TABLE OF CONTENTS

本項で使用する用語・略語 2
1. まとめ 3
2. 単回投与毒性試験 3
2.1. マウス，モルモットおよびラットを用いた単回投与によるロットリリース試験 3
3. 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 4
3.1. サルを用いた用量漸増によるロットリリース試験 4
3.2. サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（GLP 適用） 5
4. 遺伝毒性試験（GLP 適用試験） 8
5. がん原性試験 8
6. 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 9
6.1. 雄性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験） 9
6.2. 雌性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験） 10
6.3. ラットを用いた探索的胚・胎児発生毒性試験 10
6.4. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定）（GLP 適用試験） 11
6.5. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（GLP 適用試験） 12
6.6. 出生前および出生後の発生に関する試験 12
7. 局所刺激性試験 13
8. その他の毒性試験 13
8.1. 免疫毒性試験 13
8.2. *不純物B 13
8.3. hATG の交差反応性試験 14
9. 考察及び結論 14
10. 図表 16
参考文献 16

＊新薬承認情報提供時に置き換え

本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
ADA	Anti drug antibody：抗薬物抗体
AUC_{24}	Area under the plasma concentration-time curve from zero to infinity： 0 時間から投与後 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hATG	Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine)：抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン
ICH	International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
hIgG	Equine immunoglobulin G：ウマ免疫グロブリン G
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリン G
NOAEL	no-observed-adverse-effect level：無毒性量
$t_{½}$	Terminal phase half-life：消失半減期
TTC	Threshold of toxicologic concern：毒性学的懸念の閾値

1. まとめ

抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン（以下，hATG）は，旧米国アップジョン社（現ファイザー社）により開発された免疫抑制剤で，米国では 1981 年に承認され，再生不良性貧血および腎移植拒絶反応の治療に用いられている。hATG はヒト胸腺リンパ球で免疫されたウマの過免疫血清を精製，濃縮，滅菌して得られた主に単量体免疫グロブリン G（IgG）からなるガンマグロブリンであり，非臨床試験結果から強力な T 細胞抑制作用を有すると考えられている。

hATG の非臨床試験結果は，米国における長年のヒトにおける使用経験を補足するものである。hATG は霊長類のリンパ球と最も高い交差反応性を示した（M2.6.6.8.3）ことから，非臨床安全性評価のための非げっ歯類としてサルを選択した。hATG の毒性プロファイルを明らかにするために，サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験および 28 日間の回復性試験により hATG の一般毒性を評価した。また，サルを用いた雌雄受胎能試験ならびにラットおよびサルを用いた胚・胎児発生に関する試験により hATG の生殖発生毒性を評価した。重要な反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験では被験物質として 0.01%チメロサール（防腐剤）を含む hATG を，プラセボ対照として正常ウマ IgG を用い，投与経路は，臨床適用経路である静脈内投与とし，米国食品医薬品局（FDA）および本国厚生労働省の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って試験を実施した。なお，hATG の非臨床試験は，現在の規制「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」[1]の施行前に実施されているが，試験結果から hATG の毒性プロファイルが特定され，ヒトへの注意喚起に必要な情報は得られていると考える。

2. 単回投与毒性試験

2.1. マウス，モルモットおよびラットを用いた単回投与によるロットリリース試験

概要表 2.6.7.5

hATG についての標準的な単回投与毒性試験は実施していない。しかしながら，hATG の単回投与時の安全性については，げっ歯類（マウス，モルモットおよびラット）を用い，市場への出荷前に実施されるロットリリース試験で評価した[a,b]。マウスまたはモルモットを用いた試験では，マウス 2 匹およびモルモット 2 匹に，それぞれ 25 mg および 250 mg の hATG を腹腔内投与し，安全性を評価した。hATG の投与後 7 日間までに両種の動物において死亡，体重減少，またはその他の毒性所見が認められなかった場合，その hATG ロットは良好であると判断された。ラットを用いた試験では，雄ラットに hATG を 5 mg または 50 mg の用量で単回静脈内投与し，投与 18 時間後に安楽殺した。腎臓について糸球体基底膜における抗 IgG 抗体の沈着を免疫組織学的に確認し，抗体沈着が認められた場合には不適合ロットとして除外した。

---

[a] Wilson AB. ATGAM Expert Report on Toxicological and Pharmacological Documentation. 19[redacted]（参考文献 4.3.1）

[b] Part III Toxicological and Pharmacological Documentation（参考文献 4.3.2）

1 回の試験で基準を満たさなかった場合，2 回まで繰り返し，必要に応じて追加の試験を実施した。一部の例では，基準を満たさなかったロットを再精製し，再度試験を実施した。再試験の後，再び基準を満たさなかった場合，そのロットを除外した。現在までの数十年間において，これらの安全性評価で基準を満たさなかったロットは，ラットで評価した 69 ロット中 2 ロットのみであったことから，hATG の急性毒性は低いことが示唆された。

3. 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

3.1. サルを用いた用量漸増によるロットリリース試験

報告書番号 7227-[redacted]-006, 7227-[redacted]-046, 7244/[redacted]/7263/005, 7244/[redacted]/7263/010, 概要表 2.6.7.6

hATG の反復投与時の安全性については，各ロットについて実施したサルのロットリリース試験（非 GLP 適用）において評価した。ロットリリース試験は，19[redacted] 年以前はアカゲザルを用いた用量漸増試験として実施し（報告書番号 7244/[redacted]/7263/005, 7244/[redacted]/7263/010），19[redacted] 年以降カニクイザルを用いた単一用量での試験に変更した（報告書番号 7227-[redacted]-006, 7227-[redacted]-046）。アカゲザルを用いた試験では，サル 2 匹に試験 1，3 および 5 日にそれぞれ 100，200 および 400 mg/kg の hATG を 3～5 時間（50 mL/3 kg，0.191 mL/分）かけて静脈内投与した。また溶媒対照群として，別の 2 匹のサルに 0.5 mol/L 生理食塩水を静脈内投与した。初回投与後 24 または 25 日に剖検に供した。一般状態観察（体温を含む），血液学的検査，血液生化学検査，器官重量測定，剖検および病理組織学的検査を実施した。カニクイザルを用いた試験では，サル 2 匹に試験 1，3，5 および 8 日に溶媒対照（0.45%生理食塩水）または hATG 50 mg/kg を約 1 時間かけて静脈内投与した。最終投与の 3 週間後に剖検に供した。一般状態観察，血液学的検査，血液生化学検査，剖検および病理組織学的検査を実施した。

アカゲザルを用いた試験とカニクイザルを用いた試験では，同様の結果が得られた。hATG の忍容性は概して良好で，ほとんどの動物で体重の維持または増加が認められた。初回投与後 24 時間以内の体温上昇もまれではなかった。血液生化学検査パラメータに変化は認められなかった。投与に関連した所見は，ほとんどが hATG の薬理作用から想定されたものであった。すべての用量において，リンパ球数の可逆的な減少が認められた。白血球数および好中球数は 24 時間以内に増加し，一過性の血小板数減少が散見された。胸腺重量の減少が認められ，病理組織学的検査でみられた胸腺萎縮との関連が考えられた。脾臓重量は増加し，脾臓およびリンパ節の胸腺依存性領域において，リンパ球数の減少が認められた。赤血球パラメータ（赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値）の減少，網状赤血球数増加，有核赤血球数増加など，様々な程度の貧血が認められた。一部の動物で，貧血が原因の死亡が認められた。対照群および hATG 投与群のいずれにおいても，投与部位（伏在静脈と大腿静脈）に沿って血栓形成が頻発したが，hATG 投与群ではその頻度がやや高かった。

