TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1
本項で使用する用語・略語 2
1. 緒言 2
参考文献 4

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 3

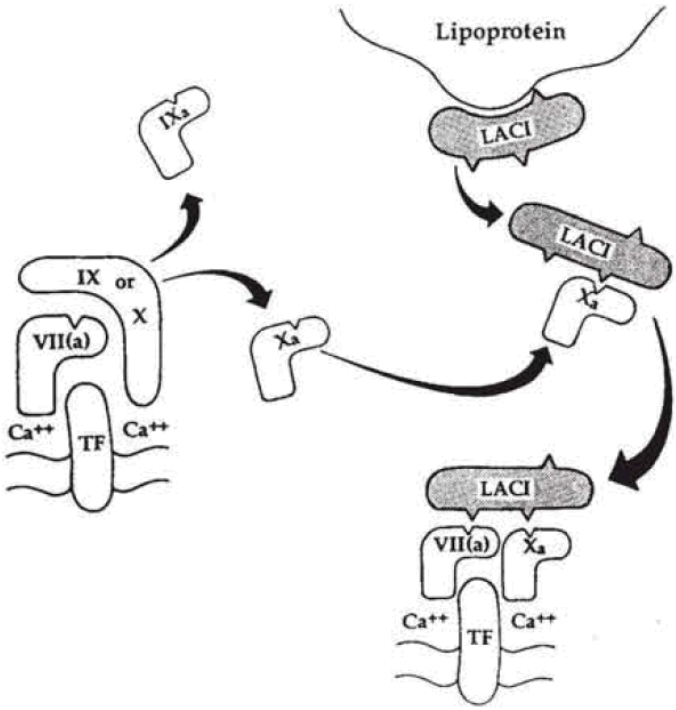
本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
dPT	dilute prothrombin time：希釈プロトロンビン時間
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
K1	Kunitz domain 1：Kunitz ドメイン 1
K2	Kunitz domain 2：Kunitz ドメイン 2
LACI	lipoprotein-associated coagulation inhibitor：リポタンパク質関連凝固インヒビター
rFVIIa	recombinant factor VII activated：遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子
SPR	surface plasmon resonance：表面プラズモン共鳴
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

1. 緒言

マルスタシマブ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，トロンビン生成を負に制御する[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，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 の 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 阻害については多くの 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。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。

マルスタシマブの効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（M1.8.1）に記載した。

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.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 2
本項で使用する用語・略語 3
1. まとめ 5
2. 効力を裏付ける試験 7
2.1. In vitro 薬理試験 7
2.1.1. 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 7
2.1.2. SRP 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 7
2.1.3. 生化学的試験でのマルスタシマブの活性 7
2.1.4. 非血友病のヒト全血に対するマルスタシマブの活性 8
2.1.5. 非血友病血漿に対する活性 9
2.1.6. 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 10
2.1.7. 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 15
2.1.8. 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 16
2.2. In vivo 薬理試験 17
2.2.1. 血友病マウスモデルに対するマルスタシマブの活性 17
2.2.2. In vivo 併用投与試験 21
2.2.2.1. 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 21
2.2.2.2. 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 22
2.2.2.3. 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 24
2.2.3. カニクイザ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 24
3. 副次的薬理試験 25
4. 安全性薬理試験 25
5. 薬力学的薬物相互作用試験 26
6. 考察及び結論 26

7. 図表 27
参考文献 27

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 11
Table 2. 最大トロンビン生成量（nmol/L） 14
Table 3. トロンビン生成開始までの時間（分） 16

LIST OF FIGURES

Figure 1. 凝固カスケードの経路図 5
Figure 2. TFPI アイソフォームドメイン構造 6
Figure 3. 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） 8
Figure 4. 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 9
Figure 5. 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 10
Figure 6. 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 12
Figure 7. 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 13
Figure 8. 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） 15
Figure 9. 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 18
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作用持続時間 18
Figure 11. 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 19
Figure 12. 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 20
Figure 13. カニクイザ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 25

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
aPCC	activated prothrombin complex concentrate：活性化プロトロンビン複合体製剤
aPTT	activated partial thromboplastin time：活性化部分トロンボプラスチン時間
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 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_t	area under the plasma concentration-time curve from zero to time t：0 時間から t 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
BID	twice a day：1 日 2 回
BU	Bethesda unit：ベセスダ単位
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
dPT	dilute prothrombin time：希釈プロトロンビン時間
EC_{50}	median effective concentration：50%有効濃度
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
IgG	immunoglobulin G：免疫グロブリン G
JET	jacketed external telemetry：体外ジャケット式テレメトリー
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
PBS	phosphate buffered saline：リン酸緩衝生理食塩液
PK	pharmacokinetics：薬物動態
PT	prothrombin time：プロトロンビン時間
QT	time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in the electrocardiogram：心電図上の QRS 群の開始から T 波の終了までの時間
QTc	QT interval, corrected for heart rate：心拍数で補正した QT 間隔
QW	once a week：週 1 回
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
RR	time from the peak of one QRS complex to the peak of the next：2 つの QRS 波の頂点の間の時間
SE	standard error：標準誤差
SPR	surface plasmon resonance：表面プラズモン共鳴
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

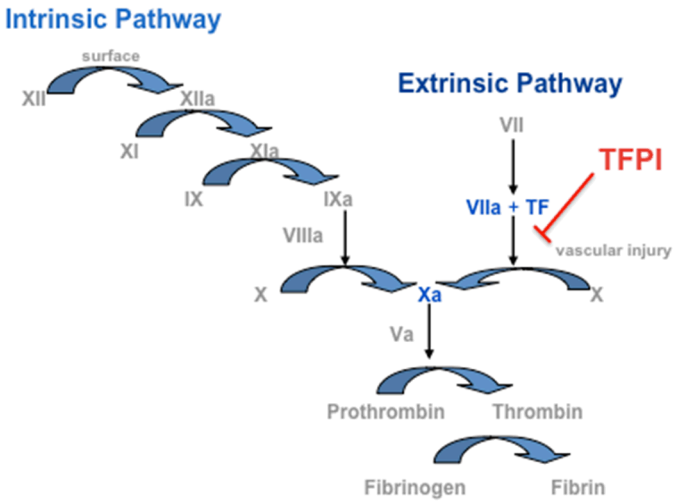
用語・略号	省略していない表現または定義
TGA	thrombin generation assay：トロンビン生成試験
T_{max}	time of occurrence of C_{max}：最高血漿中濃度到達時間

1. まとめ

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[1]。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[2,3]。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[4]。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 1）。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。凝固系が正常な場合，TFPI 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 1.　凝固カスケードの経路図

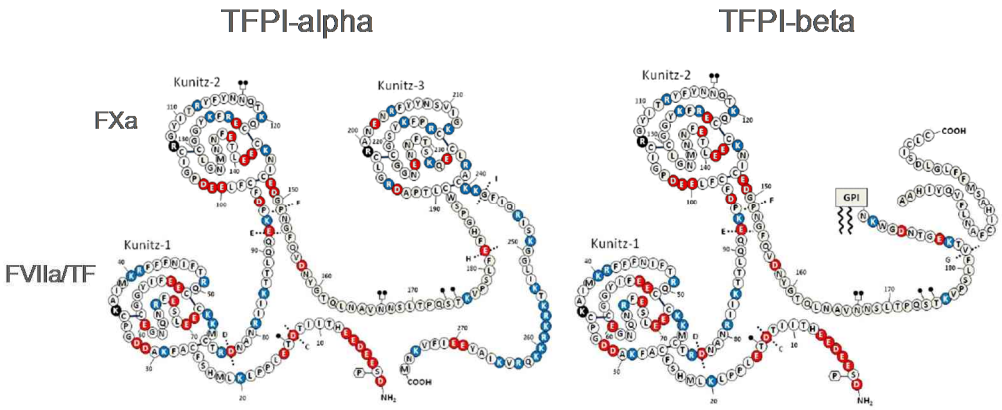


TF が損傷部位に流入すると凝固反応が開始する。TF は FVIIa と複合体を形成し，この複合体が FX を FXa に変換する。TFPI は TF/FVIIa 経路を強力に阻害するため，この経路を介した initiation phase の FXa 生成量ではトロンビン生成量を維持できない[5]。TFPI の K2 ドメインが FXa に結合すると，K1 ドメインが TF/FVIIa の結合位置に配置され，FVIIa の酵素機能を阻害すると考えられている[5,6]。このように，TFPI は血友病 A および血友病 B 患者で機能する唯一の経路である外因系経路のメディエータを阻害する。

