メプセヴィ点滴静注液 10mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）
2.6.6　毒性試験の概要文

アミカス・セラピューティクス株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 4
2.6.6.1　概要 4
2.6.6.1.1　適切な動物種 12
2.6.6.2　単回投与毒性試験 13
2.6.6.2.1　SD ラットを用いた単回投与毒性／TK 評価／CNS 安全性薬理試験（UX003-PC002） 13
2.6.6.3　反復投与毒性試験 14
2.6.6.3.1　MPS VII 型マウスを用いた反復投与試験 14
2.6.6.3.1.1　公表済みの MPS VII 型モデルマウスを用いた 3 及び 13 週間の反復投与試験 14
2.6.6.3.1.2　uGAG と病理組織変化との関係を確認する生体内分布試験（UX003-PC001） 15
2.6.6.3.2　UX003 の若齢カニクイザルにおける 26 週間静脈内持続投与（及び 4 週間の回復期間）毒性／TK 評価／心血管系安全性試験（UX003-PC003） 16
2.6.6.4　遺伝毒性試験 18
2.6.6.5　がん原性試験 18
2.6.6.6　生殖発生毒性（DART）試験 19
2.6.6.6.1　受胎能及び胚・胎児発生（EFD、Seg I／II） 19
2.6.6.6.1.1　妊娠ラットを用いた UX003 の用量範囲設定試験（GLP 非適用、UX003-PC007） 19
2.6.6.6.1.2　ラットを用いた UX003 の受胎能／胚・胎児発生毒性併合試験（GLP 適用、UX003-PC008） 21
2.6.6.6.1.3　妊娠ウサギを用いた UX003 の用量範囲設定試験（GLP 非適用、UX003-PC006） 24
2.6.6.6.1.4　ウサギを用いた UX003 の胚・胎児発生毒性試験（GLP 適用、UX003-PC009） 25
2.6.6.7　局所刺激性試験 33
2.6.6.8　その他の毒性試験 33
2.6.6.9　考察及び結論 33
2.6.6.10　参考文献 35

略語一覧

ADA	抗薬物抗体
AUC	血清中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}inf}$	投与後 0 時間から無限大までの血清中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血清中濃度－時間曲線下面積
CIM6PR	カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体
CL	静脈内投与後の薬物の総クリアランス
C_{max}	最高血中濃度
CNS	中枢神経系
[redacted]	[redacted]
CV	変動係数
DART	生殖発生毒性
DNA	デオキシリボ核酸
DPH	ジフェンヒドラミン塩酸塩
DRF	用量範囲設定
ECG	心電図
EFD	胚・胎児発生
EOI	投与終了
ERT	酵素補充療法
FDA	米国食品医薬品局
FOB	機能観察総合評価
GAG	グリコサミノグリカン
GD	妊娠日数
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GUS	β-グルクロニダーゼ
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IND	Investigational New Drug（米国治験届）
IV; i.v.	静脈内
K_{uptake}	細胞内への最大取り込み量の 50%が得られる酵素濃度
LD	Lactation day
MCB	マスターセルバンク
MPS	ムコ多糖症
MPS VII	ムコ多糖症VII型、スライ症候群（β-グルクロニダーゼ欠損症）
NOAEL	無毒性量

NZW ウサギ	New Zealand White ウサギ
PK	薬物動態
PPND	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
QOW	隔週
r^2	決定係数
rhGUS	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ
rmGUS	遺伝子組換えマウス β-グルクロニダーゼ
SD ラット	Sprague Dawley ラット
$t_{1/2}$	消失半減期
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血中濃度到達時間
uGAG	尿中グリコサミノグリカン
UX003	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ
Vz	分布容積

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　概要

非臨床プログラムは、UX003 を最大 4 mg/kg の用量で隔週（QOW）長期間静脈内投与する臨床用法の妥当性を裏付けるものであり、UX003 の承認の根拠を得ることを目的として設計した。

UX003 を静脈内投与したときの非臨床の毒性特性は、以下の複数の Ultragenyx がスポンサーの非臨床毒性試験で評価した。

1) Sprague Dawley（SD）ラットを用いた急性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC002）
2) 若齢カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC003）
3) 免疫寛容 MPS VII 型マウスを用いた 8 週間（及び 1 週間の回復期間）の生体内分布試験（UX003-PC001）
4) SD ラットを用いた用量範囲設定（DRF）試験（GLP 非適用、UX003-PC007）及びそれに続く受胎能及び胚・胎児発生（EFD）毒性本試験（GLP 適用、UX003-PC008）
5) New Zealand White（NZW）ウサギを用いた DRF 試験（GLP 非適用、UX003-PC006）及びそれに続く EFD 毒性本試験（GLP 適用、UX003-PC009）。
6) SD ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する（PPND）試験（ GLP 適用、UX003-PC010)

PPND 試験を除いて、UX003 の忍容性は 20 mg/kg まで良好で、投与に関連した毒性学的に重要な所見は認められなかった。重要な慢性毒性試験では、安全係数が予定市販用量（4 mg/kg）の 5 倍、安全域が UX003-CL301 試験 4 mg/kg 投与時の C_{max} に基づくと 22 倍、AUC に基づくと 18 倍であった（表 2.6.6.3.2.2）。これらの試験の無毒性量（NOAEL）はいずれも 20 mg/kg（最高用量）とした。PPND 試験 (UX003-PC010)では、母体の無毒性量は UX003 に対するアナフィラキシー様反応のため 2 mg/kg と考えられたが、発生に関する無毒性量は 20/12 mg/kg[1]であった（表 2.6.6.1.1）。

また、Vogler が発表した試験（Vogler et al. 2005）によると、免疫寛容 MPS VII 型マウスに遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ（rhGUS）を投与しても重要な病理学的所見は認められなかった。この結果は、Vogler の試験で保管されていた利用可能な組織スライドをすべて盲検下で再評価した Ultragenyx がスポンサーの試験（第 4.2.3.2 項：[redacted]20022037-1 及び[redacted]20022037-2）でも確認している。

急性毒性試験（UX003-PC002）、慢性毒性試験（UX003-PC003）及び生殖発生毒性（DART）試験（UX003-PC008、UX003-PC009 及び UX003-PC010）は、GLP を遵守して実施した。

マウス、ラット、ウサギ及びサルはカチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体（CIM6PR）を発現し、β-グルクロニダーゼ（GUS）のアミノ酸配列相同性が合理的で系統発生学的にヒトと類似している（それぞれ 75.0%、75.0%、82.0%及び 94.0%）ことから、対象動物種として選択した。また、これらの動物種は、これらの試験と同様に CIM6PR による細胞内取り込みの作用機序を利

[1] 20/12 mg/kg：20 mg/kg で母体動物で死亡例が認められたため、妊娠 19 日目に 12 mg/kg に減量した。

用した他の酵素補充療法（ERT）の毒性プログラムでも使用されている。

EMA は、2012 年のプロトコールアシスタンス手続き（Protocol Assistance Procedure）において、サルを用いた試験は必須ではなく、ラット及びマウスで得た結果から結論が得られない場合のみ必要とすることに合意し、ヒト以外の霊長類を用いた試験の必要性については、ラット試験の妥当性及び MPS VII 型モデルマウスで得られたデータの価値に基づいて再検討すべきであるとしたが（EMA プロトコールアシスタンス手続き、手続き番号：EMEA/H/SA/2342/1/2012/SME/III、2012 年 6 月 21 日付）、米国食品医薬品局（FDA）は 2012 年の米国治験届（IND）前相談で、げっ歯類及び非げっ歯類の双方を用いて毒性プログラムを実施することを求めた（FDA 文書［参照 ID：3158702］、2012 年 7 月 13 日付）。

また、DART 試験の実施を要請したのも FDA のみであった（FDA 文書［参照 ID：3158702］、2012 年 7 月 13 日付及び FDA 文書［参照 ID：3609572］、2014 年 8 月 13 日付）。この要請は、生物製剤承認申請（BLA）の前に Segment I 及び II を実施し、その結果を BLA に盛り込み、Segment III は承認後に実施するように指示するものであった。

静脈内投与は臨床投与経路であることから、UX003 の影響を評価する単回投与及び慢性毒性試験では本投与方法（ラット及びサルにおける 2 時間の IV 持続投与）を設定した。非臨床用量（2、6 及び 20 mg/kg）は、MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞における UX003 の K_{uptake} に基づき、臨床開始用量（2 mg/kg）の 10 倍の安全係数及び予定最大臨床用量（4 mg/kg）の 5 倍の安全係数となるよう設定した。MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞で細胞内半減期が約 40 日であったこと（UGNX-013）や、臨床で予定している投与方法を踏まえた上で、26 週間反復投与毒性試験は QOW 投与で実施した。

小児患者における慢性投与の妥当性を示すため、若齢カニクイザル（1.5～2 歳齢）を用いて 26 週間反復投与毒性試験を実施した。ヒトとサルの出生後の発達が似ていること（Zoetis et al. 2003b、Zoetis et al. 2003a、Zoetis et al. 2003c）及びグリコサミノグリカン（GAG）は動物種及び発生段階が異なっても変化がないことから（Ballesteros et al. 1990、Wenk et al. 1991）、若齢サルで得られたデータをヒトの小児集団に外挿することは可能である。したがって、若齢サルを用いた 26 週間反復毒性試験は、小児患者及び成人患者における UX003 の慢性投与の根拠となる。

非臨床安全性評価で使用した試験材料の概要を毒性試験の概要表（第 2.6.7.4 項、表 2.6.7.4.1）に示す。今回の非臨床試験すべてで使用した rhGUS は、臨床試験用物質及び将来の市販製剤の製造で使用する[redacted]（[redacted]）[redacted]するもので、従来の純化方法と同様の方法で製造したものである。UX003 のロット[redacted]、[redacted] 及びロット[redacted] のロット解析の内容を第 3.2.S.4.4 項に示す。

非臨床毒性プログラムの概要を表 2.6.6.1.1 に示し、続いて各試験の方法、結果及び結論について詳細に述べる。

表 2.6.6.1.1：　UX003 の非臨床毒性試験の概要

試験の種類	投与方法	動物種／系統	試験番号又は参考文献	該当概要表	GLP	主な所見
一般毒性試験						
単回投与[a]	i.v.（2 時間の持続投与）；単回；0、6 又は 20 mg/kg；雌雄各 6 例／群＋TK 用雌雄各 4 例／群）	Sprague Dawley ラット	UX003-PC002	第 2.6.7 項、表 2.6.7.5.1	適用	• 機能観察総合評価では、UX003 投与に関連した変化は認められなかった（CNS 安全性薬理試験）。 • 20 mg/kg まで UX003 投与に関連した変化は認められなかった。
反復投与[b]	i.v.、週 1 回 × 3（0.3、1、2.5 又は 5 mg/kg、2～3 例／群）、週 1 回 × 13（1、2 又は 4 mg/kg、4～5 例／群）、3 回／週（20 又は 40 mg/kg、2 例／群）又は週 1 回 × 4（20 mg/kg、2 例／群）	MPS VII 型モデルマウス（MPS VII/E540A^{TG}）	(Vogler et al. 2005) [redacted] 参照番号：20022037-1 及び 20022037-2	NA 第 2.6.7 項、表 2.6.7.6.1	非適用	• Vogler により報告された髄膜のライソゾーム GAG 蓄積の中等度の減少（Vogler et al.2005）は、[redacted]（[redacted]）で実施した Ultragenyx がスポンサーの盲検下再評価で確認した。 • 髄膜並びに頭頂、新皮質及び海馬のニューロン及びグリアにおける GAG 蓄積のクリアランス。肝臓及び腎臓における GAG 蓄積の減少、尿中 GAG 排泄量の減少。これらの結果は、[redacted] で実施した Ultragenyx がスポンサーの盲検下再評価で確認した。 • ニューロン、グリア及び髄膜における GAG 蓄積の減少。
反復投与	i.v.（週 1 回 8 週間）；0、0.1、0.25、1、4 又は 20 mg/kg；6 例／群	MPS VII 型モデルマウス（MPS VII/E540A^{TG}）	UX003-PC001	第 2.6.7 項、表 2.6.7.7.1	非適用	• 20 mg/kg まで UX003 投与に関連した変化は認められなかった。

試験の種類	投与方法	動物種／系統	試験番号又は参考文献	該当概要表	GLP	主な所見
慢性毒性 [c]	i.v.（2 時間の持続投与）、隔週 1 回 26 週間 + 4 週間の回復期間；0、2、6 又は 20 mg/kg；雌雄各 3 例／群 + 雌雄各 2 例／群（回復群及び高用量群）	カニクイザル（若齢）	UX003-PC003	第 2.6.7 項、表 2.6.7.7.2	適用	• 心血管安全性薬理パラメータに UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • TK プロファイル：実験 1 及び 169 日の投与前、投与後 2 分、10 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間及び 8 時間、並びに投与終了後 30 分 • 体重及び摂餌量：体重及び摂餌量、一般状態、外観及び眼科学的検査、血液学的検査、凝固機能検査、並びに尿検査において UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 血液化学的検査：実験 4 日に雌でビリルビン増加が認められたが、軽度かつ一過性で可逆的であったことから、有害作用とは見なさなかった。 • 試験したすべての用量で標的臓器は特定されなかった。器官重量、肉眼的病理所見及び病理組織学的所見に UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • UX003 曝露前に ADA 陽性であった動物を除けば、2、6 及び 20 mg/kg 群のそれぞれ 3/5 例、3/5 例及び 3/7 例で UX003 曝露後に ADA 産生が認められた。

試験の種類	投与方法	動物種／系統	試験番号又は参考文献	該当概要表	GLP	主な所見
生殖発生毒性（DART）試験						
胚・胎児発生（EFD）毒性（用量範囲設定試験、Segment II）	i.v.（30 分間の持続投与）；3 日に 1 回（妊娠 6、9、12、15 及び 18 日）；0、2、6 又は 20 mg/kg；4 例／群	Sprague Dawley ラット	UX003-PC007	第 2.6.7 項、表 2.6.7.11.1	非適用	• 体重、摂餌量及び一般状態に UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 標的臓器は特定されなかった。 • 試験期間中に ADA 産生が認められた。
受胎能及び EFD 毒性（Segment I／II）	i.v.（30 分間の持続投与）；交配前は週 1 回 2 週間（雌）又は週 1 回 4 週間（雄）、交配後は妊娠 6、9、12、15 及び 18 日に投与；0、2、6 又は 20 mg/kg；雌雄各 23 例／群 + TK 用雌雄各 3 例／群	Sprague Dawley ラット	UX003-PC008	第 2.6.7 項、表 2.6.7.12.1	適用	• 3 回目の投与後に高用量群の雌雄で、免疫応答が原因と考えられる活動性低下／嗜眠が認められた。DPH を予防的に前投与したことで、十分な予防ができたと考えられる。 • 雄では体重減少及び総体重増加量の減少が認められたが、雌では同様の傾向は認められず、投与による子宮重量の変化は見られなかった。受胎能、交尾行動、受胎率（妊娠率）、精子パラメータ（運動性、数及び形態）及び雄の器官重量に UX003 の投与による変化は認められなかった。 • 同腹児の生存率に投与に関連する差は認められなかった。 • 同腹児の平均体重は全群で同様であったことから、胎児の発育に UX003 の投与による影響は見られなかった。胎児の評価（同腹児の体重、並びに頭部、内臓又は骨格検査を含む肉眼的外表観察）で発生異常（奇形）は認められなかった。　試験期間中に ADA が産生されたため、妊娠動物ではクリアランスが速くなり、Cmax が低下した。ADA は妊娠期間後期に産生されたため、受胎の評価への影響はなかった。

試験の種類	投与方法	動物種／系統	試験番号又は参考文献	該当概要表	GLP	主な所見
EFD 毒性（用量範囲設定試験、Segment II）	i.v.（30 分間の持続投与）、1 日 1 回（妊娠 6～18 日）；0、2、6 又は 20 mg/kg；3 例／群	New Zealand White ウサギ	UX003-PC006	第 2.6.7 項、表 2.6.7.11.2	非適用	• 実験 1 日（投与前）及び実験 29 日（最終日）の TK 採血：対照群を含むすべての投与群で、妊娠 29 日の血清中 UX003 濃度は、妊娠 6 日の投与開始前の内因性濃度に比べ高かった。胎児の血中 UX003 濃度は、妊娠 6 日の投与前の母体の内因性濃度に比べ低かった。この結果から、妊娠 29 日での胎児の UX003 への曝露は否定されることが示唆された。 • 体重、摂餌量及び一般状態に UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 全投与群（対照群を含む）で認められた心拡大は、IV 持続投与時の投与容量の多さに起因したものであり、UX003 の投与に関連したものではなかった。他のすべての組織のパラメータは正常範囲内で、特記すべき所見は認められなかった。 • 試験期間中に ADA の産生が認められたが、血清中 UX003 濃度は上昇していた。

試験の種類	投与方法	動物種／系統	試験番号又は参考文献	該当概要表	GLP	主な所見
EFD 毒性（Segment II）	i.v.、妊娠 6、9、12、15 及び 18 日に投与；0、2、6 又は 20 mg/kg；23 例／群 + TK 用 3 例／群	New Zealand White ウサギ	UX003-PC009	第 2.6.7 項、表 2.6.7.3.2	適用	• 一般状態、摂餌量、体重、子宮重量及び肉眼的剖検所見に UX003 投与に関連した所見は認められなかった。 • 同腹児の大きさ、生存着床数、総着床数、非生存着床数及び胎児の体重は全群で同様であった。胎児検査（肉眼的な外表観察並びに骨格、内臓及び頭部検査）で明らかな催奇形性パターンは認められず、UX003 投与群の同腹児の平均体重は対照群と同様であった。 • 試験期間中に ADA が産生されたため、妊娠動物ではクリアランスが速くなり、C_{max} が低下した。ADA は妊娠期間後期に産生されたため、発生毒性のリスク評価への影響はなかった。

試験の種類	投与方法	動物種／系統	試験番号又は参考文献	該当概要表	GLP	主な所見
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（PPND; Seg III)	i.v., 妊娠 7 日目から授乳期 20 日まで 3 日ごとに投与； 0, 2, 6, 20/12 mg/kg ；25 例/群+ 3 例(対照群) 、 TK 用 6 例	Sprague Dawley ラット	UX003-PC010	第 2.6.7 項、 表 2.6.7.14.1	適用	• UX003 に関連した死亡例は、6 及び 20mg/kg 群の母動物にみられた。母動物では、運動量低下、四肢蒼白、下垂、低姿勢（low carriage）、運動失調、接触時冷感、異種タンパク質投与に対するアナフィラキシー様反応と思われる緩徐呼吸が見られた。 • 妊娠及び授乳期間中、2mg/kg 以上の UX003 投与群では、立毛の症状が認められた。 • UX003 投与は、母動物の平均体重、体重増加量、摂餌量及び 自然分娩指標に影響を及ぼさなかった。 • ADA は妊娠 19 日目及び授乳 14 日目に UX003 投与群の全例で認められた。 • UX003 投与群の F0 雌動物では、用量依存的なβ-グルクロニダーゼ活性の増加が認められたが、F1 児では対照群と同程度の活性であった。 • F1 児では、UX003 投与による死亡、臨床症状、肉眼的所見、並びに成長、性成熟、神経行動学的機能及び生殖機能に対する影響は認められなかった。

[a] ラットを用いた単回投与毒性試験及び TK 評価は、中枢神経系安全性薬理試験と併せて実施した。

[b] この試験で使用した酵素は、Ultragenyx がスポンサーの非臨床及び臨床試験用物質の製造で使用する[redacted]するもので、従来の純化方法と同様の方法で製造したものである。

[c] カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験及び TK 評価は、心血管系安全性薬理評価と併せて実施した。

[d] 高用量群で死亡例が認められたため、妊娠 19 日目に投与量を 20 mg/kg から 12 mg/kg に減量した。

[e] 妊娠 7 日目以降全群に、ジフェンヒドラミン塩酸塩(DPH)を投与した。

NA = 概要表に記載されていない試験

2.6.6.1.1　適切な動物種

MPS VII 型では、大部分のライソゾーム病と同様に、GAG 分解酵素の 1 つが欠損していることにより、様々な種類の細胞に GAG が過剰に蓄積する。遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ（rhGUS）は、受容体を介したエンドサイトーシスにより各種組織の細胞内に取り込まれる。CIM6PR は、基本的に体内のあらゆる細胞に存在する親和性の高い受容体であり、*in vivo* での ERT 薬の細胞内取り込みに関与する主な受容体である。CIM6PR は、哺乳類細胞で合成されるライソゾーム酵素の糖鎖上にある M6P 部分を認識する（Kaplan et al. 1977）、（Kornfeld 1990）。投与された GUS などの酵素は、細胞表面に存在する CIM6PR を介したこの送達系を利用する（Kornfeld 1987）。また、GUS は、末端マンノース残基を含む糖鎖を有することから、体中に分布している細網内皮系細胞に主に存在するマンノース受容体（MR）による細胞内取り込みも可能である。CIM6PR 発現及び非発現モデルマウスを用いた広範なデータに基づくと、ライソゾーム病に対する最適な全身治療を可能にする重要な受容体は CIM6PR であり、マンノース受容体も一定の役割を果たすことがある（Sly et al. 2006）。MPS VII 型モデルとして、これまでにマウス（Birkenmeier et al. 1989）、ネコ（Gitzelmann et al. 1994）及びイヌ（Haskins et al. 1991）が使用されている。MPS VII 型に関する試験の大半ではモデルマウスが用いられ、静脈内投与による GUS の有効性が示されている。これらの試験については第 2.6.2.3 項で検討する。

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に関する ICH ガイドライン（ICH S6［R1］）では、適切な動物種（被験物質に特異的な受容体が発現しており、被験物質が薬理学的活性を示す動物種と定義される）を用いて安全性評価を行うことが推奨されている。CIM6PR 及び MR は rhGUS の受容体であり、ヒトの細胞及び一般に使用されているあらゆる実験動物の細胞に普遍的に存在している。したがって、一般的な実験動物は rhGUS の安全性試験に適している。