3.2. サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）（GLP 適用）

報告書番号 7227-[redacted]-035，概要表 2.6.7.7

カニクイザル（雌雄各 6 匹/群）に，hATG を 0（溶媒対照：0.45%塩化ナトリウム），20，40 および 80 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 14 日間反復静脈内投与した（報告書番号 7227-[redacted]-035）。これらの投与量は臨床用量と比較してそれぞれ 1，2 および 4 倍の用量である。プラセボ対照として 80 mg/kg/日のウマ IgG を投与した。すべての群において，投与容量は 3.2 mL/kg，投与速度は 0.8 mL/分で静脈内投与した。試験 15 日に雌雄各 3 匹/群を剖検に供した。残る雌雄各 3 匹/群については 28 日間の休薬期間を設けて回復性を評価した。

一般状態観察（初回投与時は投与前および投与後 1，2，6 および 24 時間，以降 1 日 2 回），体温測定（試験 1 日の投与前および投与後 1，2，6 および 24 時間，試験 5，8，14 日の投与前，ならびに試験 21，28，35 および 43 日），体重測定（試験 1，7，14，21，28，35，42 日および解剖前），餌残量の確認（1 日 1 回），臨床病理検査（血液学的検査，血液生化学検査，血液凝固検査および尿検査：試験 2，8，14，21，28，35 および 42 日，試験 2 および 35 日は血液学的検査のみ実施），心血管系パラメータ（心電図，血圧，心拍数：試験 1，5，15 および 43 日）および呼吸数（試験 1，5，15 および 43 日）の測定，ならびに眼科検査（投与期間の第 2 週および休薬期間の最終週）を行った。また，試験 1 日の投与前および投与後 1，2，6，12 および 24 時間ならびに試験 5，8，11，15，18，21，28，35 および 42 日の投与前に採血し，血清中 hATG またはウマ IgG 濃度ならびに抗薬物抗体（ADA）を測定した。投与期間および休薬期間終了時に剖検を行い，器官重量測定および病理組織学的検査を行った。腎臓については電子顕微鏡による超微細構造の観察も実施した。また，脾臓および腎臓についてウマ IgG，サル IgG および補体の免疫組織学的評価を実施した。

80 mg/kg/日で雌各 1 例が死亡または安楽殺となった。雌 1 例が，投与初日の投与終了直後に死亡した。死亡前の一般状態観察では中等度の運動量低下および中等度の歯肉の蒼白がみられた。病理組織学的検査の結果，左心室，心室中隔の心内膜および心筋におけるうっ血および出血ならびに多巣性間質性肺胞炎がみられ，これらは剖検時にみられた左心室内の暗色領域および肺葉の暗部領域の所見とそれぞれ一致した。これらの一般状態および剖検時の所見は，アナフィラキシー様症状の特徴と一致していた。その後，別の動物に置き換えて試験を続行し，置き換えた個体は試験最終日まで生存した。雌 80 mg/kg/日のもう 1 例は，運動量低下，歯肉または全身の蒼白，脱力，赤血球パラメータ減少，頻脈，努力性呼吸が最大 3 日間にわたり認められたため，試験 8 日に安楽殺した。この動物の死因は重度の貧血によるものと考えられた。後述した追加の in vitro 試験結果から，hATG がサル赤血球の表面抗原へ結合し，その後，産生されたサル抗ウマ IgG 抗体により，hATG が結合したサル赤血球が破壊されるために，サル赤血球数が減少することが示唆された。それらの抗原はヒト赤血球には発現していないことから，サルで認められた赤血球数減少はヒトに外挿される安全性上のリスクではないと考えられた。

生存例では hATG 投与に関連する一般状態の変化として，80 mg/kg/日で運動量低下ならびに歯肉または全身の蒼白が散見され，40 mg/kg/日の雌の 1 例でも軽度の歯肉または全身の蒼白がみられるなど，貧血の症状に一致する所見が認められた。体重，定性的摂餌量，体温，眼科検査，血液凝固検査，心血管パラメータ（心電図，血圧，心拍数）および呼吸数に hATG 投与に関連した変化は認められなかった。

血液学的検査では，すべての hATG 投与群で赤血球パラメータ（赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値）の用量依存的な減少がみられた。試験 2 日において溶媒対照群と比較して雌のプラセボ対照群および雌のすべての hATG 投与群でヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の軽度の減少が認められた。試験 8 日では雌雄 40 mg/kg/日以上において赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値が溶媒およびプラセボ対照群と比較して減少した（雌 40 mg/kg/日のヘモグロビン濃度のみプラセボ対照群との比較で有意な減少を示さなかった）。試験 14 日では，hATG の 20 mg/kg/日以上で赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少がみられ，その程度は試験期間をとおして最大となり，用量制限毒性と考えられた。また，試験 14 日では雄 20 mg/kg/日以上および雌 40 mg/kg/日以上で網状赤血球数の増加，雄 80 mg/kg/日および雌 40 mg/kg/日以上で平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）および平均赤血球容積（MCV）の増加が認められ，赤血球パラメータの減少による再生応答の変化と考えられた。赤血球パラメータの減少について試験 21 日より回復性が認められ，試験 42 日ではおおむね回復した。また，試験 8 日には，40 mg/kg/日以上で用量依存的なリンパ球数減少が時に好中球数増加を伴って認められたが，試験 14 日には概ね溶媒対照群と同等の値に回復した。このリンパ球の減少は hATG の薬理学的作用の 1 つと考えられた。

血液生化学検査において, 試験 8 日に雄 80 mg/kg/日でトリグリセリドの増加が認められたが試験 14 日では増加はみられなかった。また，雄 20 mg/kg/日以上および雌 40 mg/kg 以上でアルブミンの低下，雌 20 mg/kg/日以上でグロブリンの増加ならびに雌雄 40 mg/kg/日以上で総ビリルビンの増加が認められた。試験 14 日にも雄 40 mg/kg/日以上および雌 40 mg/kg/日でアルブミンの低下，雄 40 mg/kg/日以上でグロブリンの増加がみられたが, 総ビリルビンは溶媒対照群と比較して高値を示したものの有意差はなかった。また尿検査の結果，試験 8 日および 14 日に雌雄 20 mg/kg/日以上でウロビリノーゲンの増加が認められ，試験 2 日および 14 日に雄 80 mg/kg/日で電解質の低下が認められた。血液生化学検査および尿検査でみられたこれらの変化は軽度で毒性学的意義の乏しい変化と考えられ，これらの変化には回復性がみられた。

40 mg/kg/日以上で脾臓重量の増加（最大 171%，比体重値）が認められ，病理組織学的検査より赤脾髄における細胞密度上昇またはうっ血がその一因と考えられた。hATG 投与に関連した剖検所見は認められなかった。病理組織学的検査では，80 mg/kg/日で白脾髄，主に T 細胞領域における細胞密度低下（雄 1/3 例および雌 2/2 例）がみられた。この変化は hATG の抗リンパ球に関する薬理学的作用の 1 つと考えられた。赤脾髄における細胞密度上昇がプラセボ対照群の雄の 2/3 例，20 mg/kg/日の雌雄各 2/3 例，40 mg/kg/日の雄 1/3 例および雌 2/3 例，80 mg/kg/日の雄 3/3 例でみられ，骨髄における赤芽球骨髄球の過形成が溶媒対照群の雄の 1/3 例，プラセボ対照群の雄 2/3 例および雌 1/3 例, 20 mg/kg/日の雌雄各 3/3 例, 40 mg/kg/日の雄 3/3 例および雌 2/3 例, 80 mg/kg/日の雄 2/3 例および雌 2/2 例でみられた。40 mg/kg/日以上で肝臓（40 mg/kg/日の雌 2/3 例, 80 mg/kg/日の雄 2/3 例および雌 2/2 例）および下顎リンパ節（40 mg/kg/日の雌 2/3 例，80 mg/kg/日の雄 1/3 例および雌 2/2 例）における髄外造血が認められた。これらの変化は赤血球数減少に対する応答反応に関連する変化と考えられた。また，溶媒対照群（1/6 例，雌雄の合計，以下同様），プラセボ対照群（3/6 例）および hATG 投与群（20, 40 および 80 mg/kg/日でそれぞれ 2/6，3/6 および 3/5 例）において脾臓の胚中心に球状から線維状の好酸性物質がみられた。すべての病理組織学的所見は軽度であり，回復性も認められた。