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 2）。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（PT 法の標準試薬を希釈して用いる改良法）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 2.　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[5,7]，活性化血小板から放出される[8,9]。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[10]。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[11]。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[6]。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[5]。

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. 効力を裏付ける試験

2.1. In vitro 薬理試験

2.1.1. 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

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_072904，概要表：2.6.3.1

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，ウサギおよびカニクイザル）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。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，カニクイザル：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。

2.1.2. SRP 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

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_121926，概要表：2.6.3.1

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。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（KD）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 KD 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。

2.1.3. 生化学的試験でのマルスタシマブの活性

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_085202，概要表：2.6.3.1

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。

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。

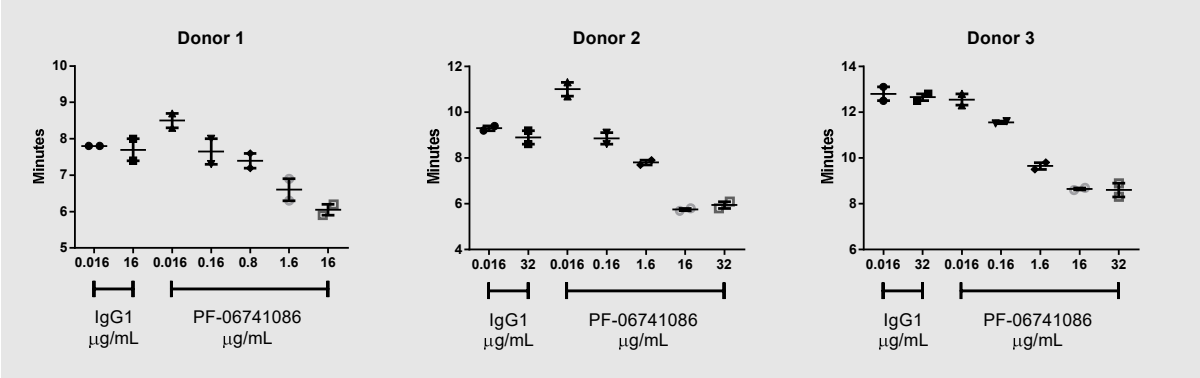
2.1.4. 非血友病のヒト全血に対するマルスタシマブの活性

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_142056，概要表：2.6.3.1

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 を用いて測定した。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[12]。

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 3）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[13]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 3.　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。

2.1.5. 非血友病血漿に対する活性

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_123404，概要表：2.6.3.1

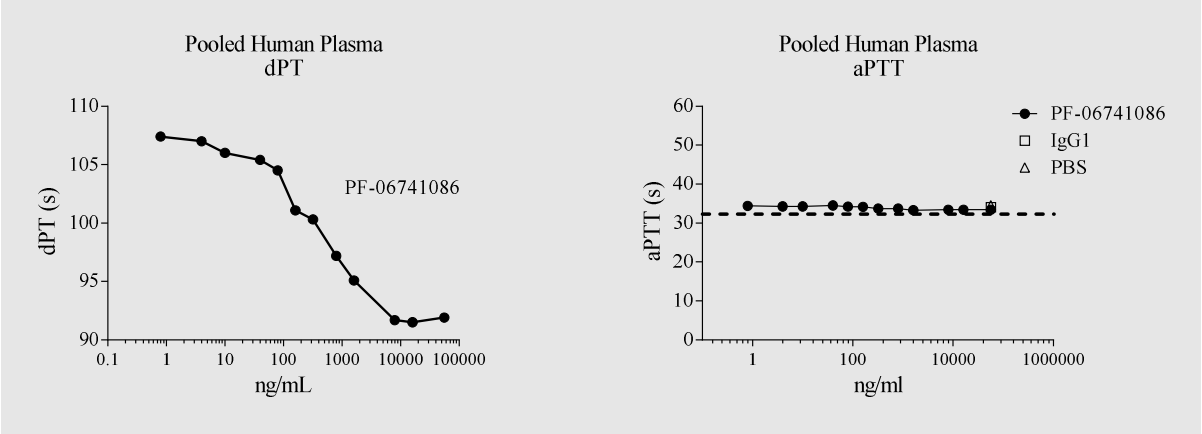
十分な凝固因子を含む非血友病のヒト血漿に対するマルスタシマブの阻害活性を，TGA，aPTT および dPT 法による in vitro 濃度反応性試験で評価した。dPT 法では，外因系経路の活性化後における血漿凝固時間を測定し，TFPI の機能と強い相関が示されている[14,15]。

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 4），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[16]。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 4）。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カニクイザ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。非血友病のウサギおよびカニクイザルの血漿にマルスタシマブを添加したところ，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，ウサギおよびカニクイザルの血漿でそれぞれ 629 および 273 ng/mL であった。

Figure 4.　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

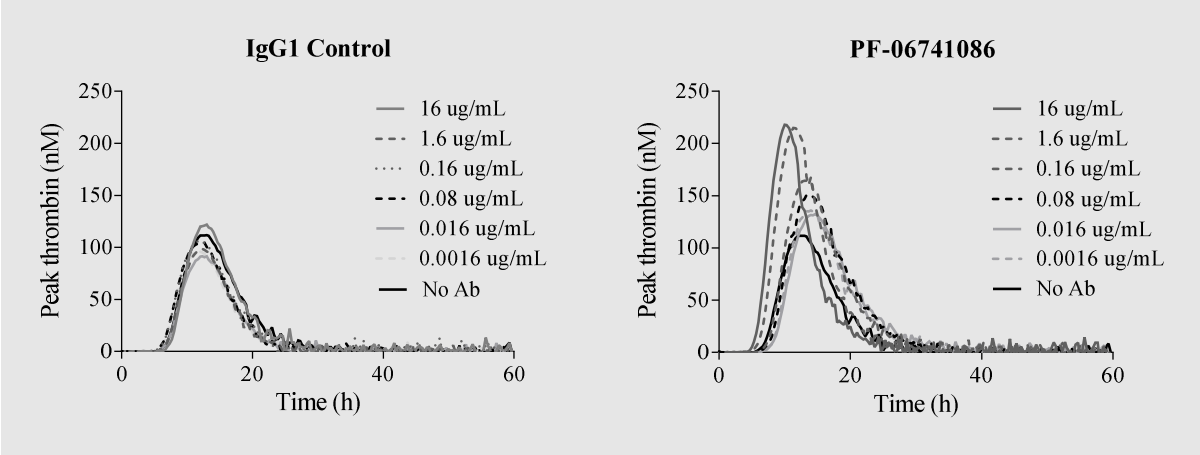


非血友病ドナーから採取したクエン酸加乏血小板血漿にマルスタシマブ（PF-06741086）または対照物質の IgG1 を各濃度で添加した際の dPT および aPTT（秒）に対する影響を評価した。マルスタシマブの濃度増加に伴い，dPT の濃度依存的な反応が認められた。マルスタシマブの濃度増加による aPTT の変化は認められず，これは外因系経路を標的とするマルスタシマブの機序と一致していた。対照物質である IgG1 または PBS の添加による dPT および aPTT の変化は認められなかった。非血友病のヒト血漿における正常な aPTT を（----）で示す。

TGA は生成開始までの時間，活性期および不活性期を含むトロンビン生成の複数のフェーズを測定する[17]。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 5）。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。

Figure 5.　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。

2.1.6. 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

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_135025，PF-06741086_[redacted]_122443，概要表：2.6.3.1