ヒト GUS と異なる動物種の GUS の同等性を評価するため、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）（www.ncbi.nlm.nih.gov）が管理している UniGene データベースから入手した情報を用いて、GUSB 遺伝子由来の GUS アミノ酸配列を複数の動物種間で比較した。結果の要約を以下の表 2.6.6.1.1.1 に示す。

表 2.6.6.1.1.1：　β-グルクロニダーゼアミノ酸配列の動物種間相同性

動物種	全アミノ酸	一致するアミノ酸	%相同率 [a]
ヒト	651	651	100
サル	651	613	94.0
イヌ	651	530	81.0
ウサギ	651	531	82.0
ラット	648	489	75.0
マウス	648	485	75.0

[a] ヒトとの比較

出典：国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI、www.ncbi.nlm.nih.gov）が管理している 遺伝子データベースから入手したデータ。

ヒト GUS との相同率は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルでそれぞれ、75.0%、75.0%、82.0%、81.0%及び 94.0%であった。アミノ酸配列の動物種間相同性の高さは、rhGUS の毒性評価

にマウス、ラット、ウサギ及びサルを用いることの妥当性を高める要素である。MPS VII 型モデルマウスとヒト MPS VII 型には、生化学的、病理学的及び臨床的特徴に多くの共通点がある。このモデルマウスは、マウス GUS を欠損しているが、活性を示さないヒト GUS タンパク質が低濃度で産生され、投与された rhGUS に対する免疫寛容が生じていることから、ERT 薬の効果を研究する上で特に有用となっている。毒性プログラムで使用する目的で選択した 3 種類の動物のうち、サル GUS はヒト GUS との相同性が最も高く、サルでは外因的に投与された rhGUS に対して免疫応答を起こす可能性が低いと考えられる。ラットは一般的に使用されているげっ歯類であり、他のムコ多糖症（MPS）疾患を対象とした ERT 薬の毒性プログラムでも使用されている。

EMA は、2012 年のプロトコールアシスタンス手続き（Protocol Assistance Procedure）において、サルを用いた試験は必須ではなく、ラット及びマウスで得た結果から結論が得られない場合のみ必要とすることに合意し、ヒト以外の霊長類を用いた試験の必要性については、ラット試験の妥当性及び MPS VII 型モデルマウスで得られたデータの価値に基づいて再検討すべきであるとした（EMA プロトコールアシスタンス手続き、手続き番号 EMEA/H/SA/2342/1/2012/SME/III、2012 年 6 月 21 日付）。しかし、FDA は 2012 年の IND 前相談で、げっ歯類及び非げっ歯類の双方を用いて毒性プログラムを実施することを求めた（FDA 文書［参照 ID：3158702］、2012 年 7 月 13 日付）。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

2.6.6.2.1　SD ラットを用いた単回投与毒性／TK 評価／CNS 安全性薬理試験（UX003-PC002）

UX003 を静脈内投与したときの影響を、SD ラットを用いた単回投与毒性／トキシコキネティクス（TK）測定／中枢神経系（CNS）安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC002）で評価した。試験デザインを以下の表 2.6.6.2.1.1 に示す。

表 2.6.6.2.1.1：　UX003-PC002 試験のデザイン

投与群	投与量 (mg/kg)	投与方法	本試験の動物数	TK 用の動物数
1	0	IV 持続投与（2 時間）	雌雄各 6 例	雌雄各 4 例
2	6	IV 持続投与（2 時間）	雌雄各 6 例	雌雄各 4 例
3	20	IV 持続投与（2 時間）	雌雄各 6 例	雌雄各 4 例

出典：表のデータは UX003-PC002 の Text table 1 から引用

約 8 週齢の SD ラットに、カテーテルから UX003 を 2 時間単回静脈内持続投与した。群 1（0 mg/kg）のラットには、調製緩衝液を静脈内持続投与した。投与容量はすべての動物で 10 mL/kg とした。UX003 曝露後の神経毒性を評価するため、本試験で群 1～3 に振り分けた動物を対象に機能観察総合評価（FOB 法）を実施した（要約を第 2.6.2.5.2 項に示す）。一般状態の変化及び健康状態／死亡の有無を確認するため、すべての動物を 1 日 2 回観察した。投与前並びに投与後の実験 1 及び 13 日に各動物の体重を記録した。摂餌量の定量評価を週 1 回行った。

TK 用の血清試料の採取は、実験 1 日の投与前、並びに投与後約 2 分、10 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間及び 8 時間時点で行った。実験 14 日に臨床病理試料を採取し、血液学的検査、凝固検査、血液化学的検査及び尿検査に供した。実験 14 日にすべての本試験動物を対象に詳細な肉眼的剖検を実施した。対照群及び高用量群のみを対象に、標準器官（脳、精巣上体、副腎、下垂

体、前立腺、甲状腺、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣、胸腺及び子宮）の重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。病理組織学的解析が必要となる可能性を考慮して、6 mg/kg 群の組織を保管した。

各投与群において、投与開始後 2.03 時間で GUS 活性がピークに達した。GUS 活性曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max}）は、雌では用量比例的であったが、6～20 mg/kg 群の雄では用量比例値をわずかに上回っていた（第 2.6.4.3.1.1 項を参照）。雌の曝露量は雄に比べわずかに低かった。

一般状態、体重、体重変化、摂餌量、機能観察総合評価、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査、凝固検査、血液化学検査及び尿検査）、肉眼的剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査所見など、いずれのパラメータでも UX003 投与に関連した変化は認められなかった。

SD ラットに UX003（最大 20 mg/kg/dose）を単回静脈内投与したときの忍容性は良好であった。これらの結果から、単回静脈内投与時の NOAEL は 20 mg/kg/dose と考えられた。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

2.6.6.3.1　MPS VII 型マウスを用いた反復投与試験

2.6.6.3.1.1　公表済みの MPS VII 型モデルマウスを用いた 3 及び 13 週間の反復投与試験

免疫寛容 MPS VII 型モデルマウス（MPS VII/ $E540A^{TG}$）を用いて、rhGUS 及び遺伝子組換えマウス GUS（rmGUS）の反復投与試験を実施し、生体内分布、ライソゾーム蓄積 GAG クリアランス及び有効性を評価した（Vogler et al. 1996、Vogler et al. 1999、Vogler et al. 2005）。公表済みの MPS VII 型モデルを用いた試験のうち、GLP 適用の正式な毒性試験として実施されたものはないが、Vogler et al.が 2005 年に実施した試験で採取した組織を認定獣医病理学者が第三者として盲検下で病理学的に評価したことで、適切な GUS 欠損動物種を用いた複数の ERT 試験で、遺伝子組換え GUS の相対的安全性に関する妥当な知見が得られている。

Vogler が 2005 年に実施した試験では、MPS VII 型マウスに rhGUS 0.3、1、2.5 及び 5 mg/kg の静脈内ボーラス投与を週 1 回 3 週間又は 1、2 及び 4 mg/kg を 13 週間行い（Vogler et al. 2005）、様々な組織における rhGUS 活性の生化学的評価及び脳組織の病理組織学的評価を行った。この試験で使用した rhGUS は、UX003 と同一の細胞株に由来するものであったが、製造工程は異なっていた。最大 5 mg/kg の rhGUS を 3 週間投与したマウスでは、髄膜のライソゾーム中 GAG 蓄積量が中程度に減少したが、新皮質ニューロンでは変化は認められなかった。20 mg/kg を週 1 回 4 週間投与したマウスでは、ニューロン、グリア及び髄膜のライソゾーム中 GAG 蓄積量が減少し、脳では平均 2.5%の野生型 hGUS 活性が認められた。臨床病理学的及び病理組織学的な有害作用は認められなかった。

重要な病理学的所見が認められなかったことを免疫寛容 MPS VII 型マウスで客観的に確認するため、Ultragenyx はこの試験で保管されていた利用可能な組織スライド試料をすべて盲検下で再評価した（[redacted]［[redacted]］、参照番号 20022037-1 及び 20022037-2）。以下の組織を盲検下で再評価した：脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、骨（肋骨）、眼及び副腎。

全体として、様々な組織で認められた細胞質内の空胞変性に対する有益な効果が認められた点で、Vogler が当初行った評価の結果と極めてよく一致していた。Vogler が得た当初の所見及び Ultragenyx がスポンサーとなって実施した再評価を第 2.6.2.3.3.1 項に示す。病理組織学的所見と

して、他に炎症などがまれに認められたが、極めて軽度であり、rhGUSの投与との関連はないと考えられた。rhGUS最大5 mg/kgの静脈内投与を3週間及び4 mg/kgの静脈内投与を13週間行っても、rhGUSの投与に起因した病理組織的所見は認められなかった。これらの結果から、rhGUSによりライソゾーム中のGAG蓄積が除去されても有害な病理学的所見は認められないことが示唆された。

2.6.6.3.1.2　uGAGと病理組織変化との関係を確認する生体内分布試験（UX003-PC001）

この試験（UX003-PC001）の目的は、MPS VII/E540A^{TG}マウスに各種用量のUX003を週1回8週連続で静脈内投与し、尿中グリコサミノグリカン（uGAG）排泄量とライソゾーム内の病理組織変化の関係を評価し、さらに毒性に関する病理組織学的分析を行うことであった。UX003の投与量は、治療用量以下の0.1 mg/kgから予定市販用量（4 mg/kg）の5倍に相当する20 mg/kgまでとした。この試験では、ヒトMPS VII型に相当するGUS欠損動物モデルを用いて、最大20 mg/kgまでの各種用量でUX003を投与したときの毒性も評価した。この試験（UX003-PC001）の薬力学的データの要約を第2.6.2.3.2.1項に示す。

この試験では最初、10～12週齢の雌雄トランスジェニック（MPS VII/E540A^{TG}）マウス計42例を使用した。マウスを7群（6例／群、回復群を含む）に振り分け、UX003を0（溶媒対照）、0.1、0.25、1、4又は20 mg/kgの投与量で週1回、最長8週連続静脈内投与した。4 mg/kgを投与した回復群のマウスでは、1週間の休薬による回復性を評価した。すべての動物について定期的に健康状態／死亡を観察し、一般状態観察を毎日、体重測定を週1回行った。群1～6のマウスは、実験8週の最終投与から約72時間後に殺処分した。群7（4 mg/kg）の休薬動物は、実験8週の最終投与から1週間後に殺処分した。すべての動物から採取した血液は、血液化学的検査及び血液学的検査用に必要に応じて処理した。剖検時には、以下の表2.6.6.3.1.2.1に示す一連の組織を用いて毒性に関する病理組織学的分析も行った。組織の独立盲検分析を行うため、固定した組織標本を[redacted]に送付した。分析結果を以下に示す。

表2.6.6.3.1.2.1：　毒性に関する正式な盲検化病理評価用に送付された組織

副腎	肝臓	脾臓
脳	肺	精巣
骨（肋骨及び胸骨）	筋肉（四頭筋）	胸腺
精巣上体	卵巣	甲状腺
心臓	下垂体	子宮
腎臓	前立腺	

出典：UX003-PC001、第3.12項

対照群及びUX003群の両群で予期せぬ死亡が認められた。対照群では、実験1日に1例が死亡したため、代わりのマウスを補充し、さらに2例がそれぞれ実験3週及び5週（投与前）に死亡した。対照群のマウスの死因は不明であるが、マウスの齢、MPS VII型疾患及び／又は試験中の頻繁なハンドリングに関連したものと考えられる。UX003群では、1 mg/kg群（1例）、4 mg/kg群（1例）及び20 mg/kg群（3例）で死亡が確認された（いずれも実験3週の投与後）。UX003群のマウスの死因は不明であるが、免疫寛容が誘導されていたにもかかわらず、UX003に対する免疫応答が生じたためと考えられる。免疫機序によるアレルギー反応は予測される反応であ

り、動物モデルを用いた ERT 試験ではよく見られる。このアレルギー反応に対処するため、実験 4 週以降は各試験投与前に抗ヒスタミン薬（シプロヘプタジン）を全例に投与した。その後、実験 4 週から 8 週までに UX003 群で新たに認められた死亡は 1 例のみであり、主な死因は体格の小ささ（発育不全）によるものであった。シプロヘプタジンにより投与後のアレルギー反応が予防できたことは、初期の死亡の一部が投与に依存した免疫応答によるものであったと考えて矛盾はない。

試験期間中に UX003 投与に関連した重要な一般状態の変化は認められなかった。ほとんどのマウスで試験期間中に体重増加が認められた。実験 8 週時点における各マウスの体重増加は、対照群と高用量群（20 mg/kg）で同程度であった。評価した血液生化学的パラメータに明らかに有害な変化は認められなかった。0.25 mg/kg 以上を投与したマウスでは、主にリンパ球数の増加による総白血球数増加が認められた。このような変化は、試験で使用した被験物質に対する免疫応答と関連していると考えられる。

この試験における盲検下病理学的評価では、評価した組織（副腎、脳、骨（肋骨及び胸骨）、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉（四頭筋）、卵巣、下垂体、前立腺、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺及び子宮等）において UX003 投与に関連した病理組織学的変化を示す所見は認められなかった（第 4.2.1.1 項：[redacted] 参照番号 20026311）。組織学的所見として、UX003 非投与の心臓弁を有するすべての対照動物で心臓弁の不整な肥厚が認められた。UX003 投与マウスの一部でも同じ所見が認められたが、対照例に比べ重症度が概して軽度であったことから、投与開始前にすでに発現していた可能性が示唆された。このほか、肝臓の軽微から軽度の炎症や好酸性結晶の沈着を伴う肺炎などが認められたが、これらは UX003 との関連のない背景病変又は偶発的な病変と判断した。

結論として、これらのデータから、UX003 の忍容性は予定臨床用量である 4 mg/kg の 5 倍に相当する 20 mg/kg（試験の最高用量）でも良好であることが示唆された。

2.6.6.3.2　UX003 の若齢カニクイザルにおける 26 週間静脈内持続投与（及び 4 週間の回復期間）毒性／TK 評価／心血管系安全性試験（UX003-PC003）

若齢カニクイザルを用いた UX003 の 26 週間反復静脈内持続投与（及び 4 週間の回復期間）毒性／TK 評価／心血管系安全性薬理併合試験（GLP 適用）を実施した。試験デザインを以下の表 2.6.6.3.2.1 に示す。

表 2.6.6.3.2.1：　UX003-PC003 試験のデザイン

投与群	投与	投与量 (mg/kg)	投与方法	動物数	
				雄 [a]	雌 [a]
1	対照（プラセボ）	0	QOW[b] × 26 週間	5	5
2	低用量	2	QOW[b] × 26 週間	3	3
3	中用量	6	QOW[b] × 26 週間	3	3
4	高用量	20	QOW[b] × 26 週間	5	5

[a] 最初の雌雄各 3 例／群（受け入れ番号が早い順）を実験 26 週の投与の翌日に安楽死させた。残りのカニクイザルには投与期間終了後に 4 週間の回復期間を設けた。

[b] QOW：隔週

出典：表のデータは UX003-PC003 試験の第 2 項、Text table 1 から引用

若齢サル（1.5～2 歳齢）は、予測される患者集団の年齢及び小児患者を対象とした他の ERT 薬による過去の経験を踏まえて選択した。群 2（2 mg/kg）、群 3（6 mg/kg）及び群 4（20 mg/kg）のサルには、UX003 の静脈内持続投与（カテーテルから 2 時間投与）を隔週で 26 週間行った。群 1（0 mg/kg）のサルには、調製緩衝液の静脈内持続投与（カテーテルから 2 時間投与）を隔週で 26 週間行った。投与容量は、投与前の直近の体重に基づいて個体ごとに設定した。群 1～4 のサルの心電図（ECG）データの要約を第 2.6.2.5.3 項に示す。

すべての動物の健康状態及び死亡の有無を 1 日 1 回観察した。2 時間の静脈内持続投与中は常時、投与後は定期的に観察した。投与日以外は、ケージサイドの観察を 1 日 1 回以上行った。

各動物の体重を投与前及びその後は週 1 回記録した。摂餌量の定性評価を週 1 回行った。投与開始前及び剖検前に、すべての動物を対象に外観検査及び眼科学的検査を実施した。

抗薬物抗体（ADA）分析用の血清試料を、投与前、実験 6、12、18 及び 26 週、並びに実験 211 日（回復期）に採取した。TK 用の血清試料の採取は、実験 1 日及び最終投与日（実験 169 日）の投与前並びに投与後約 2 分、10 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間及び 8 時間時点で行った。さらに、実験 29、57、85、113 及び 141 日の投与終了（EOI）から 30 分後にも TK 用の血清試料を採取した。回復期間終了時（実験 211 日）にも TK 用の血清試料を採取した。

投与前、実験 4 日、実験 13 週及び投与最終日に臨床病理試料を採取し、血液学的検査、凝固検査、血液化学検査及び尿検査に供した。最終投与から 24 時間後に詳細な肉眼的剖検を実施した。回復群の動物については、4 週間の回復期間終了後に詳細な肉眼的剖検を実施した。対照群及び高用量群のみを対象に、すべての器官の重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。病理組織学的解析が必要となる可能性を考慮して、2 mg/kg 及び 6 mg/kg 群の組織を保管した。

GUS 活性は投与開始後 2.03 時間でピークに達した。雌雄とも GUS 活性曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max}）が用量比例値を上回った。実験 169 日の曝露量は概して実験 1 日の曝露量の 2 倍となり、$AUC_{0\text{-}t}$ の蓄積係数は 0.856～2.23 であった（第 2.6.4.3.2.5 項を参照）。UX003 の曝露量に顕著な性差は認められなかった。ADA に関しては、0、2、6 及び 20 mg/kg 群のそれぞれ 2/10 例、4/6 例、4/6 例及び 6/10 例が試験期間中に 1 回以上 ADA 陽性となった。ただし、このうち 6 例は投与前も ADA 陽性であった。UX003 曝露前に ADA 陽性であった動物を除けば、2、6 及び 20 mg/kg 群のそれぞれ 3/5 例、3/5 例及び 3/7 例で UX003 曝露後に ADA 産生が認められた。試験期間中に免疫原性反応を示した動物はおらず、抗体の曝露量に対する影響は認められなかった。

若齢サルを用いたこの慢性毒性試験では、一般状態、摂餌量、体重、獣医師による外観検査及び生理学的測定値に UX003 投与に関連した毒性学的に重要な所見は認められなかった。また、ECG パラメータ（RR、PR、QRS、QT 及び QTca）に UX003 投与に関連した変化は認められなかった。26 週間の試験期間中に測定した血液学的検査、凝固検査及び尿検査パラメータに UX003 の影響は認められなかった。

初回投与時（投与 1 日目）には、ECG 測定、ケージ外からの一般症状の観察、血液等生物分析サンプルの採取、測定、及び ADA 測定を行い、個々の体重を記録した結果、UX003 の単回静脈内投与は、20 mg/kg の用量レベルまで幼若サルで十分に許容された。これらの結果に基づいて、幼若サルにおける単回静脈内投与の無毒性量（NOAEL）は 20 mg/kg であると見なした。

実験 4 日に雌でビリルビン増加が認められたが、軽度かつ一過性で可逆的であったことから、有害作用とは見なさなかった。試験したすべての用量で標的臓器毒性は特定されなかった。試験

した製剤はすべて判定基準内にあり、酵素活性の結果から、調製後も酵素活性の有効性が認められた。結論として、若齢カニクイザルに UX003（最大 20 mg/kg）の静脈内持続投与を隔週 1 回で 26 週間行ったときの忍容性は良好であった。この試験の NOAEL は、市販用量 4 mg/kg の安全域を十分に示す 20 mg/kg と考えられた（表 2.6.6.3.2.2）。

表 2.6.6.3.2.2：　UX003 の重要な慢性毒性試験で担保された安全域の概要

試験の種類	動物種	投与期間	用量[a] (mg/kg)	安全域 (用量ベース)	安全域 (C_{max} ベース)[b]	安全域 (AUC ベース)[c]
反復投与	カニクイザル	6 ヵ月（隔週 1 回）	20	5	22	18

[a] 無毒性量（NOAEL）

[b] 実験 46 週における UX003-CL301 試験 4 mg/kg 投与後の臨床血清中濃度ピーク値の平均（21.2 µg/mL）との比較。サルを用いた慢性毒性試験の実験 169 日における平均 C_{max} は、1,705,000 U/mL（469 µg/mL 相当）であった。

[c] サルを用いた慢性毒性試験の実験 169 日における $AUC_{0\text{-}t}$（3,720,000 h*U/mL、1024 hr*µg/mL 相当）と、実験 46 週における UX003-CL301 試験 4 mg/kg/投与後の UX003 の臨床 AUC0-t の平均値（57.9 hr*µg/mL）との比較。

出典：UX003-PC003 及び UX003-CL301 試験

2.6.6.4　遺伝毒性試験

ICH S6 ガイドラインによれば、遺伝毒性試験はバイオテクノロジー応用医薬品には適用されない。したがって、該当する試験は実施しておらず、今後実施する予定もない。UX003 は大きなタンパク質分子であるため、核内に移行又はミトコンドリア膜を通過して DNA 又はその他の染色体と直接相互作用することは考えにくい。また、内因性ヒト GUS タンパク質の遺伝子組換え酵素である UX003 は、その作用機序及び部位（細胞ライソゾームにおける GAG の分解）から遺伝毒性リスクは示唆されない。

2.6.6.5　がん原性試験

「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス（ICH S1A）」で述べられている多くの要素を勘案した上で、UX003 のがん原性試験は予定していない。ICH ガイドライン S1A では、「内因性物質を補充療法として必ず与えなくてはならないような場合（すなわち生理的レベル）、特に既に同様の製品（例えば、動物インシュリン、下垂体由来の成長ホルモン及びカルシトニンなど）で臨床経験があるような場合には、がん原性試験は一般に必要ではない」とされている。UX003 は体内に内因的に存在するヒト GUS の遺伝子組換え酵素である。したがって、がん原性は起こらないと思われる。