溶媒対照（雌雄各 2 例），プラセボ対照（雄 2 例および雌 3 例），20 mg/kg/日（雌 3 例），40 mg/kg/日（雄 1 例），80 mg/kg/日（雄 3 例および雌 2 例）について腎臓における糸球体領域の毛細血管

基底膜および関連する細胞の超微細構造について透過電子顕微鏡検査を実施した。糸球体損傷に典型的な糸球体毛細血管壁（上皮下，内皮または内透明板）への免疫複合体沈着の所見はみられなかった。

ウマ IgG，サル IgG および補体の分布を検討するため腎臓の凍結切片を免疫染色したところ，微細な顆粒状沈着物および粗状の顆粒状沈着物が糸球体に認められた。微細な顆粒状沈着物は hATG 投与群のみでみられ，抗ウマ IgG や補体によるものではなく，糸球体基底膜の染色動態は典型的な線条ではなかった。粗状の顆粒状沈着物はプラセボ対照および hATG 投与群でみられ，ウマ IgG 投与により生成した補体結合抗ウマ免疫複合体と考えられた。これらの糸球体沈着物は，腎臓に関連する血液生化学検査，尿検査，病理組織学的および超微細構造に変化は認められなかったことから毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

病理組織学的検査で脾臓に認められた好酸性物質の特徴をより詳細に調べるため，脾臓の凍結切片を用いて免疫染色を行った。免疫染色の結果からは，断定まではできないものの，好酸性物質はウマ IgG，サル IgG および補体から形成されていることが示唆された。さらに，濾胞 B 細胞によって産生される抗ウマ抗体は，ウマ IgG との免疫沈降反応とそれに続く補体結合を引き起こす可能性が考えられた。これらの所見は外来タンパク質抗原に対する正常反応と考えられ，毒性学的意義の乏しい変化であると考えられた。

試験 1 日における AUC_{24} は概ね用量に比例して増加した（M2.6.4.8.1）。各採血日の投与直前における血清中 hATG 濃度は，試験 11 日まで用量依存的に維持されたが，その後，20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日において顕著な血清中濃度の低下が認められた。しかしながら，80 mg/kg/日では投与直前における血清中濃度の低下はみられなかった。一方，対照群および 80 mg/kg/日の雄 1 例を除き，全ての動物で ADA 産生が認められ，ほとんどの動物で試験 11 日までに ADA が確認された。20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日の ADA 濃度は，80 mg/kg/日よりも高く，20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日で試験 11 日以降に認められた血清中 hATG 濃度低下の原因であると考えられた。サル血清中での hATG の $t_{½}$は 2.6 日から 4.8 日で，ヒトの $t_{½}$（5.7 日）（M2.7.2.2.2.3）とおおむね一致した。

以上より，hATG をサルに 14 日間反復静脈内投与したときの無毒性量（NOAEL）は 20 mg/kg/日と考えられた。

なお，サルにおける赤血球数減少および貧血の発現機序を調べるために，探索的な in vitro 試験を実施した。可能性が考えられた次の 3 つの機序，すなわち，1）hATG のサル赤血球に対する直接的な結合，2）抗ウマ IgG 抗体の形成，または 3）サルの赤血球に対する自己免疫機構について検討した。

1）hATG のサルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験においてプラセボ対照として用いたウマ IgG のヒト赤血球およびサル赤血球への結合をフローサイトメトリー法で評価した。hATG またはウマ IgG をヒトまたはサル赤血球とインキュベートし，その後，蛍光標識した抗ウマ IgG 抗体とインキュベートした後，フローサイトメトリー法で蛍光を測定することで結合を評価した。その結果，ヒト赤血球に対して hATG およびウマ IgG の結合はわずかであった。一方，サル赤血球に対してウマ IgG の結合はわずかであったものの，hATG は強く結合することが示された。しかしながら，

サルに対する hATG の単回投与で，赤血球数の減少は認められなかったことから，サルの赤血球数減少の原因を赤血球への hATG の結合のみで説明するには根拠不十分と考えられた。

2）hATG と結合したサル赤血球に対するサル抗ウマ IgG 抗体の産生をフローサイトメトリー法で評価した。サル赤血球を hATG またはウマ IgG とインキュベートし，その後，サル 14 日間反復投与毒性試験の試験 15 日および 42 日における溶媒対照，ウマ IgG および hATG を投与したサルから得られた血清とインキュベートした。さらに，蛍光標識したヤギ抗サル IgG を加えてインキュベートし，フローサイトメトリー法で hATG と結合したサル赤血球に対するサル抗ウマ IgG 抗体の産生を評価した。その結果，ウマ IgG および hATG を投与したサル血清とインキュベートしたサンプルで蛍光を検出したことから，hATG で被覆されたサル赤血球に産生したサル抗ウマ IgG 抗体が結合すると考えられた。また，hATG およびウマ IgG に対する ADA が多く存在する試験 15 日の血清サンプルでより強い結合がみられた。さらに，蛍光標識したヤギ抗サル IgG 抗体に代わりに蛍光標識したヤギ抗サル IgM 抗体またはウサギ抗ヒト C3C 補体抗体を用いた検討では結合はみられなかった。hATG の製造に用いるウマ血漿は，サルとヒトの赤血球に対する抗体を含有している。製造過程において，ヒト赤血球に結合する抗体は除去されるが，サル赤血球に結合する抗体は除去されずに残存する。hATG 投与後にサルで誘発されたサル抗ウマ IgG 抗体は，hATG で被覆されたサル赤血球に結合し，赤血球を除去する可能性がある。

3）サルの赤血球に対する自己抗体産生についてフローサイトメトリー法を用いて検討した。未処置のサル赤血球に試験 15 日または試験 42 日の血清を添加，インキュベートしたものの，抗サル IgM 抗体または抗サル IgG 抗体との結合はみられなかった。

これらの結果から，サル赤血球上には hATG で認識される表面抗原（ヒト赤血球上に発現していない）が発現しており，hATG に被覆されたサル赤血球にサル抗ウマ IgG 抗体 が結合することにより，赤血球が除去されることが示唆された。hATG はヒト赤血球に結合しないことから，サルで認められた赤血球数減少およびそれに伴う貧血所見は，ヒトに外挿されない変化であると考えられた。

4. 遺伝毒性試験（GLP 適用試験）

報告書番号 7228-[redacted]-058，7228-[redacted]-097，7228-[redacted]-056，概要表 2.6.7.8A，2.6.7.8B，2.6.7.8C

hATG が遺伝毒性を誘発する可能性について，細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験；報告書番号 7228-[redacted]-058）ならびにチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（報告書番号 7228-[redacted]-097）およびヒト末梢血リンパ球を用いた in vitro 染色体異常試験（報告書番号 7228-[redacted]-056）を実施した。hATG に遺伝毒性は認められなかった。

5. がん原性試験

hATG を用いたがん原性試験は実施していない。これは ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[1] に記載されたがん原性試験実施に対する考え方と一致している。さらに，ICH S1A ガイドライン「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」[2]では，臨床での使用期間が連続して 6 ヵ月未満の場合には，がん原性試験は原則要求されない。hATG の臨床における投与期間は最長 4 日間であり，この点も hATG のがん原性試験を実施しないことと合致する。