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。

[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）

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

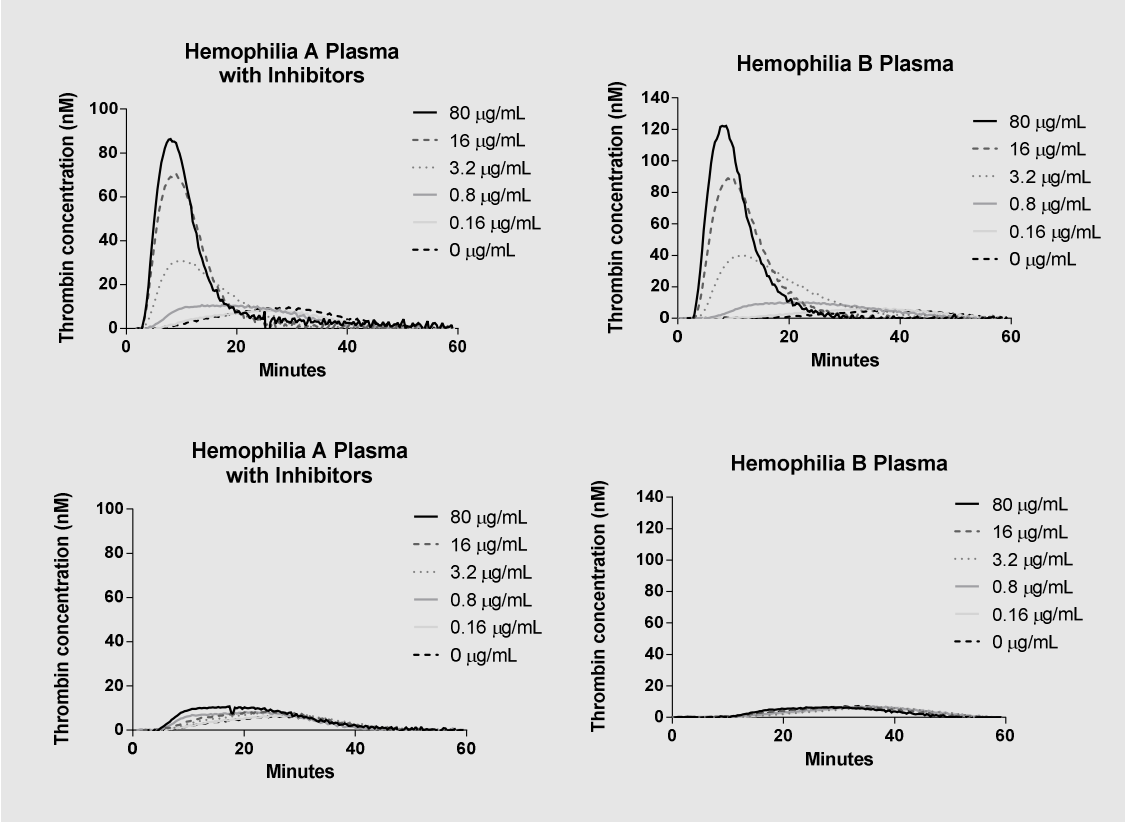
血漿	マルスタシマブ dPT EC_{50} (ng/mL)
血友病 A（GK-897-3292）	385.7
血友病 A（GK-895-3332）	450.1
血友病 A（GK-894-3414）	349.0
血友病 A（GK-899-3394）	434.9
インヒビター保有血友病 A（GK-1838-3068）176 BU	380.5
血友病 B（GK-929-3407）	471.4

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）[18]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 6）。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。

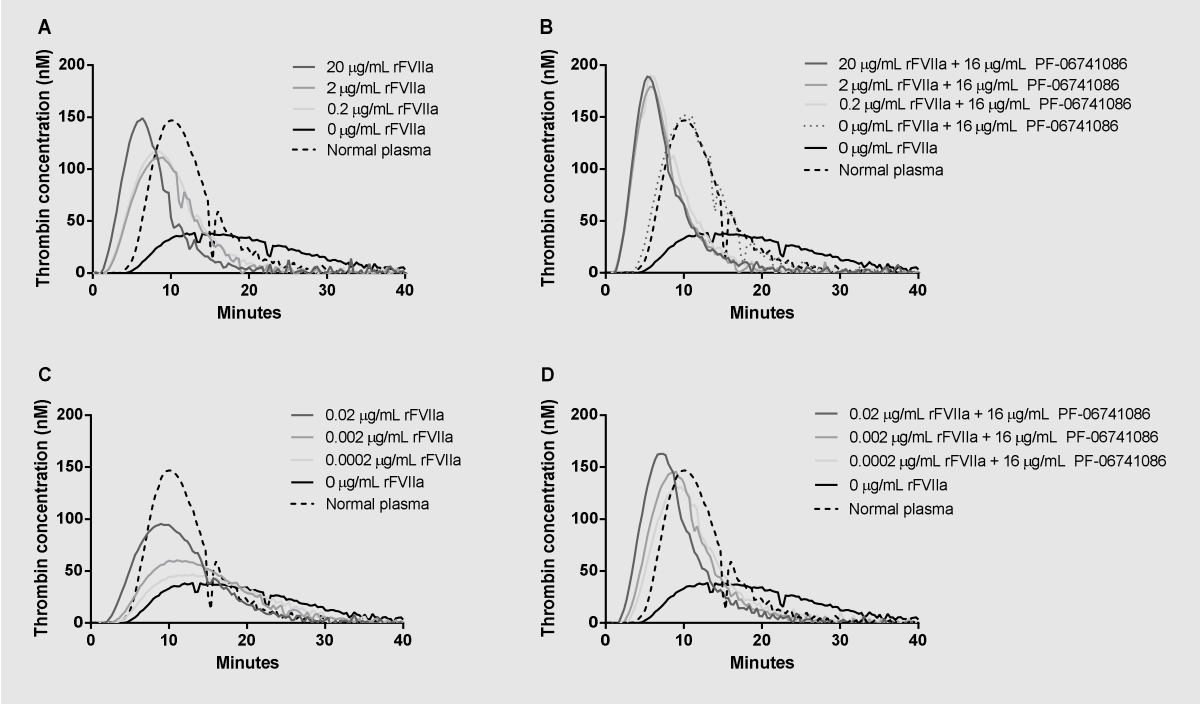
Figure 6.　インヒビター保有血友病 A 血漿および血友病 B 血漿を用いたマルスタシマブのトロンビン生成試験



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 7）。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 7）。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 7.　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。

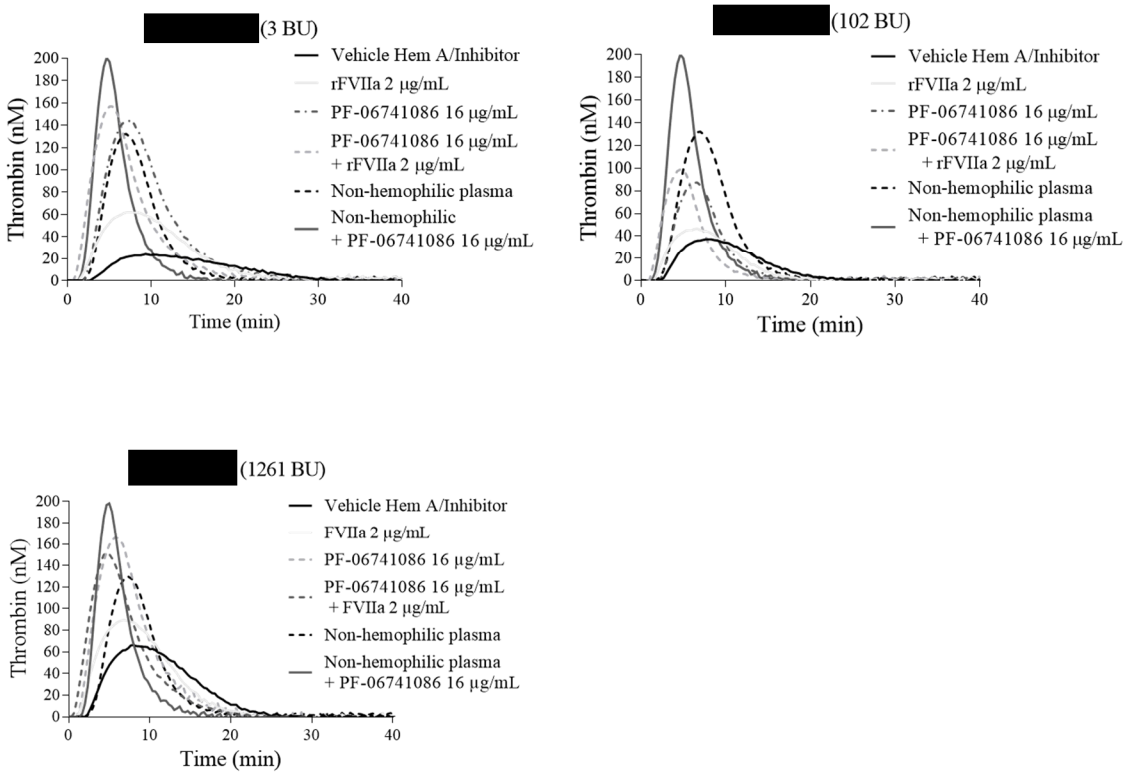
別の試験（PF-06741086_[redacted]_122443 試験）では，異なる血友病 A 患者（インヒビター保有患者を含む）および血友病 B 患者から採取した血漿を用いて，トロンビン生成におけるマルスタシマブ（16 µg/mL）の TFPI 阻害活性を rFVIIa（2 µg/mL）の存在下および非存在下で評価した（Table 2）。凝固因子活性は，いずれのドナーでも 1%未満であった。これらの試験で用いた rFVIIa 濃度（2 µg/mL）は，rFVIIa 投与後の血漿中濃度に相当し[19]，血友病 A 血漿に 0.2，2 または 20 µg/mL の rFVIIa を添加したと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 7）。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 7，Figure 8 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 8. **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。