サルを用いた試験では、UX003（2、6 及び 20 mg/kg）投与後 26 週まで増殖性又は前腫瘍性病変は観察されなかった。また、げっ歯類では UX003 に対する ADA 産生が認められることから、長期間の投与は不可能と考えられ、げっ歯類を用いた 2 年間の標準的ながん原性試験は継続が困難である。

UX003 は、極めてまれな（確認された患者数は世界で 100 例未満）、進行性消耗性かつ生命を脅かすライソゾーム病である MPS VII 型の治療を目的として開発が進められている。したがって、

曝露集団の総数は非常に少ないと思われる。UX003 が内因性物質の遺伝子組換え酵素であること、げっ歯類では ADA 産生により長期間の投与が不可能であること及びまれな患者集団が対象となることから、UX003 のがん原性試験の実施は不要である。

2.6.6.6　生殖発生毒性（DART）試験

UX003 の DART 試験の簡潔な要約を以下に示し、試験報告書を第 4.2.3.5 項に示す。DART 試験で担保された安全域を表 2.6.6.6.1 に示す。

表 2.6.6.6.1：　UX003 の DART 試験で担保された安全域の概要

試験の種類	動物種	用量[a] (mg/kg)	安全域（用量ベース）[b]	安全域（C_{max} ベース）[c]	安全域（AUC ベース）[d]
Seg I／II	ラット（雄）	20	5	18	4.5
Seg I／II	ラット（雌）	20	5	6.3	1.6
Seg II	ウサギ	20	5	18	10
Seg III	ラット	2.0	0.5[g]	N/A[e]	N/A[f]

[a] 無毒性量（NOAEL）

[b] 臨床用量 4 mg/kg との比較

[c] 実験 46 週における UX003-CL301 試験 4 mg/kg 投与後の臨床血清中濃度ピーク値の平均（21.2 µg/mL）との比較。平均 C_{max} は、ラット DART 試験（Seg I／II）における実験 22 日の雄ラット、ラット DART 試験（Seg I／II）の妊娠 18 日の雌ラット及びウサギ DART 試験（Seg II）の妊娠 18 日の雌ウサギでそれぞれ 386 µg/mL、134 µg/mL 及び 372 µg/mL であった。

[d] 実験 46 週における UX003-CL301 試験 4 mg/kg 投与後の UX003 の臨床 $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値（57.9 hr*µg/mL）との比較。平均 $AUC_{0\text{-}t}$ は、ラット DART 試験（Seg I／II）の実験 22 日の雄ラット、ラット DART 試験（Seg I／II）の妊娠 18 日の雌ラット及びウサギ DART 試験（Seg II）の妊娠 18 日の雌ウサギでそれぞれ 258 hr*µg/mL、91.7 hr*µg/mL 及び 604 hr*µg/mL であった。

[e] Cmax は TK 用採血が妊娠 7，19 及び授乳 13 日目に限定されたため計算しなかった。
[f] AUC は TK 用採血が妊娠 7，19 及び授乳 13 日目に限定されたため計算しなかった。
[g] 新生児の安全域は、20/12 mg/kg 群の NOAEL の 5/3 倍とした。
N/A=計算されなかった（not applicable）
出典：UX003-PC008、UX003-PC009、UX003-PC010 及び UX003-CL301 試験

2.6.6.6.1　受胎能及び胚・胎児発生（EFD、Seg I／II）

2.6.6.6.1.1　妊娠ラットを用いた UX003 の用量範囲設定試験（GLP 非適用、UX003-PC007）

EFD 毒性本試験（GLP 適用）における UX003 の用量を選択するため、交配した妊娠 SD ラットを用いて用量範囲設定（DRF）EFD 毒性試験を実施した。用量範囲設定試験（GLP 非適用）では、妊娠ラット（4 例／群）に UX003（2、6 及び 20 mg/kg）を 3 日に 1 回（妊娠 6、9、12、15 及び 18 日）静脈内投与し、溶媒対照群（溶媒単独群及び溶媒 + DHP 群）を設定した。ウサギを用いた DRF 試験の結果（投与容量の多さに起因して全群で心拡大が認められた。第 2.6.6.6.1.3 項及び UX003-PC006 を参照）を踏まえ、ラットの DRF 試験では、静脈内投与の頻度を 1 日 1 回から 3 日に 1 回に変更した。妊娠 21 日にラットを安楽死させ、母体の肉眼的評価を実施して子宮、卵巣及び胎児を検査した。

UX003 による母体毒性は認められず、胎児の肉眼的外表評価でも特記すべき所見は認められな

かった。UX003 の投与による子宮重量及び胎児体重への影響は認められなかった。母動物に最大 20 mg/kg/day を間欠投与しても、胎児の発育（胎児体重）及び構造（肉眼的胎児評価）に変化は認められなかった。試験期間中に母動物の死亡は認められなかった。

試験期間中に UX003 の投与に関連した臨床徴候は認められなかった。1 例の母動物では、妊娠 15 日の投与直後に赤色の膣分泌物が認められた。これは投与時の拘束チューブによる軽度の圧迫が原因と考えられる。

妊娠 21 日に殺処分したラットはすべて妊娠していた。肉眼的剖検所見に特記すべき点はなく、検査したすべての組織が正常と考えられた。妊娠期間中の摂餌量は全群で同様であり、母体摂餌量に有意差は認められなかった。UX003 投与群と対照群で体重、体重増加及び子宮重量に有意差は認められなかった。子宮重量で補正した総体重は全群で同様であったが、溶媒 + DHP 群並びに UX003 2 及び 6 mg/kg 群では、補正後の総増加量（子宮重量で補正した総増加量）が溶媒単独群に比べ有意に低値であった。この所見は、これらの群では溶媒単独群に比べ胎児数がわずかに多かったことと関連しており、同腹児数の多さによる体重増加であり、母動物の体重増加が低下したわけではないと考えられた。

投与開始前の妊娠 6 日に全群（UX003 群及び対照群）で確認した GUS 濃度から考えると、この試験ではラットの内因性 GUS 濃度が高値であった。妊娠 21 日の血清 UX003（GUS）濃度が妊娠 6 日の投与開始前の濃度と同程度であったことから、この時点で認められた GUS 活性は内因性の GUS 濃度を示していると考えられる。妊娠 18 日にあたる投与最終日から 3 日後に TK 及び ADA 測定用の採血を行ったが、この時点で最終投与から半減期の何倍もの時間が経過しているため、妊娠 21 日に外因性 UX003 の濃度が低くなることは想定内であった。胎児血中の GUS 濃度は、母体の濃度と同程度又はわずかに高く、胎児血中の GUS 量は全群（対照群及び UX003 群）で同様であった。つまり、用量反応性が認められなかったことから、この時点（妊娠 21 日）における同腹児の GUS 濃度は内因性濃度である可能性が示唆された。

表 2.6.6.6.1.1.1：　SD ラットを用いた DRF 発生毒性試験における GUS 活性の平均値（TK、U/mL 又は nmol/mL/h）（UX003-PC007）

	対照	対照 + DHP	UX003 2 mg/kg	UX003 6 mg/kg	UX003 20 mg/kg
投与前	124.425	182.100	117.425	141.625	160.950
実験 21 日	115.325	158.675	134.450	153.525	187.175
同腹児－実験 21 日	194.975	182.325	189.575	189.925	183.175

出典：表のデータは UX003-PC007 の付録 10 から引用

妊娠6日の投与開始前に、母動物11/20例でADA陽性反応が認められた。この高い偽陽性率は、分析法のバリデーション時に設定したカットポイントと関連していると考えられた。スクリーニング試験の結果、カットオフ値より高い測定値を示す曝露されていない動物が多くみられた（ウサギで5/15例、ラットで7/15例）。つまり、選択した血清試料から算出したカットオフ値に照らして試験用の血清試料を解釈すると、偽陽性率が高くなることが示唆された。しかし、精度分析の結果、この分析法は頑健で、この方法により投与前と投与後の結果を確実に比較でき、初回スクリーニングでは、薬剤投与後のウサギ又はラットに抗rhGUS抗体が発現しているかどうかを確認できることが示されている（第4.2.2.1項：CB-001662）。実際の試験では、試験前に

ADA陽性であった動物が、対照群も含め各群に（2～3例／群）ランダムに分布していた。ただし、妊娠6日に陽性反応を示した動物は妊娠21日でも同様に陽性反応を示した。UX003投与群（2、6及び20 mg/kg群）のラットでは、妊娠21日までに全例がADA陽性となり、妊娠21日の反応は妊娠6日目に比べ強くなっていた。さらに、UX003を投与した母動物の同腹児でも、強いADA陽性反応が認められた。このような反応が同腹児で認められたのは、母体の抗体が胎児に移行したためと考えられる。母体の抗体は胎盤（卵黄嚢）及び／又は羊水経口摂取を介して胎児に移行する。対照群（溶媒単独群又は溶媒 + DHP群）の母動物も妊娠6日にADA陽性を示したが、妊娠21日に陽性反応の増強は認められず、また、UX003投与群のように同腹児における反応が強くなることもなかった。

全体的に見て、同腹児の生存率に UX003 の投与に関連する差は認められなかった。着床前及び着床後胚損失率についても、UX003 投与群が対照群を上回ることはなかった。着床前胚損失率は 0～12.7%（溶媒単独群、溶媒＋DHP 群、UX003 2、6 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ 12.7%、3.6%、11.7%、9.0%及び 0%）であり、着床後胚損失率は平均で 4.4～8.8%（溶媒単独群、溶媒＋DHP 群、UX003 2、6 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ 8.8%、5.3%、5.6%、4.4%及び 5.5%）であった。

黄体数、生存着床数及び総着床数の平均値は全群で同様であったが、生存着床数は UX003 投与群が対照群に比べわずかに多かった。いずれの同腹児でも死亡胎児は認められなかった。吸収胚数（平均約 0.5～0.8）は、UX003 投与群と対照群で同程度であった。胎児の平均体重は全群で同様で、いずれの胎児にも肉眼的外表異常は認められなかった。

まとめると、UX003 を最大 20 mg/kg/day で投与しても同腹児の生存率への影響はなく、胎児の評価（同腹児の体重を含む肉眼的外表観察）では、UX003 投与に関連した発生異常（奇形）を示す所見は認められなかった。この試験の結果を踏まえ、SD ラットにおける母体及び発生毒性に対する UX003 の NOAEL は 20 mg/kg/day とした。ただし、ADA の産生が UX003 の曝露量に影響した可能性はある。

2.6.6.6.1.2　ラットを用いた UX003 の受胎能／胚・胎児発生毒性併合試験（GLP 適用、UX003-PC008）

この試験の目的は、交配前の雌雄ラット、並びに着床から主要器官形成期（着床から硬口蓋閉鎖まで）の雌ラットに UX003 を静脈内投与したときの、受胎能、交尾行動、初期胚発生及び発生毒性に対する影響、並びに TK プロファイルを評価することであった。

UX003 0（溶媒対照）、2、6 又は 20 mg/kg を、調製緩衝液（溶媒）（20 mM リン酸ナトリウム、135 mM 塩化ナトリウム、pH 6.0、20 mM L-ヒスチジン、 0.01% Tween-20）に溶解して、投与容量 10 mL/kg で 30 分静脈内持続投与した。週 1 回投与を交配前 2 週間（雌）又は 4 週間（雄）行い、交配後は雌ラットに妊娠 6、9、12、15 及び 18 日に投与した。雄ラットは殺処分するまで週 1 回投与を継続した。各群（溶媒対照群及び UX003 投与群）は、本試験用の雌雄各 23 例及び TK 用の雌雄各 3 例で構成した。なお、この試験では、溶媒単独投与に加えて、各投与開始の約 10～15 分前にジフェンヒドラミン塩酸塩（DPH）を筋肉内投与する群 5 を設けた。この DPH 対照群は、UX003 群で DPH の投与を必要とする免疫関連の有害反応が認められた場合の比較の根拠とするために設けた。週 1 回投与の 3 回目の投与時に、UX003 投与群の雄数例で反応が認められたため、残りの試験期間は UX003 投与群のすべての動物に対して予防的に DPH を投与した。

体重、体重増加量及び摂餌量を週 1 回、雌では特定の妊娠日数の時点で測定した。雄は、週 1 回

投与を 7 回行った後、2 週間の同居期間を設けて生殖機能（精子の数及び運動性）を評価し、期間終了時に安楽死させた。母動物は妊娠 21 日に安楽死させ、帝王切開及び肉眼的剖検に供した。子宮重量を測定し、切開して着床部位を検査した。胎児を摘出し、体重を測定した後、外表、骨格又は内臓／頭部を肉眼的に検査した。試験期間中の特定の時期に、TK 群の全例（胎児を含む）から TK 及び ADA 測定用の血液試料を採取した。

実験 22 日（雄ラットの 4 回目の投与、雌の未経産・非妊娠ラットの 2 回目の投与）に採取した血清試料を用いて TK パラメータを測定した（試料は投与前、30 分持続投与終了時点、投与後 1、2 及び 4 時間時点で採取）。妊娠ラットの場合は、妊娠 18 日の投与前、30 分 EOI 時点、並びに投与後 1、2 及び 4 時間時点で採取した血清試料を用いて TK パラメータを測定した。これ以外に、雄及び雌の未経産・非妊娠ラットでは実験 1 日（1 回目の投与）の投与前及び 30 分 EOI 時点、妊娠ラットでは妊娠 6 日（投与前）、妊娠 12 日（30 分 EOI 時点）及び妊娠 21 日（終了時）に TK 用試料を採取した。

最高血清中濃度（C_{max}）及び血清中濃度－時間曲線下面積（AUC）の結果が示すように、UX003 を週 1 回静脈内投与したときの全身曝露量は、雌雄ともに用量比例値を上回っていた。全体的に見て、性別とは無関係に、用量が増加すると推定クリアランス（CL）は低下した。しかし、雄における UX003 の平均血清中消失半減期（$t_{1/2}$）は、実験 22 日（投与 4）には用量と逆相関しており、2 mg/kg 及び 20 mg/kg でそれぞれ 5.15 及び 0.362 時間であった。一方、雌ラットの血清中 $t_{1/2}$ の範囲は雄に比べ狭く、非妊娠ラットでは 1.01～0.516 時間、妊娠ラットでは 4.77～3.5 時間であった。以下の表 2.6.6.6.1.2.1、表 2.6.6.6.1.2.2 及び表 2.6.6.6.1.2.3 を参照のこと。

表 2.6.6.6.1.2.1：　実験 22 日（週 1 回投与の 4 回目）に雄ラットに UX003 2、6 及び 20 mg/kg を投与したときの PK パラメータの平均値（CV%）

Dose (mg/kg)		$t_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{last} (hr*ug/mL)	AUC_{inf} (hr*ug/mL)	Vz (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
2	平均値	5.15	0.500	1.23	0.800	1.10	14300	2060
	CV%	28.3	0.0	58.6	45.6	41.2	26.1	44.4
6	平均値	0.96	0.500	39.1	20.3	20.4	530	356
	CV%	25.0	0.0	59.1	59.2	58.9	59.9	44.7
20	平均値	0.362	0.500	386	258	258	40.6	77.8
	CV%	2.0	0.0	8.2	8.6	8.6	8.7	8.9

出典：UX003-PC008

表 2.6.6.6.1.2.2：　実験 8 日（週 1 回投与の 2 回目）に雌の未経産・非妊娠ラットに UX003 2、6 及び 20 mg/kg を投与したときの PK パラメータの平均値（CV%）

Dose (mg/kg)		$t_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{last} (hr*ug/mL)	AUC_{inf} (hr*ug/mL)	Vz (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
2	平均値	1.01	0.500	12.5	7.30	7.43	405	281
	CV%	9.5	0.0	20.3	24.2	24.6	22.7	25.4
6	平均値	0.754	0.500	58.8	35.4	35.6	179	172
	CV%	37.9	0.0	26.2	16.6	17.3	20.3	16.1
20	平均値	0.516	0.500	314	191	192	77.4	104
	CV%	48.0	0.0	7.8	3.5	3.6	46.5	3.7

出典：UX003-PC008

表 2.6.6.6.1.2.3：　妊娠 18 日に妊娠ラットに UX003 2、6 及び 20 mg/kg を投与したときの PK パラメータの平均値（CV%）

Dose (mg/kg)		$t_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{last} (hr*ug/mL)	AUC_{inf} (hr*ug/mL)	Vz (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
2	平均値	4.77	0.500	1.07	0.725	1.01	13800	2060
	CV%	15.0	0.0	43.8	30.3	25.5	9.5	22.3
6	平均値	1.75	0.500	19.3	10.2	10.3	2760	909
	CV%	76.5	0.0	97.4	92.8	90.7	108.3	60.0
20	平均値	3.54	0.500	134	91.7	93.0	14300	1150
	CV%	143.3	0.0	81.0	83.2	82.1	171.6	150.8

出典：UX003-PC008

投与開始前に ADA を評価したところ、ベースライン試料で ADA は検出されなかった。実験 29 日に雄ラットを対象として再度 ADA の評価を行ったところ、UX003 を投与したすべての雄ラットが ADA 陽性を示した。雌では、ADA 評価を 3 回目の投与（非妊娠）に実施し、同じ母動物の

妊娠時（妊娠12、18及び21日）にも実施した。3回目のUX003投与時に、非妊娠ラットでADA陽性が認められ、その後も試験終了まで陽性のままであった。終了時（妊娠 21 日）には、全投与群の胎児の血清（同腹児ごとのプール血清）でも ADA が検出された。

高用量群のラット（雌雄）では、3回目のUX003投与後に活動性低下／嗜眠が認められたが、これは免疫応答に起因するものと考えられた。DPH を予防的に投与したことで、その後の投与時には雌雄ともに同様の作用を回避できたようであったが、高用量群の雄 1 例は DPH 投与で救命できず、3回目の投与後に死亡した。このほか、3 例のラット（低用量群及び DPH 対照群の雄各 1 例並びに高用量群の雌 1 例）が試験期間中に死亡した。死因はチューブによる拘束又は尿路内合併症（膀胱／腎臓感染）と関連があると考えられた。

中用量群の雌では、妊娠期間中に摂餌量に若干の統計学的な有意差が認められたが、これは偶発的なものと考えられた。雄では摂餌量に差は認められなかった。UX003 投与群と対照群で体重及び体重増加量に差が生じることは試験期間を通じてほとんどなかった。ただし、高用量群（20 mg/kg）の雄ラットでは実験 7 週の時点で対照群ほど体重が増加していなかった。この所見は総体重増加量にも表れていた。雌ラットではこのような傾向は見られず、UX003 投与による子宮重量への影響は認められなかった。受胎能、交尾行動、受胎率（妊娠率）、精子パラメータ（運動性、数及び形態）及び雄の器官重量にUX003の投与による変化は認められなかった。

全体的に見て、同腹児の生存率に UX003 の投与に関連する差は認められなかった。着床前及び着床後胚損失率は全群で同様であった。黄体数、生存着床数、総着床数及び非生存着床（吸収）数の平均値は全群で同様であった。平均吸収胚数は約 0.3～0.7 で、いずれの同腹児でも死亡胎児は認められなかった。生存胎児率は 95～99%であった。UX003 投与群と対照群で同腹児の生存データに統計学的な有意差は認められなかった。

同腹児の平均体重は全群で同様であったことから、胎児の発育に UX003 の投与による影響は見られなかった。胎児の評価（同腹児の体重、並びに頭部、内臓又は骨格検査を含む肉眼的外表観察）で発生異常（奇形）は認められなかった。全体的に見て、UX003 の投与に起因する有害かつ明らかな用量反応関係は胎児では認められなかった。

この試験で認められた1例の死亡は、UX003に対する免疫応答との関連が考えられた（その他の死亡は偶発的又は自然な死亡と考えられた）。この試験の結果を踏まえて、生殖毒性（雌雄の親ラット）及び発生毒性に対するUX003のNOAELは20 mg/kg/dayとした。ただし、ADAの産生がUX003の曝露量に影響した可能性はある。

2.6.6.6.1.3　妊娠ウサギを用いたUX003の用量範囲設定試験（GLP非適用、UX003-PC006）

EFD毒性本試験（GLP適用）におけるUX003の用量を選択するため、交配した妊娠New Zealand White（NZW）ウサギを用いてDRF EFD毒性試験を実施した。DRF試験（GLP非適用）では、妊娠ウサギ（3例／群）に、UX003（2、6及び20 mg/kg）を妊娠6～18日に1日1回静脈内投与し、溶媒対照群（溶媒単独群及び溶媒 + DHP群）を設定した。実験29日にウサギを安楽死させ、母体の肉眼的評価を実施して子宮、卵巣及び胎児を検査した。

対照群を含むすべての投与群で、妊娠 29 日の血清中 UX003（GUS）濃度は妊娠 6 日の投与開始前の内因性濃度に比べ高かった。胎児の血中 GUS 濃度は、妊娠 6 日の投与前の母体の内因性濃度に比べ低かった。この結果から、妊娠29日での胎児のUX003への曝露は否定されることが示唆された。実験6日及び29日の薬物動態（PK）データを以下の表2.6.6.6.1.3.1に示す。

表 2.6.6.6.1.3.1：　NZW ウサギを用いた用量範囲設定発生毒性試験における GUS 活性の平均値（TK、U/mL 又は nmol/mL/h）（UX003-PC006）

	対照	対照 + DHP	UX003 2 mg/kg	UX003 6 mg/kg	UX003 20 mg/kg
投与前	705.6	516.4	427.6	528.3	437.9
実験 29 日	835.9	909.2	661.5	1231.4	1522.3
同腹児－実験 29 日	45.8	108.0	74.0	83.9	115.0

