TABLE OF CONTENTS

本項で使用する用語・略語 3
1. 非臨床試験計画概略 4
2. 薬理試験 5
2.1. 要約 5
2.2. 効力を裏付ける試験 5
2.2.1. トロンビン生成試験においてヘムライブラ®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 5
2.3. 副次的薬理試験 6
2.4. 安全性薬理試験 6
2.5. 薬力学的薬物相互作用 6
3. 薬物動態試験 7
3.1. 分析法 7
3.2. 吸収 7
3.2.1. 生殖発生毒性試験における反復投与時のトキシコキネティクス 7
3.3. 分布 7
3.4. 代謝 8
3.5. 排泄 8
3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 8
4. 毒性試験 9
4.1. 単回投与毒性 9
4.2. 反復投与毒性 9
4.3. 遺伝毒性試験 9
4.4. がん原性 10
4.5. 生殖発生毒性 10
4.5.1. 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 10
4.5.2. ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 10
4.5.3. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験 10
4.5.4. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 11
4.6. 局所刺激性試験 11
4.7. その他の毒性試験 11
4.8. 毒性所見と薬物動態の関係 11

4.9. 標的臓器毒性 12
5. 総括及び結論 13
6. 参考文献 14

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
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_{tau}	AUC over the dosing interval tau：投与間隔の血漿中濃度-時間曲線下面積
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
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
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
N	number：例数
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
rFVIIa	recombinant factor VII activated：遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子
TFPI	tissue factor pathway inhibitor：組織因子経路インヒビター

1. 非臨床試験計画概略

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。マルスタシマブは「血液凝固第VIII因子又は第IX因子に対するインヒビターを保有しない先天性血友病患者における出血傾向の抑制」を適応症として 2024 年 12 月に承認を取得しており，マルスタシマブの非臨床プロファイルは初回申請承認資料に詳述された一連の薬理試験，薬物動態試験および毒性試験によって広範に評価されている。

今回の「血液凝固第VIII因子又は第IX因子に対するインヒビターを保有する先天性血友病患者における出血傾向の抑制」の適応追加に関する一部変更承認申請にあたり，初回申請以降に追加された非臨床試験成績を提出する。

薬理試験として，ヘムライブラ®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をトロンビン生成試験により評価した。

薬物動態試験として，バリデートされたリガンド結合法を用いてラットおよびウサギを用いた GLP 適用生殖発生毒性試験における曝露量を評価した。

毒性試験として，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ならびにラットまたはウサギ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を実施した。

マルスタシマブはラットおよびウサギの TFPI と結合し，ラットを用いた反復投与毒性試験および非血友病ウサギ血小板乏血漿を用いた in vitro 試験において薬理学的活性を示したことから，生殖発生毒性試験ではラットおよびウサギを用いた。

2. 薬理試験

2.1. 要約

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。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[1,2]。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[3]。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。

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。

インヒビター保有を含む血友病 A 血漿にマルスタシマブとエミシズマブ（ヘムライブラ®）を併用添加した際のトロンビン生成量は，マルスタシマブ単独と比較して増加した。しかし，その最大トロンビン生成量は非血友病血漿にマルスタシマブを単独添加時の生成量を超えず，非血友病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[4,5]。

2.2. 効力を裏付ける試験

2.2.1. トロンビン生成試験においてヘムライブラ®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]_042724

エミシズマブ（ヘムライブラ®）による治療を受けている血友病 A 患者がマルスタシマブによる治療へ切り替える状況を想定し，インヒビター保有患者由来を含む血友病 A 患者から採取された血漿を用いて，マルスタシマブとヘムライブラ®を併用したときの相加作用をトロンビン生成試験（TGA）により評価した。ヘムライブラ®の濃度（25，50 または 100 µg/mL）は，6 mg/kg のヘムライブラ®を月 1 回投与したときの定常状態における血漿中濃度に基づき設定した。マルスタシマブ濃度（4，16 または 80 µg/mL）は，第 1 相，第 2 相および第 3 相の各臨床試験におけるマルスタシマブの定常状態における血漿中濃度に基づき設定した。すべての血漿においてマルスタシマブまたはエミシズマブによるトロンビン生成量の増加が認められた。また非血友病血漿にマルスタシマブを添加した結果，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のに対して，過剰なトロンビン生成は認められず[4]，これはマルスタシマブの TFPI 阻害に基づく薬理作用と整合するものであった。