2.1.7. 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

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_045123，概要表：2.6.3.1

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。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[20]。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
血友病 B（FIX 中和抗体をスパイク）（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。

2.1.8. 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

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_103228，概要表：2.6.3.1

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。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[20]の範囲内であった。

2.2. In vivo 薬理試験

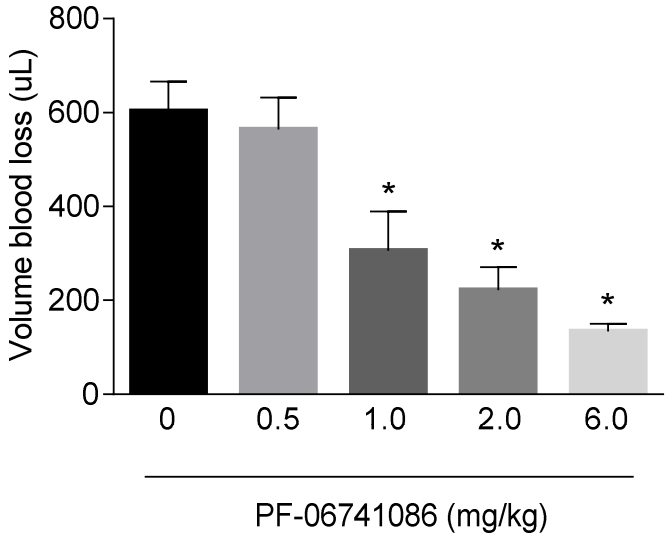
2.2.1. 血友病マウスモデルに対するマルスタシマブの活性

報告書番号：PF-06741086_[redacted]_135244，PF-06741086_[redacted]_121321，概要表：2.6.3.1

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 9）。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%）。

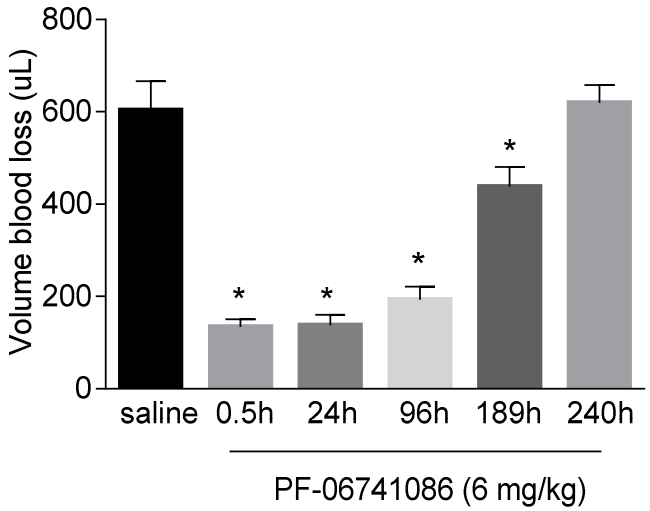
雄の血友病 A マウス（5 匹/群）を用いて，重度の尾部出血に対するマルスタシマブの出血抑制作用の持続時間を測定した（PF-06741086_[redacted]_135244 試験）。マウスの尾部切断前の所定の時点に，固定用量のマルスタシマブ（6 mg/kg）または溶媒を静脈内投与した（Figure 10）。作用の持続時間は，溶媒対照群と比較して出血量が減少した時間と定義した。マルスタシマブの投与後 0.5 時間の出血量は溶媒対照群と比較して減少し（77.9%），出血後の抑制作用は投与後 189 時間持続した（27.3%）。出血量は投与 240 時間後に溶媒対照群と同程度となった。

Figure 9.　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。

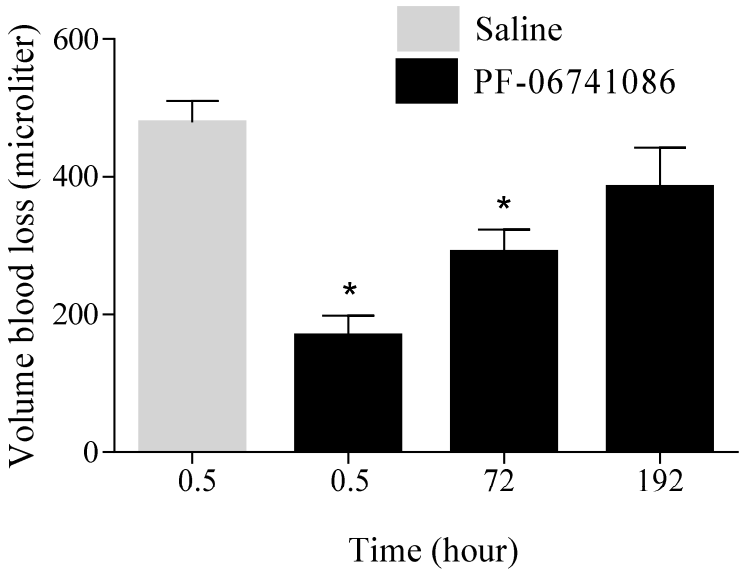
Figure 10.　血友病 A の尾部出血マウスモデルに対するマルスタシマブの作用持続時間



*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 11），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 11.　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

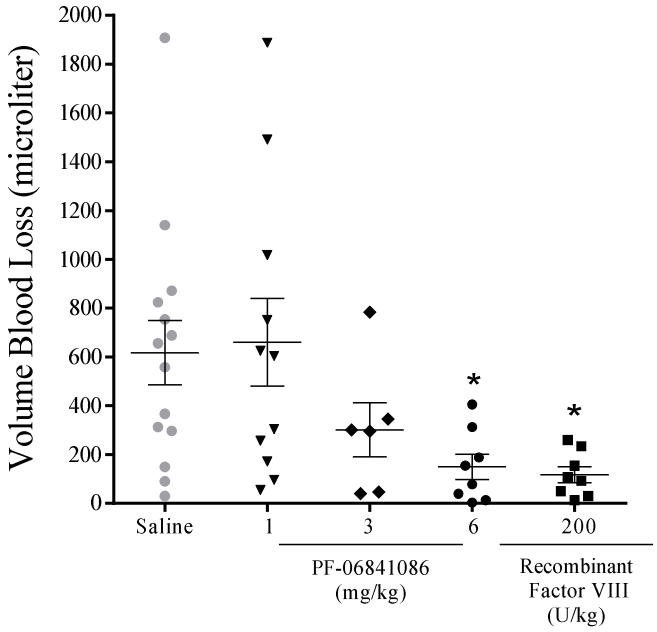


*p < 0.05，分散分析後の Dunnett 多重比較検定
血友病 B マウスにマルスタシマブ（PF-06741086）（6 mg/kg）を静脈内投与後，規定時点に尾部を切断した。尾部切断後の総出血量を測定した。対照群の血友病 B マウスには生理食塩液を投与した。動物数は 5 匹/群。図中の棒は平均値 ± SE を示す。

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 12）。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 12.　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。

2.2.2. 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探索的薬力学試験を実施し，薬力学的な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（M2.4.1）。

これらの併用投与試験の実施は規制当局との相談を基に実施された[a]。

2.2.2.1. 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

報告書番号：[redacted]MA086，概要表：2.6.3.2

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。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。また，各投与群にサテライト群（各群 8 または 12 匹，スパースサンプリングにより各測定時点で 4 匹から採血）を設け，マルスタシマブおよびノボセブン®の PK 測定を実施した。

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，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，これ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

---

[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）

（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，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ことから， マルスタシマブ（50 mg/kg）とノボセブン®（3 mg/kg）の併用による影響が大きいことが示された。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。