出典：表のデータは UX003-PC006 の付録 10 から引用

妊娠 6 日の投与開始前に、数例の母動物で ADA 陽性反応が認められた。これら母動物は対照群も含め全群でランダムに認められた。妊娠 6 日に陽性反応を示したウサギは、妊娠 29 日でも陽性であった。ただし、妊娠 29 日には 6 及び 20 mg/kg 群で用量依存的に陽性反応が強くなった。ADA 陽性反応は、6 及び 20 mg/kg 群の母動物の同腹児でも認められた。このような反応が同腹児で認められたのは、母体の抗体が胎児に移行したためと考えられる。母体の抗体は胎盤（卵黄嚢）及び／又は羊水経口摂取を介して胎児に移行する。

試験期間中、UX003 の投与に関連した一般状態の有害作用は母動物に認められず、過敏症反応を示す所見も認められなかった。母動物の摂餌量に UX003 投与の影響は認められず、体重及び体重増加量の差も認められなかった。全体的に見て、体重増加／減少は UX003 投与群と対照群で同程度であった。

剖検時の肉眼的所見として、すべての母動物で心拡大が認められたが、心臓の顕微鏡的評価では、この肉眼的所見を説明できる病理学的変化は認められなかった。この心拡大は、IV 持続投与時の投与容量の多さに起因したものであり、UX003 の投与に関連したものではなかった。他のすべての組織のパラメータは正常範囲内で、特記すべき所見は認められなかった。

黄体数、着床数及び平均同腹児数は UX003 投与群と対照群で同様であり、UX003 2、6 及び 20 mg/kg 群で同腹児の生存率に投与に関連した明らかな差は認められなかった。着床前及び着床後胚損失率は、投与群間で同程度であり、投与による影響は認められなかった。ただし、着床前胚損失率が 5～15%で、着床後胚損失率が 2～17%であったことから、これらのパラメータには若干の変動が見られた。全体的に見て、これらのパラメータで明らかな用量反応関係は認められなかった。

肉眼的外表異常についても特記すべき点はなく、胎児はすべて正常であった。胎児の評価で投与に関連した影響は明らかにならなかったが、UX003 投与群の同腹児の平均体重は対照群と同程度であった。つまり、UX003 が胎児の発育に有害な影響を及ぼすことはなかった。NZW ウサギにおける母体及び発生毒性に対する UX003 の NOAEL は 20 mg/kg/day とした。ただし、ADA の産生が UX003 の曝露量に影響した可能性はある。

2.6.6.6.1.4　ウサギを用いた UX003 の胚・胎児発生毒性試験（GLP 適用、UX003-PC009）

この試験の目的は、主要器官形成期（着床から硬口蓋閉鎖まで）のウサギに UX003 を静脈内投与したときの発生毒性を評価し、TK プロファイル及び／又は抗 ADA 抗体反応を明らかにすることであった。

UX003 0（溶媒単独）、0（溶媒 + DPH）、2、6 又は 20 mg/kg を、溶媒（20 mM リン酸ナトリウム、135 mM 塩化ナトリウム、pH 6.0、20 mM L-ヒスチジン、 0.01% Tween-20）に溶解して静脈内持続投与した。投与速度 1 mL/kg で、投与容量を 10 mL/kg で一定にして静脈内持続投与した結

果、投与時間は約 30 分となった。ウサギへの投与は妊娠 6、9、12、15 及び 18 日に行った。投与期間には、主要器官形成期全体（妊娠 6 日から妊娠 18 日、着床から硬口蓋閉鎖まで）が含まれていた。投与群（溶媒対照群及び UX003 投与群）のウサギの数は、本試験用の 23 例及び TK/ADA 測定用の 3 例であった。溶媒対照 + DPH 群は本試験用の 13 例で構成された。DPH（5 mg/kg）を各投与開始の約 10～15 分前に筋肉内投与した。この DPH 対照群は、UX003 群で DPH の投与を必要とする免疫関連の有害反応が認められた場合の比較の根拠とするために設けた。母動物の体重、体重増加量及び摂餌量を妊娠期間を通じて測定した。母動物は妊娠 29 日に安楽死させ、帝王切開及び肉眼的剖検に供した。子宮重量を測定し、切開して着床部位を検査した。胎児を摘出し、体重を測定した後、肉眼的外表検査及び内臓検査を行った。対照群及び高用量群では、胎児の骨格及び／又は頭部検査を行った。TK 及び ADA 測定用の血液試料を投与開始前及び試験期間中は定期的に採取し、さらに雌ウサギ及び同腹児（プールした胎児血）からは妊娠 29 日にも採取した。

C_{max} 及び AUC の結果が示すように、妊娠ウサギでは UX003 の全身曝露量が用量比例値を上回っていた。妊娠 18 日に 2、6 及び 20 mg/kg を投与したときの C_{max} の平均値は、それぞれ 4.65、64.3 及び 372 µg/mL、AUC_{last} の平均値はそれぞれ 3.62、58.8 及び 604 hr*µg/mL であった（表 2.6.6.6.1.4.1）。

表 2.6.6.6.1.4.1：　妊娠 18 日に雌ウサギで測定した UX003 の TK パラメータの平均値（SD、SE、CV%）

用量 (mg/kg)		$t_{1/2}$ (hr)	T_{max} (hr)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{last} (hr*ug/mL)	AUC_{inf} (hr*ug/mL)	Vz (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
2	平均値	1.74	0.500	4.65	3.62	4.11	1570	584
	SD	0.478	-	3.39	2.25	2.29	1080	268
	SE	0.276	-	1.96	1.30	1.32	623	155
	CV%	27.5	-	73.0	62.1	55.6	68.8	45.9
6	平均値	0.461	0.500	64.3	58.8	59.0	68.3	102
	SD	0.0386	-	11.9	6.11	6.14	9.88	10.1
	SE	0.0223	-	6.86	3.53	3.54	5.70	5.82
	CV%	8.4	-	18.5	10.4	10.4	14.5	9.8
20	平均値	0.856	0.500	372	604	647	41.7	39.3
	SD	0.302	-	169	292	338	10.9	25.1
	SE	0.175	-	97.4	169	195	6.29	14.5
	CV%	35.3	-	45.4	48.4	52.2	26.1	63.7

3 例／群／時点。値はすべて有効数字 3 桁に四捨五入した。

出典：UX003-PC009

全体的に見て、推定クリアランス（CL）は用量に逆相関しており、血清中半減期（$t_{1/2}$）は、2 mg/kg で 1.74 時間、20 mg/kg で 0.856 時間であった。各 UX003 投与群の平均 C_{max} は、妊娠 9、12 及び 15 日でほとんど又は全く変化しなかった。ただし、低用量及び中用量群では、妊娠 12 及び／又は 15 日に C_{max} の低値が見られ（程度には個体間でばらつきがあった）、妊娠 18 日には低用量群で平均 C_{max} が約 70%低下していた。中用量群では、妊娠 15 日から妊娠 18 日にかけて平均

C_{max}が約 20%低下しており、高用量群では 1/3 例のみ、妊娠 15 日から妊娠 18 日にかけて C_{max}が低下していた（約 65%）。UX003 投与群の成熟ウサギ（及び胎児試料）では、妊娠 18 及び 29 日（終了時）に ADA が検出されており、特に低用量群では ADA の存在が妊娠 18 日の曝露量に顕著に影響した可能性が示唆された。

試験期間中、UX003 の投与に関連した一般状態の有害作用は母動物に認められず、過敏症反応を示す所見も認められなかった。母動物の摂餌量に UX003 投与の影響は認められず、体重及び体重増加量にも投与に関連した変化も認められなかった。全体的に見て、体重増加は UX003 投与群と対照群で同程度であった。

総体重増加量及び子宮重量は全群で同様であり、UX003 の投与による影響は認められなかった。子宮重量で補正した体重は、UX003 群と溶媒対照群で有意差は認められなかった。

肉眼的剖検所見に特記すべき点はなく、組織はすべて正常範囲内であった。

全体的に見て、溶媒対照群と UX003 投与群で同腹児の生存率に投与に関連する差は認められなかった。着床前及び着床後胚損失率は全群で同様であった。黄体数、生存着床数、総着床数及び非生存着床数（吸収胚及び死亡胎児数）の平均値は全群で同様であった。生存胎児率は 94～98%であった。UX003 投与群と対照群間で同腹児の生存データに統計学的な有意差は認められなかった。

同腹児体重（平均胎児体重）は全群で同様であり、UX003 の投与による影響は認められなかった。雌雄の胎児の平均数及び割合は全群で同様であり、UX003 の投与による影響は認められなかった。

UX003 投与群及び対照群の胎児の 97～100%が正常であった。全体的に見て、肉眼的外表異常はまれであり、UX003 投与に関連した変化のパターンは示されなかった。

内臓異常はまれであり、投与群間でランダムに認められた。頭部検査に特記すべき点はなく、対照群及び高用量群で検査に供した胎児の構造はすべて正常であった。対照群及び高用量群の胎児の骨格検査では、骨格の発達に投与に関連した変化は認められなかった。対照群では胎児の 82%が正常と分類され、変異は認められず、20 mg/kg 群では胎児の 85%が正常と分類された。

同腹児の大きさ、生存着床数、総着床数、非生存着床数及び胎児の体重は全群で同様であった。胎児検査（肉眼的な外表観察並びに骨格、内臓及び頭部検査）で明らかな催奇形性パターンは認められず、UX003 投与群の同腹児の平均体重は対照群と同様であった。全体的に見て、奇形の発現率は低く、対照群の施設内又は背景データの範囲と近似していた。UX003 最大 20 mg/kg を緩徐に静脈内持続投与したときの忍容性は、母動物及び胎児ともに良好であった。母体及び発生毒性に対する NOAEL は 20 mg/kg/day とした。ただし、ADA の産生が UX003 の曝露量に影響した可能性はある。

2.6.6.6.2　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（GLP 適用、UX003-PC010)

本試験の目的は、Sprague Dawley CD（[redacted]：CD [SD]）ラットへの静脈内投与による UX003 の潜在的な影響と、着床から授乳及び離乳までの母動物の曝露に起因する新生児の発達を評価することである。

UX003 0（溶媒対照）、2、6 又は 20 mg/kg を、調製緩衝液（溶媒）（20 mM リン酸ナトリウム、135 mM 塩化ナトリウム、pH 6.0、20 mM L-ヒスチジン、0.01% Tween-20）に溶解して、投与容

量 10 mL/kg で 30 分静脈内持続投与した。投与は、妊娠 7 日目（GD7）から授乳 20 日目（LD20）まで 3 日ごとに 1 回行った。1 つの対照群は、GD 7 以降溶媒のみを投与した。DPH は、UX003 投与後の潜在的な免疫関連反応を軽減するために、静脈内注入開始の 15 分±5 分前に最新の体重に基づいて 10 mg/kg で腹腔内注射により投与した。

母動物の臨床所見は、投与期間中及び試験期間中毎日記録した。母動物の行動は、分娩後毎日記録した。体重は、投与期間中及び試験期間中毎日記録した。摂餌量は、GD 7、GD 10、GD 13、GD 16、GD 18、GD 21 及び LD 14 までの授乳期の毎日記録した。自然分娩の観察（観察された有害な臨床徴候、妊娠期間［GD 0 から最初の児を出産する時点まで］、産子数及び出生時の児の生存率）を記録した。母動物は産後 21 日目に安楽死させ、肉眼的病変について検査した。TK 及び ADA 分析の母動物の血液量は限られており、曝露確認に使用した。TK 用採血時点は、GD 7、GD 19、LD 14（又は LD 15）に投与 3 分後に収集した。TK 確認のための F1 児の採血は、産後 5、8 及び 11 日に行った。ADA 用の母動物の採血は、初回投与前、GD 19 及び LD 14（又は LD 15）で行った。

F1 児の同腹児の離乳前には、生存を 1 日に 2 回記録し、臨床的観察を 1 日に記録し、体重を産後 1、4、7、10、14、18 及び 21 日目に記録した。F1 児の離乳後には、生存を 1 日に 2 回、臨床観察を 1 週間に 1 回記録した。（F1 雌ラットには、GD 0、3、7、10、13 にも観察を行った）。体重は週に 1 回記録した（F1 雌ラットは、GD 0、3、7、10 及び 13 にも記録した）。摂餌量は、F1 雄ラットでは週 1 回、F1 雌ラットでは同居するまで、GD 0、3、7、10、13 に週 1 回記録した。F1 児のラットでは、性的成熟、受動的回避評価、M 字型水迷路評価及び生殖能力も評価した。

GUS 活性は、すべての F0 母動物及び F1 児に存在した。F0 母動物では、一般に、GD 7、GD 19 及び LD 14 で UX003 投与群の GUS 活性が用量依存的に増加した。F1 児では、GUS 活性は UX003 投与群と対照群間で同等であり、主に F1 児の内因性 GUS 活性を検出していることを示している（表 2.6.6.6.2.1 参照）。

表 2.6.6.6.2.1:　　試験動物中の平均β-グルクロニダーゼ活性の概要

F0 Generation Females						
用量 (mg/kg)	GD 7		GD 19		LD 14	
	Mean (U/mL) ± SD	N	Mean (U/mL) ± SD	N	Mean (U/mL) ± SD	N
0	93.93 ± 3.76	3	97.33 ± 18.28	3	113.5 ± 20.72	3
0/DPH	166.2 ± 59.86	6	169.1 ± 67.97	6	131.02 ± 18.61	5
2	45556 ± 6909	6	2052 ± 455	6	9121 ± 8213	6
6	291558 ± 111863	6	45029 ± 48235	6	116278 ± 136419	6
20/12	655810 ± 659512	6	189018 ± 157647	4	315221 ± 49763	2
F1 Generation Pups						
用量 (mg/kg)	PPD 5		PPD 8		PPD 11	
	Mean (U/mL) ± SD	N	Mean (U/mL) ± SD	N	Mean (U/mL) ± SD	N
0	125.2 ± 14.66	6	236.85 ± 110.86	6	216.43 ± 189.71	6
0/DPH	141.39 ± 31.34	10	173.58 ± 62.69	9	159.97 ± 77.61	10
2	151.39 ± 15.74	12	181.04 ± 38.51	12	169.03 ± 55.31	12
6	212.83 ± 29.73	12	244.53 ± 45.18	12	179.99 ± 56.75	11
20/12	289.95 ± 85.9	4	266.55 ± 95.32	4	212.83 ± 31.72	3

GD ：妊娠日数、 LD ：授乳日数、PPD：= 分別後日数
SD：標準偏差、N：動物数

抗 UX003 抗体は、GD 19 及び LD 14 に UX003 投与群の雌の全例で検出された。UX003 投与群では投与前には抗 UX003 抗体は検出されなかった。対照群では、雌 3 例に抗 UX003 抗体が検出された（0 mg / kg 群：1 例（投与前、GD 19 及び LD 14）、DPH のみ投与群：1 例（LD 14）、DPH のみ投与群：1 例（GD 19 及び LD 14））。これらの対照群では、UX003 が投与されなかったため、これらの結果は UX003 とは無関係であると見なされる。

予定外の剖検は、6mg/kg 群で 1 例及び 20/12 mg / kg 投与群で 15 例の F0 雌ラットで行った。これらの動物のうち、本試験の 12 例の F0 母動物及び TK 用の 20/12 mg / kg 群の 3 例の F0 母動物で、UX003 の投与により死亡又は予定外に安楽死させた。これらの死亡のタイミングは、9 例が、GD 16 の投与後 6～24 時間で死亡又は安楽死し、GD 19 の投与後 6～8 時間で 3 例が安楽死した。また、LD 2、8、14 のいずれかの投与後 24 時間後に 3 例の死亡が見られた。予定外に安楽死させたラットは、運動活性の低下、青白い四肢、眼瞼下垂、低姿勢、運動失調、触感冷感及びラットへの異種タンパク質の投与に対するアナフィラキシー様反応によると思われる緩徐呼吸の臨床徴候を示した。F0 母動物の 12 例中 7 例の肉眼的病変の顕微鏡検査に基づき、病理所見はまれであると考えられた。すなわち、副腎出血、肝細胞壊死、ヘモグロビン円柱を伴う腎臓の尿細管変性、膵臓の間質性浮腫及びリンパ性過形成が含まれた 腸間膜リンパ節及び脾臓が認められた。顕微鏡で評価された組織が限られていたため、予定外に安楽死させた雌の死因と UX003 投与の病理所見との関係は不明であった。加えて、6 mg / kg 群の 1 例（No.6094）が GD 17 で死亡したことが判明したが、この死亡は、浮腫性膵臓の死後観察を含めて 20/12 mg/kg で観察されたものと同様であった。これは中用量群での 1 例の発生であったが、UX003 の投与に関連していたと考えられた。

予定された安楽死まで生存しなかった本試験の残りの雌のうち、2 mg/kg 群の 2 例及び 20/12 mg/kg 群の 3 例は、妊娠/分娩しなかったため GD 25 で安楽死した。また、0/DPH 群及び 6 mg/kg 群の 2 例は、生存している児がいないため、LD 1 及び/又は LD 3 で安楽死させた。TK 用の 0/DPH 投与群の 1 例は妊娠しておらず、GD 25 まで出産しなかった。また、20/ 12 mg/kg 投与群の 1 例は、 生き残った児がいないため、LD1 で安楽死させた。他のすべての雌は、予定された安楽死まで生き残った。

<u>妊娠期間- 母動物の観察、体重、体重増加量及び摂餌量</u>

生理食塩水及び DPH の投与は、生理食塩水対照群（群 1）と比較して臨床徴候の発生率を増加させなかった。妊娠期間中に生理食塩水+DPH（群 2）対照群では、立毛、痂皮の発生率が低く、運動能が低下した。これらの各臨床徴候は、妊娠期間の終わりまで観察された。尾径部の下側、右側及び下側正中線に沿った痂皮形成は、DPH 投与経路（すなわち、腹腔内注射）によるものであった。生理食塩水+DPH 群に他の臨床所見はなかった。

UX003 関連の臨床観察には、2 mg / kg 以上投与群で立毛と軽度から中程度の脱水（皮膚膨圧に基づく）、運動能の低下、四肢蒼白、運動失調、眼瞼下垂、疲はい、冷感触感が認められた。また、20/12 mg/kg 群で徐呼吸が認められ、これは、ラットへの異種タンパク質の投与に対するアナフィラキシー様反応を示している可能性がある。1 回以上の立毛が、2 mg/kg 及び 6 mg/kg 群の GD 16 と GD 19 及び 20/12 mg/kg 群の GD 13 及び GD 19 に観察された。軽度から中程度の脱水（皮膚膨圧に基づく）、疲はい、冷感、触感、徐呼吸、運動能の低下、四肢蒼白、運動失調及び眼瞼下垂が 1 例の雌で GD 16 及び GD 19 に 1 回以上観察された。

2、6 及び 20/12 mg/kg 投与群のそれぞれ 1、1 及び 5 例の雌で、膣周囲に赤い物質が観察された。

これらの雌では、6 mg/kg 投与群の 1 例及び 20/12 mg/kg 投与群の 4 例が、予定された安楽死まで生存しなかった （死亡率/組織病理学）。剖検検査において、これらの雌の 1 例以上で着床後喪失（早期及び/又は後期吸収）が認められた。

妊娠期間中に 2 mg/kg 以上投与群で認められた立毛は、授乳期間中も持続した。2 mg/kg 投与群で LD 2 及び LD 14 に 1 回以上、6 及び 20/12 mg/kg 投与群で LD 2 及び LD 17 で 1 回又は複数回、立毛が観察された。

妊娠期間中のいずれの用量でも、平均母動物体重又は平均母動物体重増加に対する UX003 関連の影響は認められなかった。群 1 及び 2（生理食塩水及び生理食塩水+DPH 投与群）の間で平均母動物体重に統計的に有意な差はなかった。 全体として、GD 21 の平均母動物体重は、生理食塩水+DPH 投与群、2、6 及び 20/12 mg/kg 投与群の群 1 のそれぞれ 99%、97%、97%及び 97%であった。また、GD 7 から 21 間の平均母動物体重増加量は、生理食塩水+DPH、2、6 及び 20/12 mg/kg 投与群の、群 1 のそれぞれ 97%、92%、92%及び 91%であった。

妊娠期間中のいずれの用量でも、平均母動物摂餌量は UX003 関連の影響を受けなかった。群 1 及び 2（生理食塩水及び生理食塩水+DPH）の間で、平均母動物摂餌量に統計的に有意な差は認められなかった。GD 7 から 18 の間の母動物の平均摂餌量は、生理食塩水+DPH、2、6 及び 20/12 mg/kg 投与群では群 1 の 99%、99%、95%及び 94%であった。

<u>授乳期間- 母動物の観察、体重、体重増加量及び摂餌量</u>

生理食塩水及び DPH 投与群では、生理食塩水投与群と比較して臨床徴候の発生率を増加させなかったが、DPH 投与経路（腹腔内注射）に関連すると推定される多くの注射部位反応が認められた。これらの注射部位反応は、鼡径部の下側、右側及び下側正中線に沿った痂皮及び正中線に沿った擦過傷、下側正中線及び/又は右鼡径部の腫瘤及び下側正中線に沿った潰瘍等であった。

妊娠期間中に 2 mg/kg 以上で認められた立毛の観察は、授乳期間中も持続した。2 mg/kg 投与群で LD 2 及び LD 14 で 1 回以上、6 及び 20/12 mg/kg 投与群で LD 2 及び LD 17 で 1 回又は複数回、立毛が観察された。

授乳期においていずれの用量でも、母動物の平均摂餌量に対する UX003 関連の影響は認められなかった。群 1 及び 2（生理食塩水及び生理食塩水+DPH 投与）の間で母動物の平均摂餌量に顕著な違いは認められなかった。母動物の平均摂餌量は、授乳期間中すべてのグループで変動した。母動物の平均摂餌量は、群 1 と比較して 0/DPH 群で統計的に有意な差（$p \leq 0.05$ 又は $p \leq 0.01$）が認められた。これらの違いは、変化の大きさが小さいため、意味があるとは見なされなかった。 LD 1 から 14 の間で、0/DPH、2、6 及び 20/12 mg/kg 群の群 1 に比較した平均母動物摂餌量は、それぞれ 92%、91%、86%及び 92%であった。