血友病 A 血漿にマルスタシマブとヘムライブラ®を併用添加した結果，マルスタシマブ単独添加と比較してトロンビン生成量の増加が認められたが，最大トロンビン生成量は非血友病血漿へのマルスタシマブ添加でみられたトロンビン生成量を超えず，非血友病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[5]。

以上の in vitro 試験結果は，血友病 A 患者におけるヘムライブラ®とマルスタシマブの治療切り替えにおける逐次投与を支持するものと考えられる。

2.3. 副次的薬理試験

本申請における提出データなし。

2.4. 安全性薬理試験

本申請における提出データなし。

2.5. 薬力学的薬物相互作用

本申請における提出データなし。

3. 薬物動態試験

3.1. 分析法

ウサギを用いた GLP 適用生殖発生毒性試験において，バリデートされたリガンド結合法（15-[redacted]20 試験）を用いてマルスタシマブを定量した。

3.2. 吸収

ラットおよびウサギを用いた GLP 適用生殖発生毒性試験において曝露量を評価した結果，マルスタシマブの曝露量（AUC_{168}）は用量にほぼ比例して増加した。

3.2.1. 生殖発生毒性試験における反復投与時のトキシコキネティクス

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（[redacted]PZ257 試験）ならびにラットまたはウサギ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（[redacted]PZ187 試験および [redacted]PZ233 試験）において静脈内投与したときの曝露量を評価した（Table 1）。

いずれの試験においても，溶媒対照群においてマルスタシマブは検出されなかった。またマルスタシマブの曝露量（AUC_{168}）は用量にほぼ比例して増加した。

Table 1.　ラットおよびウサギへ反復投与したときのトキシコキネティクス（生殖発生毒性試験）

試験/試験番号	用量 (mg/kg/dose)	C_{max}[a] (ng/mL)	AUC_{168}[a] (ng•h/mL)
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[b]/ [redacted]PZ257	20	602,000	19,700,000
	60	2,140,000	88,500,000
	120	2940,000	169,000,000
ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験[c]/ [redacted]PZ187	20	480,000	9,120,000
	60	1,430,000	39,400,000
	180	4,130,000	154,000,000
ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験[d]/ [redacted]PZ233	10	355,000	17,600,000
	40	1,140,000	77,500,000
	125	3,690,000	291,000,000

a. 反復投与時の C_{max} および AUC_{168} は血漿中濃度の平均値を示す。
b. 雌ラットに対して交配 14 日前から週 1 回，妊娠 6 日までマルスタシマブを静脈内投与したときの妊娠 8 日の曝露量を示す（N = 5）。
c. 雌ラットに対して妊娠 6 日および妊娠 12 日にマルスタシマブを静脈内投与したときの妊娠 12 日の曝露量を示す（N = 5）。
d. 雌ウサギに対して妊娠 7 日および妊娠 14 日にマルスタシマブを静脈内投与したときの妊娠 14 日の曝露量を示す（N = 5）。

3.3. 分布

本申請における提出データなし。

3.4. 代謝

本申請における提出データなし。

3.5. 排泄

本申請における提出データなし。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

本申請における提出データなし。

4. 毒性試験

マルスタシマブの非臨床毒性試験の一覧を Table 2 に示す。非臨床試験の試験デザインおよび評価項目は，ICH，OECD ガイドラインおよび各国の規制に示される一般に認められた原則および実施基準と一致していた。重要な試験はすべて OECD のデータ相互受け入れ制度加盟国である米国において，FDA の GLP 規則に従って実施した。

