kg/日（0.4 mg/kg BID）群のノボセブン®の C_0 値（外挿値）は，マルスタシマブ併用の有無にかかわらず，試験 8 日から試験 10 日にかけて低下した。

2.1.2.2.2. 雄 Wistar Han ラットを用いたマルスタシマブおよびファイバ®の 10 日間皮下投与（QW）および 3 日間静脈内投与（BID）試験

マルスタシマブおよびファイバ®を併用投与した際の効果を検討するために，雄 Wistar Han ラット（各群 5 匹）にマルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg/日を 1 日 1 回皮下投与）およびファイバ®［試験 8 日～10 日に 10 U/kg/日（5 U/kg BID），50 U/kg/日（25 U/kg BID）または 100 U/kg/日（50 U/kg BID）を静脈内投与］を併用投与した。また，マルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg を 1 日 1 回皮下投与）またはファイバ®［試験 8 日～10 日に 10 U/kg/日（5 U/kg BID），50 U/kg/日（25 U/kg BID）または 100 U/kg/日（50 U/kg BID）を静脈内投与］を単独投与した（[redacted]GR258 試験）。

マルスタシマブおよびファイバ®の併用投与ではファイバ®単独投与時と比較してトロンビンの生成指標であるトロンビン・アンチトロンビン複合体（TAT）濃度および平均血小板容積の増加がみられたが，一般状態，臨床病理的変化ならびに剖検および病理組織学的所見はファイバ®単独投与時と同様な変化であった。マルスタシマブの曝露量はファイバの併用投与により影響を受けなかった。

マルスタシマブ（30 mg/kg/日）とファイバ®［10（5 BID）U/kg/日以上］を併用投与したところ，試験 10 日に被験物質に関連する用量依存的な TAT 濃度の上昇（各溶媒対照群の平均値の 2.30～10.84 倍，以降同様），平均血小板容積の増加（1.05～1.11 倍），aPTT の延長（1.07～1.34 倍）および PT の短縮（0.92～0.72 倍）が認められた。TAT 濃度は，ファイバ®単独投与時

（1.55～4.53 倍）と比較して，すべてのファイバ®用量でマルスタシマブの併用（2.30～10.84 倍）により増加した。

マルスタシマブとファイバ®100（50 BID）U/kg/日の併用投与では，凝固パラメータの変化（PT の短縮および TAT 濃度の増加）と相関して，一般状態の変化として尾部の変色（1/5 例），剖検所見として色調異常（尾部，2/5 例）ならびに静脈内注射部位（尾部）および尾部の血栓・塞栓（急性，軽微から軽度）の発現頻度の増加および重症度の悪化，それに伴う尾部の浮腫（軽度），出血（軽微から軽度），うっ血（軽度），表皮変性（軽度）および混合性細胞浸潤（軽度）が認められた。

マルスタシマブを単独皮下投与したとき，トロンビン生成の指標である TAT 濃度の上昇（2.06 倍）が認められたが，被験物質に関連する一般状態の変化または剖検もしくは病理組織学的所見は認められなかった。

ファイバ®の単独静脈内投与では， 10（5 BID）U/kg/日以上で被験物質に関連する用量依存的な TAT 濃度の上昇（1.55～4.53 倍），50（25 BID）U/kg/日以上で aPTT の延長（1.26～1.33 倍），10（5 BID）U/kg/日以上で用量依存的な PT の短縮（0.91～0.73 倍）が認められた。また，100（50 BID）U/kg/日で好中球，単球およびアラニンアミノトランスフェラーゼの増加（1.71～2.23 倍）が認められた。

ファイバ®100（50 BID）U/kg/日の単独投与では，PT の短縮および TAT 濃度の上昇と相関して，一般状態の変化として尾部の変色（2/5 例），剖検所見として静脈内注射部位（尾部）または尾部の色調異常（2/5 例，出血と相関）ならびに肺，静脈内注射部位（尾部）および尾部の血栓・塞栓（急性，軽微から軽度）の発現頻度の増加および重症度の悪化，それに伴う静脈内注射部位（尾部）または尾部の浮腫（軽度），出血（軽度）および混合性細胞浸潤（軽度）が認められた。臨床病理検査，剖検および病理組織学的検査における同様な所見が，ラットを用いたファイバ®の 3 日間静脈内投与試験においても認められた（2.4.4.7.8.2 項）。

試験 8 日にマルスタシマブを単独またはファイバ®と併用で投与したところ，マルスタシマブの曝露量（AUC_{48}）はいずれの投与群でも同程度であった。AUC_{48} 値に基づく試験 1 日および 8 日のマルスタシマブの累積係数（試験 8 日の AUC_{48}/試験 1 日の AUC_{48}）は，いずれの投与群でも 1.8～2.1 の範囲であった。

2.1.2.2.3. 雄 Wistar Han ラットを用いたマルスタシマブおよびバイクロット®の 10 日間皮下投与（QW）および 3 日間静脈内投与（BID）試験

マルスタシマブおよびバイクロット®を併用投与した際の効果を検討するために，雄 Wistar Han ラット（各群 5 匹）にマルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg/日を 1 日 1 回皮下投与）およびバイクロット®［試験 8 日に 60 µg/kg/日，120 µg/kg/日（60 µg/kg BID）または 180 µg/kg/日（120/60 µg/kg BID）を，試験 10 日に 60 µg/kg/日，120 µg/kg/日または 120 µg/kg/日を静脈内投与］を併用投与した（[redacted]GR075 試験）。また，マルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg を 1 日 1 回皮下投与）およびバイクロット®［試験 8 日に 60 µg/kg/日，120 µg/kg/日（60 µg/kg BID）または 180 µg/kg/日（120/60 µg/kg BID）を，試験 10 日に 60 µg/kg/日，120 µg/kg/日または 120 µg/kg/日を静脈内投与］を単独投与した。

マルスタシマブおよびバイクロット®の併用投与により，PT，aPTT および TAT といった凝固パラメータの変化が認められ，これらの変化はバイクロット®単独を投与した際の変化と同様であった。マルスタシマブの曝露量はバイクロット®の併用投与により影響を受けなかった。

マルスタシマブおよびバイクロット®を併用投与した全ての用量群において，被験物質投与に関連する PT の短縮（0.50～0.52 倍，対照群の平均値と比較，以降同様），aPTT 延長（1.44～1.46 倍）および TAT 濃度の上昇（1.41～1.89 倍）がみられた。

被験物質投与に関連する PT の短縮（0.45～0.50 倍）および aPTT 延長（1.35～1.51 倍）がバイクロット®単独投与のすべての用量群でもみられた。

マルスタシマブ単独投与群では，被験物質投与に関連する影響はみられなかった。

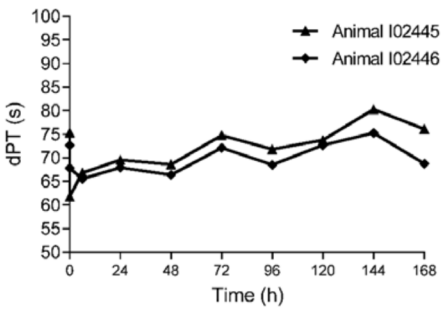
また，すべての投与群で，被験物質投与に関連する一般状態，摂餌量，血液学的検査（凝固検査を除く），血液生化学的検査，剖検または病理組織学的所見への影響はみられなかった。

2.1.2.3. サルを用いたマルスタシマブの静脈内または皮下投与試験

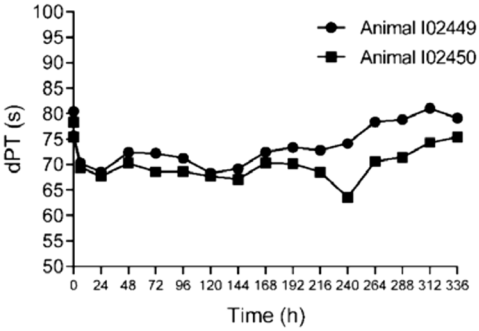
雄カニクイザル（各群 2 匹）にマルスタシマブを静脈内（1 mg/kg）または皮下（3 または 10 mg/kg）に単回投与後の血漿中における希釈プロトロンビン時間（dPT）を指標として薬効を評価した（8299672 試験）。マルスタシマブの投与前および投与後の複数の時点で各個体について dPT を秒単位で測定した。マルスタシマブを投与したすべての群の動物で，投与前の dPT のベースライン値と比較して dPT の短縮がみられた。マルスタシマブ 3 mg/kg を皮下投与した動物では，dPT がベースライン値と比較して，投与 24 時間後まで漸減し，その後，投与 240 時間後まで維持された（Figure 14B）。マルスタシマブ 1 mg/kg を静脈内投与した動物では，投与 5 分後で dPT が短縮し，その後，投与 72～96 時間後にベースライン値まで回復した（Figure 14A）。マルスタシマブ 10 mg/kg を皮下投与した動物では，投与後の限定された時点のサンプルについて評価し，投与 24 時間後では，dPT は 107.7 および 106.8 秒からそれぞれ 92.7 および 92.0 秒に短縮された。

Figure 14.　サルにマルスタシマブを皮下投与した際の dPT 凝固時間に対する時間依存的な影響

A.



