TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
本項で使用する用語・略語 3
1. まとめ 4
2. 単回投与毒性試験 5
3. 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 5
3.1. ラットを用いた反復投与毒性試験 5
3.1.1. ラットを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験 5
3.1.2. 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 6
3.1.3. 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 8
3.2. サルを用いた反復投与毒性試験 10
3.2.1. サルを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験 10
3.2.2. 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 10
4. 遺伝毒性試験 12
5. がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 12
5.1. 作用の特異性およびメカニズム 12
5.2. TFPI の腫瘍生物学的役割 13
5.3. 非臨床試験結果 13
5.4. まとめ 13
6. 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 13
6.1. 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 14
7. 局所刺激性試験 15
8. その他の毒性試験（実施している場合） 15
8.1. 光毒性試験 15
8.2. 抗原性試験 15
8.3. 免疫毒性試験 16
8.4. 毒性発現の機序に関する試験 16
8.5. 依存性試験 16
8.6. 代謝物の毒性試験 16

8.7. 不純物の毒性試験 16
8.8. その他の試験 17
8.8.1. 組織交差反応性試験 17
8.8.2. ラットを用いたファイバ®の 3 日間静脈内投与試験 17
8.8.3. ラットを用いた併用投与における探索的薬力学試験 18
9. 考察及び結論 18
9.1. 凝固カスケード 18
9.2. 皮下投与部位反応 19
9.3. その他の所見 20
9.4. まとめ 20
10. 図表 20
参考文献 20

LIST OF TABLES

Table 1. 毒性試験の概要 4

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：抗体依存性細胞介在性細胞障害
AUC	area under the plasma concentration-time curve：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
BID	twice a day：1 日 2 回
C1q	complement component 1q：補体第一成分 q
CDC	complement dependent cytotoxicity：補体依存性細胞障害
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid：エチレンジアミン四酢酸塩
FcγR	Fc gamma receptor：IgG に対する Fc 受容体
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
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
IgG1	immunoglobulin G1：免疫グロブリン 1
IL-6	interleukin 6：インターロイキン 6
IV	intravenous：静脈内投与
NOAEL	no observed adverse effect level：無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構
PT	prothrombin time：プロトロンビン時間
SC	subcutaneous：皮下投与
TFPI	tissue factor pathway inhibitor：組織因子経路インヒビター
TNF	tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子

1. まとめ

マルスタシマブの一連の非臨床毒性試験の一覧を Table 1 に示す。非臨床試験で評価した試験デザインおよび項目は 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に従った。すべての重要な試験はデータ相互受け入れ制度に参加する OECD 加盟国である米国の FDA の GLP 規則に従って実施した。

Table 1. 毒性試験の概要

試験種または試験期間/試験番号（ファイザー社試験番号）	投与経路	動物種	GLP 適用
反復投与毒性試験			
8 日間/[redacted]MA067	静脈内または皮下投与	ラット	非適用
8 日間/[redacted]MA070	静脈内または皮下投与	サル	非適用
3 ヵ月間/20064198 ([redacted]MA086)	静脈内または皮下投与	ラット	適用
3 ヵ月間/20062114 ([redacted]MA097)	静脈内または皮下投与	サル	適用
6 ヵ月間/20089324 ([redacted]MA123)	静脈内投与	ラット	適用
生殖発生毒性試験			
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験/00655204 ([redacted]GR328)	静脈内投与	雄ラット	適用
局所刺激性試験			
単回/[redacted]GR324	皮下投与	ラット	適用
その他の毒性試験			
C1q および FcγR 結合試験/[redacted]GR003	In vitro	ヒト由来試料	非適用
サイトカイン放出試験/[redacted]GR044	In vitro	ヒト由来試料	非適用
免疫組織化学的染色法を確立するための予備試験/IM2368P ([redacted]MA009)	In vitro	ヒト，サル，ラット由来試料	非適用
組織交差反応性試験/20063771 ([redacted]MA087)	In vitro	ヒト，サル，ラット由来試料	適用
ファイバ®の 3 日間投与試験/[redacted]GR090[a]	静脈内投与	ラット	非適用

a. ラットにおける探索的薬力学試験（[redacted]GR258 試験，M2.6.2.2.2.2.2）の用量を決定するために実施した試験

Wistar Han ラットまたはカニクイザルにマルスタシマブを静脈内または皮下（臨床開発時の投与経路）に 1 日 1 回，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。マルスタシマブは，20 mmol/L ヒスチジンおよび 85 mg/mL ショ糖を含む溶液（pH 5.8）または 20 mmol/L ヒスチジン，85 mg/mL ショ糖，0.05 mg/mL EDTA 二ナトリウムおよび 0.2 mg/mL ポリソルベート 80 を含む溶液（pH 5.8）を溶媒として用いて投与した。

マルスタシマブはラットおよびサルの TFPI と結合し，これらの動物種における反復投与毒性試験および非血友病サル乏血小板血漿を用いた in vitro 試験において薬理学的活性を示したことから，非臨床毒性試験ではラットおよびサルを用いた。

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，プロトロンビン時間（PT），活性化部分トロンボプラスチン時間，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。凝固カスケードに対する影響は軽微から軽度であり，マルスタシマブの薬理作用に関連すると考えられた。血液凝固パラメータの変化は，ラットでは回復性がみられたが，休薬期間終了後もマルスタシマブの曝露が継続したサルでは回復性はみられなかった。

マルスタシマブは，雄性ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に影響を示さなかった。

マルスタシマブは，C1q または FcγRs に結合しないことから，CDC または ADCC 活性を誘発するリスクは低いと推察され，ヒト全血を用いたサイトカイン放出試験でサイトカイン放出を示さなかった。

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が，オフターゲット薬理作用が生じるリスクは低いと推察された。

マルスタシマブと利用可能なバイパス製剤（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 探索的薬力学試験で得られた所見は，マルスタシマブとこれらのバイパス製剤との併用投与を支持するものであった。

2. 単回投与毒性試験

マルスタシマブの単回投与毒性試験は実施していないが，マルスタシマブを最大 1000 mg/kg の用量で静脈内投与または 300 mg/kg の用量で皮下投与したラット，最大 500 mg/kg の用量で静脈内投与または 90 mg/kg の用量で皮下投与したカニクイザルにおいて，マルスタシマブ投与に関連する急性の一般状態の変化および死亡は認められなかった。

3. 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

3.1. ラットを用いた反復投与毒性試験

3.1.1. ラットを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験

報告書番号 [redacted]MA067，概要表 2.6.7.6

雄性ラット（5 匹/群）にマルスタシマブを 0［20 mmol/L ヒスチジンおよび 85 mg/mL ショ糖を含む溶液（pH 5.8）］，3，30 または 90 mg/kg/週（IV）もしくは 3 mg/kg/週（SC）で週 1 回（試験 1 および 8 日の合計 2 回）投与し，試験 9 日に剖検に供した。一般状態観察，体重および摂餌量測定，血液学的検査，血液生化学検査，臓器重量測定，剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。また，各群にトキシコキネティクスのサテライト群（6 匹/群）を設け，静脈内投与した動物では試験 1 日の投与後 0.083，2，24，48，72，96 および 120 時間（各時点 2～3 匹）ならびに試験 8 日の投与後 0.083 時間（6 匹）に，皮下投与した動物では試験 1 日の投与後 1，2，48，72，96 および 120 時間（各時点 2～3 匹）ならびに試験 8 日の投与後 0.5 時間（6 匹）に採血した。

マルスタシマブ投与に関連した D-ダイマーの高値が，30 mg/kg/週以上の IV 群（対照群比 1.57～1.91 倍，以降同様）および 3 mg/kg/週（SC）（1.72 倍）で試験 3 日にみられた。その他の

時点で D-ダイマー値は変化しなかった。TFPI 阻害により凝固系が促進されることが予想され，また D-ダイマーは線維素溶解の副産物であることから，D-ダイマーの高値はマルスタシマブの薬効と関連している可能性があるが，試験 9 日の剖検において，マルスタシマブ投与に関連した血栓・塞栓の形成はみられなかった。

また，臨床病理学的変化として，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（0.92～0.98 倍）が試験 9 日の 30 mg/kg/週以上の IV 群でみられたが，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。

剖検で皮下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。これらの変化は，対照群と比較して高い頻度または重症度を示したが，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。

本試験で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または臓器重量の変化はみられなかった。

マルスタシマブ投与に関連した影響は，30 および 90 mg/kg/週（IV）または 3 mg/kg/週（SC）投与時にみられた D-ダイマーの高値ならびに皮下投与部位における剖検および病理組織学的所見のみであった。無影響量は 3 mg/kg/週（IV）であった。忍容性がみられた最大耐量は，静脈内および皮下投与において，それぞれ 90 および 3 mg/kg/週であり，本試験でのそれぞれの投与経路における最高用量であった。