生殖発生毒性試験として，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（[redacted]PZ257 試験）ならびにラットまたはウサギ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（[redacted]PZ187 試験および [redacted]PZ233 試験）を実施した。

Table 2. 毒性試験の概要

試験種または試験期間	試験番号	用量	概要表	GLP 適用
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	[redacted]PZ257	0，20，60，120 mg/kg/week	2.6.7.12	適用
ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験	[redacted]PZ187	0，20，60，180 mg/kg/dose	2.6.7.13A	適用
ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験	[redacted]PZ188	0，100，300，760 mg/kg/dose	2.6.7.11	非適用
ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験	[redacted]PZ233	0，10，40，125 mg/kg/dose	2.6.7.13B	適用

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における無毒性量（NOAEL）は検討した最高用量である 120 mg/kg であり，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 17 倍であった。ラットにおける胚・胎児発生毒性に関する NOAEL は 60 mg/kg であり，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 4.3 倍であった。ウサギにおける胚・胎児発生毒性に関する試験の NOAEL は検討した最高用量である 125 mg/kg であり，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 32 倍であった。

4.1. 単回投与毒性

本申請における提出データなし。

4.2. 反復投与毒性

本申請における提出データなし。

4.3. 遺伝毒性試験

本申請における提出データなし。

4.4. がん原性

本申請における提出データなし。

4.5. 生殖発生毒性

4.5.1. 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

雌のラットに，マルスタシマブを 0，20，60 または 120 mg/kg/週の用量で週 1 回，交配の 2 週間前から妊娠 6 日まで静脈内投与した（[redacted]PZ257 試験）。

評価したいずれの用量においても，マルスタシマブ投与に関連した死亡，一般状態変化，体重，体重変化，摂餌量，発情周期，交配成立までの日数、雌の生殖能（交尾率、受胎率および妊娠率）ならびに卵巣または子宮に関するパラメータへの影響がみられなかったことから，雌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 120 mg/kg/週と判断した。

4.5.2. ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠したラットにマルスタシマブを 0，20，60 または 180 mg/kg の用量で妊娠 6 日および 12 日に静脈内投与した（[redacted]PZ187 試験）。

マルスタシマブ投与に関連した毒性変化として，180 mg/kg で胎児の骨格奇形および骨格変異ならびに着床後胚損失が認められた。着床後胚損失（早期胚吸収）の増加と関連して，対照群と比較して生存胎児数の減少および妊娠子宮重量の低下が認められた。180 mg/kg の母動物で，生存胎児数の減少および妊娠子宮重量の低下に起因すると考えられる体重および体重増加量の減少が認められた。

180 mg/kg の母動物で，マルスタシマブ投与に関連した外陰部からの赤色分泌物が認められる動物数が増加し，多量の赤色分泌物を伴う瀕死状態の 1 例を安楽殺した。赤色分泌物が認められる母動物数の増加および 1 例の瀕死状態は，いずれも本用量で認められた着床後胚損失に続発したものであり，母動物に対する直接的な毒性ではないと考えられた。180 mg/kg では，胚・胎児発生に関する毒性変化が認められたことから，胚・胎児発生に関する NOAEL は 60 mg/kg と判断した。母動物に関する NOAEL は 180 mg/kg と判断した。

4.5.3. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

妊娠したウサギにマルスタシマブを 0，100，300 または 760 mg/kg の用量で妊娠 7 日および 14 日に静脈内投与し，用量設定試験を実施した（[redacted]PZ188 試験）。

マルスタシマブ投与に関連した変化は 760 mg/kg での軽度の摂餌量低下のみであった。

4.5.4. ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

妊娠ウサギにマルスタシマブを 0，10，40 または 125 mg/kg の用量で妊娠 7 日および 14 日に静脈内投与した（[redacted]PZ233 試験）。