妊娠は、0、0/DPH、2、6 及び 20/12mg/kg 投与群において、それぞれ 25（100%）、25（100%）、23（92%）、25（100%）、24（89%）の F0 母動物で確認された、これらの母動物のうち、25、25、23、24 及び 14 例の母動物が、それぞれ 0、0/DPH、2、6 及び 20/12 mg/kg 群で同腹児を産んだ。

いずれの用量でも、UX003 に関連した自然出産あるいは同腹パラメータへの影響は認められなかった。2 mg/kg 群では、生存児の平均数と死産児の平均数に統計的に有意な差（$p \leq 0.05$）が認められた。加えて、6 mg/kg 群で、分娩後 1 日目に死亡する児の数に統計的に有意な増加（$p \leq 0.05$）

があり、それに対応する生存指数（産後4日目/産後1日目に生存している児数）は統計的に有意な減少が認められた（p≤0.01）。これらの違いは、用量依存的ではなかったため、UX003とは無関係であると考えられた。

他のすべての自然分娩及び同腹パラメータは、すべての投与群で類似していた（評価パラメータ：同腹児の平均数、妊娠期間、同腹の着床部位、妊娠指数（1例以上の生存児を持つ母動物数/妊娠数）、授乳指数（出産後21日目の生存児数/出産後4日目の生存児数）、生存児数/同腹、同腹の雄児の割合及び生存同腹児の体重）。

予定された安楽死まで生き残った母動物では、UX003に関連する剖検所見はいずれの用量でも認められなかった。予定された安楽死では、生理食塩水+DPH投与群及び/又は2 mg/kg群の尾径部乳腺及び皮下組織で黄褐色の腫瘤の発生率が低く、腸間膜リンパ節の赤い病巣が1回観察された。黄褐色の腫瘤は顕微鏡的に肉芽腫と関連性が認められた。肉芽腫を覆う皮膚は、しばしば潰瘍化又は壊死し、痂皮で覆われていた。肉芽腫には、壊死中心又は痂皮のいずれかに球菌最近が多く含まれていることがよく見られた。1例の雌（No. 6032）では、細菌は肉芽腫内の中央組織裂溝に沿って広がっており、排液管と解釈された。加えて、6 mg/kg群の雌（No.6097）には、白い歯髄のリンパ組織過形成が認められた。

F1児 ― 離乳前

群1と比較して、0/DPH投与群の同腹児数が増加した。この群では軽度から重度の脱水状態（皮膚膨圧に基づく）の1例以上の児が認められた。すなわち、0/DPH群で産後3日から19日までに3つの同腹で10回の脱水が観察されたが、生理食塩水対照群（群1）では観察されなかった。離乳前の期間中、F1児にはUX003関連の臨床徴候はいずれの用量でも認められなかった。

離乳前の期間中、2又は6 mg/kg群において平均児体重に対するUX003に関連した影響は認められなかった。加えて、平均児体重は、両対照群間で同等であった。平均児体重は、群1と比較して、分娩後1日から21日までの各体重測定日に20/12 mg/kg投与群において減少した（群1の89%～95%）。ただし、それぞれの平均値は、試験施設で観察された背景データ範囲内であった。

F1児には、いずれの投与群でもUX003関連した肉眼的所見は認められなかった。 さらに、群1と比較して、0/DPH投与群のF1児には、注目すべき肉眼的所見は認められなかった。産後21日目の離乳前に、0、0/DPH、2、6及び6mg/kg投与群で、それぞれ1、6、9、7及び4例について、死亡例、予定外の安楽死又は死産のF1児に対して剖検検査が行われた。これらの児のうち、0、0/DPH、2、6及び20/12 mg/kg投与群のそれぞれ0、3、1、1及び1例の児には剖検時に胃の中にミルクが存在せず、児が授乳しなかったことを示唆した。加えて、2 mg/kg 投与群で死亡し剖検された他の1例の児は、剖検検査で濃い灰色の外観を呈した。 産後21日目までに死亡、死産、安楽死が確認された残りの児には肉眼的所見は認められなかった。

産後9、15又は21日に予定された安楽死させた児では、いずれの投与群でもF1児にUX003関連した肉眼的所見は認められなかった。

F1児- 離乳後

UX003投与群に割り当てられたすべてのF1児の雄及び雌ラットは、予定された安楽死まで生き

残った。0 mg/kg 投与群（群 1）の 1 例の雄（No. 4911）は、産後 78 日目に死亡した。死亡前の臨床徴候はなく、離乳後の観察期間中の体重について注意すべき点は認められなかった。剖検検査の肉眼的所見では何も検出されなかった。生存中又は死後の観察を行わなかったため、死因を特定することはできなかった。対照群の他のすべての雄及び雌動物は、予定された安楽死まで生き残った。

F1 児の雄又は雌動物で UX003 関連の臨床徴候は観察されなかった。 加えて、2 つの対照群で注目すべき臨床徴候は観察されなかった。

離乳後期間中のいずれの用量でも、F1 児の雄又は雌の平均体重又は平均体重増加量に対する UX003 関連の影響はなかった。妊娠期間中の雌の平均体重と平均体重増加量は、すべての群で同様であった。さらに、2 つの対照群間で平均体重又は平均体重増加量に顕著な違いは認められなかった。

離乳後期間中のいずれの投与量でも、F1 児の雄又は雌の平均絶対摂食量に対する UX003 関連の影響はなかった。妊娠期間中の雌の平均絶対摂食量は、すべての群で同様であった。さらに、2 つの対照群間で平均摂餌量に顕著な違いは認められなかった。

F1 児の雄又は雌動物のいずれの用量でも、性成熟に対する UX003 関連の影響は認められなかった。さらに、2 つの対照群間で、雄の口蓋垂分離又は雌の膣開口部に顕著な違いは認められなかった。雄の亀頭包皮分離（43.0～43.8 日）及び雌の膣開存性（31.2～31.8 日）の平均観察日は、投与群間で類似していた。同様に、F1 児の雄及び雌の性成熟の日に記録された平均体重も、すべての用量群で類似していた。

産後 24 日目及び 31 日目±1 日の受動的回避試験による評価では、F1 児の雌雄の短期及び長期記憶に対する UX003 関連の影響は認められなかった。M 字型水迷路テストによる評価では、F1 児の雄及び雌で、協調性、水泳能力、学習及び記憶に対する UX003 関連の影響は認められなかった。さらに、2 つの対照群間で M 字型水迷路試験において顕著な違いは認められなかった。

F1 児の交配又は受胎能に対して、UX003 関連の影響はいずれの用量でも認められなかった。共生の平均日数は 2.3 日から 3.5 日の範囲であり、交配指数は 92%から 100%の範囲であり、出生率は 83%から 100%の範囲であった。さらに、2 つの対照群間で交配及び生殖能力に顕著な違いはなかった。

剖検検査中に F1 児の雄ラットで UX003 関連の肉眼的所見はいずれの用量でも認められなかった。F1 児の雌では肉眼的所見は検出されなかった。さらに、2 つの対照群には注目すべき肉眼的所見は認められなかった。

F1 児の雄の平均最終体重又はペアの精巣又は精巣上体の重量又は F1 児の雌ラットのペアの卵巣の重量に対する UX003 関連の影響は認められなかった。さらに、2 つの対照群間で生殖器官の重量に顕著な違いは認められなかった。妊娠は、0、0/DPH、2、6 及び 20/12 mg/kg 群でそれぞれ 20（80%）、23（92%）、24（96%）、23（92%）及び 22（88%）の F1 児雌ラットで確認された。F1 児の雌ラットのいずれの用量でも、卵巣及び子宮パラメーターに対する UX003 関連の影響は認められなかった。黄体、着床、着床前喪失、生存及び生存不能胚、着床後喪失に関して、同腹平均値は 5 つの用量群で類似していた。検査した胎盤には検出可能な異常は認められなかった。

上記のデータに基づくと、UX003 の母動物での NOAEL は 2 mg/kg であり、発達に対する NOAEL は 20/12 mg/kg であった。

2.6.6.7　局所刺激性試験

UX003 の独立した非臨床局所刺激性試験は実施していない。しかしながら、ラットの単回投与毒性試験（UX003-PC002）及び若齢カニクイザルの 26 週間反復投与毒性試験（UX003-PC003）で、IV 注入部位に UX003 に起因する肉眼的及び病理組織学的な異常は認められなかった。ラットを用いた単回投与試験（UX003-PC002）では、対照群及び UX003 投与群のラットの一部で、投与部位（頚静脈）に軽微又は軽度の慢性炎症、内皮過形成及び／又は血栓が認められた。これらの変化は頚静脈に留置されたカテーテルに起因するものであった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

その他の毒性試験は実施していない。

2.6.6.9　考察及び結論

本非臨床プログラムは、UX003 4 mg/kg（予定市販用量）の隔週長期静脈内投与の妥当性を裏付けるものである。UX003 を静脈内投与したときの非臨床の毒性特性は、以下の複数の Ultragenyx がスポンサーの非臨床毒性試験で評価した。1) 免疫寛容 MPS VII 型マウスを用いた 8 週間（及び 1 週間の回復期間）の生体内分布試験（UX003-PC001）、2) SD ラットを用いた急性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC002）、3) 若齢カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC003）、4) SD ラットを用いた DRF 試験（UX003-PC007）及びそれに続く受胎能及び EFD 毒性試験（UX003-PC008）、5) NZW ウサギを用いた DRF 試験（UX003-PC006）及びそれに続く EFD 毒性試験（UX003-PC009）、並びに 6) SD ラットを用いた PPND 試験（GLP 適用、UX003-PC010）。PPND 試験を除く試験の NOAEL はいずれも 20 mg/kg（最高用量）と考えられた。PPND 試験では、母動物に対する NOAEL は UX003 に対するアナフィラキシー様反応から、2 mg/kg と考えられたが、発達に対する NOAEL は 20/12 mg/kg と考えられた。なお、GLP 適用毒性試験及び臨床試験用の試験物質を製造する際にも使用している細胞株に由来する rhGUS を MPS VII 型マウスで検討した各種非臨床試験の発表データも、これらの試験の基盤となっている。

マウス、ラット、ウサギ及びサルは CIM6PR を発現し、GUS のアミノ酸配列の相同性が合理的で系統発生学的に適度にヒトと類似している（それぞれ 75.0%、75.0%、82.0%及び 94.0%）ことから、毒性評価の適切な動物種として選択した。また、これらの動物種は、これらの試験と同様に CIM6PR による細胞内取り込みの作用機序を利用した他の ERT の毒性プログラムでも使用されている。

非臨床用量（2、6 及び 20 mg/kg）は、MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞における UX003 の K_{uptake} に基づき、臨床開始用量（2 mg/kg）の 10 倍の安全係数及び予定最大臨床用量（4 mg/kg）の 5 倍の安全係数となるよう設定した。MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞で細胞内半減期が約 40 日であったこと（UGNX-013）や、臨床で予定している投与方法を踏まえた上で、26 週間反復投与毒性試験は QOW で実施した。

MPS VII 型モデルマウスを用いた多くの公表論文では、投与された rhGUS が多くの組織に分布し、ライソゾーム内の GAG 蓄積を大幅に減少又は抑制することが示されている。公表済みのこれらの非臨床試験及び Vogler の試験（Vogler et al. 2005）で保管された組織病理スライドの盲検下再評価（民間企業がスポンサーとなって実施し、委員会が認定した第三者の毒性専門家が評

価）の結果、重要な毒性学的所見は認められなかった。これらの試験は、GLP 適用の正式な毒性試験として過剰な高用量投与を含めて実施されたものではないが、Vogler et al.の 2005 年の試験で採取した組織を認定獣医病理学者が病理学的に評価したことで、適切な GUS 欠損動物種を用いた複数の ERT 試験で、rmGUS 及び rhGUS の相対的安全性に関する妥当な知見が得られている。

uGAG 値と病理組織のライソゾーム内蓄積減少との比例関係を確認するために免疫寛容 MPS VII 型マウスを用いて実施した 8 週間の試験では、最大 20 mg/kg まで UX003 の忍容性は良好であり、試験期間中に UX003 投与に関連した重要な一般状態の変化は認められなかった。

SD ラットを用いた単回投与試験（GLP 適用）及び若齢カニクイザルを用いた 26 週間反復毒性試験（GLP 適用）では、UX003 を最大 20 mg/kg の投与量で静脈内投与し、いずれの試験でも NOAEL は 20 mg/kg と考えられた。これらの試験では、安全域が予定市販用量（4 mg/kg）の 5 倍、第 III 相臨床試験（UX003-CL301 試験）の 4 mg/kg 投与時の C_{max} に基づくと 22 倍、AUC に基づくと 18 倍であった。

UX003 の生殖発生毒性は、rhGUS に関する既存データ及び関連する MPS を対象とした他の ERT で得られている生殖発生毒性データに基づいて複数の方法で評価した。UX003 の受胎能への影響は、ラットを用いた急性毒性試験及びサルを用いた慢性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC002 及び UX003-PC003）、並びに MPS VII 型モデルマウスを用いた試験（UX003-PC001）において雌雄の生殖器官を評価して検討した。これら 3 件の試験では UX003 の投与に起因する肉眼的及び顕微鏡的所見は認められなかった。さらに、SD ラット及び NZW ウサギの DRF 及び静脈内投与による DART 試験（SD ラット：UX003-PC007、UX003-PC008 及び UX003-PC010、NZW ウサギ：UX003-PC006 及び UX003-PC009）では、UX003 には母体毒性並びに受胎能及び胚・胎児発生への有害作用がないことが示された。PPND 試験（GLP 適用、UX003-PC010）では、母動物に対する毒性所見は、ほとんどアナフィラキシー様反応によるものと思われ、中用量（6 mg/kg）及び高用量（20/12 mg/kg）群で確認された。すべての DART 試験において、生殖能力、胚胎児発達又は出生前及び出生後発達に対する悪影響は観察されず、発達に対する NOAEL は各 DART 試験で投与された最高用量であった。また、これらの試験では ADA が検出され、妊娠動物の UX003 曝露量に影響を及ぼしたと考えられた。しかしながら、ADA が存在したにも関わらず、母動物における UX003 の曝露量は十分であったことから、安全域は予定市販用量を上回っていた。UX003 の血清中 $t_{1/2}$ は短い（ラットにおける $t_{1/2}$ は約 1 時間、UX003-PC005）が、GUS の組織中半減期は、マウスで 80～129 時間（Vogler et al. 2005）、MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞では *ex vivo* で約 40 日である（UGNX-013）点に留意する必要がある。つまり、妊娠後期に ADA が産生され、それにより血清中曝露量が低下したが、UX003 は妊娠動物の組織中に存在していると考えられた。これらの試験では UX003 の経胎盤分布から胎児の UX003 曝露に及ぶ決定的な所見は認められなかった。これらの結果は、rhGUS のような高分子量のタンパク質が受動輸送で胎盤を通過しないこと（ICH S6 R1）及び MPS VII 型妊娠マウスに rhGUS を 3～5 mg/kg 投与した試験の結果（rhGUS は胎盤壁を通過しない［胎児に送達されない］）と一致している（Grubb et al. 2008）。全体的に見て、UX003 は受胎能又は F1 世代の発育分化に対するリスクは低いと考えられる。

結論として、上記に示す詳細な非臨床データ及び既承認の酵素補充療法治療薬に関する先行データから、UX003 が安全に臨床使用できることが裏付けられた。

2.6.6.10 参考文献

Ballesteros M, Scott CD, Baxter RC. 1990. "Developmental regulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor mRNA in the rat." *Biochem. Biophys. Res Commun.* 172 (2):775-779.

Birkenmeier EH, Davisson MT, Beamer WG, Ganschow RE, Vogler CA, Gwynn B, Lyford KA, Maltais LM, Wawrzyniak CJ. 1989. "Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with beta-glucuronidase deficiency." *J.Clin.Invest* 83 (4):1258-1266.

Gitzelmann R, Bosshard NU, Superti-Furga A, Spycher MA, Briner J, Wiesmann U, Lutz H, Litschi B. 1994. "Feline mucopolysaccharidosis VII due to beta-glucuronidase deficiency." *Vet Pathol* 31 (4):435-443.

Grubb JH, Vogler C, Levy B, Galvin N, Tan Y, Sly WS. 2008. "Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (7):2616-2621.

Haskins ME, Aguirre GD, Jezyk PF, Schuchman EH, Desnick RJ, Patterson DF. 1991. "Mucopolysaccharidosis type VII (Sly syndrome). Beta-glucuronidase-deficient mucopolysaccharidosis in the dog." *Am J Pathol* 138 (6):1553-1555.

Kaplan A, Achord DT, Sly WS. 1977. "Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74 (5):2026-2030.

Kornfeld S. 1987. "Trafficking of lysosomal enzymes." *FASEB J* 1 (6):462-468.

Kornfeld S. 1990. "Lysosomal enzyme targeting." *Biochem Soc Trans* 18 (3):367-374.

Sly WS, Vogler C, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Tan Y, Nishioka T, Tomatsu S. 2006. "Enzyme therapy in mannose receptor-null mucopolysaccharidosis VII mice defines roles for the mannose 6-phosphate and mannose receptors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (41):15172-15177.

Vogler C, Levy B, Galvin NJ, Thorpe C, Sands MS, Barker JE, Baty J, Birkenmeier EH, Sly WS. 1999. "Enzyme replacement in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to beta-glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy." *Pediatr Res* 45 (6):838-844.

Vogler C, Levy B, Grubb JH, Galvin N, Tan Y, Kakkis E, Pavloff N, Sly WS. 2005. "Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (41):14777-14782.

Vogler C, Sands MS, Levy B, Galvin N, Birkenmeier EH, Sly WS. 1996. "Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in murine mucopolysaccharidosis type VII: impact of therapy during the first six weeks of life on subsequent lysosomal storage, growth, and survival." *Pediatr.Res.* 39 (6):1050-1054.

Wenk J, Hille A, von FK. 1991. "Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose 6- phosphate receptors in human cells and tissues." *Biochem. Int.* 23 (4):723-731.

Zoetis T, and Hurtt ME. 2003a. "Species comparison of anatomical and functional renal development." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68 (2):111-120.

Zoetis, T and Hurtt ME. 2003b. "Species comparison of lung development." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68 (2):121-124.

Zoetis T, Tassinari MS, Bagi C, Walthall K, Hurtt ME. 2003c. "Species comparison of postnatal bone growth and development." *Birth Defects Res B Dev.Reprod.Toxicol.* 68 (2):86-110.

メプセヴィ点滴静注液 10mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）
2.6.7 毒性試験概要表

アミカス・セラピューティクス株式会社

Table of Contents

LIST OF ABBREVIATIONS 2

2.6.7 TOXICOLOGY TABULATED SUMMARIES 4

2.6.7.1 Toxicology: Overview 4

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies 8

2.6.7.3 Overview of Toxicokinetics Data 10

2.6.7.4 Toxicology Drug Substance 14

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity 17

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies 18

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies 19

2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro 23

2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo 23

2.6.7.10 Carcinogenicity 23

2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Non-Pivotal Studies 24

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation (Pivotal) 27

2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development (Pivotal) 40

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (Pivotal) 48

2.6.7.15 Studies in Juvenile Animals 55

2.6.7.16 Local Tolerance 55

2.6.7.17 Other Toxicity Studies 55

2.6.7.18 List of References 56

List of Abbreviations

ADA	anti-drug antibodies
ANOVA	analysis of variance
ATA	anti-therapeutic antibodies
AUC	area under the plasma concentration-time curve
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to the time of last measurable concentration
BW	body weight
°C	degrees Celsius
CL	total clearance of drug after intravenous administration
C_{max}	maximum plasma concentration
CNS	central nervous system
[redacted]	[redacted]
CTD	common technical document
DART	developmental and reproductive toxicity
DPH	diphenhydramine
DRF	dose range finding
EFD	embryo-fetal development
FDA	Food and Drug Administration
g	grams
GAG	glycosaminoglycan
GD	gestation day
GLP	Good Laboratory Practice
GUS	beta-glucuronidase
h, hr	hour(s)
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IV, i.v.	Intravenous(ly)
LD	lactation day
LSD	lysosomal storage disease, lysosomal storage disorder
mg/kg	milligrams per kilogram
mL	milliliter
mM	millimolar
MPS	mucopolysaccharidosis/mucopolysaccharidoses
MPS I	mucopolysaccharidosis type I, Hurler Syndrome or Scheie Syndrome, or Hurler-Scheie Syndrome (alpha-L-iduronidase deficiency)
MPS II	mucopolysaccharidosis type II, Hunter Syndrome (idurate-2-sulfatase deficiency)
MPS IVA	mucopolysaccharidosis type IVA, Morquio Syndrome (galactose 6-sulfatase deficiency)

MPS VI	mucopolysaccharidosis type VI, Maroteaux-Lamy Syndrome (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase deficiency)
MPS VII	mucopolysaccharidosis type VII, Sly Syndrome (beta-glucuronidase deficiency)
MPS	mucopolysaccharidosis/mucopolysaccharidoses
MPS I	mucopolysaccharidosis type I, Hurler Syndrome or Scheie Syndrome, or Hurler-Scheie Syndrome (alpha-L-iduronidase deficiency)
nM	nanomolar
NOAEL	no observed adverse effect level
NZW	New Zealand White rabbits
OECD	The Organization for Economic Co-operation and Development
PK	pharmacokinetic(s)
PPND	pre- and postnatal development
QOW	every other week
r^2	coefficient of determination
RE	percent relative error
rhGUS	recombinant human beta-glucuronidase; rh-β-glucuronidase
SD	standard deviation
SD rat	Sprague-Dawley rat
$t_{1/2}$	half-life
TK	toxicokinetic
T_{max}	time to maximum plasma concentration
US	United States
UX003	recombinant human beta-glucuronidase; rh-beta-glucuronidase; rhGUS

2.6.7 Toxicology Tabulated Summaries

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Table 2.6.7.1.1: Toxicology: Overview

Test Article: UX003

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP [a] Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity	Rat, SD[g]	IV[b] (2hr infusion)	Single dose on Day 1	0, 6, 20	Yes	[redacted]	UX003-PC002 [redacted] 20022900[c]	Module 4.2.3.1
Repeat-Dose Toxicity	MPS VII Mouse Model (MPS VII/E540A^{TG})	IV[b]	Once weekly for 8 weeks	0, 0.1, 0.25, 1, 4, 20	No	[redacted]	UX003-PC001	Module 4.2.3.2.2
	Monkey, Cynomolgus	IV[b] (2hr infusion)	Every other week for 26 weeks	0, 2, 6, 20	Yes	[redacted]	UX003-PC003 [redacted] 20022902[c]	Module 4.2.3.2.3
Genotoxicity	No studies conducted.							
Carcinogenicity	No studies conducted.							
DART[d]: DRF[e] for Embryofetal Development (EFD / Seg II)	Rat, SD[g]	IV[b] (30 min infusion)	Dosed every 3 days on GD[f] 6,9,12,15 and 18.	0, 2, 6, 20	No	[redacted]	UX003-PC007 13-720 [c]	Module 4.2.3.5.2

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP [a] Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
DART[d]: Fertility & Embryofetal Development (Seg I and II)	Rat, SD[g]	IV[b]	Dosed on GD[f] 6, 9, 12, 15 and 18. Males dosed once weekly until sacrifice	0, 2, 6, 20	Yes	[redacted]	UX003-PC008 15-817 [c]	Module 4.2.3.5.1.3 and Module 4.2.3.5.2
DART[d]: DRF[e] for Embryofetal Development (EFD / Seg II)	Rabbit, New Zealand White	IV[b] (30 min infusion)	Dosed daily from GD[f] 6 through 18.	0, 2, 6, 20	No	[redacted]	UX003-PC006 13-721 [c]	Module 4.2.3.5.2
DART[d]: Embryofetal Development (EFD / Seg II)	Rabbit, New Zealand White	IV[b]	Dosed twice weekly on GD[f] 6 through 13	0, 2, 6, 20	Yes	[redacted]	UX003-PC009 15-816 [c]	Module 4.2.3.5.2
DART[d]: Pre- and Postnatal Development (PPND; Seg III)	Rat, SD[g]	IV[b] (30 min infusion)	Dose once every three days starting on GD[f] 7 through LD[h] 20	0, 2, 6, 20/12[i, j]	Yes	[redacted]	UX003-PC010 20135840[c]	Module 4.2.3.5.3
Local Tolerance	Local tolerance was evaluated as part of the single dose rat toxicity study and the repeat-dose chronic toxicity study in cynomolgus monkeys (UX003-PC002 and UX003-PC003, respectively) through histopathologic evaluation of the injection site.							
Other Toxicity Studies	No studies conducted.							