静脈内投与後のマルスタシマブの曝露量は用量の増加に伴って増加し，試験 1 および 8 日で同様の曝露量を示した。皮下投与時のバイオアベイラビリティは 70%であった。試験 1 日の 90 mg/kg/週（IV）群における C_{max} および AUC_t はそれぞれ 3,480,000 ng/mL および 111,000,000 ng•h/mL であった。一方，試験 1 日の 3 mg/kg/週（SC）群における C_{max} および AUC_t はそれぞれ 27,000 ng/mL および 1,960,000 ng•h/mL であった。

3.1.2. 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

報告書番号 20064198，概要表 2.6.7.7A

雌雄ラット（雌雄各 10 匹/群）にマルスタシマブを 0［20 mmol/L ヒスチジン，85 mg/mL ショ糖，0.05 mg/mL EDTA 二ナトリウムおよび 0.2 mg/mL ポリソルベート 80 を含む溶液（pH 5.8）］，60，180 または 1000 mg/kg/週（IV）もしくは 0（IV 時と同一の溶媒）または 180 mg/kg/週（SC）の用量および投与経路で週 1 回，13 週間投与した。また，0 または 1000 mg/kg/週（IV）群については 6 週間の休薬期間を設けて回復性を評価した（雌雄各 5 匹/群）。被験物質の最高濃度は 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[1]，最高用量である 1000 mg/kg/週（IV）が投与可能な最大投与量であった。一般状態観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学検査，尿検査，臓器重量測定，剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。また，各群にトキシコキネティクスのサテライト群（0 mg/kg/週では雌雄各 3 匹/群，他は雌雄各 4 匹/群）を設け，静脈内投与した動物では試験 1 日，29 日および 85 日の投与後 0.25，6，24，72 および 168 時間ならびに試験 8 日，15 日，43 日，57 日および 71 日の投与後 168 時間に，皮下投与した動物では試験 1 日，29

日および 85 日の投与後 6，48，72，96 および 168 時間ならびに試験 8 日，15 日，43 日，57 日および 71 日の投与後 168 時間に採血した。0 mg/kg/週（IV）および 1000 mg/kg/週（IV）では試験 112 日および 134 日にも採血（各 1 時点）した。初回投与前（試験-4 日），試験 8 日，29 日および 85 日の投与後 168 時間，ならびに休薬期間中の試験 112 日および 134 日に採血し抗薬物抗体（ADA）の発現について評価した。

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，フィブリノゲン減少が 60 mg/kg/週以上の IV 群（0.79～0.90 倍，比対照群，以下同様）および 180 mg/kg/週の SC 群（0.90 倍）で，PT 短縮が 1000 mg/kg/週以上の IV 群（0.90 倍）および 180 mg/kg/週の SC 群（0.93 倍）で，aPTT 延長が 60 mg/kg/週以上の IV 群（1.09～1.23 倍）および 180 mg/kg/週の SC 群（1.07～1.20 倍）でみられた。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 IV 群でみられ，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または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。

本試験では，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。

以上，本試験におけるマルスタシマブの投与に関する影響として，60 mg/kg/週以上の IV 群および 180 mg/kg/週の SC 群で凝固系の変化が認められたが，軽微で一過性かつ回復性を示す変化であったことから，その毒性学的意義は乏しいと考えられた。いずれの用量においても毒性変化がみられなかったことから，それぞれの投与経路における NOAEL は 1000 mg/kg/週（IV）および 180 mg/kg/週（SC）であった。

マルスタシマブに対する ADA の発現率は，0，60，180 および 1000 mg/kg/週の IV 群では，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）であり，0 および 180 mg/kg/週の SC 群では，それぞれ 0%（0/6 例）および 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は概して同程度であった。

マルスタシマブを静脈内または皮下投与した際の曝露量に明確な性差がなかったことから雌雄合算した値で評価した。マルスタシマブを静脈内投与した際の曝露量は，試験 29 日および 85 日において，用量増加に伴って用量比例性をやや上回って増加した。累積係数（AUC_{168} の比，試験 85 日/試験 1 日）は，60 mg/kg/週（IV）および 180 mg/kg/週（SC）でそれぞれ 0.88 倍および 0.61 倍であり，180 mg/kg/週（IV）および 1000 mg/kg/週（IV）でそれぞれ 1.4 倍および 1.6 倍

であった。1000 mg/kg/週（IV）では，休薬期間終了時（試料の最終採取日である試験 134 日）にも定量可能なマルスタシマブを検出した。

静脈内投与における NOAEL である 1000 mg/kg/週（IV）群の試験 85 日における C_{max} および AUC_{168} は，それぞれ 27,800,000 ng/mL および 1,940,000,000 ng•h/mL であった。また，皮下投与における NOAEL である 180 mg/kg/週（SC）群の試験 85 日における C_{max} および AUC_{168} は，それぞれ 416,000 ng/mL および 45,300,000 ng•h/mL であった。

3.1.3. 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

報告書番号 20089324，概要表 2.6.7.7B

雌雄ラット（雌雄各 15 匹/群）にマルスタシマブを 0［20 mmol/L ヒスチジン，85 mg/mL ショ糖，0.05 mg/mL EDTA 二ナトリウムおよび 0.2 mg/mL ポリソルベート 80 を含む溶液（pH 5.8）］，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。一般状態観察，体重および摂餌量測定，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学検査，尿検査，臓器重量測定，剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。また，各群にトキシコキネティクスのサテライト群（0 mg/kg/週では雌雄各 3 匹/群，他は雌雄各 4 匹/群）を設け，試験 1 日，120 日および 176 日の投与後 0.167，6，24，72 および 168 時間に採血した。また，雌雄 0，180 および 1000 mg/kg/週群では試験 183 日の投与後 0.167 時間にも採血した。雌雄 60 mg/kg/群では，試験 183 日の投与後 0.167，6，24，72 および 168 時間ならびに 6 週間の休薬期間中の試験 203 日および 225 日にも採血（各 1 時点）した。初回投与前（試験-4 日），試験 120 日および 176 日の投与後 168 時間，ならびに休薬期間中の試験 203 日および 225 日に採血し抗薬物抗体（ADA）の発現について評価した。被験物質の最高濃度は 100 mg/mL であり，投与容量は 10 mL/kg が最適であることから [1]，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。

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/週群以上で，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，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または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（軽微な急性で器質化した血栓または塞栓）で病理組織

学的所見がみられた。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。血栓または塞栓は軽微なものであり，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。

対照群の 2 例の動物を含むすべての投与群において，散在する均一な大きさの暗点の屈折性物質を伴う軽微な細胞浸潤が肺でみられ，その発生率はマルスタシマブの投与量の増加により増加した。この所見は対照群でみられていることから，マルスタシマブ以外の因子が関与していたことを示唆するが，マルスタシマブの用量増加に伴う発現率の増加はマルスタシマブ投与との関連性を示唆している。対照群の 1 例の動物を含むすべての投与群において，毒性学的意義の乏しい，好塩基性または非好塩基性の軽微な異物も肺でみられたが，検査した個体ごとの肺切片には異物巣は少し（通常は 1 ヵ所，まれに 2 ヵ所）しかみられなかった。屈折性物質および異物の発生源および組成は不明だが，対照群にもみられた所見であり，二次的な毒性変化がみられていないことから，毒性変化ではないと考えられた。屈折性物質の細胞浸潤ならびに好塩基性または非好塩基性異物は他の試験ではみられなかった。

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。

以上，本試験におけるマルスタシマブ投与に関する影響は，60 mg/kg/週以上でみられた凝固系の変化ならびにすべての用量の一部の動物の病理組織学的検査でみられた肺または投与部位である尾静脈の血栓または塞栓であり，これらの変化は毒性学的に意義の乏しい変化と考えられた。いずれの用量においても毒性変化がみられなかったことから，NOAEL は 1000 mg/kg/週であった。

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/週群（試験 225 日においてほとんどの動物では血漿中マルスタシマブ濃度は定量下限未満であった）において ADA は検出されなかった。

マルスタシマブの曝露量は，試験 1，120 および 176 日において，おおよそ用量比例的に増加した。また，曝露量に一貫した性差はみられなかったことから雌雄合算で評価した。蓄積係数（試験 120 日，176 日および 183 日における AUC_{168} の試験 1 日の AUC_{168} に対する比）は，60，180 および 1000 mg/kg/週群において，試験 120 日でそれぞれ 0.98，1.5 および 1.5，試験 176 日でそれぞれ 1.1，1.6 および 1.6 であり，試験 183 日における 60 mg/kg/週での蓄積係数は 1.0 であった。休薬期間終了時（試験 225 日）における 60 mg/kg/週群での血漿中マルスタシマブ濃度は 6/8 例で定量下限（58 ng/mL）未満であった。

NOAEL は 1000 mg/kg/週であり，その用量における試験 176 日での C_{max} および AUC_{168} はそれぞれ 29,800,000 ng/mL および 1,840,000,000 ng•h/mL であった。