B.



マルスタシマブ投与前および投与後の各個体における dPT 凝固時間（秒）（A：1 mg/kg 静脈内投与，B：3 mg/kg 皮下投与）

マルスタシマブはサルにおいて dPT を短縮し，その作用が投与 24 時間後から 240 時間後まで継続する薬力学的作用を示した。

2.2. 副次的薬理試験

マルスタシマブの副次的薬理試験は実施していない。マルスタシマブは標的分子である TFPI に対して，マウス，ラット，ウサギ，サルおよびヒトを含む複数の動物種において数 nmol/L 以下の結合親和性を有するモノクローナル抗体である。組織交差反応性試験（M2.6.6.8.8.1）の結果から，マルスタシマブではオフターゲットの影響は予測されない。

2.3. 安全性薬理試験

マルスタシマブの独立した安全性薬理試験は実施していないが，ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22]に従い，サルを用いた GLP 適用の反復投与毒性試験に安全性薬理試験の評価項目を組み込んで評価した（20062114 試験）。

雌雄カニクイザルにマルスタシマブを週 1 回 13 週間，静脈内投与（0，30，90 および 500 mg/kg）または皮下投与（0 および 90 mg/kg）し，一部の動物では 6 週間の休薬期間を設けた。マルスタシマブ投与に関連した神経学的パラメータ（一般状態，行動，運動機能，脳および脊髄神経系機能，固有感覚および姿勢反応），呼吸数（ケージ横での用手計測），心電図パラメータまたは循環動態（収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧，心拍数および脈拍）への影響はみられなかった。

2.4. 薬力学的薬物相互作用

マルスタシマブおよび利用可能なバイパス製剤（ノボセブン®，ファイバ®およびバイクロット®）の併用による in vitro および in vivo での薬力学的相互作用試験の結果から，マルスタシマブとこれらの製剤との併用投与は支持される。正常な FVIII および FIX 値を示すラットにおける非臨床薬理試験の結果は，マルスタシマブを投与しているインヒビター保有の血友病 A または血友病 B 患者の出血に対して，マルスタシマブおよび臨床投与量のノボセブン®（90 µg/kg），ファイバ®（100 U/kg）またはバイクロット®（120 µg/kg）の併用投与を支持するものである。

3. 薬物動態試験

Wistar Han ラットまたはカニクイザルにマルスタシマブを投与したときの非臨床 PK および TK を評価した。これらの試験の概要は M2.6.5.1 に示した。非臨床試験で使用する動物種に単回静脈内投与したときの $t_{½}$は約 12～118 時間であった。サルでの PK は用量依存的であり，低用量での消失が速やかであることから，TMDD の可能性が示唆された。

GLP 適用反復投与毒性試験では，マルスタシマブの曝露量は投与量の増加に伴い増加し，サルでは静脈内投与による反復投与後により高値を示した。ラットでは明らかな蓄積はみられなかった。また，曝露量に一貫した性差はみられなかった。ラットにマルスタシマブを反復投与

したところ ADA 生成が認められたが，ADA 陽性のラットにおけるマルスタシマブ曝露量は ADA 陰性のラットと同様であった。

ラットを用いた検討において，マルスタシマブを単剤またはノボセブン®，ファイバ®あるいはバイクロット®と併用投与した際，反復投与後におけるマルスタシマブの曝露量はすべての用量群で同様であった。これらの結果から，併用投与による非臨床 PK に対する薬物相互作用は示さないことが示唆された。

ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] に基づくと，マルスタシマブのようなバイオテクノロジー医薬品では，非臨床における代謝試験，P450 等に関する薬物動態学的薬物相互作用試験または排泄試験は不要と考えられることから実施していない。

3.1. 分析法

ラットおよびサルを用いた GLP 適用毒性試験では，バリデートされたリガンド結合分析法を用いてマルスタシマブを定量し，ADA を検出した。

3.2. 吸収

3.2.1. 単回投与時の薬物動態

ラット（3，30 および 90 mg/kg，[redacted]MA067 試験）およびサル（3，30 および 90 mg/kg，[redacted]MA070 試験）を用いた探索的毒性試験ならびにサル（1 および 10 mg/kg）を用いた PK/PD 試験（8299672 試験）で，マルスタシマブを単回静脈内投与したときの PK を評価した。検討した用量において $t_{½}$は約 12～118 時間であった。

サルにおけるマルスタシマブの PK は用量依存的であり，低用量での消失が速やかであることから，TMDD の可能性が示唆された。探索的毒性試験（[redacted]MA070 試験）において，3，30 および 90 mg/kg の用量でマルスタシマブを静脈内投与した際の CL は 0.25～0.61 mL/h/kg であった。

サルにおけるマルスタシマブのより低用量での PK/PD 試験（8299672 試験）において，CL は 10 および 1 mg/kg の用量でそれぞれ 0.51 および 2.6 mL/h/kg であった。同じ試験において，血漿中にマルスタシマブが存在する場合，総 TFPI 濃度はマルスタシマブの影響を受けて，総 TFPI 濃度の増加および TFPI のターンオーバー遅延がみられた。この結果は，マルスタシマブの分布および結合標的に対する TMDD の影響を裏付けるものであった。

3.2.2. 反復投与時の薬物動態

雄性ラットを用いたマルスタシマブとノボセブン®（[redacted]MA086 試験），ファイバ®（[redacted]GR258 試験）またはバイクロット®（[redacted]GR075 試験）との併用投与による探索的薬力学試験の一部として，反復投与後の PK を評価した。これらの試験における試験 8 日のマルスタシマブの曝露量（AUC）は，マルスタシマブの単独投与とノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®と併用投与した際の曝露量とで同様な結果を示した。

3.2.3. 反復投与時のトキシコキネティクス

6 週間の休薬期間を設けた 3 ヵ月間または 6 ヵ月間反復投与毒性試験の一部として，ラットおよびサルに週 1 回静脈内または皮下投与したときの TK および ADA を評価した。ラットおよびサルの TK データをそれぞれ Table 4 および Table 5 に示した。

反復静脈内投与したときの曝露量は，投与量に比例して増加した。ラットでは蓄積はほとんどまたは全くみられなかったが，サルでは反復投与により曝露量が増加した。マルスタシマブに対する ADA の発現がラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験のみで認められ，ADA 発現率は，180 mg/kg(SC)，60 mg/kg(IV)，180 mg/kg(IV)および 1000 mg/kg(IV)の用量でそれぞれ 75%（6/8 例），37.5%（3/8 例），0%（0/8 例）および 0%（0/8 例）であった。この試験では，ADA 陽性のラットと ADA 陰性のラットでマルスタシマブの曝露量（C_{max} および AUC_{168}）は同程度であった。ただし，血中のマルスタシマブ濃度が ADA の検出に干渉した可能性は考えられる。ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験およびサルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験では，反復静脈内投与したとき，マルスタシマブに対する ADA は発現しなかった。

Table 4.　ラットにおけるマルスタシマブの反復投与後の TK パラメータ

試験	用量 (mg/kg/week)	試験日	C_{max} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)
20064198 (3 ヵ月試験 [a])	180 (SC)[b]	1	693,000	74,800,000
		29	524,000	57,100,000
		85	416,000	45,300,000
	60 (IV)	1	1,430,000	62,200,000
		29	1,670,000	57,700,000
		85	1,530,000	54,500,000
	180 (IV)	1	3,690,000	205,000,000
		29	6,190,000	263,000,000
		85	5,410,000	283,000,000
	1000 (IV)[c] 回復群あり	1	21,000,000	1,090,000,000
		29	28,900,000	1,660,000,000
		85	27,800,000	1,940,000,000
20089324 (6 ヵ月試験 [a])	60 (IV)[d] 回復群あり	1	1,640,000	68,700,000
		120	2,020,000	62,000,000
		176	2,330,000	73,100,000
		183	2,130,000	69,700,000
	180 (IV)	1	5,170,000	239,000,000
		120	5,820,000	354,000,000
		176	7,030,000	373,000,000
	1000 (IV)	1	23,300,000	1,120,000,000
		120	27,100,000	1,740,000,000
		176	29,800,000	1,840,000,000

a. 4 匹/性/群（3 ヵ月試験では合計 14 回投与，6 ヵ月試験では合計 27 回投与）。
b. 試験 1，29 および 85 日の T_{max} はそれぞれ 63，48 および 51 時間であった。
c. 回復期間終了後（試験 134 日）に採取されたすべての試料において定量可能なマルスタシマブを検出した。
d. 回復期間終了後（試験 225 日）に採取された 2/8 例において定量可能なマルスタシマブを検出した。