各用量のノボセブン®を単独投与またはマルスタシマブと併用投与したところ，被験物質に関連する用量非依存的な PT（群平均値）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用量非依存的なグルコース値（群平均値）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。試験 8 日のマルスタシマブ（50 mg/kg）群，マルスタシマブ（50 mg/kg）およびノボセブン®（3 mg/kg）併用群およびマルスタシマブ（50 mg/kg）およびノボセブン® ［0.8 mg/kg（0.4 mg/kg BID）］併用群の C_{max} はそれぞれ 1,670，1,690 および 1,750 µg/mL，AUC_t はそれぞれ 41,800，45,400 および 43,200 µg•h/mL，T_{max} はそれぞれ 0.083，1 および 1 時間であった。ノボセブン®の投与後に T_{max} が延長した。

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_{max} 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 日に低下した。

マルスタシマブおよびノボセブン®の曝露量（C_{max} および AUC_t）は，それらの併用投与による影響を受けなかった。

2.2.2.2. 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

報告書番号：[redacted]GR258，概要表：2.6.3.2

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。

マルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg/回）を単独皮下投与した場合，ファイバ®［試験 8～10 日に 10（5 BID），50（25 BID）または 100（50 BID）U/kg/日］を単独静脈内投与した場合，マルスタシマブ（試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg/回）を皮下投与およびファイバ®［試験 8～10 日に 10（5 BID），50（25 BID）または 100（50 BID）U/kg/日］を外側尾静脈から静脈内投与して併用した場合のいずれにおいても，被験物質に関連する死亡例はなく忍容性が認められた。

以下の結果は，それぞれの対照群における平均値と比較した値である。

試験 1 日および 8 日に 30 mg/kg/日のマルスタシマブを単独皮下投与したとき，試験 10 日にトロンビン生成の指標であるトロンビン・アンチトロンビン複合体（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。

試験 8～10 日のファイバ®の単独静脈内投与では，試験 10 日に，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。100（50 BID）U/kg/日では，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。過去にラットへのファイバ®投与により，PT の短縮および aPTT の延長が認められている[21]。また，100（50 BID）U/kg/日で試験 10 日に好中球，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。100（50 BID）U/kg/日の 1 例で，軽度の混合性細胞浸潤とともに，軽度の血栓・塞栓に関連する尾部の変色が認められた。

ファイバ®［10（5 BID）U/kg/日以上］とマルスタシマブ（30 mg/kg/日）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（2.30～10.84 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，すべてのファイバ®用量でマルスタシマブの併用により上昇したが，aPTT および PT の変化はファイバ®単独投与時と同様であった。100（50 BID）U/kg/日のファイバ®をマルスタシマブ（30 mg/kg/日）と併用投与したところ，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（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。ファイバ®［10（5 BID）U/kg/日以上］とマルスタシマブ（30 mg/kg/日）の併用投与により，平均血小板容積の増加（1.05～1.11 倍）も認められた。被験物質に関連する血栓・塞栓の発現頻度および分布は，ファイバ®単独およびマルス

タシマブとの併用投与時と同様であったが，併用投与時の肺における発現頻度は対照群と同様であった。

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 1～8 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。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。

2.2.2.3. 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

報告書番号：[redacted]GR075，概要表：2.6.3.2

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。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），臨床病理検査，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。

2.2.3. カニクイザ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

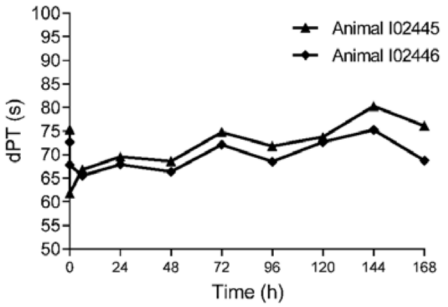
報告書番号：8299672，概要表：2.6.3.2

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。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

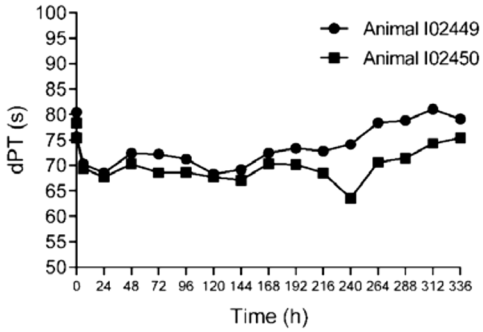
と比較して dPT の短縮がみられた。マルスタシマブ 3 mg/kg を皮下投与した動物では，dPT がベースライン値と比較して，投与 24 時間後まで漸減し，その後，投与 240 時間後まで維持された。マルスタシマブ 1 mg/kg を静脈内投与した動物では，投与 5 分後で dPT が短縮し，その後，投与 72～96 時間後にベースライン値まで回復した。マルスタシマブ 10 mg/kg を皮下投与した動物では，投与後の限定された時点のサンプルについて評価し，投与 24 時間後では，dPT は 107.7 および 106.8 秒からそれぞれ 92.7 および 92.0 秒に短縮された。

Figure 13. カニクイザ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）

マルスタシマブはカニクイザルにおいて 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。

3. 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，カニクイザ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。

4. 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)ガイドラインに従い，カニクイザルを用いた 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，M2.6.7.7C）。

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。評価したいずれの神経学的パラメータでもマルスタシマブ投与に関連する変化（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を試験 1，90 および 130 日に評価）は認められなかった。マルスタシマブ投与に関連する呼吸数の変化（試験 1，

43，46，85，88，90 および 128 日にケージ横で用手計測）は認められなかった。体表面心電図測定（試験 85 日の静脈内投与前および投与後 30 分以内ならびに試験 85 日の皮下投与後約 72 時間）に基づく，マルスタシマブ投与に関連する QT，QTc および RR 間隔の異常は認められなかった。JET の定期的測定（試験 2，8，15，22，36，50，64 および 86 日の投与前 3 時間から投与後 21 時間）に基づく，マルスタシマブ投与に関連する収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧，心拍数，脈拍および活動性への影響は認められなかった。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

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（2.6.2.2.1.6，2.1.7，2.1.8 項）および in vivo（2.6.2.2.2.2 項）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。

6. 考察及び結論

効力を裏付ける試験において，ヒト TFPI および非臨床試験動物種由来の TFPI に対するマルスタシマブの結合親和性（KD）を SPR 法を用いて評価したところ，検討したすべての動物種の TFPI に対して数 nmol/L 以下の KD（ヒト：3.7，マウス：0.575，ラット：1.57，ウサギ：4.25，カニクイザル：1.22 nmol/L）を示した。ヒト TFPI K2 および TFPI K1K2 に対するマルスタシマブの KD は類似していたが，ヒト TFPI K1 には結合しなかった。

純化系ならびに血友病および非血友病ドナーの血漿を用いた多数の試験で，マルスタシマブは止血促進作用を示した。複数の血友病血漿を TGA および dPT 法で評価した結果，マルスタシマブの止血促進作用が示された。マルスタシマブは，血友病 A 血漿，インヒビター保有血友病 A 血漿，血友病 B 血漿（FIX の中和抗体またはマウス FIX 阻害モノクローナル抗体をスパイクした血漿を含む）といった複数の血友病血漿のトロンビン生成量を濃度依存的に増加させた。

マルスタシマブ（16 µg/mL）とノボセブン®（2 µg/mL）の併用添加では，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が，その程度は，非血友病血漿にマルスタシマブのみを添加した際にみられた最大トロンビン生成量を超えなかった。インヒビター保有の血友病 A および血友病 B の血漿にマルスタシマブおよびファイバ®を併用で添加したところ，それぞれを単独で添加した際と比較して最大トロンビン濃度の上昇がみられたが，非血友病の正常血漿を用いた検討での結果の範囲内であった。dPT 法で外因系経路を評価した結果，複数の血友病血漿に対するマルスタシマブの止血促進作用が示された。aPTT 法でのマルスタシマブの効果はわずかであり，血漿中で外因系経路の TFPI 活性を阻害するマルスタシマブの機序と一致していた。非血友病の全血を用いて TEG を評価した。インヒビター保有の血友病血漿にマルスタシマブおよびバイクロット®を併用で添加したところ，それぞれを単独で添加した際と比較して，最大トロンビン濃度の上昇を含むトロンビン生成量の増加がみられたが，非血友病の正常血漿を用いた検討の範囲内の増加であった。

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。尾部出血マウスモデルにマルスタシマブを 1 mg/kg 以上投与したときの出血量は，溶媒対照群と比較して減少した。この出血の抑制作用は，マルスタシマブ（6 mg/kg）を投与した血友病 A マウスで最長 189 時間，血友病 B マウスで最長 72 時間持続した。出血または血管傷害を誘発させた血友病マウスにマルスタシマブ（6 mg/kg）を投与したところ，出血量が減少し血餅形成が促進された。

マルスタシマブとバイパス製剤の併用投与の効果を検討す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（50 mg/kg）およびノボセブン®（3 mg/kg）を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。また，マルスタシマブ（30 mg/kg/日）とファイバ®［10（5 BIF）U/kg/日以上］の併用投与でトロンビン・アンチトロンビン複合体濃度および血小板容積の上昇がみられた。マルスタシマブ（30 mg/kg/日）とバイクロット®（最大 180 µg/kg/日）の併用投与では，バイクロット®単独投与時と同様の効果がみられ，凝固パラメータに対する効果のみがみられた。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。

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，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（神経学的検査），呼吸系（呼吸数測定）および心血管系（JET による心電図および血行動態測定）に対する影響は認められなかった。

以上の薬理試験成績は，マルスタシマブの臨床使用を支持するものであった。

7. 図表

図表は本文中または概要表に示した。

参考文献

1 World Federation of Hemophilia. Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. Haemophilia. 2020;26 Suppl 6:1-158. doi: 10.1111/hae.14046.