3.2. サルを用いた反復投与毒性試験

3.2.1. サルを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験

報告書番号 [redacted]MA070，概要表 2.6.7.6

雌雄カニクイザル（雌雄各 1 匹/群）にマルスタシマブを 0［20 mmol/L ヒスチジンおよび 85 mg/mL ショ糖を含む溶液（pH 5.8）］，3，30 または 90 mg/kg/週（IV）もしくは 3 mg/kg/週（SC）で週 1 回（試験 1 および 8 日の合計 2 回）投与し，試験 9 日に剖検に供した。0 mg/kg/週群には，静脈内投与に加え，皮下投与も実施した。一般状態観察，体重および摂餌量測定，血液学的検査，血液生化学検査，剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。また，静脈内投与した動物では試験 1 日の投与前，投与後 0.083，2，24，48，72 および 96 時間ならびに試験 8 日の投与後 0.083 時間に，対照群および皮下投与した動物では試験 1 日の投与前，投与後 0.5，1，2，48，72 および 96 時間ならびに試験 8 日の投与後 0.5 時間に採血し，トキシコキネティクスを評価した。

マルスタシマブ投与に関連した D-ダイマー比値の増加は試験 2 日には認められ，その後，試験 9 日まで継続した（雄 1.16～6.47 倍，雌 1.29～9.71 倍，いずれも投与前値比）。この増加は雄と比較して雌で多くみられたが，用量依存的ではなかった。TFPI 阻害は凝固を促進し，D-ダイマーは線溶系の副産物であることから，D-ダイマー比の増加はマルスタシマブの薬理作用と関連している可能性が考えられるが，試験 9 日の剖検所見において，マルスタシマブ投与に関連した血栓または塞栓形成はみられなかった。

本試験でマルスタシマブ投与に関連した一般状態，体重，摂餌量，血液学的検査（凝固検査を除く）および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。

マルスタシマブ投与に関連した影響は，対照群で得られた D-ダイマー値比（投与前の D-ダイマー値に対する投与後の D-ダイマー値の比）と比較してすべての投与量でみられた D-ダイマー値比の高値であった。各投与経路において忍容性がみられた最大用量は，静脈内および皮下投与において，それぞれ 90 および 3 mg/kg/週であり，本試験におけるそれぞれの投与経路における最高用量であった。

IV 後のマルスタシマブの曝露量は用量の増加に伴って増加し，試験 1 日および 8 日で同様の曝露量を示した。SC 後のバイオアベイラビリティはマルスタシマブの消失相を評価できなかったため算出しなかった。試験 1 日の 90 mg/kg/週（IV）における C_{max} および AUC_t はそれぞれ 2,680,000 ng/mL および 138,000,000 ng•h/mL であった。一方，試験 1 日の 3 mg/kg/週（SC）における C_{max} および AUC_t はそれぞれ 7,140 ng/mL および 432,000 ng•h/mL であった。

3.2.2. 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

報告書番号 20062114，概要表 2.6.7.7C

雌雄カニクイザル［0 および 500 mg/kg/週（IV）では雌雄各 5 匹/群，他の群では雌雄各 3 匹/群］にマルスタシマブを 0［20 mmol/L ヒスチジン，85 mg/mL ショ糖，0.05 mg/mL EDTA 二ナトリウムおよび 0.2 mg/mL ポリソルベート 80 を含む溶液（pH 5.8）］，30，90 または 500 mg/kg/週（IV）もしくは 0 または 90 mg/kg/週（SC）の用量および投与経路で週 1 回，13 週間投

与した。なお，IV と SC の 0 mg/kg/週群（対照群）には同一動物を供した。一般状態観察，体重および摂餌量測定，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，血液生化学検査，尿検査，臓器重量測定，剖検ならびに病理組織学的検査を実施した。静脈内投与した動物では試験 1 日，29 日および 85 日の投与前（試験 1 日のみ），投与後 0.25，6，24，72 および 168 時間ならびに試験 8 日，15 日，43 日，57 日，71 日の投与後 168 時間に採血した。皮下投与した動物では試験 1 日，29 日および 85 日の投与前（試験 1 日のみ），投与後 6，48，72，96 および 168 時間ならびに試験 8 日，15 日，43 日，57 日，71 日の投与後 168 時間に採血し，トキシコキネティクスを評価した。また，0 または 500 mg/kg/週（IV）群の一部の動物（雌雄各 5 匹/群のうち雌雄各 2 匹/群）については 6 週間の休薬期間を設けて回復性を評価した。試験 112 日および 133 日に採血（1 時点）し，曝露量を評価した。また，試験 15 日，36 日，64 日および試験 92 日の投与前，ならびに休薬期間中の 112 日および 133 日に採血し抗薬物抗体（ADA）の発現について評価した。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 [1]，最高用量である 500 mg/kg/週（IV）が投与可能な最大投与量であった。

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 IV 群のみでみられた。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。

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。

以上，本試験におけるマルスタシマブの投与に関する影響は，30 mg/kg/週以上の IV 群および 90 mg/kg/週の SC 群でみられた毒性学的意義の乏しい凝固系の変化であった。いずれの用量においても毒性変化がみられなかったことから，それぞれの投与経路における NOAEL は 500 mg/kg/週（IV）および 90 mg/kg/週（SC）であった。

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。

マルスタシマブを静脈内投与した際の曝露量は，おおよそ用量比例的に増加した。また，曝露量に一貫した性差はみられなかったことから雌雄合算で評価した。すべての投与群における累積係数（AUC_{168} の比，試験 29 日/試験 1 日または試験 85 日/試験 29 日）は，2.6 倍未満（AUC_{168} の比，試験 29 日/試験 1 日）または 1.2 倍未満（AUC_{168} の比，試験 85 日/試験 29 日）であった。500 mg/kg/週（IV）では，休薬期間終了時（試料の最終採取日である試験 133 日）にも定量可能なマルスタシマブを検出した。

IV における NOAEL である 500 mg/kg/週（IV）群の試験 85 日における C_{max} および AUC_{168} は，それぞれ 18,400,000 ng/mL および 2,000,000,000 ng•h/mL であった。また，SC における NOAEL である 90 mg/kg/週（SC）群の試験 85 日における C_{max} および AUC_{168} は，それぞれ 2,480,000 ng/mL および 364,000,000 ng•h/mL であった。

4. 遺伝毒性試験

「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［ICH S6(R1)］」[2]の考え方に基づくと，バイオテクノロジー由来の分子は DNA やその他の染色体関連物質と直接的な相互作用をしないことから，一般的に遺伝毒性試験は適用されない。そのため，マルスタシマブの遺伝毒性試験は実施していない。

5. がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

「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［ICH S6(R1)］[2]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。

5.1. 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，カニクイザル，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。

---

[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）

- 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。
- 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。

5.2. 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[3]。
- 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[4,5]。
- 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[6]。
- 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[7,8]。
- 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 [7,9]。
- 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。

5.3. 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。

5.4. 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。

6. 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

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（2.6.6.6.1 項）。

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[10,11,12]，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（2.6.6.6.1 項）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 FDA および CHMP と合意した。

6.1. 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

報告書番号 00655204，概要表 2.6.7.12

雄の Wistar Han ラット（20 匹/群）にマルスタシマブを 0［20 mmol/L ヒスチジン，85 mg/mL ショ糖，0.05 mg/mL EDTA 二ナトリウムおよび 0.2 mg/mL ポリソルベート 80 を含む溶液（pH 5.8）］，60，180 または 1000 mg/kg/週の用量で週 1 回，交配の 4 週間前から交配期間を通して解剖までの期間に計 11 回，静脈内投与した。

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の生存率，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 はいずれも 1000 mg/kg/週と考えられた。

---

[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），[redacted] Meeting Preliminary Comments, [redacted] 20[redacted]（M4.3.9），PF-06741086 [redacted], [redacted], [redacted] 20[redacted] (PF-06741086_[redacted]-3-20[redacted]-[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]-[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）

1000 mg/kg/週の試験 70 日における投与 5 分後における 1 時点での血漿中マルスタシマブ濃度は 50,800,000 ng/mL であった。

7. 局所刺激性試験

報告書番号 [redacted]GR324，概要表 2.6.7.16

ラットにマルスタシマブ 300 mg/kg を単回皮下投与した際の急性または遅発性の局所刺激性を評価した（[redacted]GR324 試験，M2.6.7.16）。Wistar Han ラットにマルスタシマブを 300 mg/kg の用量で投与し，急性および遅発性の影響について，それぞれ投与 1 日および 1 週間後に評価した。本試験の用量は，臨床で使用予定である薬液濃度 150 mg/mL と一致する 300 mg/kg を選択した。この用量は非臨床のすべての皮下投与試験における最高用量である。

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（マクロファージ，好中球，リンパ球および少数の皮下組織の形質細胞の混合により特徴づけられる）の発現頻度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。

以上より，マルスタシマブ皮下投与に関連した毒性変化はみられなかったことから NOAEL は 300 mg/kg であった。

また，局所刺激性については，ラットおよびカニクイザルを用いた反復投与毒性試験の成績からも評価した。反復投与毒性試験で使用した投与液のマルスタシマブ濃度は，ラットの静脈内および皮下投与においてそれぞれ 0.6～100 および 0.6～18 mg/mL，サルの静脈内および皮下投与においてそれぞれ 1.5～100 および 1.5～18 mg/mL であり，すべての投与液の pH は 5.8 に調整された。サルの静脈内または皮下投与部位において，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。ラットでは，6 ヵ月間静脈内投与（2.6.6.3.1.3 項）により，60 mg/kg/週群以上の用量で，投与部位の尾静脈において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に意義の乏しい変化と考えられた。また，探索的なラットを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.1 項）では，剖検で皮下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。