Table 5.　サルにおけるマルスタシマブの反復投与後の TK パラメータ

試験	用量 (mg/kg/week)	試験日	C_{max} (ng/mL)	AUC_{168} (ng•h/mL)
20062114 (3 ヵ月試験 [a])	90 (SC)[b]	1	969,000	123,000,000
		29	2,160,000	315,000,000
		85	2,480,000	364,000,000
	30 (IV)	1	817,000	55,700,000
		29	1,240,000	139,000,000
		85	1,290,000	160,000,000
	90 (IV)	1	1,570,000	173,000,000
		29	3,600,000	387,000,000
		85	4,510,000	474,000,000
	500 (IV)[c,d] Recovery Dose Group	1	10,500,000	937,000,000
		29	17,300,000	1,820,000,000
		85	18,400,000	2,000,000,000

a. 3 匹/性/群（合計 14 回投与）
b. 試験 1，29 および 85 日の T_{max} はそれぞれ 64，41 および 48 時間であった。
c. 5 匹/性/群（合計 14 回投与）
d. 試験 133 日（最終の試料採取時点）まで定量可能なマルスタシマブを検出した。

3.3. 分布

血漿タンパク結合率および非臨床試験で用いる動物種における組織分布に関する試験は実施していない。モノクローナル抗体（アルブミンまたはα1 酸性糖タンパク質を標的とする場合を除く）が低分子化合物と同様にアルブミンまたはα1 酸性糖タンパク質と結合することはあまり考えられない。サルにおけるマルスタシマブの分布容積 V_{ss} は，予測される IgG の分布が限定的であることと一致している[23,24]。

3.4. 代謝

ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] の考え方に基づくと，マルスタシマブのような生物学的製剤の代謝試験は不要または重要でないと考えられていることから，代謝試験は実施していない。サルで認められた TMDD が示唆される消失パターン（[redacted]MA070 試験および 8299672 試験）に基づき，マルスタシマブは，マルスタシマブ/TFPI 複合体を形成し，標的分子を介したクリアランスにより消失するか，または他の細胞取り込み過程を介したクリアランスによって消失すると予測される。また，血漿中 TFPI は，タンパク質分解に加え，低比重リポタンパク受容体関連タンパク質およびヘパラン硫酸プロテオグリカンによる受容体を介したクリアランスにより消失することが報告されている[25]。マルスタシマブは他のタンパク質製剤と同様に，細胞内に取り込まれたあと，主にタンパク質分解による異化作用によって代謝されると予測される[24,26,27]。

3.5. 排泄

ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] の考え方に基づくと，マルスタシマブのようなバイオテクノロジー応用医薬品では，低分子薬で通常実施される排泄試験は不要または重要でないと考えられる。そのため，非臨床動物種を用いたマルスタシマブの排泄試験は実施していない。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

生物学的製剤の薬物動態学的薬物相互作用に関して，in vitro の試験結果からヒトへの外挿については情報が限られるため，マルスタシマブの P450 の薬物相互作用に関する in vitro 評価は実施していない[28]。一方，サイトカインまたはサイトカイン調節因子である生物学的製剤が，P450 または潜在的にトランスポーターに関与する薬物相互作用と関連することが知られている[28]。ヒト全血を用いたアッセイにおいて，マルスタシマブは 3 種のヒト炎症性サイトカイン（TNF-α，IL-6 および IFN-γ）の放出を誘発しなかった（M2.6.6.8.3）。したがって，サイトカインを介した P450 またはトランスポーターへの影響は引き起こさないと予測される。また，マルスタシマブの主な消失機序は，標的分子（TFPI）との結合後に生じる受容体を介したエンドサイトーシスおよび通常の IgG 異化経路と予測されることから，P450 はマルスタシマブのクリアランスに影響を及ぼさないと予測される。

ラットを用いた探索的薬力学試験において，マルスタシマブ単独投与およびマルスタシマブをノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®と併用投与した際のマルスタシマブの曝露量（AUC）は，いずれの投与群においても同様であったことから，併用投与によりマルスタシマブの PK に対する薬物動態学的薬物相互作用を示さないと考えられた。

以上より，マルスタシマブは薬物相互作用のリスクを示さないと予測される。

4. 毒性試験

マルスタシマブの非臨床毒性試験の一覧を Table 6 および M2.6.7.1 に示す。非臨床試験の試験デザインおよび評価項目は，ICH，OECD ガイドラインおよび各国の規制に示される一般に認められた原則および実施基準と一致していた。重要な試験はすべて OECD のデータ相互受け入れ制度加盟国である米国において，FDA の GLP 規則に従って実施した。

マルスタシマブを静脈内または皮下投与により，ラットでは最長 6 ヵ月間，サルでは最長 3 ヵ月間投与した。ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] の考え方ならびに FDA および CHMP との合意[a]に基づいて，サルを用いた 6 ヵ月間投与試験は実施しなかった。

マルスタシマブの生殖発生毒性の評価は，雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験のみ実施した（2.4.4.5 項）。

投与経路および動物種の選択理由については 2.4.1 項に示した。

[a] [redacted] Meeting Memorandum of Meeting Minutes, [redacted] 20[redacted]（M4.3.6），PF-06741086 [redacted], [redacted], [redacted] 20[redacted] (PF-06741086_[redacted]-1-20[redacted])（M4.3.3）

Table 6.　毒性試験の一覧

試験	試験番号（ファイザー社番号）	投与量または濃度	概要表	GLP
反復投与毒性試験				
雄ラットを用いた 8 日間 IV または SC 毒性試験	[redacted]MA067	0, 3, 30, 90 mg/kg/週 IV[a]; 0, 3 mg/kg/週 SC[a]	2.6.7.6	非適用
サルを用いた 8 日間 IV または SC 毒性試験	[redacted]MA070	0, 3, 30, 90 mg/kg/週 IV[a]; 0, 3 mg/kg/週 SC[a]	2.6.7.6	非適用
ラットを用いた 3 ヵ月間 IV または SC 毒性/TK 試験および 6 週間回復性試験	20064198 ([redacted]MA086)	0, 60, 180, 1000 mg/kg/週 IV[a]; 0, 180 mg/kg/週 SC[a]	2.6.7.7A	適用
ラットを用いた 6 ヵ月間 IV 毒性/TK 試験および 6 週間回復性試験	20089324 ([redacted]MA123)	0, 60, 180, 1000 mg/kg/週 [a]	2.6.7.7B	適用
サルを用いた 3 ヵ月間 IV または SC 毒性/TK 試験および 6 週間回復性試験	20062114 ([redacted]MA097)	0, 30, 90, 500 mg/kg/週 IV[a] 0, 90 mg/kg/週 SC[a]	2.6.7.7C	適用
生殖発生毒性試験				
雄ラットを用いた IV による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	00655204 ([redacted]GR328)	0, 60, 180, 1000 mg/kg/週	2.6.7.12	適用
局所刺激性試験				
ラットを用いた単回 SC 局所刺激性および 1 週間回復性試験	[redacted]GR324	0, 300 mg/kg	2.6.7.16	適用
その他の毒性試験				
In Vitro ヒトC1qおよびFcγR結合試験	[redacted]GR003	最高 30 µg/mL	2.6.7.17	非適用
In Vitro ヒトサイトカイン放出試験	[redacted]GR044	1, 10, 100, 1000 µg/mL	2.6.7.17	非適用
IHC染色法を確立するための予備試験	IM2368P ([redacted]MA009)	1-25 µg/mL	2.6.7.17	非適用

ヒト，カニクイザルおよびWistar Han ラットの正常組織を用いた組織交差反応性試験	20063771 ([redacted]MA087)	5, 25 µg/mL	2.6.7.17	適用
雄ラットを用いたファイバの3 日間 IV 試験 [b]	[redacted]GR090	0, 50, 100, 200 (0, 25, 50, 100 BID) U/kg/日	2.6.7.17	非適用

a. 週 1 回投与
b. ラットの探索的薬力学試験（Study [redacted]GR258; 2.4.2.1.2.2.2 項）の用量設定のために実施した。

マルスタシマブの反復投与毒性試験でみられた主な所見は，D-ダイマー，PT，aPTT，フィブリノゲンの変化およびラットでのみ病理組織学的に認められた血栓・塞栓を含む凝固カスケードへの影響，ならびにラットにおける皮下投与部位の病理組織学的所見であるが，いずれの所見も毒性学的意義は乏しいと考えられた。

主な所見および関連するマルスタシマブの曝露量比のリスク評価については 2.4.4.4.7.10 項および Table 8 に示す。曝露量比は，ヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与（B7841002 試験，M2.7.2.2.2.1.2）したときの C_{max} および AUC_{tau} に基づいて算出した。

ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験における NOAEL は，静脈内投与で検討した最高用量である 1000 mg/kg であり，曝露量比は 466 倍（C_{max}）および 201 倍（AUC_{168}）であった。サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験における NOAEL は，各投与経路で検討した最高用量である 500 mg/kg［静脈内投与，曝露量比は 288 倍（C_{max}）および 219 倍（AUC_{168}）］および 90 mg/kg［皮下投与，曝露量比は 39 倍（C_{max}）および 40 倍（AUC_{168}）］であった。

ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験における雄ラットの一般毒性ならびに生殖および初期胚発生毒性に関する NOAEL は静脈内投与で 1000 mg/kg であり，ラット 3 ヵ月間反復投与毒性試験の TK 結果を用いると曝露量比は 212 倍（AUC_{168}）であった。

ラットを用いた単回投与局所刺激性試験における NOAEL は皮下投与で 300 mg/kg であった。

マルスタシマブはヒト C1q または FcγR に結合しなかったことから，CDC または ADCC 活性のリスクが低いことが示唆され，ヒト全血サイトカイン放出試験においてサイトカイン放出を誘発しなかった。