2 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.

3 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.

[4] 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.

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

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

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

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

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

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] Elg M, Carlsson S, Gustafsson D. Effect of activated prothrombin complex concentrate or recombinant factor VIIa on the bleeding time and thrombus formation during anticoagulation with a direct thrombin inhibitor. Thromb Res. 2001;101:145-57.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 5
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS 14
2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY 15

2.6.3.1. Pharmacology: Overview

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
Binding (KD) to recombinant human TFPI (K1K2) from multiple species using SPR	rhTFPI K1K2 protein and TFPI K1K2 from mouse, rat, rabbit, and cynomolgus monkey	In vitro PF-06741086 (0.5 µg/mL) immobilized on sensor chip	WRDM	PF-06741086_[redacted]_072904
Binding (KD) to human TFPI (K1, K2, K1K2) using SPR	hTFPI K1, K2, and K1K2	In vitro PF-06741086 (0.5 µg/mL) immobilized on sensor chip	WRDM	PF-06741086_[redacted]_121926
Dose-dependent neutralization assays measuring FXa activity and TF/FVII/FX activity	rhTFPI K1K2	In vitro PF-06741086 or control IgG1 (0 up to 80000 ng/mL); (0 up to 32000 ng/mL)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_085202
Dose-dependent TFPI neutralization examined by TEG, clotting time (R) and clot formation time (K)	TFPI in normal human non-hemophilic whole blood	In vitro PF-06741086 or IgG1 (16 to 32000 ng/mL)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_142056
Inhibitory activity evaluated measuring aPTT (intrinsic pathway), dPT (extrinsic pathway), and TGA	non-hemophilic human, rabbit, and cynomolgus monkey plasma	In vitro PF-06741086 (0.8-56000 ng/mL) IgG1 control (56933 ng/mL) or PBS (vehicle)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_123404
Inhibitory activity (dose response) on plasma TFPI in human hemophilia A ± inhibitor; hemophilia B plasma; measuring dPT, aPTT, and TGA (with increasing concentrations of rFVIIa)	human hemophilia A and B plasma	In vitro PF-06741086 or IgG1 (0 to 80000 ng/mL or 16000 ng/mL) ±rFVIIa (0.0002 to 20 µg/mL)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_135025
Evaluation of PF-06741086 in combination with a fixed concentration of rFVIIa on thrombin generation (TGA) in severe hemophilic plasma	human hemophilia A and B plasma; non-hemophilic plasma	In vitro PF-06741086 (up to 16000 ng/mL) rFVIIa (2 µg/mL)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_122443
Evaluation of PF-06741086 alone and in combination with FEIBA (aPCC) on thrombin generation (TGA) in severe hemophilic plasma with inhibitor	human hemophilia A and B plasma; non-hemophilic plasma	In vitro PF-06741086 (up to 16000 ng/mL) aPCC (FEIBA®) (up to 1 U/mL)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_045123

2.6.3.1. Pharmacology: Overview

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
In vitro characterization of PF-06741086 activity in human hemophilia plasma in combination with BYCLOT	human hemophilia A and B plasma; non-hemophilic plasma	In vitro alone: PF-06741086 (16 µg/mL); Byclot FVIIa/FX (0.25/2.5 to 8/80 µg/mL) combination: PF-06741086 (16 µg/mL) + Byclot FVIIa/FX (0.5/5 to 2/20 µg/mL)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_103228
Primary Pharmacodynamics				
Pharmacodynamic effect in male cynomolgus monkey plasma demonstrated by dPT	male cynomolgus monkey plasma	In vivo single IV (1 mg/kg) or SC (3 or 10 mg/kg)	[redacted]	8299672
Dose response in correction of blood loss in a severe injury tail bleeding model	male hemophilia A mice	In vivo; IV PF-06741086 (0.5, 1, 2, 6 mg/kg)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_135244
Correction of blood loss in a severe injury tail bleeding model	male hemophilia B mice	In vivo; IV PF-06741086 (6 mg/kg)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_135244
Duration of action in the correction of a severe injury tail bleeding model	male hemophilia A mice	In vivo; IV PF-06741086 (6 mg/kg); 0-240 hr	WRDM	PF-06741086_[redacted]_135244
Activity in endothelial cell, laser induced injury model; intravital microscopy; visualization of platelet and fibrin deposition	male hemophilia A mice	In vivo; IV PF-06741086 (6 mg/kg) rFVIII (200 IU/kg)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_135244
Duration of action in the correction of a severe injury tail bleeding model	male hemophilia B mice	In vivo; IV PF-06741086 (6 mg/kg), 0.5 to 192 hours	WRDM	PF-06741086_[redacted]_121321
Correction of blood loss in a severe injury tail bleeding model	male hemophilia A mice	In vivo; IV up to 2 minutes post bleed onset, PF-06741086 (0, 1, 3 and 6 mg/kg) rFVIII (200 U/kg)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_121321
Activity in an endothelial cell laser induced injury model post injury; intravital microscopy; visualization of platelet and fibrin deposition	male hemophilia A mice	In vivo; IV immediately following injury, PF-06741086 (6 mg/kg)	WRDM	PF-06741086_[redacted]_121321
10-day IV investigative study of PF-06741086 and Novoseven®RT in male Wistar Han rats	male Wistar Han rats	In vivo; IV PF-06741086 50 mg/kg on Day 1 and Day 8; NovoSeven®RT (rFVIIa) (0.4, 1, or 3 mg/kg once daily) or 0.8 mg/kg (0.4 twice daily) on Days 8-10 alone or in combination with PF-06741086	WRDM	[redacted]MA086

2.6.3.1. Pharmacology: Overview

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
10-day subcutaneous (once weekly) or 3-day (twice daily) intravenous investigative study of PF-06741086 or Factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA) in male Wistar Han rats	male Wistar Han rats	In vivo SC: PF-06741086 (30 mg/kg/day) on Day 1 and 8 and/or IV: FEIBA 10 (5 BID), 50 (25 BID) and 100 (50 BID) U/kg/day on Day 8-10	WRDM	[redacted]GR258
10-day subcutaneous (once weekly) or 3-day (twice daily) intravenous investigative study of PF-06741086 or Byclot® in male Wistar Han rats	male Wistar Han rats	In vivo Single or combination SC PF-06741086 (30 mg/kg/dose, once weekly) or single or combination IV of Byclot® (60, 120, or 180/120 µg/kg/day; 2 doses on Day 8 and 1 dose on Day 10).	WRDM	[redacted]GR075
Safety Pharmacology				
NA[a]				
Pharmacodynamic Drug Interactions				
NA				

aPCC = activated prothrombin complex concentrate; aPTT = activated partial thromboplastin time; dPT = dilute prothrombin time; Factor Xa = factor X activated; FEIBA® = factor eight inhibitor bypassing activity; h = human; IgG1 = immunoglobulin G1; IU = international units; rh = recombinant human; rFVIII = recombinant factor VIII; rFVIIa = recombinant factor VII activated (eptacog alfa); SPR = surface plasmon resonance; TEG = thromboelastography; TFPI = tissue factor pathway inhibitor; TGA = thrombin generation assay; U = units; 1000 ng/mL = 1 µg/mL; WRDM = worldwide research, development and medical.

a. An assessment of safety pharmacology endpoints (neurological, respiratory, cardiovascular) was included in the 13-week GLP Non-Human Primate Toxicity Study (20062114; Tabulated Summary 2.6.7.7C).