6. 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

6.1. 雄性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験）

報告書番号 1470-[redacted]-025，概要表 2.6.7.12A

カニクイザル（雄 5 匹/群：5〜9 歳齢）に，hATG を 0（プラセボ対照：ウマ IgG 40 mg/kg/日），10，20 および 40 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 14 日間反復静脈内投与し，雄受胎能に対する影響を評価した。すべての群において，投与容量は 3.2 mL/kg，投与速度は 0.8 mL/分で静脈内投与した。本試験の最高用量はサル 14 日間反復投与毒性試験において，死亡がみられなかった最高用量である 40 mg/kg/日とした（M2.6.6.3.2）。用量-反応関係を明らかにするために hATG の投与量を 10，20 および 40 mg/kg/日とした。サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験（28 日間回復性試験を含む）で hATG に対する ADA が認められたことから，投与期間は 14 日間とした。雄では，一般状態観察（1 日 2 回），体重測定（週 1 回），餌残量の確認（1 日 1 回），精子検査（第 2 週に 1 回：精液の色，精液量，凝固部分重量，精子数，運動性，生存率および形態）および血清中テストステロン濃度測定（投与期間中 2 回）を実施した。投与期間終了後，雄はそれぞれ未処置の雌 2 匹（正常な月経周期を示す 3 歳以上の雌）と 5 日間同居させた。雌の妊娠が確認された後，雄については剖検および器官重量測定（精巣，精巣上体，前立腺，精嚢および下垂体）を実施した。雌では，一般状態観察（1 日 1 回），体重（妊娠 0，20，30，40，50，60，70 および 80 日）および餌残量の確認（1 日 1 回）を行い，妊娠 80〜82 日に帝王切開し，胎児パラメータ（生存数，性別，体重，胎盤の重量測定ならびに外表，内臓および骨格検査）を評価した。

雄で死亡例は認められなかった。hATG 投与に関連した一般状態の変化は 40 mg/kg/日のみでみられ，口腔粘膜の蒼白（2 例：投与期間中および投与期間終了後），鎮静（1 例：投与期間終了後）および運動量低下（1 例：投与期間終了後）が認められた。また，40 mg/kg/日で投与期間中に一過性の体重減少ならびに投与期間中および投与終了後の初期に摂餌量の低下がみられた。一般状態，体重および摂餌量の変化は剖検までには回復した。また，hATG 投与に関連した精子検査および血清中テストステロン濃度の変化は認められなかった。交尾率は全群で 100%であり，交尾行動に異常は認められなかった。雄の受胎率はプラセボ対照，10，20 および 40 mg/kg/日でそれぞれ 80%，40%，60%および 80%であった。雄では，剖検所見および器官重量の変化は認められなかった。

妊娠した雌において hATG 投与に関連した毒性変化は認められなかった。胎児死亡は認められず，hATG 投与に関連した胎児パラメータの変化も認められなかった。40 mg/kg/日で一般状態，体重減少および摂餌量の低下が認められたことから雄の一般毒性に関する NOAEL は 20 mg/kg/日であり，雄の受胎能および交尾行動に関する NOAEL は 40 mg/kg/日であった。

6.2. 雌性サルを用いた受胎能試験（GLP 適用試験）

報告書番号 1470-[redacted]-024，概要表 2.6.7.12B

カニクイザル（雌 5 匹/群：3～8 歳齢）に，hATG を 0（プラセボ対照：ウマ IgG 40 mg/kg/日），10，20 および 40 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 14 日間（予測排卵日を挟んで前後 7 日間）反復静脈内投与し，月経周期，交尾行動，受胎能および胚発生に対する影響を評価した。すべての群において，投与容量は 3.2 mL/kg，投与速度は 0.8 mL/分で静脈内投与した。本試験の最高用量はサルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験において，死亡がみられなかった最高用量である 40 mg/kg/日とした（M2.6.6.3.2）。用量-反応関係を明らかにするために hATG の投与量を 10，20 および 40 mg/kg/日とした。サル 14 日間反復投与毒性試験で hATG に対する ADA が認められたことから，投与期間は 14 日間とした。雌では，一般状態観察（投与期間：1 日 2 回，投与期間以外：1 日 1 回），体重測定（妊娠前：週 1 回，妊娠期間：妊娠 0，7，14，21，30，40，50，60，70 および 80 日），餌残量の確認（1 日 1 回），月経周期（妊娠が確認されるまで 1 日 1 回）ならびに血清中プロゲステロン，17β-エストラジオールおよびプロラクチン濃度測定（投与開始前，投与期間および投与期間終了後）を実施した。妊娠観察（妊娠 30，40，50，60 および 70 日）を実施した。投与期間終了後，雌を未処置雄（受胎能が正常な 5 歳以上の雄）と 5 日間同居させ，妊娠しなかった場合には，再度同居させた。妊娠は超音波検査で確認し，妊娠 80～82 日に帝王切開し，胎児パラメータ （生存率，性別，体重，器官重量，胎盤の重量測定ならびに外表，内臓および骨格検査）を評価した。

40 mg/kg/日の雌の 1 例が投与終了から 11 日後に死亡した。この個体は口腔粘膜の蒼白，運動量低下および鎮静が認められ，サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験において貧血により死亡した個体で認められた一般状態変化と一致していた。この個体では，削痩および脱水がみられ，剖検では脳，心臓，肺，肝臓，脾臓および腎臓の蒼白が認められた。20 mg/kg/日および 40 mg/kg/日の生存例のそれぞれ 2 例で口腔粘膜の蒼白および活動性低下が投与開始後 7 日から投与終了後 18 日まで認められた。20 mg/kg/日の 1 例および 40 mg/kg/日の 2 例で体重減少が投与期間中および投与期間終了後の早期に認められたものの，2 回目の交配期間終了時（投与終了後 8～12 週間）までに回復した。40 mg/kg/日の 1 例で一過性の摂餌量低下が認められた。月経周期ならびに血清中プロゲステロン，17β-エストラジオールおよびプロラクチン濃度に hATG 投与に関連する変化は認められなかった。交尾率は全群で 100%であり，交尾行動に異常は認められなかった。雌の受胎率は，プラセボ対照群，hATG の 10，20 および 40 mg/kg/日でそれぞれ 60%，60%，20%および 40%であり，hATG 投与群と対照群の間に統計学的な有意差は認められなかった。母動物の黄体数や胎児パラメータに hATG 投与に関連した変化は認められなかった。

以上，20 mg/kg/日で一般状態および体重の変化がみられたことから，母動物の一般毒性に関する NOAEL は 10 mg/kg/日であり，受胎能および初期胚発生に関する NOAEL は 40 mg/kg/日であった。

6.3. ラットを用いた探索的胚・胎児発生毒性試験

報告書番号 1470-[redacted]-003，概要表 2.6.7.13A

妊娠した Sprague-Dawley ラット（雌 13 匹/群）に，hATG を 0（溶媒対照：0.9%塩化ナトリウム），25，50 および 100 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から 17 日まで 1 日 1 回反復静脈内投与し，母動物

および胚・胎児発生に対する影響を評価した。プラセボ対照として，hIgG（100 mg/kg/日）を投与した。投与容量は 2 mL/kg とした。本試験の用量は予備的検討の結果に基づいて設定した。母動物について一般状態観察（1 日 1 回以上），体重測定（妊娠 0，7 および 20 日），摂餌量（1 日 1 回：妊娠 7 日から 19 日まで）を行い，妊娠 20 日に剖検後，妊娠子宮重量および器官重量を測定した。胎児について生存胎児数，胎児の性別判定，胎児体重，胎盤重量ならびに胎児の外表，内臓および骨格検査を行った。

いずれの用量においても死亡はみられず，一般状態変化，母動物の体重および摂餌量に hATG 投与に関連した変化はみられなかった。黄体数，着床数，着床率，生存胎児数，死亡胎児数，早期・後期吸収胚数，流産した母動物数に変化はみられなかった。また，性別，胎児体重および胎盤重量にも変化はみられなかった。胎児の外表，内臓および骨格に hATG 投与に関連した催奇形性はみられなかった。100 mg/kg/日では，胎児に骨格変異である頸椎椎弓の低形成の増加が認められた。