組織交差反応性試験では，血管内皮細胞ならびに胎盤の脱落膜細胞および栄養膜細胞に予測された染色像が認められた。

マルスタシマブおよび市販中のバイパス製剤（ノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®）との併用投与による in vivo 探索的薬力学試験における安全性評価により，マルスタシマブとこれらの製剤との併用投与が支持された。

4.1. 単回投与毒性

マルスタシマブの単回投与毒性試験は実施していない。

4.2. 反復投与毒性

4.2.1. ラットを用いた反復投与毒性試験

4.2.1.1. ラットを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験

雄ラットにマルスタシマブを 0，3，30 または 90 mg/kg/週の用量で静脈内もしくは 3 mg/kg/週の用量で皮下に週 1 回（試験 1 日および試験 8 日の合計 2 回）投与し，試験 9 日に剖検に供した（[redacted]MA067 試験）。NOEL は静脈内投与で 3 mg/kg/週であった。最大耐量は，静脈内投与で 90 mg/kg/週，皮下投与で 3 mg/kg/週であった。

マルスタシマブ投与に関連する臨床病理学的変化として，D-ダイマーの高値が 30 mg/kg/週以上の静脈内投与（1.57～1.91 倍，比対照群，以降同様）および 3 mg/kg/週の皮下投与（1.72 倍）で試験 3 日にみられた。その他の時点では D-ダイマーの変化はみられず，剖検時に評価した組織において血栓または塞栓はみられなかった。試験 9 日には，臨床病理学的変化として，30 mg/kg/週以上の静脈内投与でグロブリンの軽微な高値（1.05～1.08 倍）および A/G 比の低値（0.92～0.96 倍）がみられた。これらの変化はマルスタシマブ投与に関連した変化と考えられた。

剖検および病理組織学的所見は 3 mg/kg/週の皮下投与のみで認められた。3 mg/kg/週の皮下投与では，剖検で投与部位にマルスタシマブ投与に関連する色調異常が認められ，病理組織学的検査で認められた混合性細胞浸潤，壊死および出血と一致した。これらの所見は重症度が軽微から軽度であったことから用量制限毒性とはみなさなかった。

マルスタシマブ投与に関連した死亡，一般状態の変化，体重および摂餌量への影響ならびに臓器重量の変化はみられなかった。

4.2.1.2. ラットを用いた 3 ヵ月間静脈内または皮下投与毒性試験および 6 週間回復性試験

雌雄ラットにマルスタシマブを 0，60，180 または 1000 mg/kg/週の用量で静脈内もしくは 0 または 180 mg/kg/週の用量で皮下に週 1 回，13 週間投与した。また，0 または 1000 mg/kg/週の静脈内投与の一部の動物については 6 週間の休薬期間を設け，回復性を評価した（20064198 試験）。被験物質の濃度は 100 mg/mL であり，静脈内投与における投与容量は 10 mL/kg が最適であることから[29]，最高用量である 1000 mg/kg/週が投与可能な最大投与量であった。いずれの用量でも毒性変化が認められなかったことから， NOAEL は，静脈内投与で 1000 mg/kg/週，皮下投与で 180 mg/kg/週であった。

マルスタシマブ投与に関連する凝固系パラメータへの影響として，対照群と比較してフィブリノゲン減少（60 mg/kg/週以上の静脈内投与で 0.79～0.90 倍，180 mg/kg/週の皮下投与で 0.90 倍），PT 短縮（1000 mg/kg/週の静脈内投与で 0.90 倍，180 mg/kg/週の皮下投与で 0.93 倍）および aPTT 延長（60 mg/kg/週以上の静脈内投与で 1.09～1.23 倍，180 mg/kg/週の皮下投与で 1.07～1.20 倍）が認められた。これらの変化は一過性で軽微であり，関連する一般状態の変化および病理組織学的所見がみられなかったことから毒性変化ではないと考えられた。休薬期間終了時に，これらのパラメータにマルスタシマブ投与に関連する変化はみられなかった。

マルスタシマブ投与に関連する血液生化学パラメータへの影響として，投与期間終了時に，アルブミン減少（最小 0.90 倍），グロブリン増加（最大 1.74 倍），総タンパク増加（最大 1.24

倍）および A/G 比低下（最小 0.50 倍）が 1000 mg/kg/週の静脈内投与でみられ，これはマルスタシマブの高曝露に起因すると考えられた。これらの変化は，関連する一般状態の変化および病理組織学的所見がみられなかったことから毒性変化ではないと考えられた。また，休薬期間終了時に血液生化学パラメータにマルスタシマブ投与に関連する変化はみられなかった。

投与期間終了時および休薬期間終了時に，マルスタシマブ投与に関連する死亡ならびに一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，眼科学的検査，血液学的検査（凝固検査を除く），尿検査，臓器重量，剖検および病理組織学的検査における変化はみられなかった。

マルスタシマブに対する ADA 発現率は，0，60，180 および 1000 mg/kg/週の静脈内投与でそれぞれ 16.7%（1/6 例：この動物では 1 時点で ADA を検出したが定量可能なマルスタシマブを検出しなかった），37.5%（3/8 例），0%（0/8 例）および 0%（0/8 例）であった。0 および 180 mg/kg の皮下投与では，それぞれ 0%（0/6 例）または 75.0%（6/8 例）であった。マルスタシマブを投与したすべての動物における ADA 発現率は 28.1%（9/32 例）であった。しかしながら，ADA 陽性動物と ADA 陰性動物の血漿中曝露量（C_{max} および AUC_{168}）は概して同程度であった。

4.2.1.3. ラットを用いた 6 ヵ月間静脈内投与毒性試験および 6 週間回復性試験

雌雄ラットにマルスタシマブを 0，60，180 または 1000 mg/kg/週の用量で週 1 回，26 週間静脈内投与した。60 mg/kg/週の TK コホートについては 6 週間の休薬期間を設けて TK を検討した（20089324 試験）。被験物質の濃度は 100 mg/mL であり，静脈内投与における投与容量は 10 mL/kg が最適であることから [29]，最高用量である 1000 mg/kg/週が投与可能な最大投与量であった。いずれの用量でも毒性変化が認められなかったことから，NOAEL は 1000 mg/kg/週であった。

マルスタシマブ投与に関連する凝固系パラメータへの影響として，60 mg/kg/週以上で，用量依存的なフィブリノゲン減少（0.76～0.94 倍，比対照群，以下同様），aPTT 延長（1.05～1.19 倍）および用量依存的な D-ダイマー増加（1.37～5.33 倍）がみられ，1000 mg/kg/週群で PT 延長（1.04～1.12 倍）がみられた。これらの変化はマルスタシマブの薬理作用と関連していると考えられ，また，全般的に軽度な変化であり，一般状態の変化もなく，病理組織学的検査でみられた肺または投与部位の血栓または塞栓が二次的な組織損傷を伴わず毒性学的意義の乏しい軽微な変化であることから，毒性変化ではないと考えられた。

マルスタシマブ投与に関連する血液生化学パラメータへの影響として，60 mg/kg/週以上で用量依存的な軽度から中等度のグロブリン増加（1.06～1.68 倍）が，180 mg/kg/週以上で総タンパク増加（1.05～1.27 倍）および A/G 比低下（0.54～0.90 倍）が，また 1000 mg/kg/週で軽度のアルブミン減少（0.89～0.96 倍）がみられた。これらの変化はマルスタシマブの高曝露に起因すると考えられ，関連する一般状態の変化および病理組織学的所見がみられなかったことから毒性変化ではないと考えられた。

対照群を含むすべての投与群の一部の動物において，マルスタシマブ投与に関連する肺（軽微な急性で器質化した血栓または塞栓，屈折性物質を伴う軽微な細胞浸潤，軽微な好塩基性または非好塩基性の異物）または投与部位の尾静脈（軽微な急性で器質化した血栓または塞栓）に病理組織学的所見がみられた。これら屈折性物質と異物の由来および組成は不明である。血栓

または塞栓は凝固系パラメータの軽度の変化と関連し，マルスタシマブの薬理作用と関連していると考えられた。血栓または塞栓の近傍または内部に屈折性物質または好塩基性異物を含む細胞浸潤が認められたことは，これらの物質が血栓または塞栓形成に関与することを示唆している。認められた病理組織学的所見はいずれも重症度が軽微であり，二次的な毒性変化が認められなかったことから毒性変化ではないと考えられた。

マルスタシマブ投与に関連する死亡ならびに一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，眼科学的検査，血液学的検査（凝固検査を除く），尿検査，臓器重量および剖検での変化はいずれの用量においてもみられなかった。

投与期間中のすべての投与群または休薬期間終了時の 60 mg/kg/週（ほとんどの動物で血漿中マルスタシマブ濃度が定量限界未満であった）において ADA は検出されなかった。

4.2.2. サルを用いた反復投与毒性試験

4.2.2.1. サルを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験

雌雄カニクイザルにマルスタシマブを 0，3，30 または 90 mg/kg/週の用量で静脈内もしくは 3 mg/kg/週の用量で皮下に週 1 回（試験 1 日および試験 8 日の合計 2 回）投与し，試験 9 日に剖検に供した（[redacted]MA070 試験）。最大耐量は，静脈内投与で 90 mg/kg/週，皮下投与で 3 mg/kg/週であった。