8. その他の毒性試験（実施している場合）

8.1. 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，光毒性試験は実施していない。

8.2. 抗原性試験

ラットおよびカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において，マルスタシマブが抗体反応を誘導する可能性について評価した。ADA が認められたのは，ラットを用いた 3 ヵ月間反復静脈

内または皮下投与毒性試験のみであり，マルスタシマブ投与群における発現率は全体で 28.1%であった。他の試験においても，循環血中のマルスタシマブが ADA 検出に影響を及ぼした可能性は考えられる。ADA はマルスタシマブの曝露量に影響せず，ADA 生成に関連した一般状態の変化（過敏症反応など）はみられなかった。

動物においてヒトタンパク質に対する ADA 生成は予想されるものであり，一般的にヒトでの ADA 生成を予測するものではないと考えられる。マルスタシマブはヒト IgG1 抗体であり，対応する内因性物質は存在しないことから，ADA 発現は主に薬物動態，薬効または血漿中マルスタシマブ濃度測定に影響を及ぼすことが考えられる。

8.3. 免疫毒性試験

報告書番号 [redacted]GR003，[redacted]GR044，概要表 2.6.7.17

マルスタシマブは IgG1 抗体であり，Fc ドメインには CDC または ADCC のような IgG1 が媒介するエフェクター機能を縮小するための点突然変異がある。マルスタシマブが CDC または ADCC エフェクター機能を誘発する可能性を検討するため，in vitro でのヒト C1q および FcγR（CD16，CD32 および CD64）結合アッセイによりマルスタシマブとの結合性について評価した（[redacted]GR003 試験）。マルスタシマブは C1q および FcγR と結合しなかったことから，CDC または ADCC を誘発する可能性は低いと考えられた。

また，ヒト全血を用いたマルスタシマブの in vitro サイトカイン放出試験（[redacted]GR044 試験）を実施した。健康ドナー8 例から採取した全血をマルスタシマブと 24 時間インキュベーションし，血漿中の炎症性サイトカインを測定した。マルスタシマブは TNF-α，IL-6 および IFN-γの放出を誘発しなかった。

8.4. 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。

8.5. 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，ラットまたはカニクイザ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。

8.6. 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）。

8.7. 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。

8.8. その他の試験

8.8.1. 組織交差反応性試験

報告書番号 20063771，IM2368P，概要表 2.6.7.17

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，膵島細胞およびラットの海綿状栄養膜細胞における細胞質ならびにサルの卵巣内の細胞外物質で検出された。

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[13,14]，単核球[15,16,17]，胎盤[18]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想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[2]および他の参考文献[19,20]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。

8.8.2. ラットを用いたファイバ®の 3 日間静脈内投与試験

報告書番号 [redacted]GR090，概要表 2.6.7.17

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），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。

8.8.3. ラットを用いた併用投与における探索的薬力学試験

報告書番号 [redacted]MA086, [redacted]GR258, [redacted]GR075，概要表 2.6.3.2

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。

9. 考察及び結論

非臨床試験の結果から，マルスタシマブ投与後の主な所見として，凝固カスケードへの影響および投与部位に関連する病理組織学的所見が認められた。マルスタシマブ投与に関連する他の所見としては生化学パラメータの変化がみられた。

9.1. 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。

マルスタシマブのラットを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験における凝固パラメータへの影響に関する NOAEL は最高用量の 1000 mg/kg/週（IV）であり，その時の曝露量は，ヒトに 300 mg/kg を週 1 回皮下投与した際の C_{max} および AUC_{168}（B7841002 試験，2.7.2.2.2.1.2 項）[a]のそれぞれ 466 および 201 倍の曝露量であった。また，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への影響に関する NOAEL は最高用量の 500 mg/kg/週（IV）であり，その時の曝露量は，ヒトに 300 mg/kg を週 1 回皮下投与した際の C_{max} および AUC_{168} のそれぞれ 288 および 219 倍の曝露量であった。

[a] C_{max}: 63,930 ng/mL， AUC_{168}: 9,146,000 ng•h/mL

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と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（2.6.6.8.8.3 項）。

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[21]。

9.2. 皮下投与部位反応

皮下投与部位におけるマルスタシマブ投与に関連する影響は，探索的な 8 日間投与毒性試験および局所刺激性試験においてラットのみでみられ，投与部位における軽微から軽度の混合性細胞浸潤および色調異常として認められた。これらの投与部位でみられた剖検または病理組織学的所見は，重症度の程度が軽度であり，関連する一般状態の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。

マルスタシマブのラットを用いた局所刺激性試験における皮下投与部位への影響に関する NOAEL は 300 mg/kg であった。ラット局所刺激性試験の投与量 300 mg/kg は，非臨床のすべての皮下投与試験における最高用量であり，臨床で使用予定である薬液濃度 150 mg/mL と一致することから 300 mg/kg を選択した。

ラットの単回皮下投与局所刺激性試験の 300 mg/kg 群では，皮下投与部位に軽微な浮腫または出血を伴った軽微から軽度の混合性細胞浸潤の発現頻度または重症度の増加（対照群と比較）がみられたが，毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。これらの所見は，試験 2 日に解剖した動物でみられたが，試験 8 日に解剖した動物で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。

ラットを用いた 8 日間静脈内または皮下投与毒性試験における 3 mg/kg/週（SC）群では，マルスタシマブ投与に関連する毒性学的意義に乏しい投与部位の色調異常がみられ，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，壊死または出血との関連が認められた。

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

9.3. 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[22,23]。これらの臨床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。

9.4. まとめ

以上の毒性試験成績は，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。

10. 図表

図表は本文中または概要表に示した。

参考文献

1 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.

2 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）

3 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.

4 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.

5 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

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

[10] 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.

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

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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).

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 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.

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

TABLE OF CONTENTS

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.7.2 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES 4
2.6.7.3 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA 5
2.6.7.4 DRUG SUBSTANCE 8
2.6.7.6 REPEAT-DOSE TOXICITY: NONPIVOTAL STUDIES 11
2.6.7.7A REPEAT-DOSE TOXICITY 13
2.6.7.7B REPEAT-DOSE TOXICITY 16
2.6.7.7C REPEAT-DOSE TOXICITY 20
2.6.7.12 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT TO IMPLANTATION 23
2.6.7.16 LOCAL TOLERANCE 25
2.6.7.17 OTHER TOXICITY STUDIES 26

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a,b] (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
Repeat-Dose Toxicity								
Nonpivotal								
	Rat/Wistar Han	Intravenous/ Subcutaneous	8 Days	IV: 0, 3, 30, 90; SC: 0, 3	No	PWRDM	[redacted]MA067	NA
	Monkey/Cynomolgus	Intravenous/ Subcutaneous	8 Days	IV: 0, 3, 30, 90; SC: 0, 3	No	PWRDM	[redacted]MA070	NA
Pivotal[c]								
	Rat/Wistar Han	Intravenous/ Subcutaneous	3 Months	IV: 0, 60, 180, 1000; SC: 0, 180	Yes	[redacted][d]	20064198	[redacted]MA086
	Rat/Wistar Han	Intravenous	6 Months	0, 60, 180, 1000	Yes	[redacted][d]	20089324	[redacted]MA123
	Monkey/Cynomolgus	Intravenous/ Subcutaneous	3 Months	IV: 0, 30, 90, 500; SC: 0, 90	Yes	[redacted][e]	20062114	[redacted]MA097
Reproductive and Developmental Toxicity								
Male fertility and early embryonic development	Rat/Wistar Han	Intravenous	4 Weeks	0, 60, 180, 1000	Yes	[redacted][f]	00655204	[redacted]GR328
Local Tolerance								
Local tolerance	Rat/Wistar Han	Subcutaneous	1 Day	0, 300 mg/kg	Yes	PWRDM	[redacted]GR324	NA
Other Toxicity Studies								
Tissue cross-reactivity methods development	Human, Rat/Sprague-Dawley, and Monkey/Cynomolgus tissues	In vitro	NA	1 to 25 µg/mL	No	[redacted][g]	IM2368P	[redacted]MA009
Tissue cross-reactivity	Human, Rat/Wistar-Han, and Monkey/Cynomolgus tissues	In vitro	NA	5, 25 µg/mL	Yes	[redacted][g]	20063771	[redacted]MA087

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a,b] (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
FcR binding and C1q binding assays	FcR Binding: CD64, CD32a, CD32a (167Arg/His), CD16a, CD16a (176Phe/Val), CD32b	In vitro	NA	Up to 30 µg/mL	No	PWRDM	[redacted]GR003	NA
Cytokine release assay	Human whole blood	In vitro	NA	1, 10, 100, 1000 µg/mL	No	PWRDM	[redacted]GR044	NA
Factor eight inhibitor bypassing activity (FEIBA)	Rat/Wistar Han	IV injection	3 Days	0, 50 (25 BID), 100 (50 BID), 200 (100 BID) U/kg/day[h]	No	PWRDM	[redacted]GR090	NA

BID = twice daily; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; NA = not applicable; PWRDM = Pfizer worldwide research development and medicine; SC = subcutaneous; U = units factor VIII inhibitor bypassing activity

a. Unless specified otherwise, all doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per dose.

b. All in vivo doses are by once weekly intravenous or subcutaneous injection, unless otherwise noted.

c. For pivotal repeat-dose toxicity studies, the NOAEL (no observed adverse effect level) is underlined.

d. [redacted]

e. [redacted]

f. [redacted]

g. [redacted]

h. All doses are expressed as U of protein per kg of body weight.