骨格変異を評価する最適の本評価法において，母動物の一般毒性および生殖毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg/日，胎児発達に関する NOAEL は骨格への影響（変異）を考慮し 50 mg/kg/日と考えられた。また，器官形成期における hATG の投与において 100 mg/kg/日まで催奇形性を示さなかった。

hATG 投与に関連する頸椎椎弓の低形成は可逆的な化骨遅延と考えらえる発生学的変異であり，動物の健康状態，生存および身体的発育に影響は及ぼさないことから，正常からの逸脱はごく軽微と考えられる[3]。以上より，100 mg/kg/日は動物の健康状態，生存および身体的発育に関する骨格への悪影響を示さない用量と考えられた。

6.4. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定）（GLP 適用試験）

報告書番号 1470-[redacted]-022，概要表 2.6.7.11

本試験はサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（M2.6.6.6.5）における用量を設定するために実施した。妊娠したカニクイザル（雌 3 匹/群：4～6 歳齢）に，hATG を 10，20 および 40 mg/kg/日の用量で妊娠 20 日から 35 日まで 1 日 1 回反復静脈内投与し，妊娠維持および胚・胎児発生に対する影響を評価した。投与容量は 3.2 mL/kg，投与速度は 0.8 mL/分とした。母動物について一般状態観察（1 日 1 回以上），体重測定（妊娠 0，20，27，36，40，50，60，70 および 80 日），定性的摂餌量を行い，妊娠 80 または 81 日に帝王切開した。胎児について生存胎児数，胎児の性別判定，胎児体重，外表検査および胎盤重量測定を行った。

すべての投与群において母動物の死亡はみられなかった。いずれの用量においても軽度の体重減少がみられたものの，背景データの範囲であった。40 mg/kg/日の 1 例で流産が，40 mg/kg/日の 2 例および 20 mg/kg/日の 1 例で胎児死亡が認められた。この胎児死亡は，M2.6.6.6.3.2 で述べたように，サル赤血球抗原に対する抗ウマ IgG 抗体の作用に伴う母動物の貧血に起因するものであり，ヒト胎児への外挿性は低いものと考えられた。生存胎児数は 10 mg/kg/日で 3 例（雄 2 例，雌 1 例），20 mg/kg/日で 2 例（雄 2 例）で，胎児体重，形態または胎盤重量について hATG 投与に関連する変化はみられなかった。生存または死亡胎児に催奇形性はみられなかった。

6.5. サルを用いた胚・胎児発生毒性試験（GLP 適用試験）

報告書番号 1470-[redacted]-023，概要表 2.6.7.13B

妊娠したカニクイザル（雌 5 匹/群：3～7 歳齢 ）に，hATG を 0（プラセボ対照：ウマ IgG　20 mg/kg/日），5，10 および 20 mg/kg/日の用量で妊娠 20 日～妊娠 35 日（器官形成期前半）に，加えて 20 mg/kg/日を妊娠 35 日～妊娠 50 日（器官形成期後半）に，1 日 1 回反復静脈内投与し，胚・胎児発生に対する影響を評価した。M2.6.6.6.4 のサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定）において，20 mg/kg/日の 1/3 例および 40 mg/kg/日の 3/3 例（1 例は流産）で胎児死亡がみられたことから，本試験では 20 mg/kg/日を最高用量として設定した。母動物について一般状態観察（1 日 1 回以上），体重測定（妊娠 0，20，27，34，41，51，60，70，80，90 および 100 日），餌残量の確認（1 日 1 回）を行い，妊娠 100 日～妊娠 102 日に帝王切開した。母動物では子宮の左右における黄体数を測定した。胎児について，生存胎児数，胎児の性別判定，胎児体重，胎盤重量ならびに胎児の外表，内臓および骨格検査を行った。

母動物の死亡はみられなかった。器官形成期前半の妊娠 20 日から妊娠 35 日まで 20 mg/kg/日を投与した母動物の 1 例で流産，2 例で胎児死亡が，妊娠 35 日～妊娠 60 日に認められた。5 mg/kg/日および 10 mg/kg/日でそれぞれ胎児 1 例に死亡がみられたが，この発現頻度は試験実施期間における背景データと同様であったため，hATG 投与に関連しない偶発的なものと考えられた。一方，20 mg/kg/日での胎児死亡は，用量設定試験（M2.6.6.6.4）の 20 mg/kg/日の母動物において貧血がみられていることから，母動物の貧血に起因するものと考えられた。M2.6.6.3.2 で述べたように，母動物での貧血はサル赤血球抗原に対する抗ウマ IgG 抗体の作用に伴う変化であることから，ヒト胎児への外挿性は低いものと考えられた。加えて，胎児の死亡はヒトでみられる貧血の様々な転帰の 1 つである[4]。流産がみられた 20 mg/kg/日の 1 例で体重および摂餌量の減少がみられた。器官形成後期の妊娠 35 日から妊娠 50 日まで 20 mg/kg/日を投与した母動物では，流産または胎児死は認められなかった。いずれの投与群でも子宮および卵巣（黄体数も含む）の異常はみられなかった。

生存胎児数は，プラセボ対照群で 5 例（雄 4 例，雌 1 例），5 mg/kg/日で 4 例（雄 3 例，雌 1 例），10 mg/kg/日で 4 例（雄 3 例，雌 1 例），20 mg/kg/日（器官形成期前半）で 2 例（雄 2 例），20 mg/kg/日（器官形成期後半）で 5 例（雄 2 例，雌 3 例）であった。hATG 投与に関連した胎児体重，臓器重量，胎盤の重量および形態（外観）に変化は認められず，胎児の外表，内臓および骨格の変異や奇形は認められなかった。また，死亡胎児に形態異常は認められなかった。

以上，20 mg/kg/日で母動物において流産ならびに体重および摂餌量の変化がみられ，また胎児死亡がみられたことから，母動物の一般毒性および生殖毒性，ならびに胚・胎児発生に対する NOAEL は 10 mg/kg/日と考えられた。なお，20 mg/kg/日でみられた胚・胎児死亡については，サル特異的な機序による母動物の貧血に起因するものであり，ヒトへの外挿性はないと考えられる。

6.6. 出生前および出生後の発生に関する試験

サルを用いて実施した胚・胎児発生毒性試験の結果に基づいて， hATG の出生前および出生後の発生に関する試験については実施しなかった。すなわち，妊娠したサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（用量設定試験）において，40 mg/kg/日の全 3 例および 20 mg/kg/日の 3 例中 1 例で胎児

死亡または流産がみられた（M2.6.6.6.4）。また，妊娠したサルを用いた胚・胎児発生毒性試験（重要な試験）において，妊娠 20 日～妊娠 35 日（器官形成期前半）に 20 mg/kg/日を投与した 5 例中 3 例で流産または胎児死亡がみられた（M2.6.6.6.5）。20 mg/kg/日で胎児毒性および胚致死性がみられたことから，母動物の毒性および胚・胎児発達に関する NOAEL は 10 mg/kg/日であった。妊娠したサルを用いたこれらの試験結果を考慮すると，出生前期間に臨床用量（40 mg/kg/日）を妊娠サルに投与しても，出生後の発達への影響を評価するために十分な数の出生児が得られないと考えられた。

7. 局所刺激性試験

hATG を用いた局所刺激性試験は実施していない。サルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験では，投与部位に hATG 投与に関連する所見は認められなかった（M2.6.6.3.2）。なお，ロットリリース試験においてサルに溶媒対照（生理食塩水）および hATG を静脈内投与した際，いずれにおいても投与部位に沿って血栓形成が頻発した。血栓形成の頻度は hATG 投与群の方で対照群と比べてわずかに高かった（M2.6.6.3.1）。