[a] Studies were conducted in compliance with United States FDA and OECD GLPs.
[b] IV= Intravenous
[c] Test facility study number

[d] DART: Developmental and Reproductive Toxicity
[e] DRF: Dose Range Finding study
[f] GD: Gestation Day
[g] SD: Sprague Dawley
[h] LD: Lactation Day
[i] Due to mortalities observed in the high dose group, doses were decreased from 20 mg/kg to 12 mg/kg on Gestation Day 19.
[j] Diphenhydramine (DPH) was administered to all treated groups starting on Gestation Day 7.

Table 2.6.7.1.1: Toxicology: Overview

Test Article: rhGUS[a]

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity (Blinded Pathology Reassessment at [redacted] by Sponsor)	MPS VII Mouse Model (MPS VII/E540A^{TG})	IV[c]	Once weekly for 3 weeks	0.3, 1, 2.5, 5	No	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO [d] and [redacted][d]	Publication (Vogler et al. 2005), and [redacted][b] 20022037-1 and 20022037-2	Module 4.2.3.2
			Once weekly for 13 weeks	1, 2, 4				
			Thrice weekly for 1 week	20, 40				
			Once weekly for 4 weeks	20				
Repeat-Dose Toxicity	No studies conducted with rhGUS.							
Genotoxicity	No studies conducted with rhGUS.							
Carcinogenicity	No studies conducted with rhGUS.							
Local Tolerance	No studies conducted with rhGUS.							
Other Toxicity Studies	No studies conducted with rhGUS.							

[a] The enzyme in this study was produced from the same master cell bank that is used to produce material for Ultragenyx sponsored nonclinical and clinical studies, by comparable traditional purification method.
[b] Test facility study number
[c] IV= Intravenous
[d] Testing originally was conducted at St. Louis, MO for Vogler study (Vogler et al. 2005), the Ultragenyx sponsored blinded pathology reassessment was conducted at [redacted] ([redacted]).

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Table 2.6.7.2.1: Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: UX003

Type of Study	Test System	Method of Administration and Regimen	Doses (mg/kg)	GLP[d] Compliance	Study Number	Location in CTD
Single-dose Toxicity and CNS Safety Pharmacology	Rat, SD[c]	IV[h] infusion (2 hr)	0, 6, 20	Yes	UX003-PC002, 20022900[a]	Module 4.2.3.1
Repeat-dose chronic toxicity, 26-week	Monkey, Cynomolgus	IV[h] infusion (2hr) every other week	0, 2, 6, 20	Yes	UX003-PC003, 20022902[a]	Module 4.2.3.2
DART[e]: EFD[f] dose range-finding	Rat, SD[c]	IV[h] (30 min infusion)	0, 2, 6, 20	No	UX003-PC007 13-720[b]	Module 4.2.3.5.2
DART[e]: Fertility and EFD[f] combined (Seg I/II)	Rat, SD[c]	IV[h]; females dosed on GD[g]6, 9, 12, 15 and 18; males dosed once weekly until sacrifice	0, 2, 6, 20	Yes	UX003-PC008, 15-817[b]	Module 4.2.3.5.1 and Module 4.2.3.5.2
DART[e]: EFD[f] dose range-finding	Rabbit, New Zealand White	IV[h] (30 min infusion)	0, 2, 6, 20	No	UX003-PC006 13-72[b]	Module 4.2.3.5.2
DART[e]: EFD[f] (Seg II)	Rabbit, New Zealand White	IV[h]; dosed twice weekly on GD6 through 13	0, 2, 6, 20	Yes	UX003-PC009 15-816[b]	Module 4.2.3.5.2
DART[e]: Pre- and Postnatal Development (PPND; Seg III)	Rat, SD[c]	IV[h] (30 min infusion); dosed once every three days starting on GD[g] 7 through LD[i] 20	0, 2, 6, 20/12[j, k]	Yes	UX003-PC010 20135840[a]	Module 4.2.3.5.3

[a] [redacted] study number
[b] [redacted] study number
[c] SD: Sprague Dawley
[d] Studies were conducted in compliance with United States FDA and OECD GLPs.
[e] DART: Developmental and Reproductive Toxicity
[f] EFD: Embryofetal Development

[g] GD: Gestation Day
[h] IV= Intravenous
[i] LD=Lactation Day
[j] Due to mortalities observed in the high dose group, doses were decreased from 20 mg/kg to 12 mg/kg on Gestation Day 19.
[k] Diphenhydramine (DPH) was administered to all treated groups starting on Gestation Day 7.

2.6.7.3 Overview of Toxicokinetics Data

Table 2.6.7.3.1: Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: UX003

AUC_{0-t} (hr*U/mL)								
Dose (mg/kg)	**Rats (Single dose) Study No. UX003-PC002**		**Monkey (Repeat dose – QOW) Study No. UX003-PC003 (Day 1)**			**Monkey (Repeat dose – QOW) Study No. UX003-PC003 (Day 169)**		
	M	**F**	**M**	**F**	**M/F Combined**	**M**	**F**	**M/F Combined**
0	1360 ± 56.8	1060 ± 93.4	721 ± 519	701 ± 169	NTa	617 ± 332	834 ± 313	NTa
2	NT[a]	NT[a]	33,300 ± 5720	40,100 ± 1750	NT[a]	63,400 ± 33,900	34,700 ± 13,700	NT[a]
6	116,000 ± 26,100	99,400 ± 1300	152,000 ± 8060	236,000 ± 54,600	NT[a]	278,000 ± 26,200	465,000 ± 206,000	NT[a]
20	534,000 ± 46,000	385,000 ± 18,100	1,810,000 ± 355,000	1,620,000 ± 255,000	NT[a]	3,980,000 ± 821,000	3,460,000 ± 591,000	NT[a]

C_{max} (U/mL)								
Dose (mg/kg)	**Rats (Single dose) Study No. UX003-PC002**		**Monkey (Repeat dose – QOW) Study No. UX003-PC003 (Day 1)**			**Monkey (Repeat dose – QOW) Study No.UX003-PC003 (Day 169)**		
	M	**F**	**M**	**F**	**M/F Combined**	**M**	**F**	**M/F Combined**
0	161	127	89.1 ± 59.8	84.5 ± 16.4	NT[a]	77.6 ± 39.1	96.4 ± 34.4	NT[a]
0.1	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]
1	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]
2	NT[a]	NT[a]	17,400 ± 1270	23,700 ± 1050	NT[a]	44,000 ± 19,100	25,500 ± 9220	NT[a]
6	82,900	75,800	95,800 ± 22,000	146,000 ± 28,900	NT[a]	174,000 ± 16,300	256,000 ± 74,800	NT[a]
20	418,000	294,000	1,050,000 ± 119,000	910,000 ± 104,000	NT[a]	1,780,000 ± 168,000	1,630,000 ± 131,000	NT[a]
T_{max} (hr)								
Dose (mg/kg)	**Rats (single dose) Study No. UX003-PC002**		**Monkey (Repeat dose – QOW) Study No. UX003-PC003 (Day 1)**			**Monkey (Repeat dose – QOW) Study No. UX003-PC003 (Day 169)**		
	M	**F**	**M**	**F**	**M/F Combined**	**M**	**F**	**M/F Combined**
0	4	0	4.00	2.17	NT[a]	2.50	10.0	NT[a]
0.1	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]
1	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]	NT[a]
2	NT[a]	NT[a]	2.03	2.03	NT[a]	2.03	2.03	NT[a]
6	2.03	2.03	2.03	2.03	NT[a]	2.03	2.03	NT[a]
20	2.03	2.03	2.03	2.03	NT[a]	2.03	2.03	NT[a]

[a]NT – not tested
Source: UX003-PC002, UX003-PC003

Table 2.6.7.3.2: Overview of Toxicokinetics Data

Test Article: UX003

AUC_{0-t} (hr*μg/mL)				
Dose (mg/kg)	**Rats (DART)[a] Study No. UX003-PC008**			**Rabbits (DART)[b] Study No. UX003-PC009**
	M[c]	**F[d]**	**F[e]**	**F[f]**
2	0.800 + 45.6	7.30 + 24.2	0.725 + 30.3	3.62 + 62.1
6	20.3 + 59.2	35.4 + 16.6	10.2 + 92.8	58.8 + 10.4
20	258 + 8.6	191 + 3.5	91.7 + 83.2	604 + 48.4
C_{max} (μg/mL)				
Dose (mg/kg)	**Rats (DART)[a] Study No. UX003-PC008**			**Rabbits (DART)[b] Study No. UX003-PC009**
	M[c]	**F[d]**	**F[e]**	**F[f]**
2	1.23 + 58.6	12.5 + 20.3	1.07 + 43.8	4.65 + 73.0
6	39.1 ± 59.1	58.8 ± 26.2	19.3 ± 97.4	64.3 ± 18.5
20	386 ± 8.2	314 ± 7.8	134 ± 81.0	372 ± 45.4
T_{max} (hr)				
Dose (mg/kg)	**Rats (DART)[a] Study No. UX003-PC008**			**Rabbits (DART)[b] Study No. UX003-PC009**
	M[c]	**F[d]**	**F[e]**	**F[f]**
2	0.500 ± 0.0	0.500 ± 0.0	0.500 ± 0.0	0.500
6	0.500 ± 0.0	0.500 ± 0.0	0.500 ± 0.0	0.500
20	0.500 ± 0.0	0.500 ± 0.0	0.500 ± 0.0	0.500

$t_{1/2}$ (hr)				
Dose (mg/kg)	**Rats (DART)[a] Study No. UX003-PC008**			**Rabbits (DART)[b] Study No. UX003-PC009**
	M[c]	**F[d]**	**F[e]**	**F[f]**
2	5.15 ± 28.3	1.01 ± 9.5	4.77 ± 15.0	1.74 ± 27.5
6	0.96 ± 25.0	0.754 ± 37.9	1.75 ± 76.5	0.461 ± 8.4
20	0.362 ± 2.0	0.516 ± 48.0	3.54 ± 143.3	0.856 ± 35.3

Rats (DART: Pre- and Postnatal Development (PPND; Seg III) Study No. UX003-PC010						
Dose (mg/kg)[gh]	**F0 Generation Female Rats** **Mean** β-Glucuronidase Activity **(U/mL) ± SD**					
	GD 7	**N**	**GD 19**	**N**	**LD 14**	N
0	93.93 ± 3.76	3	97.33 ± 18.28	3	113.5 ± 20.72	3
0 + DPH	166.2 ± 59.86	6	169.1 ± 67.97	6	131.02 ± 18.61	5
2 + DPH	45556 ± 6909	6	2052 ± 455	6	9121 ± 8213	6
6 + DPH	291558 ± 111863	6	45029 ± 48235	6	116278 ± 136419	6
20/12 + DPH	655810 ± 659512	6	189018 ± 157647	4	315221 ± 49763	2
Dose (mg/kg)[gh]	**F1 Generation Pups** **Mean** β-Glucuronidase Activity **(U/mL) ± SD**					
	PPD 5	**N**	**PPD 8**	**N**	**PPD 11**	N
0	125.2 ± 14.66	6	236.85 ± 110.86	6	216.43 ± 189.71	6
0 + DPH	141.39 ± 31.34	10	173.58 ± 62.69	9	159.97 ± 77.61	10
2 + DPH	151.39 ± 15.74	12	181.04 ± 38.51	12	169.03 ± 55.31	12
6 + DPH	212.83 ± 29.73	12	244.53 ± 45.18	12	179.99 ± 56.75	11
20/12 + DPH	289.95 ± 85.9	4	266.55 ± 95.32	4	212.83 ± 31.72	3

DPH=Diphenhydramine; GD=Gestation Day; LD=Lactation Day; PPD=Postpartum Day; SD=Standard Deviation

[a] DART: Developmental and Reproductive Toxicity; Study Title: Combined Intravenous Fertility and Developmental Toxicity study (Segment I and II) of UX003 in Rat

[b] DART: Developmental and Reproductive Toxicity; Study Title: Definitive Intravenous Developmental Toxicity Study (Seg II) of UX003 in Rabbits

[c] N= 3 Male Rats on Study Day 22 (4th weekly dose)

[d] N= 3 Nulliparous Non-gestational Female Rats on Study Day 8 for Females (2nd weekly dose)

[e] N= 3 Gestational Female Rats on Gestation Day 18

[f] N= 3 Female Rabbits on Gestation day 18/ group/ timepoint. All values are rounded to 3 significant figures

[g] DPH was administered to all treated groups starting on Gestation Day 7.

[h] Due to mortalities observed in the high dose group, doses were decreased from 20 mg/kg to 12 mg/kg on Gestation Day 19.

2.6.7.4 Toxicology Drug Substance

Table 2.6.7.4.1: Toxicology Drug Substance

Test Article: rhGUS[a]/UX003

Test Article	Batch No.	Purity by SEC (%)	Study Number	Type of Study
rhuGUS	[redacted][a,b]	99	(Vogler et al. 2005)	Repeat-Dose Toxicity Study in Mice
UX003	[redacted][c]	94	UX003-PC001	Repeat-Dose Toxicity Study in Mice
UX003	[redacted][f]	98	UX003-PC002	Single-Dose Toxicity Study in Rats
UX003	[redacted][f]	98	UX003-PC003	Repeat-Dose Toxicity Study in Monkeys
UX003	[redacted][f]	98	UX003-PC006	DART[d] DRF[e] for Embryofetal Development (EFD / Seg II) in Rabbits
UX003	[redacted][f]	98	UX003-PC007	DART: DRF for Embryofetal Development (EFD / Seg II) in Rats
UX003	[redacted][g]	99	UX003-PC008	DART: Fertility & Embryofetal Development (Seg I and II) in Rats
UX003	[redacted][g]	99	UX003-PC009	DART: Embryofetal Development (EFD / Seg II) in Rabbits
UX003	[redacted][g/g]	99.7/99.8	UX003-PC010	DART[d]: Pre- and Postnatal Development (PPND; Seg III) in Rats

[a] The enzyme in this study was produced from the same [redacted] that is used to produce material for Ultragenyx sponsored nonclinical and clinical studies, by comparable traditional purification method.
[b] Batch [redacted] formulation: 25 mM Tris, 1 mM Na-β-glycerophosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5
[c] Batch [redacted] formulation: 25 mM Tris, 1 mM Na-β-glycerophosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5 + 0.01% Tween-20
[d] DART: Developmental and Reproductive Toxicity
[e] DRF: Dose Range Finding study
[f] Batch [redacted] formulation: 20mM Na-Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5 + 0.01% Tween-20
[g] Batch [redacted], [redacted], and [redacted] formulation: 20 mM Na-phosphate , 135 mM NaCl, pH 6.0, 20 mM L-histidine + 0.01% Tween-20

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity

Table 2.6.7.5.1: Single-Dose Toxicity

Test Article: UX003

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number	Location in CTD
Rat/ Sprague Dawley	IV infusion, 2 hr (20 mM Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.01% Tween-20)	0, 6 and 20	6M/6F; TK: 4M/4F	20	There were no toxicologically significant findings related to administration of UX003 on clinical signs, body weight, food consumption, functional observation battery/CNS-assessment, clinical chemistry, hematology, coagulation, urinalysis, toxicokinetic patterns, macroscopic and microscopic pathology.	UX003-PC002	Module 4.2.3.1

Source: UX003-PC002

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies

Table 2.6.7.6.1: Repeat-Dose Toxicity: Non-Pivotal Studies

Test Article: rhGUS[a]

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[b] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Reference/ Study Number	Location in CTD
MPS VII Mouse Model (MPS VII/ E540A^{Tg})	IV[c], slow bolus (10mM Tris, pH 7.5; 150mM NaCl; 1 mM Beta-glycerophosphate)	0.3, 1, 2.5, 5	2 or 3/ group	40	Moderate decrease in meningeal storage described by Vogler (2005) and confirmed in blinded reassessment at [redacted] ([redacted]) sponsored by Ultragenyx.	Publication (Vogler et al. 2005), and [redacted][b] 20022037-1 and 20022037-2	Module 4.3 Module 4.2.3.2
		1, 2, 4	4 or 5/ group		Clearance in meninges and parietal, neocortical and hippocampal neurons + glia. Reduced GAG storage in liver and kidney; reduced GAG excretion in urine. Results confirmed in blinded reassessment at [redacted] sponsored by Ultragenyx. No change in LSD in CNS except meninges.		
		20, 40	2		Decreased neuronal, glial and meningeal storage. Moderate decrease in meningeal storage described by Vogler (2005) and confirmed in blinded reassessment at [redacted] ([redacted]) sponsored by Ultragenyx.		
		20	2		Clearance in meninges and parietal, neocortical and hippocampal neurons + glia. Reduced GAG storage in liver and kidney; reduced GAG excretion in urine. Results confirmed in blinded reassessment at [redacted] sponsored by Ultragenyx.		