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: PF-06741086

Type of Study	Species	Method of Administration[a]	Doses[b,c] (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
8-day exploratory toxicity	Rat/Wistar Han	Intravenous/Subcutaneous	IV: 0, 3, 30,90 SC: 0, 3	No	[redacted]MA067
8-day exploratory toxicity	Monkey/Cynomolgus	Intravenous/Subcutaneous	IV: 0, 3, 30, 90 SC: 0, 3	No	[redacted]MA070
3-month toxicity with 6-week recovery	Rat/Wistar Han	Intravenous/Subcutaneous	IV: 0, 60, 180, 1000 SC: 0, 180	Yes	20064198 ([redacted]MA086)
6-month toxicity with 6-week recovery	Rat/Wistar Han	Intravenous	0, 60, 180, 1000	Yes	20089324 ([redacted]MA123)
3-month toxicity with 6-week recovery	Monkey/Cynomolgus	Intravenous/Subcutaneous	IV: 0, 30, 90, 500 SC: 0, 90	Yes	20062114 ([redacted]MA097)
4-week male fertility and early development	Rat/Wistar Han	Intravenous	0, 60, 180, 1000	Yes	00655204 ([redacted]GR328)
Local Tolerance	Rat/Wistar Han	Subcutaneous	0, 300[d]	Yes	[redacted]GR324

GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic
a. All doses are IV unless otherwise stated; controls are both IV and SC.
b. All doses are expressed as mg of active test article moiety per kg body weight per dose unless otherwise noted.
c. All doses expressed as mg of protein per kg body weight.
d. Doses were administered as a single SC injection expressed as mg protein per kg of body weight.

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: PF-06741086

Dose[a] (mg/kg/dose)	Steady State AUC (ng•h/mL)						
	Mouse		Rat	Rabbit		Monkey	Human
	M	F	Combined	M	F	Combined	
Clinical dose: 300 mg SC QW[b]							9,146,000
Intravenous							
3							
30	-	-	2810000[c]	-	-	3510000[d]	
	-	-	29700000[c]	-	-	34700000[d]	
60	-	-	-	-	-	160000000[f]	
	-	-	54500000[e]	-	-	-	
90	-	-	73100000[g]	-	-	-	
	-	-	111000000[c]	-	-	138000000[d]	
180	-	-	-	-	-	474000000[f]	
	-	-	283000000[e]	-	-	-	
500	-	-	373000000[g]	-	-	-	
1000	-	-	-	-	-	2000000000[f]	
	-	-	1940000000[e]	-	-	-	
	-	-	1840000000[g]	-	-	-	
Subcutaneous							
3							
90	-	-	1960000[c]	-	-	432000[d]	
180	-	-	-	-	-	364000000[f]	
300	-	-	45300000[e]	-	-	-	
	-	-	139000000[i]	-	-	-	

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: PF-06741086

Dose[a] (mg/kg/dose)	C_{max} (ng/mL)						
	Mouse		Rat	Rabbit		Monkey	Human
	M	F	Combined	M	F	Combined	Combined
Clinical dose: 300 mg SC QW[b]							63,930
Intravenous							
3							
30	-	-	89000[c]	-	-	127000[d]	
	-	-	882000[c]	-	-	582000[d]	
60	-	-	-	-	-	1290000[f]	
	-	-	1530000[e]	-	-	-	
	-	-	2330000[g]	-	-	-	
90	-	-	3790000[h]	-	-	-	
	-	-	3480000[c]	-	-	2680000[d]	
180	-	-	-	-	-	4510000[f]	
	-	-	5410000[e]	-	-	-	
	-	-	7030000[g]	-	-	-	
500			11500000[h]	-	-	-	
1000	-	-	-	-	-	18400000[f]	
	-	-	27800000[e]	-	-	-	
	-	-	29800000[g]	-	-	-	
Subcutaneous			50800000[h]	-	-	-	
3							
90			27000[c]			7140[d]	
180	-	-	-	-	-	2480000[f]	
300	-	-	416000[c]	-	-	-	
	-	-	1390000[i]	-	-	-	

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data — Test Article: PF-06741086

C_{max} = maximum observed concentration; F = female; M = male; QW = once weekly; SC = subcutaneous.
a. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per dose.
b. Human dose is 300 mg SC QW.
c. 8-day toxicity rat (Day 1; AUC_{τ}; [redacted]MA067).
d. 8-day toxicity monkey (Day 1; AUC_{τ}; [redacted]MA070).
e. 3-month toxicity rat [Day 85; AUC_{168}; 20064198 ([redacted]MA086)].
f. 3-month toxicity monkey [Day 85; AUC_{168}; 20062114 ([redacted]MA097)].
g. 6-month toxicity rat [Day 176; AUC_{168}; 20089324 ([redacted]MA123)].
h. 4-week male fertility and early development plasma concentration only (Day 70; 00655204 [[redacted]GR328]).
i. One-day subcutaneous local tolerance rat (Day 1; AUC_{168}; [redacted]GR324).

2.6.7.4 Drug Substance

Test Article: PF-06741086

Proposed Specification		Sections 3.2.S.4.1 and 3.2.P.5.1 Specification(s) – Drug Substance		
Lot/Batch Number	**Protein Concentration (mg/mL)**		**Study Number (Sponsor Reference Number)**	**Type of Study**
[redacted]	54.13		[redacted]MA067	8-Day Rat Toxicity
[redacted]	54.13		[redacted]MA070	8-Day Monkey Toxicity
[redacted]	54.13		IM2368P ([redacted]MA009)	Tissue Cross Reactivity Methods Development
[redacted]	118.6		200064198 ([redacted]MA086)	3-Month Rat Toxicity
[redacted]	118.6		20062114 ([redacted]MA097)	3-Month Monkey Toxicity
[redacted]	118.6		20063771 ([redacted]MA087)	Tissue Cross Reactivity
[redacted][a]	118.4		200064198 ([redacted]MA086)	3-Month Rat Toxicity
[redacted][a]	118.4		20089324 ([redacted]MA123)	26-Week Rat Toxicity

2.6.7.4 Drug Substance

Test Article: PF-06741086

Proposed Specification		Sections 3.2.S.4.1 and 3.2.P.5.1 Specification(s) – Drug Substance		
Lot/Batch Number	**Protein Concentration (mg/mL)**	[redacted]	**Study Number (Sponsor Reference Number)**	**Type of Study**
[redacted][a]	118.4		20062114 ([redacted]MA097)	3-Month Monkey Toxicity
[redacted]	120.4		200064198 ([redacted]MA086)	3-Month Rat Toxicity
[redacted]	120.4		20062114 ([redacted]MA097)	3-Month Monkey Toxicity
[redacted]	120.4		[redacted]GR003	FcR Binding and C1q Binding Assays
[redacted]	120.4		[redacted]GR044	Cytokine Release Assay
[redacted][b]	107.5		20089324 ([redacted]MA123)	26-Week Rat Toxicity
[redacted][c]	113.8		20089324 ([redacted]MA123)	26-Week Rat Toxicity

2.6.7.4 Drug Substance

Test Article: PF-06741086

Proposed Specification		Sections 3.2.S.4.1 and 3.2.P.5.1 Specification(s) – Drug Substance		
Lot/Batch Number	**Protein Concentration (mg/mL)**		**Study Number (Sponsor Reference Number)**	**Type of Study**
[redacted]	201.6	[redacted]	00655204 ([redacted]GR328)	Rat Fertility and Early Embryonic Development
[redacted]	201.6		[redacted]GR324	Rat Local Tolerance

[redacted]

a. Additional tests for Lot [redacted]

b. Additional tests for Lot [redacted]

c. Additional tests for Lot [redacted]

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Test Article: PF-06741086

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Doses[a, b] (mg/kg/week)	Number/ Sex/Group	NOAEL (mg/kg/week)	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Rat/Wistar Han	IV/SC, 5 mL/kg (20 mM histidine, 8.5% sucrose in milli-Q water, pH 5.8/Solution) Lot [redacted]	8 Days[c]	0 (IV/SC), 3, 30, 90; 3 (SC)	5M	Not reported	**3 mg/kg/week (SC):** ↑ D-Dimer concentrations, SC injection site: ↑ abnormal color, ↑ mixed cell infiltrate, hemorrhage or necrosis **≥30 mg/kg/week (IV):** ↑ D-Dimer concentrations, ↑ globulin, ↓ albumin:globulin	[redacted]MA067 (M4.2.3.2.1)/ No

Toxicokinetic Parameters (Males): Dose (mg/kg/week)	0	3 (IV)	30 (IV)	90 (IV)	3 (SC)
Day 1					
C_{max} (ng/mL)	NA[d]	89000	882000	3480000	27000
AUC_t (ng•h/mL)	NA[d]	2810000	29700000	111000000	1960000

AUC_t = area under the concentration-time curve from 0 to time t, where t can have a numerical value; C_{max} = maximum observed concentration; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; M = male; NA = Not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; SC = subcutaneous.

a. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per week.

b. All doses were IV unless otherwise stated; controls were both IV and SC (total dose volume for controls was 10 mL/kg).

c. Animals dosed once weekly on Days 1 and 8.

d. All samples below assay limit of quantitation (<4.5 ng/mL).