8. その他の毒性試験

8.1. 免疫毒性試験

hATG を用いた免疫毒性試験は実施していない。hATG の薬効薬理作用である免疫抑制作用に起因して，hATG は標準的な免疫毒性試験において陽性を示すと考えられる。hATG を用いたサル 14 日間静脈内投与毒性試験において，白血球数および好中球数の増加ならびに抗ウマ IgG 抗体の産生が認められていることから，非臨床で用いた動物種において免疫原性を示すと考えられる（M2.6.6.3.2）。

8.2. *不純物B

*不純物B は hATG における工程由来不純物である。hATG のバッチの実測値に基づく *不純物B の規格値は 0.1 µg/mL である。細菌を用いた変異原性試験において *不純物B は前進突然変異原性[5]および復帰突然変異原性[6]を示した。 *不純物B の発がん性については不明であることから，「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺[ICH M7(R1)]」[7]における変異原性物質の評価および管理の考え方を *不純物B にあてはめた場合，許容限度値［適切な毒性学的概念の閾値（TTC）］以下で管理する必要がある。

hATG の臨床使用歴に基づき， *不純物B 曝露に関連するリスクを評価した。再生不良性貧血の適用における hATG の最大投与量は，40 mg/kg/日の 4 日間投与で，体重 50 kg のヒトの場合の

*不純物B　摂取量は 1 日あたり 4 μg[a]となる。この値はガイドラインで規定する TTC 値（投与期間 1 ヵ月以下，1 日摂取量：120 μg/日）以内である。

以上より， 再生不良性貧血患者において，hATG 投与に伴う　*不純物B　曝露によって想定される発がんリスクは極めて低いと考えられた。

8.3. hATG の交差反応性試験

報告書番号 7227-[redacted]-028

抗体，特に抗リンパ球抗体の結合および有効性は動物種に特異的であると考えられる。hATG の安全性を評価するための最適な動物種の選択においては，ヒトと同じまたは類似の交差反応性抗原を有する動物種が好ましいと考えられることから，hATG のリンパ球および白血球との結合性についてヒトまたは動物の血液を用いて評価した。

本試験では健康被験者，カニクイザル，ラット，ネコ，イヌ，マウス，ブタ，ウサギおよびモルモットから採取した血液を使用した。これらの塗抹標本を作製し，エタノールで固定後，非特異的な結合をブロッキングした後，hATG または正常ウマ IgG（陰性対照）とインキュベートした。その後，蛍光標識したウサギ抗ウマ IgG を二次抗体として，hATG のリンパ球および白血球との結合を蛍光顕微鏡下で観察した。hATG はヒトの好中球，リンパ球，単球，好酸球および血小板と結合したが赤血球とは結合しなかった。hATG のカニクイザルの血液細胞への結合はヒト血液細胞への結合に類似していたが，その結合性はヒトより少し弱かった。hATG のマウスおよびモルモットの血液細胞への結合はみられず，その他の動物種においても血液細胞への結合は限定的で弱かった。

以上より，hATG はヒト以外の動物の中ではカニクイザルの血液細胞と最も高い交差性を示したことから，hATG の安全性評価にカニクイザルを用いることとした。また，hATG は非霊長類のリンパ球および他の血液細胞とほとんどもしくは全く交差反応性を示さなかった。

9. 考察及び結論

本項に収載する非臨床毒性試験の成績は，海外での豊富な臨床使用実績とともに，中等度以上の再生不良性貧血における hATG の使用を十分に支持するものと考える。hATG の非臨床安全性試験は，ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価に関する ICH ガイドライン」[1] の制定前に実施された。しかしながら，一連の薬理，薬物動態およ

[a] 40 mg/kg/日を体重 50 kg のヒトに投与した際の hATG の投与量は 2000 mg/日であり，投与容量は投与量 2000 mg を製剤濃度 50 mg/mL で除した 40 mL となる。 *不純物B　規格値は 0.1 μg/mL であることから，1 日あたりの　*不純物B　摂取量は 4 μg/日となる。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

び毒性試験は hATG の特性および必要な注意喚起を理解するため，ならびに臨床利用をサポートするのに十分であると考えられる。

カニクイザルを用いた 14 日間静脈内投与毒性試験における主な毒性として，用量依存的な赤血球パラメータの低下が認められた。80 mg/kg/日では，重度の貧血により雌 1 例が死亡した。サルにおける貧血は，赤血球表面上に hATG で認識される表面抗原が発現していることによるもので，赤血球表面抗原が発現しないヒトでのリスクとはならないと考えられた。試験 8 日の 40 mg/kg/日以上でリンパ球数の減少が時に好中球数の増加を伴って認められたが，試験 14 日には概ね対照群と同等の値に回復した。リンパ球の減少は hATG の薬理学的作用の 1 つと考えられた。病理組織学的検査では，hATG の薬理作用である免疫抑制作用と一致した変化（胸腺萎縮，白脾髄の細胞密度低下）または赤血球数減少に対する再生応答の変化（赤脾髄の細胞密度上昇，骨髄における赤芽球骨髄球の過形成，髄外造血）が認められた。

サルを用いた受胎能試験では，雌雄ともに最高用量である 40 mg/kg/日まで hATG による受胎能への影響はみられなかった。40 mg/kg/日の雌 1 例が投与終了から 11 日後に死亡した。死亡を含む親動物に認められた重篤な毒性（蒼白，運動量低下および鎮静などの一般状態の変化）は貧血に起因していた。妊娠ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験では，器官形成期（妊娠 7 日～妊娠 17 日）に最高用量 100 mg/kg/日まで投与したところ，母動物への毒性，胎児の外表，内臓および骨格の変異や奇形は認められなかった。また，100 mg/kg/日でみられた所見は，胎児における頸椎椎弓の低形成のみであった。妊娠サルを用いた胚・胎児発生毒性試験では，器官形成前半期（妊娠 20～35 日）に 20 mg/kg/日を投与した際に流産または胎児死亡が認められたが，器官形成後半期（妊娠 35～50 日）に投与した際は同様の変化はみられなかった。この胎児死亡は，M2.6.6.3.2 で述べたように，サル赤血球表面抗原に対する抗ウマ IgG 抗体の結合に伴う母動物の貧血に起因するものであり，ヒトには外挿されない。加えて，胎児の死亡はヒトでみられる貧血の様々な転帰の 1 つである [4]。死亡胎児に形態異常は認められず，生存した胎児においても hATG 投与に関連した外表，内臓および骨格の変異や奇形は認められなかった。

hATG のがん原性試験は実施していない。これは ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」[1] に記載されたがん原性試験実施に対する考え方と一致している。さらに，ICH S1A ガイドライン「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」[2] では，臨床での使用期間が連続して 6 ヵ月未満（米国では 3 ヵ月未満）の場合には，がん原性試験は原則要求されない。hATG の臨床における投与期間は最長 4 日間であり，この点も hATG のがん原性試験を実施しないことと合致する。

hATG 中に遺伝毒性不純物である　*不純物B　が含まれることに伴うリスクは，想定される適応症である再生不良性貧血の治療に対して用いる場合には許容できる範囲であると考えられ，「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺」[7] の考え方とも一致している。

以上，一連の非臨床試験結果ならびに海外での臨床使用実績は，中等度から重度の再生不良性貧血の治療における hATG の使用を支持するものと考える。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

10. 図表

本文中に図表は含まれない。

参考文献

[1] ICH S6(R1)ガイドライン : バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（薬食審査発 0323 第 1 号　平成 24 年 3 月 23 日）

[2] ICH S1A ガイドライン : 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（薬審第 315 号　平成 9 年 4 月 14 日）

[3] Carney EW, Kimmel CA. Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2007;80(6):473-96.

[4] Rathod Niranjan. High Risk Cases in Obstetrics 2014;1(e):20. DOI: 10.5005/jp/books/12373_2

[5] Wugmeister M, Summers WC. A bacterial mutagenicity study of rivanol, an acridine derivative used as an abortifacient. Yale J Biol Med 1983;56(1):9-13.