マルスタシマブ投与に関連する所見として，すべての用量で対照群と比較して大幅な D-ダイマー値比の高値（投与前値の最大 9.71 倍）のみが認められた。マルスタシマブ投与に関連する一般状態，体重，摂餌量，血液学的検査（凝固検査を除く），血液生化学的検査への影響ならびに剖検および病理組織学的検査で変化はみられなかった。

4.2.2.2. サルを用いた 3 ヵ月間静脈内または皮下投与毒性試験および 6 週間回復性試験

雌雄カニクイザルにマルスタシマブを 0，30，90 または 500 mg/kg/週の用量で静脈内もしくは 0 または 90 mg/kg/週の用量で皮下に週 1 回，13 週間投与した。0 および 500 mg/kg/週の静脈内投与群の一部の動物については 6 週間の休薬期間を設け，回復性を評価した（20062114 試験）。被験物質の最高濃度は 100 mg/mL であり，投与容量は 5 mL/kg が最適であることから [29]，最高用量である 500 mg/kg/週の静脈内投与が投与可能な最大投与量であった。いずれの用量でも毒性変化が認められなかったことから，NOAEL は静脈内投与で 500 mg/kg/週，皮下投与で 90 mg/kg/週であった。

マルスタシマブ投与に関連する凝固系パラメータへの影響として，投与期間中のすべての投与群でフィブリノゲン減少（0.56～0.81 倍，投与前値比，以下同様），PT 延長（1.10～1.30 倍）および D-ダイマー増加（1.20～4.42 倍）がみられ，これらはマルスタシマブの薬理作用に関連した変化と考えられた。aPTT 延長（1.10～1.16 倍）は 500 mg/kg/週の静脈内投与のみでみられた。これらの凝固系パラメータの変化は，マルスタシマブの曝露量が投与期間中の曝露量と同様であった休薬期間終了時にもみられた。これらの変化は軽微であり，関連する一般状態の変化および病理組織学的所見がみられなかったことから毒性変化ではないと考えられた。

マルスタシマブ投与に関連する血液生化学パラメータへの影響として，総タンパク質増加（1.06～1.22 倍）を伴うグロブリン増加（1.08～1.57 倍）および A/G 比低下（0.55～0.94 倍）が

投与期間中のすべての投与群でみられたが，休薬期間終了時にはみられなかった。これらの変化は，マルスタシマブ投与に関連した一般状態の変化および病理組織学的所見がみられなかったことから毒性変化ではないと考えられ，マルスタシマブの高曝露に起因する可能性が高いと考えられた。

ADA は投与期間および休薬期間において，いずれの投与群でも検出されなかったが，循環血中のマルスタシマブが ADA 検出に干渉していた可能性は考えられる。また，休薬期間終了時の最終採血時点まで定量可能なマルスタシマブを検出した。

マルスタシマブ投与に関連した死亡ならびに一般状態，体重，摂餌量，中枢神経系，呼吸数，眼科学的検査，心電図，血行動態，血液学的検査（凝固検査を除く），尿検査，臓器重量，剖検および病理組織学的検査で変化はみられなかった。

4.3. 遺伝毒性試験

マルスタシマブの遺伝毒性試験は実施していない。ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] に記載されているように，バイオテクノロジー応用医薬品は DNA や他の染色体成分に直接相互作用しないと考えられるため，一般的に遺伝毒性試験の実施は適切ではない。

4.4. がん原性

ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] に従って，マルスタシマブのがん原性の可能性について化合物特異的な評価を実施し，さらに証拠の重み付け（WoE）評価によりマルスタシマブのがん原性リスクは低いことが示されたことから，追加の試験は実施しなかった[a]。なお，化合物特異的な評価について，FDA はレビューを実施[b]し，追加の非臨床試験は必要ないとの見解で合意[c]した。CHMP についても 2 年間のげっ歯類を用いたがん原性試験を実施しないことについて合意[d]した。

4.4.1. 作用の特異性およびメカニズム

- マルスタシマブは TFPI の K2 ドメインを標的とするヒト IgG1 モノクローナル抗体であり，検討したすべての動物種（ヒト，サル，ウサギ，ラットおよびマウス）で数 nmol/L 以下の親和性で結合する。
- マルスタシマブはヒト TFPI K2 および TFPI K1K2 に同様の親和性で結合するが，ヒト TFPI K1 には結合しない。
- Fc ドメインにはエフェクター機能を縮小するための特異的点突然変異が含まれている。

---

[a] CARCINOGENICITY ASSESSMENT FOR MARSTACIMAB（M4.3.7）

[b] [redacted] Meeting Briefing Document, [redacted] 20[redacted]（M4.3.8）

[c] [redacted] Meeting Written Responses, [redacted] 20[redacted]（M4.3.4）

[d] PF-06741086 [redacted], [redacted], [redacted] 20[redacted] (PF-06741086_[redacted]-3-20[redacted]-[redacted])（M4.3.5）

- マルスタシマブはモノクローナル抗体であることから DNA と直接的に相互作用しないため，遺伝毒性による発がん性リスクは示さない。

4.4.2. TFPI の腫瘍生物学的役割

- TFPI 阻害と発がん性リスクとの間に決定的な関係性は確立されていない。
- TFPI はヒト乳がん細胞株において細胞増殖，遊走および浸潤を阻害した[30]。
- マウスを用いた in vivo 実験モデルにおいて，TFPI 投与によりマウス黒色腫細胞および Lewis 肺癌細胞の転移を減少させることが示されている[31,32]。
- TFPI は ex vivo での検討において，患者の慢性リンパ性白血病細胞の経内皮遊走を促進することが示されたが，正常な B 細胞では促進しなかったことから，患者において TFPI が臓器浸潤に関与している可能性が示された[33]。
- 肺癌患者では血漿中 TFPI 濃度が低い場合に腫瘍転移との関連がみられ，乳がん患者では腫瘍での TFPI 発現が増加すると転帰の改善との関連がみられた[34,35]。
- 血友病患者で止血を促進させるための凝固経路の調節と悪性腫瘍の発現率増加との関連を示唆するような臨床データは得られていない。
- TFPI の遺伝子多型は特定の乳がんサブタイプと関連しているが，乳がん進行における TFPI 遺伝子多型の正確な役割についてはさらなる検討が必要である [34,36]。
- TFPI 阻害のホルモンおよび免疫調節への影響についてのエビデンスは得られていない。

4.4.3. 非臨床試験結果

ラット 6 ヵ月間投与毒性試験およびサル 3 ヵ月間投与毒性試験を含む反復投与毒性試験において，マルスタシマブ投与に関連した増殖性/過形成性の病変または腫瘍は認められず，また，免疫抑制，免疫刺激性，ホルモン調節および慢性組織損傷を示す所見も認められなかった。

組織交差反応性試験では，免疫系（骨髄，白血球，リンパ節，脾臓および胸腺）および内分泌系の組織または細胞に対するマルスタシマブの反応性および交差反応性はみられなかった。

4.4.4. まとめ

以上より，WoE 評価から，動物およびヒトにおける標的分子に関連する決定的な発がん性リスクはないこと，ホルモン調節および免疫調節に関するエビデンスがないこと，ならびに最長 6 ヵ月間のラット毒性試験を含む毒性試験において増殖性病変がみられなかったことから，マルスタシマブの発がん性リスクは低いことが示された。

4.5. 生殖発生毒性

マルスタシマブのラットを用いた 6 ヵ月までの反復投与毒性試験およびサルを用いた 3 ヵ月までの反復投与毒性試験において雌雄の動物の生殖器に影響はみられなかった。女性における有病率が低いことから，雌ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，胚・胎児発生に関する試験ならびに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施

しなかった。雄ラットを用いた受胎能試験により X 染色体連鎖性を示す血友病における男性集団の受胎能障害の可能性を評価できることから，マルスタシマブの生殖発生毒性の評価は，ラットを用いた雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のみを実施した（M2.6.6.6.1）。

マルスタシマブの幼若動物を用いた試験は実施していない。サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験に組み入れた動物の年齢は 3.7～7.2 歳でおおむね青年から若年成人の年齢と一致していた。非臨床毒性試験におけるマルスタシマブ投与に関連した所見は凝固カスケードの調節に関するものであった。凝固系は出生時には完全に機能し，6 ヵ月齢までに完全に成熟することから[37,38,39]，マルスタシマブの幼若動物を用いた毒性試験により小児患者における毒性のリスクに関する追加情報は得られないと考えられる。

なお，生殖発生毒性試験［雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（M2.6.6.6.1）を除く］[a]および幼若動物を用いた試験[b]を実施しないことについては FDA および CHMP と合意されている。