マルスタシマブ投与に関連した母動物の死亡，一般状態変化，体重，体重増加量および摂餌量の変化ならびに卵巣または子宮パラメータへの影響，剖検所見は認められなかった。また胎児の生存率，胎児体重ならびに胎児の外表，内臓および骨格への影響も認められなかった。いずれの用量においてもマルスタシマブ投与に関連した影響が認められなかったことから，母動物および胚・胎児発生に関する NOAEL は 125 mg/kg と判断した。

4.6. 局所刺激性試験

本申請における提出データなし。

4.7. その他の毒性試験

本申請における提出データなし。

4.8. 毒性所見と薬物動態の関係

ラットおよびウサギにマルスタシマブを投与したときの曝露量（C_{max} および AUC_{168}）を Table 3 に示す。

生殖発生毒性試験において，ラットおよびウサギにマルスタシマブを投与したときのマルスタシマブの曝露量（AUC_{168}）は用量にほぼ比例して増加した。

Table 3.　　薬物動態と臨床曝露量の関係

試験/試験番号	投与量 (mg/kg)	C_{max}[a] (ng/mL)	AUC_{168}[a] (ng•h/mL)	曝露量比[b] C_{max}	曝露量比[b] AUC_{168}
ラット					
雌動物を用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する静脈内投与試験 /[redacted]PZ257	20	602,000	19,700,000	9.4	2.2
	60	2,140,000	88,500,000	33	9.7
	120（NOAEL）	2,940,000	169,000,000	46	18
胚・胎児発生に関する静脈内投与試験 /[redacted]PZ187	20	480,000	9,120,000	7.5	1.0
	60（胚・胎児発生に関する NOAEL）	1,430,000	39,400,000	22	4.3
	180（母動物に関する NOAEL）	4,130,000	154,000,000	65	17
ウサギ					
胚・胎児発生に関する静脈内投与試験 /[redacted]PZ233	10	355,000	17,600,000	5.6	1.9
	40	1,140,000	77,500,000	18	8.5
	125（胚・胎児発生および母動物に関する NOAEL）	3,690,000	291,000,000	58	32

a. 反復投与試験の平均血漿中濃度から算出した C_{max} および AUC_{168} を示す。
b. C_{max} および AUC_{168} の曝露量比は，ヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与したときの C_{max}（63,930 ng/mL）および AUC_{tau}（9,146,000 ng•h/mL）を用いて算出した（初回申請資料 2.7.2 項）。

4.9. 標的臓器毒性

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験で，胎児の骨格奇形および骨格変異ならびに着床後胚損失（早期胚吸収）が認められ，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 17 倍であった。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において，発生毒性は認められなかった。

5. 総括及び結論

インヒビター保有を含む血友病 A 血漿にマルスタシマブとエミシズマブ（ヘムライブラ®）を併用添加した際のトロンビン生成量は，マルスタシマブ単独添加と比較して増加した。しかし，その最大トロンビン生成量は非血友病血漿にマルスタシマブを単独添加した値を超えず，非血友病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[4,5]。この in vitro 試験結果は，血友病 A 患者におけるヘムライブラ®とマルスタシマブの治療切り替えにおける逐次投与を支持するものと考えられる。

ラットおよびウサギを用いた GLP 適用生殖発生毒性試験において曝露量を評価した結果，マルスタシマブの曝露量（AUC_{168}）は用量にほぼ比例して増加した。

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における NOAEL は検討した最高用量である 120 mg/kg であり，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 18 倍であった。

ラットにおける胚・胎児発生毒性に関する NOAEL は 60 mg/kg であり，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 4.3 倍であった。ウサギにおける胚・胎児発生毒性に関する試験の NOAEL は検討した最高用量である 125 mg/kg であり，そのときの曝露量はヒトに 300 mg を週 1 回皮下投与した際の AUC_{tau} の 32 倍であった。

6. 参考文献

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

[2] 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.

[3] 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.

[4] Pittman DD, Rakhe S, Bowley SR, et al. Hemostatic efficacy of marstacimab alone or in combination with bypassing agents in hemophilia plasmas and a mouse bleeding model. Res Pract Thromb Haemost. 2022;6(2):e12679.

[5] 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.