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Test Article: PF-06741086

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Doses[a,b] (mg/kg/week)	Number/ Sex/Group	NOAEL (mg/kg/dose)	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Monkey/ Cynomolgus	IV/SC, 2 mL/kg (20 mM histidine, 8.5% sucrose in milli-Q water, pH 5.8/Solution) Lot [redacted]	8 Days[c]	0 (IV/SC), 3, 30, 90; 3 (SC)	1M/1F	Not reported	**3 mg/kg/week (SC):** ↑ D-Dimer concentrations **≥3 mg/kg/week (IV):** ↑ D-Dimer concentrations	[redacted]MA070 (M4.2.3.2.2) / No

Toxicokinetic Parameters (Combined Sexes): Dose (mg/kg/week)	0 (IV/SC)	3 (IV)	30 (IV)	90 (IV)	3 (SC)
Day 1					
C_{max} (ng/mL)	NA[d]	127000	582000	2680000	7140
AUC_t (ng•h/mL)	NA[d]	3510000	34700000	138000000	432000

AUC_t = area under the concentration-time curve from 0 to time t, where t can have a numerical value; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; SC = subcutaneous.

a. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per dose.

b. All doses were IV unless otherwise stated; controls were both IV and SC (total dose volume for controls was 4 mL/kg).

c. Animals dosed once weekly on Days 1 and 8.

d. All samples below assay limit of quantitation (<3.24 ng/mL).

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Report Title: A 3-Month Intravenous or Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study of PF-06741086 in Rats With a 6-Week Recovery Phase

Test Article: PF-06741086

Species/Strain: Rat/Wistar Han
Age at first dose: 10 Weeks
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Duration of Dosing: 3 Months
Duration of Postdose: 6 Weeks
Method of Administration: IV or SC, once weekly, 10 mL/kg

Study Number: 20064198 (M4.2.3.2.3)
Sponsor Reference Number: [redacted]MA086
Lot Number: [redacted], [redacted], and [redacted]
GLP Compliance: Yes

Vehicle/Formulation: 20 mM Histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL disodium EDTA, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 5.8/Solution
Special Features: Anti-drug antibody analysis was conducted
No Observed Adverse Effect Level: 1000 mg/kg/week (IV) and 180 mg/kg/week (SC)

Dose[a] (mg/kg/week)	**0 (Control) (IV or SC)[b]**		**60 (IV)**		**180 (IV)**		**180 (SC)**		**1000 (IV)**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals										
Toxicity	15/10	15/10	10	10	10	10	10	10	15	15
Toxicokinetics	3/3	3/3	4	4	4	4	4	4	4	4
Toxicokinetics:	Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes	
C_{max} (ng/mL)										
Day 1	NA[c]		1430000		3690000		693000		21000000	
Day 29	NA[c]		1670000		6190000		524000		28900000	
Day 85	NA[c]		1530000		5410000		416000		27800000	
AUC_{168} (ng•h/mL)										
Day 1	NA[c]		62200000		205000000		74800000		1090000000	
Day 29	NA[c]		57700000		263000000		57100000		1660000000	
Day 85	NA[c]		54500000		283000000		45300000		1940000000	
Anti-Drug Antibody (incidence)	1/6 and 0/6		3/8		0/8		6/8		0/8	
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund										
Toxicity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1[d]
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 20064198 (M4.2.3.2.3) (continued)

Dose[a] (mg/kg/week)	0 (Control) (IV or SC)[b]		60 (IV)		180 (IV)		180 (SC)		1000 (IV)	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/Coagulation										
Prothrombin Time (sec)										
Day 29 (IV)/32 (SC)[e]	11.7/10.9	10.8/9.8	11.7	10.2†	11.5	10.5	10.1‡	9.1‡	12.1	10.7
Day 50	-	10.4/10.1	-	10.1	-	10.0*	-	10.2	-	9.4‡
Day 93/94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Activated partial thromboplastin time (sec)										
Day 29 (IV)/32 (SC)[e]	16.8/16.4	18.5/18.5	18.8‡	20.4	19.7‡	20.0	19.7†	19.8*	18.9‡	19.1
Day 50	15.9/16.2	16.4/17.7	17.5†	17.8†	17.4†	18.3‡	17.9†	18.9	17.6‡	18.5‡
Day 93/94	-	14.1/16.1	-	16.7†	-	16.1*	-	15.4	-	17.3‡
Fibrinogen (mg/dL)										
Day 15	-	217/212	-	196	-	193*	-	191*	-	193*
Day 29 (IV)/32 (SC)[e]	270/271	198/207	250	183	252	188	275	197	212‡	160‡
Day 50	-	217/202	-	186‡	-	186‡	-	186	-	174‡
Day 93/94	-	174/160	-	149	-	155	-	156	-	167
Clinical Chemistry										
Day 93/94										
Albumin (g/dL)	3.1/3.0	-	3.0*	-	3.0*	-	3.0	-	2.8‡	-
Globulin (g/dL)	2.3/2.3	2.3/2.2	2.4	2.4	2.6	2.4	2.3	2.2	4.0‡	3.5‡
A/G Ratio	1.4/1.3	1.6/1.5	1.3	1.6	1.2	1.4	1.4	1.6	0.7‡	1.0†
Total Protein (g/dL)	5.4/5.3	5.6/5.6	5.4	5.9	5.6	5.7	5.3	5.6	6.7‡	6.8‡
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	10/10	10/10	10	10	10	10	10	10	10	10
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	10/10	10/10	10	10	10	10	10	10	10	10
Postdose Evaluation										
Number Evaluated	5 (IV)	5 (IV)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	4

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 20064198 (M4.2.3.2.3) (continued)

Dose[a] (mg/kg/week)	0 (Control) (IV or SC)[b]		60 (IV)		180 (IV)		180 (SC)		1000 (IV)	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Noteworthy Findings	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
Mean Plasma Test Article Concentrations (ng/mL)										
Day 112	NA[c]	NA[c]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	947000	661000
Day 134	NA[c]	NA[c]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	22900	6860

∗ = p ≤0.05, † = p ≤0.01, ‡ = p ≤0.001, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
- = No noteworthy findings; A/G = albumin/globulin ratio; AUC_{168} = area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable; SC = subcutaneous.
a. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per week.
b. Two control groups were utilized (one group each) for IV and SC.
c. All samples below assay limit of quantitation (58.2 ng/mL) with the exception of 2 samples from the SC control group with concentrations of 273 and 128 ng/mL at 168 hours postdose on Days 15 and 85, respectively. These low concentrations are not consistent with inadvertent administration of PF-06741086 and did not impact toxicokinetic data analysis.
d. Animal found dead following blood collection on Day 29. The cause of death was attributed to blood collection procedure and not considered test article related.
e. IV groups (Groups 1, 3, 4, and 6) were sampled on Day 29; SC groups (Groups 2 and 5) were sampled on Day 32.

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Report Title: A 6-Month Intravenous Bolus Injection Toxicity Study of PF-06741086 in Rats with a 6-Week Recovery Period

Test Article: PF-06741086

Species/Strain: Rat/Wistar Han
Age at First Dose: 9 Weeks
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Duration of Dosing: 6 Months
Duration of Postdose: 6 Weeks[a]
Method of Administration: IV (slow bolus), once weekly, 10 mL/kg

Study Number: 20089324 (M4.2.3.2.4)
Sponsor Reference Number: [redacted]MA123
Lot Number: [redacted], [redacted], and [redacted]
GLP Compliance: Yes

Vehicle/Formulation: 20 mM Histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL disodium EDTA, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 5.8/Solution
Special Features: Anti-drug antibody analysis was conducted
No Observed Adverse Effect Level: 1000 mg/kg/week

Dose[b] (mg/kg/week)	**0 (Control)**		**60**		**180**		**1000**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals								
Toxicity	15	15	15	15	15	15	15	15
Toxicokinetics	3	3	4	4	4	4	4	4
Toxicokinetics:	Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes	
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	NA[c]		1640000		5170000		23300000	
Day 120	NA[c]		2020000		5820000		27100000	
Day 176	NA[c]		2330000		7030000		29800000	
Day 183	NA[c]		2130000		NA[d]		NA[d]	
AUC_{168} (ng•h/mL)								
Day 1	NA[c]		68700000		239000000		1120000000	
Day 120	NA[c]		62000000		354000000		1740000000	
Day 176	NA[c]		73100000		373000000		1840000000	
Day 183	NA[c]		69700000		NA[d]		NA[d]	
Anti-drug Antibody (incidence)	0/3	0/3	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund								
Toxicity	0	0	0	0	0	0	0	0
Toxicokinetics	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Study Number: 20089324 (M4.2.3.2.4) (continued)**