4.5.1. ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

雄の Wistar Han ラットに，マルスタシマブを 0，60，180 または 1000 mg/kg/週の用量で，交配前 4 週間以上，交配期間中および安楽殺まで週 1 回（合計 11 回）静脈内投与した（00655204 試験）。マルスタシマブ投与に関連した一般状態，体重，体重増加量，摂餌量，雄性生殖能，精子形成，マルスタシマブを投与した雄と交配させた無処置の雌における胚生存率，臓器重量および剖検所見の変化がみられなかったことから，雄ラットの一般毒性ならびに生殖および初期胚発生毒性に関する NOAEL は 1000 mg/kg/週と考えられた。

4.6. 局所刺激性試験

Wistar Han ラットを用いた単回皮下投与による局所刺激性試験を実施した（[redacted]GR324 試験）。ラットにマルスタシマブを 300 mg/kg の用量で投与し，急性および遅発性作用をそれぞれ投与後 1 日および 1 週間に評価した。臨床濃度である 150 mg/mL と一致するように 300 mg/kg を選択した。この用量は，非臨床試験全体で皮下投与された最高用量である。マルスタシマブ投与に関連する毒性変化が認められなかったことから，NOAEL は 300 mg/kg であった。

試験 2 日に対照群と比較して，マルスタシマブ投与に関連した投与部位の軽微な浮腫または出血に関連した軽微から軽度の混合性細胞浸潤の発現頻度の増加または重症度の増加がみられたが，1 週間後には認められなかったことから回復性のある変化と考えられた。また，1 週間の休

---

[a] [redacted] Meeting Memorandum of Meeting Minutes, [redacted] 20[redacted]（M4.3.6），PF-06741086 [redacted], [redacted], [redacted] 20[redacted] (PF-06741086_[redacted]-1-20[redacted])（M4.3.3），[redacted] Meeting Preliminary Comments, [redacted] 20[redacted]（M4.3.9），PF-06741086 [redacted], [redacted] 20[redacted] (PF-06741086_[redacted]-3-20[redacted])（M4.3.5）

[b] [redacted] Meeting Memorandum of Meeting Minutes, [redacted] 20[redacted]（M4.3.6），[redacted], [redacted] 20[redacted]（M4.3.10），PF-06741086 [redacted], [redacted] 20[redacted] (PF-06741086_[redacted]-3-20[redacted])（M4.3.5），EMA PIP Decision EMEA-002285-PIP02-19, 12 August 2020（M4.3.11），医薬品[redacted]相談記録（実施日：令和[redacted]年[redacted]月[redacted]日）（M1.13）

薬期間に，マルスタシマブ投与に関連した軽微な摂餌量の低下（0.90～0.92 倍，比対照群）がみられた。病理組織学的所見および摂餌量への影響は，一般状態の変化を伴わず軽微な変化であったことから毒性変化ではないと考えられた。

また，ラットを用いた 8 日間投与毒性試験（M2.6.6.3.1.1）では，3 mg/kg/週の皮下投与において，剖検でマルスタシマブ投与に関連する投与部位の色調異常が認められ，病理組織学的検査で認められた混合性細胞浸潤，壊死および出血と一致した。また，ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験では，マルスタシマブ投与に関連する病理組織学的所見として，すべての用量で投与部位の尾静脈に軽微な急性で器質化した血栓または塞栓がみられたが，これらの変化は毒性学的意義の乏しい変化と考えられた（M2.6.6.3.1.3）。

ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験またはサルを用いた 8 日間もしくは 3 ヵ月間反復投与毒性試験において，静脈内または皮下投与部位にマルスタシマブ投与に関する剖検または病理組織学的所見は認められなかった。

4.7. その他の毒性試験

4.7.1. 光毒性試験

マルスタシマブはタンパク質製剤であり，290～700 nm の紫外線 A および B ならびに可視光線領域における吸収がないことから，マルスタシマブの光毒性試験は実施していない。

4.7.2. 抗原性試験

ラットおよびサルを用いた反復投与毒性試験で，マルスタシマブが抗体反応を誘発する可能性を評価した。ADA はラットを用いた 3 ヵ月間静脈内および皮下投与毒性試験のみで検出された。発現率はマルスタシマブ投与群全体で 28.1%であり，マルスタシマブの曝露量に対する影響は認められなかった。その他の試験において，被験物質の血中濃度が ADA の検出能に影響を及ぼした可能性は考えられる。

4.7.3. 免疫毒性試験

C1q および FcγR（CD16，CD32 および CD64）結合試験において，マルスタシマブを in vitro で評価し，CDC および ADCC 活性誘導能を測定した（[redacted]GR003 試験）。マルスタシマブによる C1q および FcγR 結合は認められなかったことから，CDC または ADCC 活性誘導能は低いことが示唆された。

マルスタシマブは，全血を用いた in vitro サイトカイン放出試験において TNF-α，IL-6 および IFN-γを誘発しなかった（[redacted]GR044 試験）。

4.7.4. 毒性発現の機序に関する試験

マルスタシマブの一連の毒性試験で認められた所見に基づき，毒性発現の機序に関する試験は不要と考えられた。

4.7.5. 依存性試験

マルスタシマブの薬理作用メカニズムは既知の薬物乱用または依存性メカニズムの経路と関連しておらず，ラットまたはサルにおける反復投与毒性試験において中枢神経系活性化を示唆する一般状態の変化もみられていないことから，依存性試験は実施していない。

4.7.6. 代謝物の毒性試験

マルスタシマブはタンパク質分解による異化作用ならびに受容体および標的分子を介したクリアランスによって除去されると考えられることから，マルスタシマブの代謝物の毒性試験は実施していない（M2.6.4.5）。

4.7.7. 不純物の毒性試験

マルスタシマブの不純物の毒性試験は実施していない。

4.7.8. その他の試験

4.7.8.1. 組織交差反応性試験

予備試験（IM2368P 試験）で確立した免疫組織化学的染色の手法により，ヒト，サルおよびラットの組織試料を用いて，マルスタシマブの組織交差反応性試験（20063771 試験）を実施した。

IM2368P 試験では，ヒト，カニクイザルおよび Sprague-Dawley ラットから採取した特定の組織の凍結切片中においてマルスタシマブの結合を適切に検出可能であった。

マルスタシマブによる染色シグナルはヒト胎盤脱落膜細胞の膜顆粒で検出された。また，ヒト，サルおよびラットの血管内皮細胞，ヒトおよびサルの胎盤の栄養膜細胞，脱落膜細胞および上皮細胞，ヒトの扁桃細胞，サルの中皮細胞，膵島細胞および卵巣内の細胞外物質，ラットの海綿状栄養膜細胞でも検出された。

TFPI は主に血管内皮で生成され，さらに線維芽細胞などの紡錘型の細胞[40,41]，単核球[42,43,44]，胎盤[45]などのその他の少数の細胞型でも発現することが報告されているため，組織交差反応性試験の結果は予測されたものであった。TFPI の中皮，上皮または膵島細胞での発現は報告されていないが，これらの細胞質部位で染色が認められた。しかしながら，ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[22] および他の参考文献[46,47]によると，細胞質部位へのモノクローナル抗体の結合は一般的に毒性学的意義に乏しいものと考えられている。

4.7.8.2. ラットを用いたファイバ®の 3 日間静脈内投与試験

ファイバ®のラット in vivo 探索的薬力学試験（[redacted]GR258 試験，M2.6.2.2.2.2.2）における用量設定のため，雄ラットにファイバ®を 0［溶媒，4 mg/mL クエン酸三ナトリウムおよび 8 mg/mL 塩化ナトリウムを含む滅菌注射用水溶液（pH 5.8）］，50（25 BID），100（50 BID）および 200（100 BID）U/kg/日の用量で 1 日 2 回，3 日間静脈内投与した（[redacted]GR090 試験）。ファイバ®は最高用量まで忍容性を示したが，一部の動物では，投与部位である尾部への影響によりすべての投与日において投与が制限された。

ファイバ®投与に関連する血液学的検査および凝固系パラメータの変化として，PT 短縮，血小板数低下，aPTT 延長ならびにフィブリノゲン濃度，単球および好中球数の増加がすべての用量でみられた。

ファイバ®投与に関連する用量依存的な尾部の褪色または浮腫がすべての用量でみられ，100（50 BID）U/kg/日以上の用量における尾部では剖検（色調およびサイズの異常）および病理組織学的所見（表皮肥厚，うっ血，浮腫，出血，混合性細胞浸潤，筋組織での炎症/変性/壊死ならびに表皮内または表皮下の空胞/膿疱/裂傷）を伴っていた。また，100（50 BID）U/kg/日以上で，病理組織学的検査において，肺または尾部での血栓または塞栓の発現頻度および重篤度の増加がみられた。

4.7.8.3. ラットを用いた併用投与における探索的薬力学試験

雄ラットを用いて，マルスタシマブと臨床で用いられているバイパス製剤（ノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®）の併用による反復投与試験を実施し，薬理作用の相加効果について検討した（M2.6.2.2.2.2）。マルスタシマブとノボセブン®との併用投与（[redacted]MA086 試験）では，対照群と比較して，肺または尾部における急性の血栓または塞栓の発現頻度および重症度が増加した。また，マルスタシマブとファイバ®の併用投与（[redacted]GR258 試験）では，対照群と比較して尾部における急性の血栓または塞栓の発現頻度および重症度の増加，トロンビン・アンチトロンビン複合体濃度および血小板容積の増加がみられた。マルスタシマブとバイクロット®の併用投与（[redacted]GR075 試験）での影響は，バイクロット®単剤投与でみられた凝固系パラメータへの影響のみがみられた。併用投与試験において，マルスタシマブ投与に関連する新たな所見はみられなかった。ノボセブン®，ファイバ®またはバイクロット®の併用投与はマルスタシマブの曝露量に影響を及ぼさなかった。