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Binding (KD) to recombinant human TFPI (K1K2) by SPR, cross-species, cross-reactivity (KD) assessment	human, mouse, rat, rabbit, and cynomolgus monkey	In vitro dose response	PF-06741086 (Batch [redacted]: Lot [redacted]) (0.5 µg/mL) immobilized on sensor chip	N=2	KD (nM) Human = 3.7 ± 0.28 Mouse = 0.575 ± 0.05 Rat = 1.57 ± 0.04 Rabbit = 4.25 ± 0.05 Cynomolgus Monkey = 1.22 ± 0.03	No	PF-06741086_[redacted]_072904
Binding (KD) to human TFPI (K1, K2, K1K2) using SPR	human	In vitro dose response	PF-06741086 (Lot [redacted]/ [redacted]) (0.5 µg/mL) immobilized on sensor chip	N=4 (hTFPI K2) N=6 (hTFPI K1K2; hTFPI K1)	KD (nM) hTFPI K2 = 2.63 ± 0.08 hTFPI K1K2 = 7.91 ± 0.33 hTFPI K1 = no observed binding (up to high concentration 50 nM). Ka (1/Ms average) hTFPI K1K2 = 4.26E+06 hTFPI K2 = 1.07E+07 hTFPI K1 = not determined	No	PF-06741086_[redacted]_121926
Neutralization of rhTFPI K1K2 inhibition of: • FXa catalytic activity • FVIIa/TF mediated FX activation using two-stage chromogenic substrate assay	Recombinant human TFPI	In vitro dose response	PF-06741086 ([redacted]) or control IgG1 (0 to 80000 ng/mL); (0 to 32000 ng/mL)	N=1	EC_{50} = 1312 ng/mL (FXa) EC_{50} = 1985 ng/mL (FVIIa/TF mediated FXa)	No	PF-06741086_[redacted]_085202
Dose-dependent TFPI neutralization examined by TEG, clotting time (R) and clot formation time (K)	TFPI in normal human non-hemophilic whole blood	In vitro dose response	PF-06741086 ([redacted]) or Control IgG1 (16 to 32000 ng/mL)	3 donors	Dose-dependent decrease in clotting time (R) and clot formation time (K) compared to control IgG1. No change in maximum amplitude, a measure of clot strength, was observed.	No	PF-06741086_[redacted]_142056

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Inhibitory activity measured in hemostatic assays 1) aPTT (intrinsic pathway) 2) dPT (extrinsic pathway) 3) TGA thrombin generation	non-hemophilic human, rabbit, and cynomolgus monkey plasma	In vitro dose-response	PF-06741086 (Batch [redacted] / Lot [redacted]) In the rabbit (early research lot anti-TFPI 23; [redacted]; [redacted] used for Rabbit non-hemophilic plasma) (0.8-56000 ng/mL) IgG1 control (56933 ng/mL) or PBS (vehicle)	2 per group	aPTT: no effect dPT (ng/mL): Human EC_{50} = 406 Rabbit EC_{50} = 629 Cynomolgus Monkey EC_{50} = 273 Control IgG1 = no effect PBS (vehicle) = no effect TGA: Dose-dependent increase with 16 µg/mL of PF-06741086. Decrease in lag-time and increase in velocity index.	No	PF-06741086_[redacted]_123404

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Inhibitory activity (dose response) on plasma TFPI in human hemophilia A ± inhibitor, and hemophilia B plasma measured using hemostatic assays dPT, aPTT, and TGA (in the presence of increasing concentrations of rFVIIa)	human hemophilia A and B plasma	In vitro dose-response	In vitro dPT and aPTT: PF-06741086 (0.8 - 56000 ng/mL) IgG1 control (56933 ng/mL) TGA: PF-06741086 or IgG1 (0 to 80000 ng/mL or 16000 ng/mL) ±rFVIIa (0.0002 to 20 µg/mL) PF-06741086 ([redacted])	four severe human hemophilia A, one hemophilia A with inhibitor and one hemophilia B	dPT: Dose-dependent decrease seen in clotting time in all hem A ± inhibitor and hem B plasmas EC_{50} 349.0 to 471.4 ng/mL; peak thrombin increased, lag time decreased. aPTT: PF-06741086 addition did not alter clotting times. TGA: PF-06741086 (16000 ng/mL) with rFVIIa, increased peak thrombin and decreased lag time compared to rFVIIa alone. Thrombin generation restored to normal, non-hemophilic plasma levels.	No	PF-06741086_[redacted]_135025
Evaluation of PF-06741086 in combination with a fixed concentration of rFVIIa on thrombin generation (TGA) in severe hemophilic plasma	human hemophilia A and B plasma; non-hemophilic plasma	In vitro	PF-06741086 (0 - 16000 ng/mL) rFVIIa (2 µg/mL) non-hemophilic plasma PF-06741086 (0 and 16000 ng/mL) PF-06741086 ([redacted])	6 severe hemophilia A patients; 3 hemophilia A + inhibitor patients; 1 hemophilia B patient; non-hemophilic plasma	PF-06741086 + rFVIIa = induced an increase in peak thrombin levels PF-06741086 (16000 ng/mL) ± rFVIIa = comparable to those observed in non-hemophilic plasma; did not exceed the level observed in non-hemophilic plasma with 16 µg/mL of PF-06741086.	No	PF-06741086_[redacted]_122443

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Evaluation of PF-06741086 alone and in combination with FEIBA (aPCC) on thrombin generation (TGA) in severe hemophilic plasma with inhibitor	human hemophilia A and B plasma; non-hemophilic plasma	In vitro	aPCC (FEIBA®) alone (0.063, 0.125, 0.5, or 1 U/mL) PF-06741086 alone (500 - 16000 ng/mL) non-hemophilic plasma PF-06741086 (16000 ng/mL) PF-06741086 ([redacted])	4 severe hemophilia A donors + inhibitor; 1 severe hemophilia B donor + inhibitor; non-hemophilic plasma	Peak thrombin increased; lag time decreased PF-06741086 (16 µg/mL) + aPCC [1 U/mL (FEIBA)] = No additive decrease in lag time Higher peak thrombin concentration compared to addition of either alone, but was within the range in studies reported for non-hemophilic normal plasma	No	PF-06741086_[redacted]_045123
Characterization of PF-06741086 activity in human hemophilia plasma in combination with BYCLOT in a TGA assay	human hemophilia A and B plasma; non-hemophilic plasma	In vitro	**Byclot Alone** FVIIa/FX (0.25/2.5 to 8/80 µg/mL): Hemophilia A or B inhibitor plasma **PF-06741086 alone** (16 µg/mL)**:** Hemophilia A or B inhibitor plasma or non-hemophilic plasma **Combination** PF-06741086 (16 µg/mL) + Byclot FVIIa/FX (0.5/5 - 2/20 µg/mL) in Hemophilia A or B inhibitor plasma	N=1 Hemophilia A inhibitor plasma N=1 Hemophilia B inhibitor plasma N=1 non-hemophilic plasma 2 replicates per plasma sample	A decrease in the lag time was observed with both PF-06741086 (16 µg/mL) and Byclot (FVIIa /FX at 2/20 or 1/10 or 0.5/5 µg/mL) alone in hemophilia plasma. However, there was no additive decrease in the lag time with PF-06741086 and Byclot in combination, where addition to hemophilia plasmas with an inhibitor resulted in increase in thrombin generation, including higher peak thrombin concentration compared to the addition of either agent alone and was within the range reported in studies for non-hemophilic normal plasma.	No	PF-06741086_[redacted]_103228