Dose[b] (mg/kg/week)	0 (Control)		60		180		1000	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/Coagulation								
Prothrombin Time (sec)								
Day 50	11.44	10.64	11.55	10.83	11.67	10.48	12.79§	11.30§
Day 92	11.78	10.87	11.75	10.78	11.87	10.99	13.04§	11.51†
Day 127	11.54	10.75	11.38	10.48	11.88	10.68	12.61§	11.13
Day 182/183	11.73	10.51	12.21	10.40	11.67	10.59	12.80§	11.19†
Activated Partial Thromboplastin Time (sec)								
Day 50	17.09	17.15	18.61*	20.41§	19.28†	19.11*	17.89	18.82
Day 92	17.45	-	18.74	-	18.01	-	18.03	-
Day 127	17.58	18.65	18.67*	18.65	19.02*	19.76	17.55	19.71
Day 182/183	15.73	17.63	16.69	17.30	17.00	18.16	17.02	18.91
Fibrinogen (mg/dL)								
Day 50	298.07	204.47	278.87*	216.67	269.36§	180.62*	231.07§	158.23§
Day 92	299.92	171.85	297.71	203.07§	294.40	175.47	252.86§	161.90
Day 127	299.67	182.27	285.43	185.18	276.85	165.85*	228.73§	140.93§
Day 182/183	300.08	169.90	288.09	159.36	278.56	156.70	231.60§	138.07§
D-Dimer (µg/mL)								
Day 92	0.26	0.14	0.21	0.30	0.36	0.14	0.37	0.52
Day 127	0.18	0.22	0.16	0.52	0.70	0.15	0.70	0.71
Day 182/183	0.17	0.27	0.57	0.57	0.14	0.14	0.92	0.61
Clinical Chemistry – Day 183								
Total Protein (g/dL)	6.03	6.30	5.99	6.55	6.36	6.70†	7.67§	7.57§
Albumin (g/dL)	3.14	3.59	3.10	3.68	3.11	3.63	2.81§	3.45
Globulin (g/dL)	2.89	2.73	2.89	2.89*	3.26†	3.06§	4.87§	4.13§
Albumin/Globulin Ratio	1.09	1.31	1.07	1.28	0.97*	1.19§	0.59§	0.84§
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	15	15	15	15	15	15	15	15

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 20089324 (M4.2.3.2.4) (continued)

Dose[b] (mg/kg/week)	0 (Control)		60		180		1000	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Histopathology								
Number Examined	15	15	15	15	15	15	15	15
Lung								
Thrombi/emboli, acute								
Minimal	0	0	2	1	3	0	1	4
Thrombi/emboli, organizing								
Minimal	0	0	1	1	4	2	1	0
Infiltrate with refractile material								
Minimal	0	2	5	4	6	5	10	12
Foreign material, basophilic								
Minimal	1	0	0	1	1	2	5	2
Foreign material								
Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Injection Site, Tail Vein								
Thrombi/emboli, acute								
Minimal	0	0	0	1	2	0	2	1
Thrombi/emboli, organizing								
Minimal	0	0	0	0	0	1	1	0
Postdose Evaluation								
Number Evaluated	NA	NA	4	4	NA	NA	NA	NA
Mean Plasma Test Article Concentrations (ng/mL)								
Day 203	NA	NA	3.93[e]	0.377[e]	NA	NA	NA	NA
Day 225	NA	NA	0.162[e]	BLQ[e]	NA	NA	NA	NA
Anti-drug Antibody (incidence)	NA	NA	0/4	0/4	NA	NA	NA	NA

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity **Study Number: 20089324 (M4.2.3.2.4) (continued)**

∗ p ≤0.05; † p ≤0.01; § p≤0.001, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
- = no noteworthy findings; AUC_{168} = area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ = below the limit of quantitation; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable.
a. The recovery phase was to further characterize the toxicokinetics effects of the 60 mg/kg/week group with blood sample collection on Day 203 and 225.
b. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per week.
c. All samples below assay limit of quantitation (58.0 ng/mL).
d. Samples not collected per study design.
e. Quantifiable concentrations of PF-06741086 were observed until Day 225 of the recovery phase for 60 mg/kg/dose males (2 out of 4 animals) and until Day 203 of the recovery phase for 60 mg/kg/dose females (4 out of 4 animals). All samples collected from females on Day 225 of the recovery phase were below assay limit of quantitation (58.0 ng/mL).

2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity

Report Title: A 3-Month Intravenous or Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study of PF-06741086 in Cynomolgus Monkeys With a 6-Week Recovery Phase

Test Article: PF-06741086

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: 3-7 Years
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Duration of Dosing: 3 Months
Duration of Postdose: 6 Weeks
Method of Administration: IV or SC, once weekly, 5 mL/kg

Study Number: 20062114 (M4.2.3.2.5)
Sponsor Reference Number: [redacted]MA097
Lot Number: [redacted], [redacted], and [redacted]
GLP Compliance: Yes

Vehicle/Formulation: 20 mM Histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL disodium EDTA, 0.2 mg/mL polysorbate 80, pH 5.8/Solution
Special Features: Anti-drug antibody measurements, jacketed external telemetry (for evaluating systolic, diastolic, and mean blood pressure, heart rate, pulse height, and animal activity), electrocardiograms (restrained and not sedated), respiration rate (manually counted), and neurologic examinations (cage side and restrained observations for general attitude, behavior, motor function, cranial nerves, proprioception and postural reactions, and spinal nerves) were conducted.
No Observed Adverse Effect Level: 500 mg/kg/week (IV) and 90 mg/kg/week (SC)

Dose[a] (mg/kg/week)	**0 (Control) (IV and SC)**		**30 (IV)**		**90 (IV)**		**500 (IV)**		**90 (SC)**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	5	5	3	3	3	3	5	5	3	3
Toxicokinetics:	Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes	
C_{max} (ng/mL)										
Day 1	NA[b]		817000		1570000		10500000		969000	
Day 29	NA[b]		1240000		3600000		17300000		2160000	
Day 85	NA[b]		1290000		4510000		18400000		2480000	
AUC_{168} (ng•h/mL)										
Day 1	NA[b]		55700000		173000000		937000000		123000000	
Day 29	NA[b]		139000000		387000000		1820000000		315000000	
Day 85	NA[b]		160000000		474000000		2000000000		364000000	
Anti-Drug Antibody (incidence)	2/10		0/6		0/6		0/10		0/6	
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity — Study Number: 20062114 (M4.2.3.2.5) (continued)

Dose[a] (mg/kg/week)	0 (Control) (IV and SC)		30 (IV)		90 (IV)		500 (IV)		90 (SC)	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Physical Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurologic Examination	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiration Rate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jacketed External Telemetry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/Coagulation										
Prothrombin Time (sec)										
Baseline	12.26	12.28	12.50	11.80	12.13	11.83	12.20	11.46	12.07	11.87
Day 29	11.86	12.74	13.27*	12.77	12.93*	12.67	13.88*	13.02	12.60	12.70
Day 92	13.20	13.74	13.73	13.37	14.40	12.87	14.36	13.52	13.97	15.47
APTT (sec)										
Baseline	21.90	-	22.27	-	22.33	-	21.76	-	23.07	-
Day 29	22.06	-	22.03	-	23.13	-	25.14	-	23.20	-
Day 92	21.32	-	22.43	-	22.13	-	23.96	-	23.07	-
Fibrinogen (mg/dL)										
Baseline	246.00	246.80	255.67	231.00	258.67	240.00	243.00	232.40	310.33	215.67
Day 29	209.00	211.40	149.33	150.67*	175.33	148.67*	135.20*	140.60*	187.00	173.00
Day 92	206.80	242.20	171.67	160.00*	164.67	193.33	161.80	161.80*	251.33	169.00
D-Dimer (µg/mL)										
Baseline	1.03	0.66	1.35	1.05	1.38	0.60	1.27	1.12	1.84	1.10
Day 29	0.49	0.81	2.29*	2.40	2.45*	2.65*	2.51*	2.68*	2.33*	2.55*
Day 92	0.78	0.52	2.25*	1.93*	2.40*	2.20*	2.31*	2.27*	2.20*	2.34*
Clinical Chemistry										
Globulin (g/dL)										
Baseline	3.38	3.70	3.50	3.70	3.40	3.83	3.50	3.64	3.53	3.67
Day 29	3.26	3.60	3.57	4.07	3.93*	4.43*	5.36*	5.70*	3.83*	4.40*
Day 92	3.04	3.40	3.27	3.67	3.53	3.70	4.26*	4.48*	3.97*	3.73

2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity — Study Number: 20062114 (M4.2.3.2.5) (continued)