4.7.9. 毒性所見と薬物動態の関係

ラットおよびサルにマルスタシマブを投与したときの曝露量（C_{max} および AUC_{168}）を Table 7 に示す。ラットおよびサルのいずれにも性差は認められなかったため，各動物種の曝露データは雌雄合算で示す。

ラットにマルスタシマブを週 1 回最長 6 ヵ月間反復静脈内投与したときの曝露量は，ほぼ投与量に比例して増加した。3 ヵ月間および 6 ヵ月間投与試験では，180 mg/kg/週および 1000 mg/kg/週の静脈内投与で蓄積が認められ，累積係数（試験 85 日または試験 176 日の AUC_{168}/試験 1 日の AUC_{168}）は 1.4～1.8 であった。3 ヵ月間および 6 ヵ月間投与試験における休薬期間の試料の最終採取時点まで，マルスタシマブ濃度は定量可能であった。

サルにマルスタシマブを週 1 回最長 3 ヵ月間反復静脈内投与したときの曝露量は，ほぼ投与量に比例して増加し，試験 85 日で試験 1 日より高く，累積係数（試験 85 日の AUC_{168}/試験 1 日の AUC_{168}）は 2.1～2.9 であった。週 1 回皮下投与したときの累積係数（試験 85 日の AUC_{168}/試験 1 日の AUC_{168}）は約 3 であった。3 ヵ月間投与試験の休薬期間の試料の最終採取時点まで，マルスタシマブ濃度は定量可能であった。

ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与試験のみで認められた ADA 発現は，曝露量に影響を及ぼさなかった（M2.6.6.3.1.2）。

Table 7.　薬物動態と臨床曝露量の関係

試験/試験番号	投与量 (mg/kg)	C_{max}[a] (ng/mL)	AUC_{168}[a] (ng•h/mL)	曝露量比[b] C_{max}	曝露量比[b] AUC_{168}
ラット					
8 日間静脈内または皮下投与試験 /[redacted]MA067	3 (IV)	89,000	2,810,000	1.4	0.3
	30 (IV)	882,000	29,700,000	14	3.2
	90 (IV) MTD	3,480,000	111,000,000	54	12
	3 (SC) MTD	27,000	1,960,000	0.4	0.2
3 ヵ月間静脈内または皮下投与毒性および 6 週間回復性試験 /20064198	60 (IV)	1,530,000	54,500,000	24	6.0
	180 (IV)	5,410,000	283,000,000	85	31
	1000 (IV) NOAEL	27,800,000	1,940,000,000	435	212
	180 (SC) NOAEL	416,000	45,300,000	6.5	5.0
6 ヵ月間静脈内投与毒性および 6 週間回復性試験/20089324	60	2,130,000	69,700,000	33	7.6
	180	7,030,000	373,000,000	110	41
	1000 NOAEL	29,800,000	1,840,000,000	466	201
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する静脈内投与試験 /00655204[c]	60	1,530,000	54,500,000	24	6.0
	180	5,410,000	283,000,000	85	31
	1000 NOAEL	27,800,000	1,940,000,000	435	212
単回皮下投与局所刺激性および 1 週間回復性試験/[redacted]GR324	300 NOAEL	1,390,000	139,000,000	22	15
サル					
8 日間静脈内または皮下投与試験 /[redacted]MA070	3 (IV)	127,000	3,510,000	2.0	0.4
	30 (IV)	582,000	34,700,000	9.1	3.8
	90 (IV) MTD	2,680,000	138,000,000	42	15
	3 (SC) MTD	7,140	432,000	0.11	0.05
3 ヵ月間静脈内または皮下投与毒性および 6 週間回復性試験 /20062114	30 (IV)	1,290,000	160,000,000	20	17
	90 (IV)	4,510,000	474,000,000	71	52
	500 (IV) NOAEL	18,400,000	2,000,000,000	288	219
	90 (SC) NOAEL	2,480,000	364,000,000	39	40

a. 反復投与試験の C_{max} および AUC は血漿中濃度の平均値を示す。
b. C_{max} および AUC の曝露量比は，ヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与したときの C_{max}（63,930 ng/mL）および AUC_{168}（9,146,000 ng•h/mL）を用いて算出した（B7841002 試験，M2.7.2.2.2.1.2）。
c. 曝露量はラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験の値を示す。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験における，試験 70 日の投与後 5 分の血漿中濃度（平均値）は，60，180 および 1000 mg/kg/週でそれぞれ 3,790,000，11,500,000 および 50,800,000 ng/mL であった。

4.7.10. 標的臓器毒性

実施した非臨床試験によりマルスタシマブ投与後の重要な所見として確認されたのは，凝固カスケードへの影響および投与部位の病理組織学的所見のみであった（Table 8）。マルスタシマブ投与に関連するその他の所見は，血液生化学パラメータの変化であった。

Table 8.　主な所見および関連する曝露量比

主な所見	動物種	投与量 (mg/kg)	曝露量比 [a] C_{max} (ng/mL)	曝露量比 [a] AUC_{168} (ng/mL)
凝固カスケード				
臨床病理学的パラメータ：D-ダイマー↑，aPTT↑または↓，PT↑または↓，フィブリノゲン↓	ラット	3 (SC) LOEL	0.4	0.2
		30 (IV) LOEL	14	3.2
		180 (SC) NOAEL	6.5	5.0
		1000 (IV) NOAEL	466	201
	サル	3 (SC) LOEL	0.11	0.05
		3 (IV) LOEL	2.0	0.4
		90 (SC) NOAEL	39	40
		500 (IV) NOAEL	288	219
病理組織学的所見：尾静脈（投与部位）および肺の血栓・塞栓	ラット	60 (IV) LOEL	33	7.6
		1000 (IV) NOAEL	466	201
皮下投与部位				
皮下投与部位の混合性細胞浸潤，出血，壊死および浮腫	ラット	3 (SC) LOEL	0.4	0.2
		300 (SC) NOAEL	22	15

a. 曝露量比はヒトに 300 mg を週 1 回投与したときの C_{max}（63,930 ng/mL）および AUC_{tau}（9,146,000 ng•h/mL）に基づいて算出した（B7841002 試験，M2.7.2.2.2.1.2）。

4.7.10.1. 凝固カスケード

マルスタシマブ投与に関連する凝固カスケードへの影響として，フィブリノゲン減少，D-ダイマー増加，PT および aPTT の変化がみられ，また，ラットのみで血栓または塞栓形成を示す病理組織学的所見がみられたが，これらの変化は毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの影響は一般的に用量依存性はなく，程度は小さく，重症度も軽微であった。ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験における凝固パラメータの変化は，6 週間の休薬期間後には回復したが，サルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験における凝固パラメータの変化は 6 週間の休薬期間終了時にもみられ，これは，休薬期間終了時においてもマルスタシマブの曝露が続いていたことによる可能性が高いと考えられた。

ラットおよびサルでみられた PT 短縮，フィブリノゲン減少および D-ダイマー増加は凝固カスケードの活性化と一致した変化で，マルスタシマブの作用メカニズムに関連する予測される薬理作用であり，毒性学的意義の乏しい変化と考えられる。

これらの薬理作用の所見と矛盾して，ラットを用いた 3 ヵ月および 6 ヵ月間反復投与毒性試験ならびにサルを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験における一部の用量で，PT および aPTT 延長がみられた。これらの影響は，被験物質投与に関連した過剰な出血を示す一般状態の変化（皮下出血や採血後の止血困難など）または出血と一致する病理組織学的所見を伴わなかったことから毒性変化ではないと考えられた。

ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験において，対照群を含むすべての投与群の一部の動物で肺（軽微な急性で器質化した血栓または塞栓，屈折性物質を伴う軽微な細胞浸潤，好塩基性または非好塩基性の軽微な異物）または投与部位の尾静脈（軽微な急性で器質化した血栓または塞栓）に被験物質投与に関連する病理組織学的所見がみられた。これらの凝固パラメータの変化を伴った血栓または塞栓はマルスタシマブの薬理作用と関連するものと考えられたが，重症度が軽微であったこと，また二次的な毒性変化がみられなかったことから，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

凝固カスケードに対する同様の影響は，マルスタシマブとバイパス製剤の併用投与による探索的薬力学試験でも認められた（M2.6.6.8.8.3）。

PT，aPTT およびフィブリノゲンに関する影響を伴わない D-ダイマー増加は，ノボノルディスクファーマの TFPI に対するヒト化モノクローナル抗体であるコンシズマブの健康成人または血友病患者への単回静脈内または皮下投与後においても認められている[48]。