[a] The enzyme in this study was produced from the same [redacted] that is used to produce material for Ultragenyx sponsored nonclinical and clinical studies, by comparable traditional purification method
[b] Test facility study number
[c] IV=Intravenous
Source: (Vogler et al. 2005), [redacted] 20022037-1, and [redacted] 20022037-2

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies

Table 2.6.7.7.1: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies

Test Article: UX003

Report Title: Biodistribution Study to Confirm the Relationship Between Urinary GAG Substrate and Tissue Pathology after Intravenous Administration of UX003 for 8 weeks in MPS VII Mice												
Species/Strain: Mouse, MPS VII/E540A^{Tg}			**Duration of Dosing:** Once weekly for 8 weeks				**Study Reference:** UX003-PC001					
Initial Age: 10-12 weeks old			**Duration of Postdose:** 1 week				**Location in CTD:** Module 4.2.1.1					
Date of First Dose: 24 July 2012			**Method of Administration:** IV[a]				**GLP Compliance:** non GLP					
			Vehicle/Formulation: Phosphate Buffered Saline									
8-Week Results (duration of main study group)												
Daily Dose (mg/kg)	**Control**		**0.1**		**0.25**		**1**		**4**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals (main group only)	**3**	**3**	**3**	**3**	**4**	**2**	**4**	**2**	**4**	**2**	**5**	**1**
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	Incidences of mortality were observed in both control (N=3) and UX003-treated animals (N=5; 1 in 0.1mpk group; 1 in 1mpk group; 2 in 6mpk group)[b]											
Body Weight Change (%) Week 8	There were no significant adverse effects noted in body weight determinations											
Food Consumption (g) - Qualitative	Not determined											
Clinical Observations	There were no significant adverse effects noted in clinical observations											
Hematology	There were no significant adverse effects noted in hematology											
Serum Chemistry	There were no significant adverse effects noted in serum chemistry											
Urinary GAG	Dose dependent reduction in GAG excretion with increasing doses with 2mpk likely being the saturation point											
Organ Weights (% difference from control)	Not determined											
Gross Pathology	Not reported											
Histopathology (number of animals assessed)	A dose dependent reduction (starting at 0.1mpk of UX003) in cytoplasmic vacuolization in most tissues and tissue elements											

Anti-DrugAntibodies - Number of animals positive for ADA/ Total number of animals assessed[a]	Not determined	
1 Week Recovery Group Results		
Daily Dose (mg/kg)	**4**	
Sex	**Male**	**Female**
Number of Animals	**4**	**2**
Noteworthy Findings		
Died or Sacrificed Moribund	Mortality was observed (1 mouse died in recovery group)[b]	
Body Weight (g) Day	There were no significant adverse effects noted in body weight determinations	
Food Consumption (g) - Qualitative	Not determined	
Clinical Observations	There were no significant adverse effects noted in clinical observations	
Ophthalmoscopy	Not determined	
Hematology	There were no significant adverse effects noted in hematology	
Serum Chemistry	There were no significant adverse effects noted in serum chemistry	
Urinary GAG	Retention in GAG reduction in the recovery period	
Organ Weights	Not determined	
Gross Pathology	Not reported	
Histopathology	Cytoplasmic vacuolization in most tissues and tissue elements (with the exception of glial cells and perivascular cells in brain) did not appear to reverse 1 week following dosing	

[a] IV= Intravenous

[b] Mortality may be attributed to several factors: MPS7 disease state, age of animals, extensive handling, and/or immune response related to UX003 or rapid bolus injection. Following implementation of antihistamine pretreatment, only 1 additional death was observed in the treated animals

Table 2.6.7.7.2: Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies

Test Article: UX003

Report Title: A 26-Week Toxicity, Toxicology and Cardiovascular Safety Study of UX003 by Intravenous Infusion Administration in Juvenile Cynomolgus Monkeys with a 4 Week Recovery Period								
Species/Strain: Cynomolgus monkeys/ Macaca fascicularis			**Duration of Dosing:** Every 2 weeks for 26 weeks		**Study Reference:** UX003-PC003, [redacted] 20022902			
Initial Age: 1.8 to 1.9 years old			**Duration of Postdose:** 4 weeks		**Location in CTD:** Module 4.2.3.2			
Date of First Dose: 29 Jan 2013			**Method of Administration:** IV infusion, 2 hr		**GLP Compliance:** GLP			
Special Features: NA			**Vehicle/Formulation:** 20 mM Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.01% Tween-20					
26-Week Results (duration of main study group)								
Daily Dose (mg/kg)	**Control**		**2**		**6**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals (main group plus recovery group)	5	5	3	3	3	3	5	5
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (kg) Day 182	2.36	2.44	2.50	2.50	2.40	2.40	2.44	2.46
Food Consumption (g) - Qualitative	No treatment-related abnormalities reported.							
Clinical Observations	No treatment-related abnormalities reported.							
Hematology	No treatment-related abnormalities reported.							
Serum Chemistry								
Total Bilirubin - mg/dL (Day 4)	0.20	0.21	0.25	0.20	0.18	0.31	0.26	0.31*
Total Bilirubin - mg/dL (Day 88)	0.13	0.16	0.16	0.14	0.12	0.18	0.15	0.15
Urinalysis	No treatment-related abnormalities reported.							
Organ Weights (% difference from control)	No treatment-related abnormalities reported.							

Gross Pathology	No treatment-related abnormalities reported.							
Histopathology (number of animals assessed)	3	3	0	0	0	0	3	3
	No treatment-related abnormalities reported.							
Anti-DrugAntibodies -Number of animals positive for ADA/ Total number of animals assessed[a]	**2/10**		**3/5**		**3/5**		**3/7**	
4-Week Recovery Group Results								
Daily Dose (mg/kg)	**Control**		**2**		**6**		**20**	
Sex	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Number of Animals	2	2	0	0	0	0	2	2
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (kg) Day 210	2.70	2.20	NA	NA	NA	NA	2.55	2.55
Food Consumption (g) - Qualitative	No treatment-related abnormalities reported.							
Clinical Observations	No treatment-related abnormalities reported.							
Ophthalmoscopy	No treatment-related abnormalities reported.							
Hematology	No treatment-related abnormalities reported.							
Serum Chemistry	No treatment-related abnormalities reported.							
Urinalysis	No treatment-related abnormalities reported.							
Organ Weights	No treatment-related abnormalities reported.							
Gross Pathology	No treatment-related abnormalities reported.							
Histopathology	No treatment-related abnormalities reported.							

* ANOVA with Dunnett's/Dunn's (p <= 0.05)

[a] Discounting animals with pre-existing positive ATA results

2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro

No in vitro genotoxicity studies were conducted.

2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo

No in vivo genotoxicity studies were conducted.

2.6.7.10 Carcinogenicity

No carcinogenicity studies were conducted.

2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Non-Pivotal Studies

Table 2.6.7.11.1: Non-Pivotal, Range-Finding Intravenous Developmental Toxicity Study in SD Rats

Test Article: UX003

Species /Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-lethal Dose (mg/kg)	LD_{50}	Noteworthy Findings	Study Number
Sprague Dawley Rat	IV infusion, 30 min (20 mM Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.01% Tween-20)	0, 2, 6 and 20	4F per group	20	Not applicable	• Single TK sampling on GD 6 (pretreatment) and GD 21 (terminal): Serum levels of UX003 on GD 21 were similar to those seen prior to treatment initiation on GD 6. UX003 levels in fetal blood were comparable to those seen in the dams. • BWs and food consumption: There were no UX003-related effects • Clinical observations: There were no UX003-related effects • No target organs identified • ADA analysis: Some of the rats in each group had anti-drug antibodies prior to treatment. Animals which had a positive response on gestation day 6 remained positive on GD 21; however, the magnitude of the response was greater on GD 21 for dams receiving 2, 6 or 20 mg/kg. Fetal blood from treated litters had a positive ADA response of greater magnitude compared to the two control groups (vehicle alone or vehicle + DHP).	UX003-PC007 [redacted] 13-720[a]

a: [redacted] Study number

Table 2.6.7.11.2: Range-Finding Intravenous Developmental Toxicity Study in NZW Rabbits

Test Article: UX003

Species /Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-lethal Dose (mg/kg)	LD_{50}	Noteworthy Findings	Study Number
New Zealand White Rabbit	IV infusion, 30 min (20 mM Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.01% Tween-20)	0, 2, 6 and 20	Females 3/gp	20	Not applicable	• Single TK sampling on Day 1 (pretreatment) and Day 29 (terminal): Serum levels of UX003 on gestation day 29 were higher than those seen prior to treatment initiation on gestation day 6 in all groups including the controls. UX003 levels in fetal blood were lower than those seen prior to treatment on gestation day 6 in the does. This was suggestive of no exposure of the fetus to UX003 on gestation day 29. • BWs and food consumption: There were no UX003-related effects • Clinical observations: There were no UX003-related effects • There was one target organs identified at all dose levels including the control groups: Gross necropsy findings consisted of dilatation of the heart in all does, although microscopic evaluation of the hearts did not reveal any pathological changes that could account for the gross findings. Dilatation of the heart was related to the large volume of fluid administered to the rabbits via intravenous infusion and not associated with UX003 treatment. All other tissues were unremarkable and within normal limits. • ADA analysis: Due to endogenous levels of GUS, a positive response for ADA was seen prior to treatment initiation in all groups on gestation day 6. Animals which had a positive response on gestation day 6 remained	UX003-PC006 [redacted] 13-721[a]

Species /Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-lethal Dose (mg/kg)	LD_{50}	Noteworthy Findings	Study Number
						positive on gestation day 29; however, a dose related-increase was seen in the does given 6 and 20 mg/kg on gestation day 29. A positive ADA response was also seen in the litters from dose treated with 6 and 20 mg/kg treated groups. The ADA response in litters from does in the vehicle, vehicle+DHP and 2 mg/kg groups were lower and likely represent a background response due to endogenous levels of GUS.	

a: [redacted] Study number

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

Table 2.6.7.12.1: Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic Development to Implantation

Report Title: Combined Intravenous Fertility and Developmental Toxicity Study (Segment I and II) of UX003 in Rats		**Test Article: UX003**
Design Similar to ICH 4.1.1: Yes	**Dosing Period:** M: 4 weeks prior to mating F: 2 weeks prior to mating	**Study Number: 15-817/ UX003-PC008**
Species/Strain: Sprague-Dawley rat		
Initial Age: Approximately 6-7 weeks (males) and 5-6 weeks (females) at receipt	**Day of Mating:** GD (Gestation Day) 0 **Day of Cesarean Section:** GD 21	**Location in CTD:** 4.2.3.5.1
Date of First Dose: 9/9/15 (males), 9/23/15 (females)	**Method of Administration:** Intravenous infusion	
Vehicle Control: Formulation buffer: 20 mM Na-phosphate, 135 mM NaCl pH 6.0, 20 mM L-histidine, + 0.01% Tween 20		
Vehicle Control and DPH: Formulation buffer: 20 mM Na-phosphate, 135 mM NaCl pH 6.0, 20 mM L-histidine, + 0.01% Tween 20 and diphenhydramine		
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level: Maternal toxicity: 20 mg/kg; **Reproductive performance and fertility:** 20 mg/kg		

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[1]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Males					
No. Evaluated	23	13	23	23	23
No. Died or Sacrificed Moribund [2]	0	1	1	0	1
Clinical Observations [3]					
Hypoactivity	0	0	0	0	3
Body Weight (g)[4]					
Day 7	351	354	346	350	347
Day 28	446	455	427	437	433
Day 49	509	505	481	490	468*
Males (Cont.)					
Body Weight Gain (g) [6]					
Day 7	46	51	44	46	43
Day 28	25	31	19*	21	19
Day 49	63	51	53	54	35*

[1] Diphenhydramine (5 mg/kg)

[2] One high dose male rat (#822) died after the 3rd administration on study day 15. This rat along with a few others from that group (#817, 823, and 835) appeared hypoactive immediately after the infusion was completed. The hypoactivity persisted for males # 817, 822 and 835 and they were administered a 5 mg/kg dose of DPH via IM injection. Males 817 and 835 recovered, while #822 was found dead later that day. Two other males, one low dose (#770) and one vehicle + DPH (#755) died during the study. The low dose male #770 was found dead in the tube at the end of the 4th administration; it had received DPH prior to initiation of infusion. No clinical signs or evidence of distress were noted during the infusion as such the death may have been related to the confined space/restraint in the tube during infusion. The vehicle control + DPH male (#755) died during the mating period (study day 43) before the daily dose was given. Based on the gross necropsy finding (kidney cyst with adhesions and urinary bladder pigmentation dark) this death was most likely related to complications within the urinary tract.

[3] The incidence reflects that the observation was noted for a given animal at least once during the observation period.

[4] Group means are shown.

*Significantly different from Control, $p \leq 0.05$

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[1]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Food Consumption (g/animal/interval)[5]					
Day 7	221	217	215	230	228
Day 28	232	226	217	231	227
Necropsy Observations	**-[6]**	**-**	**-**	**-**	**-**
Male Organ Weights					
Testes (Mean)	3.58	3.63	3.51	3.60	3.59
Testes to Body Weight Ratios (Mean)	0.706	0.720	0.733	0.735	0.773*
Epididymis (Mean)	1.46	1.43	1.45	1.51	1.43

[5] Group means are shown.
[6] No salient observations.
*Significantly different from Control, p≤0.05

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[7]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Males (Cont.)					
Sperm Analysis (N)	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
% Motile (Mean)	77.6	81.8	82.2	80.2	81.9
% Progressive (Mean)	20.2	22.5	21.5	21.7	22.5
Sperm Count (Mean)	745.2	729.1	817.8	705.9	799.1
Sperm/g x 108 (Mean)	7.45	7.29	8.18	7.06	7.99
Sperm Morphology (% Normal/200 sperm male)	95	NA	NA	NA	97
No. of Mating Pairs (1 to 1 mating Male to Female)	**23**	**13**	**22**	**23**	**22**
Total Sperm Positive (Total Mated)	23	12	21	23	22
Percent Mated (%)	100	92	95	100	100
Successful Mating Outcomes (gravid)	22	9	19	23	21
% Successful Outcomes (+/pregnant)	96	75	90	100	95
Mean Latency to Mate (Days)	2.2	2.4	2.0	2.2	3.0

[7] Diphenhydramine (5 mg/kg)

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[8]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Females					
No. Evaluated	23	13	23	23	23
No. Died or Sacrificed Moribund[9]	0	0	0	0	1
Clinical Observations [10]					
Convulsions	0	0	0	1[11]	0
Denuded Tail	0	0	0	1[12]	0
Head Bobbing	0	0	0	1[12]	0
Hypoactivity	0	0	0	1[12]	0
Irregular Breathing	0	0	0	1[12]	0
Premating Body Weight (g)[12]					
Day 7	244	242	241	242	243
Day 14	251	248	250	250	253

[8] Diphenhydramine (5 mg/kg)
[9] Death possibly related to restraint in the tube.
[10] The incidence reflects that the observation was noted for a given animal at least once during the observation period.
[11] Single female with multiple observations of denuded tail, convulsions shortly prior to dosing, head bobbing, hypoactivity.
[12] Group means are shown.

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[13]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Females (Cont.)					
Premating Body Weight Gain (g)[14]					
Day 7	14	14	12	13	13
Day 14	7	6	9	8	10
Premating Food Consumption (g/animal/interval)[15]					
Day 7 (interval 0-7)	149	151	155	152	151
Day 20 (interval 14-21)	135	130	134	134	132
Gravid Females (N)	**20**	**9**	**19**	**22**	**20**
Gestation Body Weight (g)[15]					
GD 6	288	288	284	284	285
GD 21	396	405	377	379	390
Gestation Body Weight Gain (g)[15]					
GD 6	27	31	30	24	25
GD 21	42	45	42	37	41
Gestation Food Consumption (g/animal/interval)[15]					
GD 6 (interval GD 0-6)	123	131	124	123	122
GD 21 (interval GD18-21)	76	81	73	73	72

[13] Diphenhydramine (5 mg/kg)
[14] Group means are shown

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[15]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Females (Cont.)					
Necropsy Observations	-[16]	-	-	-	-
Cesarean Section Observations					
Actual Group Size (gravid)	20	9	19	22	20
Viable Litters (≥ 1 live)[17]	20	9	19	22	20
Non-viable Litters (no live)[18]	0	0	0	0	0
% Non-Viable	0	0	0	0	0
Corpora Lutea (Sum)	304	137	270	321	301
Mean No. Corpora Lutea	15.2	15.2	14.2	14.6	15.1
Implantation Sites (Sum)	278	132	260	295	284
Mean No. Implantation Sites	13.9	14.7	13.7	13.4	14.2
Mean [19] % Pre-implantation Loss[20]	9.6	3.5	3.5	8.0	5.8
Viable Fetuses (Sum)	272	131	256	284	270
Mean No. Viable Fetuses	13.6	14.6	13.5	12.9	13.5
Mean % Post-implantation Loss[21]	2.0	0.9	1.4	3.8	5.1

[15] Diphenhydramine (5 mg/kg)
[16] No salient observations
[17] Viable litters refer to the number of does with at least 1 live implant on gestation day 21.
[18] Nonviable litters refers to the number of does that had no live implants, but were pregnant on gestation day 21
[19] The mean reported utilizes the litter as the unit of observation ± standard deviation (SD); the N used is the number gravid unless the parameter requires an intact fetus for evaluation (e.g., malformed), in which case the N utilized is viable litters.
[20] % Pre-implantation Loss = [(Total Corpora Lutea – Total Implants) ÷ Total Corpora Lutea] *100. When the number of implants is greater than the number of corpora lutea, a zero was used to indicate 0% pre-implantation loss.
[21] % Post-implantation Loss = [(Total Implants - Live) ÷ Total Implants] *100.

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[15]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Cesarean Section Observations (Cont.)					
Early Resorptions (Sum)	6	1	4	11	14
Mean[22] No. Early Resorptions	0.3	0.1	0.2	0.5	0.7
Late Resorptions (Sum)	0	0	0	0	0
Mean No. Late Resorptions	0	0	0	0	0
Total Resorptions (Sum)	6	1	4	11	14
Mean No. Total Resorptions	0.3	0.1	0.2	0.5	0.7
Early Deaths (Sum)	0	0	0	0	0
Mean No. Early Deaths	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Late Deaths (Sum)	0	0	0	0	0
Mean No. Late Deaths	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total Deaths (Sum)	0	0	0	0	0
Mean No. Total Deaths	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total Non-live Resorptions & Deaths	6	1	4	11	14
Mean No. Non-live Resorptions & Deaths	0.3	0.1	0.2	0.5	0.7

[22] The mean reported utilizes the litter as the unit of observation ± standard deviation (SD); the N used is the number gravid unless the parameter requires an intact fetus for evaluation (e.g., malformed), in which case the N utilized is viable litters.

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[23]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Litter Examinations					
Number of Litters Examined	20	9	19	22	20
Live Fetuses/Total Implants	272/278	131/132	256/260	284/295	270/284
% Live	97.8	99.2	98.5	96.3	95.1
Early Resorptions/Total Implants	6/278	1/132	4/260	11/295	14/284
% Early Resorptions	2.2	0.8	1.5	3.7	4.9
Late Resorptions/Total Implants	0/278	0/132	0/260	0/295	0/284
% Late Resorptions	0	0	0	0	0
Total Resorptions/Total Implants	6/278	1/132	4/260	11/295	14/284
% Total Resorptions	2.2	0.8	1.5	3.7	4.9
Early Deaths/Total Implants	0/278	0/132	0/260	0/295	0/284
% Early Deaths	0	0	0	0	0
Late Deaths/Total Implants	0/278	0/132	0/260	0/295	0/284
% Late Deaths	0	0	0	0	0
Total Non-Live/Total Implants	6/278	1/132	4/260	11/295	14/284
% Non-Live	2.2	0.8	1.5	3.7	5.2
Malformed Fetuses/Live Implants	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
% Malformed	0	0	0	0	0
Litter Examinations (Cont.)					
Litters with:					
Resorptions	5	1	4	8	10
Deaths	0	0	0	0	0
Non-Live	5	1	4	8	10
Malformed	0	0	0	0	0

[23] Diphenhydramine (5 mg/kg)

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[23]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
% Litters with:					
Resorptions	25	11	21	36	50
Deaths	0	0	0	0	0
Non-Live	25	11	21	36	50
Malformed	0	0	0	0	0
Mean Litter Body Weight					
Males	5.80	5.73	5.63	5.63	5.77
Females	5.50	5.47	5.34	5.43	5.44
Males + Females	5.69	5.59	5.50	5.52	5.61
Sex Ratio and Mean Number of M/F Fetuses					
Males (Sum)	146	59	134	135	138
Mean	7.3	6.6	7.1	6.1	6.9
Females (Sum)	125	72	131	140	132
Mean	6.6	8.0	6.9	6.7	6.9
Male : Female Ratio	1 : 1.2	1 : 0.8	1 : 1.0	1 : 1.0	1 : 1.0

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[24]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Litter Examinations (Cont.)					
Gross External Morphology	**Fetuses/Litter**				
Number Examined (Live):	272/20	131/9	256/19	262/22	270/20
Number Normal:	272/20	131/9	256/19	262/22	269/20
% Normal (fetal):	100	100	100	100	99.6
Edematous (Variation):	0	0	0	0	1
Visceral Observations					
Number Examined (Live):	134/20	66/9	127/19	132/22	133/20
Number Normal:	130/20	65/9	125/19	129/22	131/20
% Normal (fetal):	97	98	98	98	98
Innominate short (Variation)	1	1	1	1	1
Innominate long (Variation)	1	0	0	0	0
Hydro-ureter/nephrosis (Variation)	1	0	0	1	2
Liver focus red (Gross Observation)	1	0	0	0	0
Thymus red (Gross Observation)	0	0	0	1	0
Umbilical artery, left (Variation)	0	0	1	0	0
Cephalic Observations					
Number Examined (Live):	135/20	-	-	-	133/20
Number Normal:	135	-	-	-	133
Skeletal Examination	**Fetuses/Litter**				
Number Examined (Live):	137/20	-	-	-	138/20
Number Normal:	104/20	-	-	-	99/20
% Normal (fetal):	73	-	-	-	74
Variations					

[24] Diphenhydramine (5 mg/kg)

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[24]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Litter Examinations (Cont.)					
Skull	8/4	-	-	-	19/8*[25]
Incomplete Ossification	8/4	-	-	-	19/8
Score 1 -Variation within normal limits (fetal incidence)	4	-	-	-	13
Score 2 - Slight variation (fetal incidence)	2	-	-	-	3
Score 3 - Moderate variation (fetal incidence)	2	-	-	-	3
Fontanelle Enlarged, Score 2 - Slight variation	1/1	-	-	-	0/0
Ribs	9/6	-	-	-	19/9*[29]
Wavy/ Bulbous	2	-	-	-	13
Incomplete Ossification	1	-	-	-	3
Rudimentary 14th rib, Score 2 - Slight variation	7	-	-	-	1
Skeletal Examination (Cont.)	**Fetuses/Litter**				
Variations (Cont.)					
Ribs (Cont.)					
Cervical rib, Score 4 - Severe variation	0/0	-	-	-	2/2
Rib Scores	9/6	-	-	-	19/9*[26]
Score 1- Variation within normal limits (fetal incidence)	0	-	-	-	7
Score 2 - Slight variation (fetal incidence)	8	-	-	-	4
Score 3 - Moderate variation (fetal incidence)	1	-	-	-	6

[25]Skull and rib variations seen in the high dose fetuses were significantly elevated above concurrent control but were within recent historical control values for this facility or MARTA/MTA. Recent Facility Historical Maximum Fetal Incidence for Ribs: 21/132 (16%), Ribs wavy/bulbous 10/132 (8%), MARTA/MTA (1996) Historical range for cervical rib: Ave. 0.372% Max. 1.94%. and Facility Maximum Fetal Incidence for Skull: 15/132 (11%).
*Significantly different from Control $p \leq 0.05$.
[26] Rib variations seen in the high dose fetuses were significantly elevated above concurrent control but were within recent historical control values for this facility or MARTA/MTA. Recent Facility Historical Maximum Fetal Incidence for Ribs: 21/132 (16%), Ribs wavy/bulbous 10/132 (8%), MARTA/MTA (1996) Historical range for cervical rib: Ave. 0.372% Max. 1.94%.