Dose[a] (mg/kg/week)	0 (Control) (IV and SC)		30 (IV)		90 (IV)		500 (IV)		90 (SC)	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Total Protein (g/dL)										
Baseline	7.72	7.76	7.63	7.77	7.47	7.97	7.68	7.78	7.63	7.73
Day 29	7.92	7.62	8.07	8.20	8.13	8.53∗	9.38∗	9.42∗	8.10	8.47∗
Day 92	7.50	7.54	7.60	7.57	7.77	7.80	8.50∗	8.46∗	8.20∗	7.70
Albumin/Globulin Ratio										
Baseline	1.30	1.08	1.20	1.10	1.20	1.10	1.20	1.16	1.17	1.10
Day 29	1.44	1.12	1.27	1.03	1.03∗	0.93	0.76∗	0.64∗	1.13∗	0.93
Day 92	1.48	1.26	1.37	1.07	1.20	1.10	1.00∗	0.90∗	1.10	1.10
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Postdose Evaluation										
Number Evaluated	2	2	NA	NA	NA	NA	2	2	NA	NA
Hematology/Coagulation[c]										
Prothrombin Time (sec)	12.75	-	NA	NA	NA	NA	13.60	-	NA	NA
APTT (sec)	24.20	-	NA	NA	NA	NA	26.15	-	NA	NA
Fibrinogen (mg/dL)	216.50	232.50	NA	NA	NA	NA	156.00	136.50	NA	NA
D-Dimer (µg/mL)	0.28	0.29	NA	NA	NA	NA	2.35	1.63	NA	NA

∗ p ≤0.05, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.

- = no noteworthy findings; APTT = activated partial thromboplastin time; AUC_{168} = area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = good laboratory practice; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable; SC = subcutaneous.

a. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per week.

b. All samples below assay limit of quantitation (<48200 ng/mL).

c. Day 133 individual values used with the same rounding as dosing phase values.

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation

Report Title: A Fertility and Early Embryonic Development Study of PF-06741086 by Intravenous Injection in Male Wistar Rats

Test Article: PF-06741086

Design Similar to ICH 4.1.1: Yes
Species/Strain: Rat/Wistar Han
Age at First Dose: 8 Weeks
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]

Dosing Period:
M: 4 Weeks premating, through mating, to euthanasia[a]
F: Not dosed
Day of Mating (Naïve F): GD 0
Day of Cesarean Section: GD 14
Method of Administration: IV (slow bolus), once weekly, 10 mL/kg

Study Number: 00655204 (M4.2.3.5.1.1)
Sponsor Reference Number: [redacted]GR328
Lot Number: [redacted]
GLP Compliance: Yes

Vehicle/Formulation: 20 mM Histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.2 mg/mL polysorbate 80, and 0.05 mg/mL disodium EDTA, pH 5.8/Solution
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level:
Male Systemic Toxicity: 1000 mg/kg/week
Male Fertility and Early Embryonic Development: 1000 mg/kg/week

Dose[b] (mg/kg/week)	0 (Control)	60	180	1000
Males				
Number of Animals	20	20	20	20
Mean Plasma Test Article Concentrations (ng/mL)				
5 Minutes Postdose				
Day 0	NA[c]	3730000	8670000	47300000
Day 28	NA[c]	3200000	10100000	46800000
Day 70	NA[c]	3790000	11500000	50800000
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Mean Number Days Prior to Mating	-	-	-	-
Number of Males Mated (Confirmed)	18	20	20	20
Number of Fertile Males	16	18	20	20
Organ Weights	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Sperm Motility (% motile cells)	-	-	-	-
Sperm Count (million sperm/gram cauda weight)	-	-	-	-

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation **Study Number: 00655204 (M4.2.3.5.1.1) (continued)**

Dose[b] (mg/kg/week)	0 (Control)	60	180	1000
Females				
Number of Animals	20	20	20	20
Cesarean Section Observations	-	-	-	-

- = No noteworthy findings; BLQ = below the limit of quantitation; F = female; GD = gestation day; GLP = good laboratory practice; ICH = international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable.
a. 11 total doses.
b. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight per week.
c. All samples below assay limit of quantitation (58.0 ng/mL).

2.6.7.16 Local Tolerance

Test Article: PF-06741086

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg)	Number/Sex/ Group	Noteworthy Findings	Study Number (Sponsor Reference Number)/ GLP Compliance
Rat/Wistar Han	SC, QD, 2 mL/kg (20 mM histidine, 85 mg/mL sucrose, 0.05 mg/mL EDTA, 0.20 mg/mL polysorbate-80, pH 5.8/Solution) Lot [redacted] ([redacted])	1 Day	0, 300	15	**300 mg/kg**: ↑ minimal to mild mixed cell infiltration at injection site; minimal edema and/or hemorrhage in dermis; ↓ food consumption (0.90x-0.92x). C_{max} of 1390000 ng/mL and AUC_{168} of 139,000,000 ng•h/mL.	[redacted]GR324 (M4.2.3.6.1)/Yes

AUC_{168} = area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; C_{max} = maximum observed concentration; EDTA = edetate disodium dihydrate; GLP = good laboratory practice; QD = once daily; SC = subcutaneous.
a. All doses are expressed as mg of protein per kg of body weight.

2.6.7.17 Other Toxicity Studies

Test Article: PF-06741086

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Article Lot Number	Concentrations (µg/mL)	Number/ Group	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Tissue cross reactivity methods development	Human, Rat/Sprague-Dawley, Monkey/Cynomolgus tissues	[redacted]	1 to 25 µg/mL	NA	Based on the results of the staining method using the glucose oxidase peroxidase block and salmon sperm DNA in the nonspecific protein block, positive and negative control materials, and test article and control article (commercially supplied human IgG1) concentrations have been judged qualified for use in subsequent tissue cross-reactivity studies with PF-06741086.	IM2368P (M4.2.3.7.7.1) (Sponsor Reference [redacted]MA009)/No
Tissue cross reactivity	Human, non-human primate (cynomolgus monkey), Wistar-Han rat tissues	[redacted]	5, 25 µg/mL	NA	Staining with PF-06741086 was observed in membrane granules of human placental decidual cells. In addition, staining with PF-06741086 was observed in the cytoplasm, peripheral cytoplasm and/or cytoplasmic granules/globules of the endothelium of human, monkey and rat samples (including rat reticuloendothelium); placental trophoblasts of human and monkey samples and spongiotrophoblasts of rat samples; epithelium (including reticular epithelium) and tonsillar reticular cells of human	20063771 (M4.2.3.7.7.2) (Sponsor Reference [redacted]MA087)/Yes

2.6.7.17 Other Toxicity Studies

Test Article: PF-06741086

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Article Lot Number	Concentrations (µg/mL)	Number/ Group	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
					samples; and mesothelium, islet cells, and extra cellular material of monkey samples.	
FcR binding/C1q binding assay	FcR Binding: CD64, CD32a, CD32a (167Arg/His), CD16a, CD16a (176Phe/Val), CD32b C1q: Rituxan	[redacted]	Up to 30 µg/mL	NA	PF-06741086 did not bind to C1q at the concentrations tested and therefore is considered to have a low potential of inducing CDC. PF-06741086 binding to FcγR was similar to, or lower than, assay control mAb 8.8 (TM). These data suggest that PF-06741086 has low potential to elicit ADCC activity.	[redacted]GR003 (M4.2.3.7.2.1)/No
Cytokine release assay	Human whole blood	[redacted]	Up to 1000 µg/mL	NA	There was no test article-related cytokine (TNF-α, IL-6, and IFN-γ) release induced by PF-06741086.	[redacted]GR044 (M4.2.3.7.2.2)/No

In Vivo

Species/Strain	Method of Administration (Test Article Lot Number)	Duration of Dosing	Doses (U/kg/day)[a]	Number/Sex/Group	Noteworthy Findings	Study Number/GLP Compliant
Factor eight inhibitor bypassing activity Rat/Wistar Han	IV, BID, 52.3 U/mL, ([redacted])	3 Days	0, 50 (25 BID), 100 (50 BID), 200 (100 BID) U/kg/day	5M	At ≥50 (25 BID) U/kg/day, test article-related changes were observed in clinical signs (tail) and hematology and coagulation parameters. At ≥100 (50 BID) U/kg/day, test article-related microscopic findings [injection	[redacted]GR090 (M4.2.3.7.7.3)/No

2.6.7.17 Other Toxicity Studies

Test Article: PF-06741086

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Article Lot Number	Concentrations (μg/mL)	Number/ Group	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
					site (tail) and lung] as well as macroscopic changes [injection site (tail)] were observed.	

ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; BID = twice daily; CDC = complement dependent cytotoxicity; DNA = deoxyribonucleic acid; FEIBA = factor VIII inhibitor bypassing activity; GLP = good laboratory practice; IgG1 = immunoglobulin G1; IFN-γ = interferon gamma; IL = interleukin; NA = not applicable; TM = triple mutant; TNF = tumor necrosis factor; U = units FEIBA.
a. All doses are expressed as U of protein per kg of body weight.