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Pharmacodynamic effect in male cynomolgus monkey plasma demonstrated by dPT	cynomolgus monkey plasma	In vivo IV or SC	PF-06741086 (Lot [redacted]) single IV (1 mg/kg) or SC (3 or 10 mg/kg)	Male 2 per group	A stable decrease in dPT clotting time from 24 to 240 hours following a single IV (1 mg/kg) or SC (3 or 10 mg/kg).	No	8299672
Dose response in severe tail clip injury model	Hemophilia A mouse	In vivo IV dose-response	PF-06741086 ([redacted]) (0.5, 1, 2, 6 mg/kg); Control saline	Male 5 per group	Dose-dependent reduction in blood loss at dose ≥1 mg/kg	No	PF-06741086_[redacted]_135244
Duration in severe tail clip injury model	Hemophilia A mouse	In vivo IV single dose	PF-06741086 ([redacted]) (6 mg/kg); Control saline	Male 5 per group	Reduction in the volume of blood loss, persisted up to 189 hours	No	PF-06741086_[redacted]_135244
Severe tail clip injury model	Hemophilia B mouse	In vivo IV single dose	PF-06741086 ([redacted]) (6 mg/kg); Control saline	Male 5 per group	Reduction in the volume of blood loss	No	PF-06741086_[redacted]_135244
Laser injury model fibrin and platelet measurement	Hemophilia A and C57BL/6J mouse	In vivo IV single dose	PF-06741086 ([redacted]) (6 mg/kg) Control saline rFVIII (200 IU/kg)	Male 3 mice 7 to 12 injuries each	Platelet accumulation and fibrin generation in precapillary arterioles at 0.5 hours and 168 hours post-dosing of PF-06741086. Response similar to PF-06741086 at 0.5 hours	No	PF-06741086_[redacted]_135244

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Duration in severe tail clip injury model	Hemophilia B mouse	In vivo IV single dose	PF-06741086 (Batch [redacted]; Lot [redacted]) (6 mg/kg) Control saline	Male 5 per group	Reduction in the volume of blood, persisted for at least 72 hours	No	PF-06741086_[redacted]_121321
Severe tail clip injury model	Hemophilia A mouse	In vivo IV single dose	PF-06741086 (Batch [redacted]; Lot [redacted]) (1, 3, 6 mg/kg) Control saline rFVIII (200 U/kg)	Male 5-13 per group	Administered immediately or two minutes into an active bleed. Reduction in the volume of blood loss. The magnitude of the effect in mice that received PF-06741086 (6 mg/kg) at 2 minutes post injury was similar to hemostatic effects of recombinant FVIII administered two minutes after the tail clip.	No	PF-06741086_[redacted]_121321
Laser injury model, fibrin and platelet measurement	Hemophilia A mouse	In vivo, IV single dose	Untreated PF-06741086 (Batch [redacted]; Lot [redacted]) (6 mg/kg)	Male 18 individual mice	Following the monitoring in each untreated mouse following a laser bleeding injury, a second laser injury was made and PF-06741086 was immediately administered. Enhanced platelet accumulation and fibrin deposition at the site of injury was observed when PF-06741086 was administered in hemophilia A mice during an ongoing bleed induced with laser injury compared to untreated mice.	No	PF-06741086_[redacted]_121321

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
10-day investigative study of combination PF-06741086 and NovoSeven®RT To investigate the cumulative pharmacodynamic and potential additive effects of the combined PF-06741086 and NovoSeven RT	Rat/Wistar Han	In vivo, IV multiple dose	PF-06741086 (Lots [redacted]; [redacted]) 50 mg/kg on Day 1 and Day 8 NovoSeven RT (rFVIIa) 0.4, 1, or 3 mg/kg once daily or 0.8 (0.4 twice daily) mg/kg on Days 8-10 alone or in combination with PF-06741086 Vehicle control: sterile 20 mM histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL disodium EDTA, 0.2 mg/mL polysorbate-80, pH 5.8	Male/5	Increased incidence and/or severity of microscopic minimal to mild, acute thrombi/emboli in lung and injection site (tail) with combined administration of PF-06741086 (50 mg/kg) and NovoSeven RT (3 mg/kg) Systemic exposures characterized by C_{max} and AUC_t for PF-06741086 and NovoSeven RT were not affected by combined test article administration	No	[redacted]MA086

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
10-day SC (once weekly) or 3-day (twice daily) IV investigative study of PF-06741086 or Factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA) in male Wistar Han rats	Rat/Wistar Han	In vivo, SC/IV multiple dose	SC administration of PF-06741086 [Lot [redacted] ([redacted)] (30 mg/kg/day) on Day 1 and 8 and/or Intravenous FEIBA 10 (5 BID), 50 (25 BID) and 100 (50 BID) U/kg/day on Day 8-10 Vehicle Control[a]	Male/5	Similar clinical observations, clinical pathology differences, macroscopic and microscopic findings as compared with FEIBA [≥10 (5 BID) U/kg/day] alone, except for higher means for thrombin-antithrombin complexes and mean platelet volume at all FEIBA combined doses. Increased incidence of thrombi/emboli in the lung was not observed at 100 (50 BID) U/kg/day of FEIBA when combined with PF-06741086. Mean systemic exposure of PF-06741086 (as assessed by AUC_{48} was similar in all dose groups when PF-06741086 was administered alone or in combination with FEIBA on Day 8.	No	[redacted]GR258
10-day SC (once weekly) or 3-day (twice daily) IV Investigative study of PF-06741086 or Byclot® in male Wistar Han rats	Rat/Wistar Han	In vivo, SC/IV	Single or combination SC dose administration PF-06741086 [Lot [redacted] ([redacted)] (30 mg/kg/dose, once weekly) or single or combination IV dose administration of Byclot (60, 120, or 180/120 µg/kg/day; 2 doses on Day 8 and 1 dose on Day 10). Vehicle Control[b]	Male/5	The combined administration of Byclot (60, 120 or 180/120 µg/kg/day; Days 8 and 10; IV via lateral tail vein) and PF-06741086 (30 mg/kg/dose; Days 1 and 8; SC) in male Wistar Han rats resulted in similar clinical pathology differences, compared with Byclot alone. Mean systemic exposures (as assessed by Cmax and AUC) to PF-06741086 in rats administered PF-06741086 in combination with increasing doses of Byclot were similar when compared with those in animals administered PF-06741086 alone on Day 8.	No	[redacted]GR075

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	PF-06741086 Batch/Lot; Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number

aPCC = activated prothrombin complex concentrate (FEIBA®); aPTT = activated partial thromboplastin time; AUCt = area under the plasma concentration-time curve from 0 to time t; Cmax = maximum plasma concentration; dPT = dilute prothrombin time; EC_{50} = concentration corresponding to 50% of the maximum effect; Factor Xa = factor X activated; FEIBA® = factor eight inhibitor bypassing activity; FVIIa = factor VII activated; GLP = good laboratory practice; IgG1 = immunoglobulin G1; IU = international units; IV = intravenous; K1 = Kunitz domain 1; K2 = Kunitz domain 2; KD = dissociation constant; rFVIIa = recombinant factor VII activated, eptacog alfa; rFVIII = recombinant factor VIII; TEG = thromboelastography; TFPI = tissue factor pathway inhibitor; TGA = thrombin generation assay; U = units; 1000 ng/mL = 1 μg/mL.

a. Group 1 Control: sterile solution of 20 mM of histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL EDTA, 0.20 mg/mL polysorbate-80, pH 5.8. Group 2 Control: 4 mg/mL of trisodium citrate and 8 mg/mL of sodium chloride in sterile water for injection. Groups 3 and 11 Combo: Vehicles 1 and 2
b. Group 1 Control (Vehicle 1): 20 mM histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL EDTA, 0.20 mg/mL polysorbate-80, pH 5.8. Group 2 Control (Vehicle 2): 0.232% sodium chloride, 0.116% trisodium citrate dihydrate, 31.2 mg/mL sucrose, 0.052 mg/mL polysorbate-80 in sterile water for injection, 6 hours BID; dose volume of 0.2 (AM)/0.1 (PM) mL/kg/dose on Day 8 and once on Day 10 (dose volume of 0.2 mL/kg/dose). Group 3 Control Combination: Vehicle 1 followed by Vehicle 2 [administered 6 hours BID; dose volume of 0.2 (AM)/0.1 (PM) mL/kg/dose] on Days 1 and 8 and Vehicle 1 followed by Vehicle 2 once on Day 10 (0.2 mL/kg/dose).

2.6.3.3. Secondary Pharmacodynamics

Test Article: PF-06741086

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
No studies conducted[a]							

a. Marstacimab is a monoclonal antibody with low-nanomolar or sub-nanomolar binding affinity to its target, TFPI, across multiple species including mouse, rat, rabbit, cynomolgus monkey, and human. Based on results from the tissue cross-reactivity studies, off-target effects are not anticipated with marstacimab.

2.6.3.4. Safety Pharmacology

Test Article: PF-06741086

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
No studies conducted[a]							

a. Consistent with the ICH S6 guidance [ICH S6(R1), 2011], safety pharmacology endpoints were incorporated into the GLP-compliant repeat-dose toxicity study in cynomolgus monkeys (Study 20062114; Tabulated Summary 2.6.7.7C).