[6] Yasunaka K, Okada H. Mutagenic activity of acrinol in Salmonella typhimurium. Mutat Res 1985;144(1):9-12.

[7] ICH M7 (R1)ガイドライン : 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺（薬生薬審発 0627 第 1 号　平成 30 年 6 月 27 日）

TABLE OF CONTENTS

2.6.7.1 TOXICOLOGY: OVERVIEW 2
2.6.7.2 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS STUDIES 6
2.6.7.3 TOXICOKINETICS: OVERVIEW OF TOXICOKINETICS DATA 7
2.6.7.5 SINGLE-DOSE TOXICITY 9
2.6.7.6 REPEAT-DOSE TOXICITY: NONPIVOTAL STUDIES 10
2.6.7.7 REPEAT-DOSE TOXICITY 12
2.6.7.8A GENOTOXICITY: IN VITRO (AMES) 17
2.6.7.8B GENOTOXICITY: IN VITRO 20
2.6.7.8C GENOTOXICITY: IN VITRO 22
2.6.7.11 REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY: NONPIVOTAL STUDIES 24
2.6.7.12A REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – MALE FERTILITY 25
2.6.7.12B REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – FEMALE FERTILITY 28
2.6.7.13A REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – EFFECTS ON EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT 31
2.6.7.13B REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY – EFFECTS ON EMBRYO-FETAL DEVELOPMENT 33
2.6.7.17 OTHER TOXICITY STUDIES 35

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: hATG

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
Single-Dose Toxicity[b]								
	Mouse	Intraperitoneal	1 day	25 mg	No	Upjohn	[c]	NA
	Rat/Upj:TUC(SD) spf	Intravenous	1 day	0, 5, 50 mg	No	Upjohn	[c]	NA
	Guinea pig	Intraperitoneal	1 day	250 mg	No	Upjohn	[c]	NA
Repeat-Dose Toxicity[d]								
Nonpivotal[b]								
	Monkey/Rhesus	Intravenous	3 doses over 5 days	Vehicle; Day 1: 100; Day 3: 200; Day 5: 400	No	Upjohn	[e]	NA
	Monkey/Cynomolgus	Intravenous	4 doses over 8 days	Days 1, 3, 5, and 8: 50	No	Upjohn	[f]	NA
Pivotal								
	Monkey/Cynomolgus	Intravenous	14 days	0, 20, 40, 80	Yes	Upjohn	7227-[redacted]-035	NA
Genotoxicity								
Bacterial Mutagenicity Assay	Salmonella typhimurium/ TA-97A, TA-98, TA-100, TA-102 and TA-1535	In vitro	NA	5000 to 62 µg/plate (with S9 activation) 1667 to 21 µg/plate	Yes	Upjohn	7228-[redacted]-058	NA

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: hATG

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
Genotoxicity								
In vitro Chromosomal Aberration Assay	Chinese hamster ovary/ CHO-WBL	In vitro	NA	24 hours exposure 1250 to 5000 µg/mL 48 hours exposure 625 to 2500 µg/mL (without S9 activation) 1250 to 5000 µg/mL(with S9 activation)	Yes	Upjohn	7228-[redacted]-097	NA
In vitro Chromosomal Aberration Assay	Human peripheral lymphocytes/1 male donor, 1 female donor	In vitro	NA	24 hours exposure 312.5 to 1250 µg/mL 48 hours exposure 156.3 to 625 µg/mL (without S9 activation) 1250 to 5000 µg/mL (with S9 activation)	Yes	Upjohn	7228-[redacted]-056	NA
Carcinogenicity								
None								

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: hATG

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
Reproductive and Developmental Toxicity								
Male Fertility	Monkey/Cynomolgus	Intravenous	14 days	0, 10, 20, 40	Yes	Upjohn	1470-[redacted]-025	NA
Female Fertility	Monkey/Cynomolgus	Intravenous	14 days	0, 10, 20, 40	Yes	Upjohn	1470-[redacted]-024	NA
Embryo-Fetal Development	Rat/Sprague-Dawley	Intravenous	GD7-GD17	0, 25, 50, 100	No	Upjohn	1470-[redacted]-003	NA
Preliminary Embryo-Fetal Development	Monkey/Cynomolgus	Intravenous	GD20-GD35	10, 20, 40	Yes	Upjohn	1470-[redacted]-022	NA
Embryo-Fetal Development	Monkey/Cynomolgus	Intravenous	GD20-GD35 GD35-GD50	0, 5, 10, 20 20	Yes	Upjohn	1470-[redacted]-023	NA

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Test Article: hATG (continued)

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Sponsor Reference Number
Local Tolerance								
None								
Other Toxicity Studies								
Species Cross Reactivity of ATGAM®	Not applicable	In vitro	NA	NA	No	Upjohn	7227-[redacted]-028	NA

GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); GD = Gestation day; NA = Not applicable.
a. Unless specified otherwise, all doses are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
b. Lot release general safety tests
c. Data from evaluation of multiple drug lots between 19[redacted] and 19[redacted] summarized in Expert Report on Toxicological and Pharmacological Documentation, 19[redacted] and Part III Toxicological and Pharmacological Documentation.
d. For repeat-dose toxicity studies the NOAEL (no observed adverse effect level) is underlined.
e. Technical Report 7244/[redacted]/7263/005 and Technical Report 7244/[redacted]/7263/010 are examples of lot release safety tests in rhesus monkeys.
f. Data from evaluation of multiple drug lots between 19[redacted] and 19[redacted] summarized in Expert Report on Toxicological and Pharmacological Documentation, 19[redacted] and Part III Toxicological and Pharmacological Documentation, which includes Technical Report 7227-[redacted]-006 and Technical Report 7227-[redacted]-046 that summarize the results of the 62 commercial lots tested in cynomolgus monkeys between 19[redacted] and 19[redacted].

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: hATG

Type of Study	Species	Method of Administration	Doses[a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study Number
14-Day Repeat Dose	Monkey	Intravenous	0, 20, 40, 80	Yes	7227-[redacted]-035

GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine).
a. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data Test Article: hATG

Dose[a] (mg/kg/day)	Day 1 AUC_{24} (µg•h/mL)[b]	
	Monkeys	
	Male	Female
20	10500 ± 3850	10280 ± 820
40	20970 ± 4060	29260 ± 6930
80	43520 ± 15250	45410 ± 9330
Placebo[c]	36620 ± 5510	35530 ± 5360

AUC_{24} = Area under the concentration -time curve from time zero to 24 hours (1 day); hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine).
a. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
b. 14-Day Repeat-Dose study (7227-[redacted]-035); values are mean ± standard deviation, N = 5-6. Due to unanticipated cryoprecipitation in some samples, only a description of pharmacokinetic trends was possible.
c. Normal horse IgG at 80 mg/kg/day.

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data — Test Article: hATG

Dose[a] (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)[b]		
	Monkey[c]		Human
	Male	Female	Male + Female
10-15	Not dosed	Not dosed	727 ± 310
20	659.5 ± 208.4	625.9 ± 76.0	Not dosed
40	1455 ± 522	1743 ± 790	Not dosed
80	1892 ± 286	3098 ± 1399	Not dosed
Placebo[d]	2767 ± 869	1987 ± 503	Not dosed

C_{max} = Maximum observed concentration; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine).
a. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
b. Values in monkeys are mean ± standard deviation observed at 1 hour postdose, N = 5-6; the value in humans is mean peak value ± standard deviation, N = 27 renal transplant patients.
c. 14-Day Repeat-Dose study (7227-[redacted]-035). Due to unanticipated cryoprecipitation in some samples, only a description of pharmacokinetic trends was possible.
d. Normal horse IgG at 80 mg/kg/day.