4.7.10.2. 皮下投与部位反応

単回投与局所刺激性試験では，300 mg/kg（臨床濃度である 150 mg/mL と一致するように選択され，非臨床試験全体で皮下投与されたマルスタシマブの最高用量）で，毒性学的意義の乏しい所見として，対照群と比較して皮下投与部位の軽微な浮腫または出血を伴う軽微から軽度の混合性細胞浸潤の発現頻度の増加または重症度の増加が認められた。これらの所見は，投与後 1 日に安楽殺した動物に認められた。投与後 8 日に安楽殺した動物の投与部位では病理組織学的所見が認められなかったことから，回復性が示された。

ラットを用いた 8 日間投与毒性試験では，3 mg/kg/週の皮下投与において，剖検でマルスタシマブ投与に関連する毒性学的意義の乏しい投与部位の色調異常が認められ，投与部位の病理組織学的所見としてみられた混合性細胞浸潤，壊死および出血との関連が認められた。

ラットの皮下投与部位に認められた病理組織学的所見および剖検所見はいずれも軽微から軽度であり，関連する一般状態の変化が認められなかったことから，毒性変化とはみなさなかった。

ラット（180 mg/kg/週）またはサル（90 mg/kg/週）を用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験において，皮下投与部位にマルスタシマブ投与に関連する剖検または病理組織学的所見はみられなかった。

4.7.10.3. その他の所見

ラットまたはサルを用いた反復投与毒性試験において，マルスタシマブ投与に関連する毒性学的意義の乏しい血液生化学パラメータへの影響として，グロブリン，総タンパク質，アルブミンおよび A/G 比の変化がみられたが，これらの変化は高濃度のマルスタシマブが投与されたことによるものと考えられた。アルブミン減少はマルスタシマブ投与に関連すると考えられ，マルスタシマブがアルブミンと競合して胎児性 Fc 受容体と結合し，その結果，アルブミンの分解率が上昇して血清中アルブミン濃度が低下したためと考えられた[49,50]。これらの血液生化学パラメータの変化は，ラットおよびサルにおいて，6 週間の休薬期間終了後にはみられず，また一

般状態の変化または病理組織学的所見もみられなかったことから毒性変化ではないと考えられた。

5. 総括及び結論

以上の非臨床試験成績は，マルスタシマブの臨床使用を支持するものと考えられた。

6. 参考文献

1 Baugh RJ, Broze GJ Jr, Krishnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. J Biol Chem 1998;273(8):4378-86.

2 Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, et al. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. Nature 1989; 338(6215):518-20.

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

4 World Federation of Hemophilia. Guidelines for the management of Hemophilia, 3rd edtion. Srivastava A, Santangostino E, Dougall A, et al. Haemophilia. 2020;26 Suppl 6:1-158. Doi: 10.1111/hae.14046.

5 Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. N Eng J Med. 2007;357(6):535-44.

6 Manco-Johnson MJ, Kempton CL, Reding MT, et al. Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART). J Thromb Haemost. 2013;11(6):1119-27.

7 Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. N Engl J Med. 2013;368(3):231-9.

8 Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B, et al. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. Blood. 2003;101(11):4387-92.

9 Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, et al. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. Blood. 1988;72(6):2020-5.

10 Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. Blood. 2007;109(5):1931-7.

11 Piro O, Broze GJ Jr. Comparison of cell-surface TFPIalpha and beta. J Thromb Haemost. 2005;3(12):2677-83.

12 Broze GJ Jr, Lange GW, Duffin KL, et al. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. Blood Coagul Fibrinolysis. 1994;5(4):551-9.

13 Luddington RJ. Thromboelastography/thromboelastometry. Clin Lab Haematol. 2005;27(2):81-90.

[14] Waters EK, Genga RM, Schwartz MC, et al. Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. Blood. 2011;117(20):5514-22.

[15] Welsch DJ, Novotny WF, Wun TC. Effect of lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI) on thromboplastin-induced coagulation of normal and hemophiliac plasmas. Thromb Res. 1991;64(2):213-22.

[16] Dahm AEA, Andersen TO, Rosendaal F, et al. A novel anticoagulant activity assay of tissue factor pathway inhibitor I (TFPI). J Thromb Haemost. 2005;3(4):651-8.

[17] Greaves M, Preston FE. Approach to the bleeding participant. In: Coleman, RW, Hirsh, J, Marder, VJ, Clowes, AW, Geroge, JN, editors. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 4th ed. Philadelphia, PA. 2001:783-93.

[18] Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003;33(1):4-15.

[19] 北島　勲，凝固・線溶と臨床検査，日本血栓止血学会誌 2008, 19(4): 462-6.

[20] Scharling B, Nielsen GG, Klitgaard T, et al. Comparison of coagulant activity of factor VII and activated factor VII activity assays when used for determination of recombinant activated factor VII levels in plasma. Blood Coagul Fibrinolysis. 2007;18(7):677-84.

[21] Dargaud Y, Beguin S, Lienhart A, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. Thromb Haemost. 2005;93(3):475-80.

[22] バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（薬食審査発 0323 第 1 号　平成 24 年 3 月 23 日）

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

[24] Mascelli MA, Zhou H, Sweet R, et al. Molecular, biologic, and pharmacokinetic properties of monoclonal antibodies: impact of these parameters on early clinical development. J Clin Pharmacol 2007; 47(5):553-65.

[25] Crawley JTB, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28(2):233-42.

[26] Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Pharm Sci 2004; 93(11):2645-68.

[27] Vugmeyster Y, Xu X, Theil, FP, et al. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. World J Biol Chem 2012; 3(4): 73-92.

[28] Drug-Drug Interaction Assessment for Therapeutic Proteins Guidance for Industry: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). June 2023. Available from: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/drug-drug-interaction-assessment-therapeutic-proteins-guidance-industry.

[29] Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 2001:21:15-23.

[30] Xing M, Yang Y, Huang J, et al. TFPI inhibits breast cancer progression by suppressing ERK/p38 MAPK signaling pathway. Genes and Genomics 2022;44:801-12.

[31] Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. Throm Haemost 2002;87:930-6.

[32] Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiu A et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. Cancer Res 2003;63(11):2997–3000.

[33] Cui XY, Tjonnfjord GE, Kanse SM, et al. Tissue factor pathway inhibitor upregulates CXCR7 expression and enhances CXCL12-mediated migration in chronic lymphocytic leukemia. Scientific Reports 2021;11:5127.

[34] Tinholt M, Vollan HKM, Sahlberg KK, et al. Tumor expression, plasma levels and genetic polymorphisms of the coagulation inhibitor TFPI are associated with clinicopathological parameters and survival in breast cancer, in contrast to the coagulation initiator TF. Breast Cancer Research 2015;17:44.

[35] Fei X, Wang H, Yuan W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-1 is a valuable marker for the prediction of deep venous thrombosis and tumor metastasis in patients with lung cancer. BioMed Res International 2017;2017:Article ID 8983763.

[36] Tinholt M, Sandset PM, Iversen N. Polymorphisms of the coagulation system and risk of cancer. Thromb Res 2016;140(Suppl 1):S49-54.

[37] Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood. 1987;70(1):165-72.

[38] Andrew M, Vegh P, Johnston M, et al. Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood. 1992;80(8):1998-2005.

[39] Miller BE, Bailey JM, Mancuso TJ, et al. Functional maturity of the coagulation system in children: An evaluation using thrombelastography. Anesth Analg. 1997;84:745-8.

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

[41] Bajaj MS, Pendurthi U, Koenig K, et al. Tissue factor pathway inhibitor expression by human pleural mesothelial and mesothelioma cells. Eur Respir J 2000 June;15(6):1069-78.

[42] Rugeri L, Susen S, Bard JM, et al. Monocyte tissue factor response is decreased in patients with hyperlipidemia. Thromb Res 1999 November 15;96(4):283-92.

[43] Wright JR, Appleby JA, Chan D, et al. Activated platelets induce tissue factor pathway inhibitor in peripheral blood monocytes. J Thromb Haemost 2007;5 (Supplement 2)(O-W-028).

[44] Ott I, Andrassy M, Zieglgansberger D, et al. Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1. Blood 2001 June 15;97(12):3721-6.

[45] Edstrom CS, Calhoun DA, Christensen RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in human fetal and placental tissues. Early Hum Dev 2000 August;59(2):77-84.

[46] Hall WC, Price-Schiavi SA, Wicks J, et al. Tissue Cross-Reactivity Studies for Monoclonal Antibodies: Predictive Value and Use for Selection of Relevant Animal Species for Toxicity Testing. In: Cavagnaro JA, editor. Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals: A Science-Based Approach to Facilitating Clinical Trials. Wiley-Interscience; 2008. p. 208-40.

[47] Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, et al. Use of tissue cross-reactivity studies in the development of antibody-based biopharmaceuticals: history, experience, methodology, and future directions. Toxicol Pathol 2010 December;38(7):1138-66.

[48] Chowdary P, Lethagen S, Friedrich U, et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. J Thromb Haemost 2015;13(5):743-54.

[49] Kim J, Bronson CL, Hayton WL, et al. Albumin turnover: FcRn-mediated recycling saves as much albumin from degradation as the liver produces. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:G352-G360.

[50] Stein C, Kling L, Proetzel G, et al. Clinical chemistry of human FcRn transgenic mice. Mamm Genome 2012; 23:259-69.