Reproductive and Developmental Toxicity – Fertility and Early Embryonic Development to Implantation			**Study Number: UX003-PC008**		
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[24]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Litter Examinations (Cont.)					
Score 4 - Severe variation (fetal incidence)	0	-	-	-	2
Centra	23/11	-	-	-	5/4*[27]
Dumbbell/Bipartite	23/11	-	-	-	5/4
Score 1- Variation within normal limits (fetal incidence)	16	-	-	-	4
Score 2 - Slight variation (fetal incidence)	7	-	-	-	2
Pubis, Score 2 Slight variation	1/1	-	-	-	0/0

[27] Centra variations seen in the high dose were significantly lower than controls but control values were within recent historical control values for this facility; Facility Maximum Historical Fetal Incidence for Centra 20/132 (15%).
*Significantly different from Control p≤0.05.

2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development (Pivotal)

Table 2.6.7.13.1: Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development

Report Title: Definitive Intravenous Developmental Toxicity Study (Seg. II) of UX003 in Rabbits					**Test Article: UX003**
Design Similar to ICH 4.1.3: Yes	**Dosing Period:** Gestation Day (GD) 6 to 18 (GD 6, 9, 12, 15, 18)			**Study Number:** UX003-PC009 (15-816)	
Species/Strain: New Zealand White Rabbit	**Day of Mating:** GD 0			**Sponsor Report Number:**UX003-PC009	
Initial Age: Approximately 5 months at receipt	**Day of Cesarean Section:** GD 29			**Location in CTD:** 4.2.3.5.2	
Date of First Dose: September 23, 2015	**Method of Administration:** Intravenous infusion				
Vehicle Control: Formulation buffer: 20 mM Na-phosphate, 135 mM NaCl pH 6.0, 20 mM L-histidine, + 0.01% Tween 20				**GLP Compliance:** Yes	
Vehicle Control + DPH Formulation buffer + diphenhydramine[a]					
Special Features: None					
No Observed Adverse Effect Level:					
Maternal toxicity: 20 mg/kg **Developmental toxicity:** 20 mg/kg					
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[1]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Maternal Females					
Main Study:					
No. of Main Study Animals	23	13	22	23	23
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Clinical Observations[2]					
Red Material excrement pan	0	0	0	1	1
Scant Feces	2	0	2	2	4

[1] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.
[2] The incidence reflects that the observation was noted for a given animal at least once during the observation period.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			Study Number: UX003-PC009		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[3]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Maternal Females (Cont.)					
No. of Main Study Animals (Gravid)	22	12	20	19	21
Gestation Body Weight (g)[4]					
GD 6	3050	3340*	3038	3066	3092
GD 19	3196	3529*	3190	3225	3220
GD 29	3417	3650	3388	3446	3418
Gestation Body Weight Gain (g)[4]					
GD 7	-28	-39	-22	-20	-20
GD 19	25	9	25	29	-6
GD 29	44	35	46	56	43
Gestation Food Consumption (g/animal/day)[4]					
GD 6-7	155	199	161	170	169
GD 16-19	509	556	520	532	433
GD 27-29	291	323	244	303	284
Gravid Uterine Weight (g)	486	470	506	477	467
Adjusted Final Body Weight (g)	2932	3180*	2882	2969	2951
Adjusted Body Weight Change (g)	-118	-161	-156	-97	-140
Necropsy Observations	-[5]	-	-	-	-
Number Examined	23	13	22	23	23
Remarkable findings	-	-	-	-	-

[3] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.
[4] Group means are shown for gravid does.
[5] = No noteworthy findings
* significantly different from control $p \leq 0.05$.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			**Study Number: UX003-PC009**		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[6]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Maternal Females (Cont.)					
Cesarean Section Observations/Litter Viability					
No. Evaluated	23	13	22	23	23
No. Pregnant	22	12	20	19	21
Sum Corpora Lutea	211	118	212	181	197
Mean No. Corpora Lutea	9.6	9.8	10.6	9.5	9.4
No. Implantation Sites (Total)	203	111	198	170	185
Mean No. Implantation Sites	9.2	9.3	9.9	8.9	8.8
Mean % Preimplantation Loss	3.9	5.7	5.7	5.8	6.0
No. Live Fetuses (Sum)	199	104	190	163	180
Mean No. Live Fetuses	9.0	8.7	9.5	8.6	8.6
Mean % Postimplantation Loss	1.9	6.5	4.2	4.0	2.6
No. Early Deaths (Sum)	0	0	0	3	0
Mean No. Early Deaths	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0
No. Late Deaths (Sum)	1	0	3	0	1
Mean No. Late Deaths	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
Total No. Deaths (Sum)	1	0	3	3	1
Mean No. Deaths	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
No. Early Resorptions (Sum)	2	6	5	4	4
Mean No. Early Resorptions	0.1	0.5	0.3	0.2	0.2
No. Late Resorptions (Sum)	1	1	0	0	0

[6] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			Study Number: UX003-PC009		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[6]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Cesarean Section Observations/Litter Viability (Cont.)					
Mean No. Late Resorptions	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
No. Resorptions (Sum)	3	7	5	4	4
Mean No. Total Resorptions	0.1	0.6	0.3	0.2	0.2
Non-live Resorptions & Deaths (Sum)	4	7	8	7	5
Mean No. Non-live Resorptions & Deaths	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2
Live Fetuses/Total Implants	199/203	104/111	190/198	163/170	180/185
% Live	98.0	93.7	96.0	95.9	97.3
Early Resorptions/Total Implants	2/203	6/111	5/198	4/170	4/185
% Early Resorptions	1.0	5.4	2.5	2.4	2.2
Late Resorptions/Total Implants	1/203	1/111	0/198	0/170	0/185
% Late Resorptions	0.5	0.9	0	0	0
Total Resorptions/Total Implants	3/203	7/111	5/198	4/170	4/185
% Total Resorptions	1.5	6.3	2.5	2.4	2.2
Early Deaths/Total Implants	0/203	0/111	0/198	3/170	0/185
% Early Deaths	0	0	0	1.8	0
Late Deaths/Total Implants	1/203	0/111	3/198	0/170	1/185
% Late Deaths	0.49	0.00	1.52	0.00	0.54
Total Non-Live/Total Implants	4/203	7/111	8/198	7/170	5/185
% Non-Live	2.0	6.3	4.0	4.1	2.7
Malformed Fetuses/Live Implants	2/203	1/111	1/198	0/170	4/185
% Malformed	1.0	0.9	0.5	0.0	2.2

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			**Study Number: UX003-PC009**		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[7]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Litters with					
Resorptions	3	7	4	4	4
Deaths	1	0	3	2	1
Non-Live	4	7	7	6	5
Malformed	2	1	1	0	3
% Litters with					
Resorptions	14	58	20	21	19
Deaths	5	0	15	11	5
Non-Live	18	58	35	32	24
Malformed	9	8	5	0	14
Fetuses					
No. Fetuses (Live)/Litters Evaluated	199/22	103/12	190/20	163/19	180/21
Mean Fetal Body Weight (g)					
Males	39.40	39.00	38.34	39.68	40.16
Females	37.33	38.90	38.13	39.33	38.32
Males + Females	38.27	38.92	38.17	39.63	39.09
Number of					
Males (Sum)	99	46	89	85	90
Males (Mean)	4.5	3.8	4.5	4.5	4.3
Females (Sum)	100	57	101	78	90
Females (Mean)	4.5	4.8	5.1	4.3	4.3
Male : Female Ratio	1:1.0	1:0.8	1:0.9	1:1.1	1:1.0

[7] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			**Study Number: UX003-PC009**		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[8]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Fetal Observations					
Gross External Morphology					
Number Examined	199/22	103/12	190/20	163/19	180/21
Number Normal	198/22	103/12	189/20	163/19	178/21
% Normal (fetal)	99	100	99	100	99
Hyperflexion (V, variation)	1	0	0	0	1
Open eyelid (M, malformation)	0	0	0	0	1
Cleft Lip (M) and Macrognathia (M)	0	0	0	0	1
Protruding tongue (M)	0	0	1	0	0
[Macerated (COXL, common observation for late death)	[1	0	[2	0	0
[Dead fetus, cleft lip (M), hyperflexion (V)	0	[1	0	0	0
[Macerated (COXL), clubbed forelimb (M)	0	0	[1	0	0
[Macerated (COXL), Hyperflexion forelimb (V)	0	0	0	0	[1
Visceral Observations	**Fetuses/Litter**				
Number Examined (Live):	199/22	103/12	190/20	163/19	180/21
Number Normal:	196/22	100/12	189/20	163/19	176/21
% Normal (fetal):	98	97	99	100	98

[8] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.
[= Indicates data are intended for information only, these are tabulated and summarized with the viability data (e.g. Late Deaths)

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			Study Number: UX003-PC009		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[9]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Fetal Observations (Cont.)					
Variations (fetal)					
Hydro-nephrosis-ureter (V)	1	0	0	0	0
Gallbladder, enlarged (V)	0	0	1	0	0
Gallbladder, small (V)	0	1	0	0	0
Innominate, short (V)	0	1	0	0	0
Innominate, long (V)	0	0	0	0	1
Innominate, absent (V)	0	0	0	0	1
Malformations (fetal)[10]					
Aorta, enlarged no arch (M)	0	0	0	0	1
Gallbladder, absent (M)	1	1	0	0	0
Diaphragmatic Hernia (lungs small) (M)	1	0	0	0	0
Testis, absent (M)	0	0	0	0	1
Cephalic Observations	**Fetuses/Litter**				
Number Examined (Live):	65/22	Not Examined			54/21
Number Normal:	65/22				54/21
% Normal (fetal):	100				100

[9] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.
[10] Fetal malformations approximate historical control parameters for this facility and/or published data.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development			Study Number: UX003-PC009		
Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**2**	**6**	**20**
Group Name	**Vehicle Control**	**Vehicle Control+DPH[11]**	**Low Dose**	**Mid Dose**	**High Dose**
Fetal Observations (Cont.)					
Skeletal Observations	**Fetuses/Litter**				
Number Examined	199/22	Not Examined			180/21
Normal	164/22				153/21
% Normal (fetal)	82				85
# Skulls Examined	134/22				127/21
Incomplete Ossification, Score 1[12] (fetal)	1				1
Fontanelle Enlarged, Score 2[13] (fetal)	1				0
Sternebrae (fetal)					
# 5/6 Variation Score 1[14]	30				22
Asymmetrical or Fused, Score 4[14]	1				3
Ribs (fetal)					
12, Normal	70				87
12 Ru Normal	0				1
13, Normal	75				44
13 Ru/Rd, Normal	36				23
13 Ru/Uni, Normal	18				24
Forked/Fused, Score 5[15] (M)	0				1

[11] Diphenhydramine (DPH) was given IM at 5 mg/kg prior (~15 to 20 minutes) to IV administration.
[12] Score 1 -Variation within normal limits
[13] Score 2 - Slight variation
[14] Score 4 - Severe variation
[15] Score 5 – Malformation – Permanent Change

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function (Pivotal)

Table 2.6.7.14.1 Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Report Title: A Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study of UX003 by Intravenous Infusion in Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation					**Test Article: UX003** **Treatment Article:** Diphenhydramine Hydrochloride (DPH)
Design Similar to ICH 4.1.3: Yes	**Dosing Period:** Once every three days beginning on Gestation Day (GD) 7 and continuing through Day 20 postpartum (Lactation Day [LD 20])			**Study Number:** 20135840	
Species/Strain: Rat/[redacted]:CD(SD) Sprague Dawley	**Day of Mating:** Gestation Day 0			**Sponsor Reference:** UX003-PC010	
Initial Age: 62 to 78 days of age				**Location in CTD:** 4.2.3.5.3	
Date of First Dose: 26 Mar 2018	**Method of Administration:** Intravenous infusion (30 minutes in duration)				
Vehicle/Formulation: 20 mM sodium phosphate, 135 mM sodium chloride, 20 mM L-histidine, 0.01% polysorbate 20, pH 6.0				**GLP Compliance:** Yes	
				Litters Culled/Not Culled: Not culled	
Special Features: Toxicokinetics Anti-Drug Antibody (ADA) Bioanalytical (β-glucuronidase activity)					
No Observed Adverse Effect Level: **F0 Females:** 2 mg/kg **F1 Males/F1 Females:** 20/12 mg/kg **F1 Litters:** 20/12 mg/kg					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DPH**	**2**	**6**	**20/12**
F0 Females (TK): β-glucuronidase activity					
GD 7	+	+	+	+	+
GD 19	+	+	+	+	+
LD 14	+	+	+	+	+

+ = confirmed

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Study Number: UX003-PC010**		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DHP**	**2**	**6**	**20/12**
F1 pups (TK): β-glucuronidase activity					
PPD 5	+	+	+	+	+
PPD 8	+	+	+	+	+
PPD 11	+	+	+	+	+
F0 Females (Main): ADA (confirmed positive)					
Predose, (%)	4%	0%	0%	4%	0%
GD 19, (%)[1]	4%	4%	100%	96%	72%
LD 14, (%)[1]	4%	8%	92%	88%	44%
F0 Females					
No. Pregnant	25	25	23	25	24
No. Died or Sacrificed Moribund (Main)	0	0	0	1	12[2]
No. Aborted of with Total Res. of Litter	0	0	0	0	0
Histopathology	-	-	-	-	[3]
Clinical Observations (N/N)					

- No noteworthy findings; + = confirmed; GD=Gestation day; LD = Lactation day; PPD = Day of Postpartum;
N/N = Total number of observations/number of rats with observation.

[1] All surviving UX003-treated animals had detectable antibodies on GD 19 and LD 14.
[2] UX003-related mortality was observed in main study. In the main study, 8 F0 generation females were found dead between GD 16 and LD 15 and 4 F0 generation females were euthanized between GD 17 and GD 19.
[3] Histopathology evaluation was performed on F0 generation females assigned to the 20/12 mg/kg dose group that was found death or euthanized due to adverse signs that had gross lesion findings noted at necropsy examination. Based on microscopic examination of the gross lesions retained from 7 of the 12 F0 generation females, pathology findings were considered rare and included adrenal hemorrhage, hepatocellular necrosis, tubular degeneration of the kidney with hemoglobin casts, interstitial edema of the pancreas and lymphoid hyperplasia of the mesenteric lymph nodes and spleen. As limited tissues were microscopically evaluated, the definitive cause of death of unscheduled euthanized females and relationship of pathology finding to UX003 administration was undetermined. Please see Pathology report for details.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Study Number: UX003-PC010**		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DHP**	**2**	**6**	**20/12**
Piloerection	-	-	17/14[4]	30/21[4]	31/23[4]
Decreased motor activity	-	-	-	-	3/3[4]
Pale extremities	-	-	-	-	3/3[4]
Ataxia	-	-	-	-	3/3[4]
Ptosis	-	-	-	-	3/3[4]
Prostrate	-	-	-	-	1/1[4]
Cold to touch	-	-	-	-	1/1[4]
Bradypnea	-	-	-	-	1/1[4]
Mild to moderate dehydration	-	-	-	-	3/2[4]
Red perivaginal substance	-	-	1/1[4]	1/1[4]	5/5[4]
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Gestation Body Weight (g,%[5]), GD 21	374.9	-1.1	-2.6	-2.7	-3.3
Gestation Body Weight Gains (g,%[5]) GD 7 to 21	139.5	-3.1	-7.7	-8.3	-8.8
Lactation Body Weight (g,%[5]), LD 21	307.5	-1.2	-1.1	+0.2	+0.1
Lactation Body Weight Gains (g,%[5]) LD 1 to 21	37.0	-10.3	-15.7	+1.1	+0.5
Gestation Food Consumption (g,%[5]) GD 7 to 18	24.1	-0.8	-1.2	-5.4	-5.8

No noteworthy findings; + = confirmed; GD=Gestation day; LD = Lactation day; PPD = Day of Postpartum;
N/N = Total number of observations/number of rats with observation

[4] UX003-related clinical signs.
[5] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Study Number: UX003-PC010**		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DHP**	**2**	**6**	**20/12**
Lactation Food Consumption (g,%[5]) LD 1 to 14	53.9	-8.3	-8.7	-13.7	-8.3
Mean Duration of Gestation (days)	22.4	22.5	22.3	22.5	22.4
Abnormal Parturition	-	-	-	-	-
F1 Litters (Preweaning)					
No. Litters Evaluated	25	25	23	24	14
Mean No. of Implantations	12.5	12.4	12.3	11.2	12.6
Mean No. Pups/Litter	11.6	10.8	11.3	10.4	11.6
Mean No. Liveborn Pups/Litter	11.6	10.8	11.0	10.2	11.6
No. of Litters with stillborn Pups	0	0	0.3[*,6]	0.2	0.1
Postnatal Survival to Day 4 (%)	99.3	97.8	97.2	92.6[**,6]	98.1
Postnatal Survival to Weaning (%)	100	98.5	100	99.6	100
No. of Total Litter Losses	0	0	0	0	0
Changes in Pup Body Weights PPD 21 (g, %)[5]	46.5	-5.2	-4.9	-4.9	-7.1[7]
Pup Sex Ratios	-	-	-	-	-
Pup Clinical Signs (N/N)	-	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations	-	-	-	-	-

- No noteworthy findings; GD=Gestation day; LD = Lactation day; PPD = Day of Postpartum; *-p<0.05, ** -p<0.01

[5] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

[6] These differences were considered unrelated to UX003 because they were not dose dependent

[7] Mean pup body weights were reduced in the 20/12 mg/kg dose group on each weighing day between Days 1 and 21 postpartum compared to the Group 1 controls (89% to 95% of Group 1 controls). However, each of the mean values were within the range observed historically at the Testing Facility.

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Study Number: UX003-PC010**		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DHP**	**2**	**6**	**20/12**
F_1 Males					
No Evaluated Postweaning	25	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	1	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Body Weight Change (g,%)[5] PPD 22 to 113	563.5	-2.0	-2.3	-2.2	-0.5
Food Consumption (g,%)[5] PPD 22 to 92	56.6	+1.4	+0.7	+1.4	+1.8
Preputial Separation	-	-	-	-	-
Passive Avoidance	-	-	-	-	-
M-Shaped Water Maze	-	-	-	-	-
Mean No. Days in Cohabitation	2.6	2.3	3.1	2.4	3.0
No. of Males that Mated	23	24	24	24	23
Fertility Index (%)	87%	91.7%	100%	91.7%	95.6%
Terminal body weights (g, %)[5]	638.4	-2.3	-2.6	-2.2	-4.2
Organ weights	-	-	-	-	-
F1 Females					
No Evaluated Postweaning	25	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Premating Body Weight Change (g,%)[5] PPD 22 to 29	239.9	-0.6	-2.2	+0.1	+1.7

- No noteworthy findings; PPD = Day of Postpartum

[5] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Study Number: UX003-PC010**		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DHP**	**2**	**6**	**20/12**
Gestation Body Weight Change (g,%)[5] GD 0 to 13	67.5	-7.4	-10.8	-2.5	-2.2
Premating Food Consumption (g,%)[5] PPD 22 to 92	37.7	0	-0.3	-1.1	-1.6
Gestation Food Consumption (g,%)[5] GD 0 to 13	24.9	+0.4	-4.4	+2.8	+2.0
Vaginal Patency (days)	-	-	-	-	-
Passive Avoidance	-	-	-	-	-
M-Shaped Water Maze	-	-	-	-	-
Mean No. Days in Cohabitation	2.8	2.4	3.4	2.7	3.5
No. of Females that Mated	24	25	24	25	23
Fertility Index (%)	83.3%	92%	100%	92%	95.6%
No. of Pregnant Females	20	23	24	23	22
Mean No. Corpora Lutea	16.6	16.5	16.7	17.2	16.9
Mean No. Implantations	15.5	14.6	15.0	15.7	14.9
Mean % Preimplantation Loss	6.2	11.0	10.4	7.9	11.6
Terminal body weights (g, %)[5]	358.4	-0.9	-1.8	+0.8	-0.7
Organ weights	-	-	-	-	-

- No noteworthy findings; + = confirmed; GD=Gestation day; PPD = Day of Postpartum;
N/N = Total number of observations/number of rats with observation.

[5] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Study Number: UX003-PC010**		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0/DHP**	**2**	**6**	**20/12**
F_2 Litters					
Mean No. Live Conceptuses/Litter	14.4	13.6	13.9	15.1	13.9
No. of Litter with Dead Conceptuses	11	11	18	11	16
No. Dead Conceptuses	1.0	1.0	1.1	0.6	1.0
Mean % Post-implantation Loss	6.8	6.6	7.5	3.8	9.0

2.6.7.15 Studies in Juvenile Animals

Study UX003-PC003 was conducted in juvenile cynomolgus monkeys and is described in Table 2.6.7.7.2.

2.6.7.16 Local Tolerance

No dedicated nonclinical local tolerance studies for UX003 were conducted. However, no gross or histopathological abnormalities attributed to UX003 were observed at the IV infusion sites in the single dose rat toxicity study or the 26-week repeat-dose toxicity study in juvenile cynomolgus monkeys (UX003-PC002 and UX003-PC003, respectively). In single dose rat study (UX003-PC002), minimal or mild, chronic inflammation, endothelial hyperplasia, and/or thrombosis were observed at the administration site (jugular vein) of some control and UX003-dosed animals. These changes were attributed to the presence of the indwelling jugular catheter.

2.6.7.17 Other Toxicity Studies

No other toxicity studies have been conducted.

2.6.7.18 List of References

Vogler, C, Levy, B, Grubb, JH, Galvin, N, Tan, Y, Kakkis, E, Pavloff, N, and Sly, WS. 2005. "Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (41):14777-82.