2.6.7.5 Single-Dose Toxicity

Test Article: hATG

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Doses (mg)	Number/Group	Observed Maximum Nonlethal Dose (mg)	Approximate Lethal Dose (mg)	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Mouse[a]	Intraperitoneal (undiluted) Multiple commercial lots	25	2	25	>25	Test is satisfactory if both mice survive, maintain body weight, and exhibit no adverse effects for up to 7 days postdose. None of the 53 lots manufactured between 19[redacted] and 19[redacted] failed, suggesting low acute toxicity.	[b]/No
Rat/Upj:TUC(SD) spf[a]	Intravenous (undiluted) Multiple commercial lots	0, 5, 50	1-2 M	50	>50	Test for determination of presence of anti-glomerular basement membrane antibodies; only 2 of 69 lots rejected due to presence of antibodies.	[b]/No
Guinea pig[a]	Intraperitoneal (undiluted) Multiple commercial lots	250	2	250	>250	Test is satisfactory if both guinea pigs survive, maintain body weight, and exhibit no adverse effects for up to 7 days postdose. None of the 53 lots manufactured between 19[redacted] and 19[redacted] failed, suggesting low acute toxicity.	[b]/No

GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); M = Male.
a. Lot release general safety test.
b. Data from evaluation of multiple drug lots between 19[redacted] and 19[redacted] summarized in Expert Report on Toxicological and Pharmacological Documentation, 19[redacted] and Part III Toxicological and Pharmacological Documentation.

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Test Article: hATG

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/day)	Number/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Monkey/Rhesus[b]	Intravenous (0.5N saline) Numerous commercial Lots	3 doses over 5 days[c]	Vehicle; 100; 200; 400	1M + 1F	400	Generally well tolerated. **≥100 mg/kg:** occasional death attributed to anemia. Increased body temperature, leukocytes, and neutrophils during first 24 hours postdose. Decreased lymphocytes, erythrocytes, Hgb, Hct, and increased reticulocytes and nucleated erythrocytes. Decreased thymus, increased spleen weights. Thymic atrophy and decreased lymphocytes in thymus-dependent areas of spleen and lymph nodes. Thrombus formation in injected veins.	[d]/No
Monkey/ Cynomolgus[b]	Intravenous (0.45% saline) 62 commercial Lots tested between 19[redacted] and 19[redacted]	4 doses over 8 days	50	2	50	Generally well tolerated. **≥50 mg/kg:** occasional death attributed to anemia. Increased body temperature, leukocytes, and neutrophils during first 24 hours postdose. Decreased lymphocytes, erythrocytes, Hgb, Hct, and increased reticulocytes and nucleated erythrocytes. Decreased thymus, increased spleen weights. Thymic atrophy and decreased lymphocytes in thymus-dependent areas of spleen and lymph nodes. Thrombus formation in injected veins.	[e]/No

2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Test Article: hATG

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/day)	Number/ Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance

F = Female; GLP = Good Laboratory Practices; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); Hct = Hematocrit; Hgb = Hemoglobin; M = Male; N = Normal; NOAEL = No observed adverse effect level.

a. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

b. Lot release general safety test.

c. Animals received 100 mg/kg on Day 1, 200 mg/kg on Day 2, and 400 mg/kg on Day 4.

d. Technical Report 7244/[redacted]/7263/005 and Technical Report 7244/[redacted]/7263/010 are examples of lot release safety tests in rhesus monkeys.

e. Data from evaluation of multiple drug lots between 19[redacted] and 19[redacted] summarized in Expert Report on Toxicological and Pharmacological Documentation, 19[redacted] and Part III Toxicological and Pharmacological Documentation, which includes Technical Report 7227-[redacted]-006 and Technical Report 7227-[redacted]-046 that summarize the results of the 62 commercial lots tested in cynomolgus monkeys between 19[redacted] and 19[redacted].

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity **Report Title: A 14-Day Toxicity Study with Toxicokinetics of ATGAM® Followed by 28 Days of Recovery When Administered by Bolus Intravenous Infusion to Cynomolgus Monkeys** **Test Article: hATG**

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: Young adult
Date of First Dose: [redacted] 19[redacted]
Duration of Dosing: 14 days
Duration of Postdose: 28 days
Method of Administration: Intravenous infusion
Study Number: 7227-[redacted]-035
Lot Number: [redacted]
GLP Compliance: Yes
Vehicle/Formulation: Sodium Chloride, 0.45% for Injection, USP; administered once daily at a dose volume of 3.2 mL/kg
Special Features: Electron microscopic evaluation of spleen, kidney; immunocytochemical evaluation of spleen and kidney for horse IgG, monkey IgG, and complement; assessment of anti-hATG antibodies.
No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day

Dose[a] (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**0 (placebo)[b]**		**20**		**40**		**80**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals										
Toxicity	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics	NS	NS	6	6	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics:										
AUC_{24} (µg•hr/mL)										
Day 1[c]	NS	NS	36620	35530	10500	10280	20970	29260	43520	45410
Toxicokinetics:	Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes		Combined Sexes	
AUC_{24} (µg•hr/mL)										
Day 1[c]	NS		36070		10390		25120		44550	
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2[d]
Body Weight (kg)[e]	2.7	2.7	3.0	2.6	-	-	-	-	-	-
Food Consumption[f]	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 7227-[redacted]-035 (continued)

Dose[a] (mg/kg/day)	0 (Control)		0 (placebo)[b]		20		40		80	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Clinical Observations										
Pale gums/body	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
Decreased activity	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Body Temperature	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiratory rate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart rate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood pressure (indirect)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/Coagulation[g]										
Erythrocyte count (10^{12}/L)	5.33	5.39	5.07	5.08	4.14*	4.12*	3.62*	2.89*	2.85*	2.28*
Hemoglobin (g/L)	108	107	100	97	86*	81*	76*	66*	67*	52*
Hematocrit (L/L)	0.37	0.37	0.35	0.34	0.29	0.28*	0.26*	0.23*	0.22*	0.18*
Reticulocyte count (10^6/L)	120562	122277	169367	102967	280708*	239055	385487*	436457*	459125*	489374*
Mean corpuscular volume (fL)	69.0	69.2	68.7	67.3	70.5	67.6	70.8	78.8*	78.8*	79.6*
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	20.4	19.8	19.9	19.0	20.9	19.7	20.9	22.8*	23.8*	23.4*
Lymphocyte count (10^9/L) – Day 8	5.68	5.57	3.89*	3.17*	3.63*	4.40	3.18*	3.02*	2.60*	2.84*
Neutrophil count (10^6/L) – Day 8	2.40	2.54	1.90	2.60	2.49	3.09	3.94	4.45	4.70*	2.36*
Clinical Chemistry[g]										
Bilirubin (µmol/L)	6.3	4. 5	4.2	3.7	10.8	8.6	12.4	7.8	16.4	7.9
Albumin (g/L)	46	46	42	41	42	39	40*	38*	38*	37
Globulin (g/L)	32	34	41*	49*	37	41	41*	44	45*	45
Albumin/Globulin Ratio	1.4	1.4	1.1	0.9*	1.1	1.0	1.0*	0.9*	0.9*	0.9*
Triglycerides (mmol/L)	0.42	0.41	0.71	0.92	0.46	1.23	0.82	0.61	0.82	0.80
Urinalysis[g]										
Urobilinogen (No. of animals ≥16 µmol/L)	1	1	1	1	4	5	6	4	6	4
Sodium (mmol)	4.64	4.63	3.90	4.01	4.47	3.89	4.56	5.13	2.65	4.25
Potassium (mmol)	3.93	3.47	4.03	3.34	3.53	4.04	3.38	3.49	2.19*	4.39
Chloride (mmol)	4.50	4.65	3.87	3.96	4.22	3.68	4.34	5.55	2.08	5.04

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 7227-[redacted]-035 (continued)

Dose[a] (mg/kg/day)	0 (Control)		0 (placebo)[b]		20		40		80	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Organ Weights[e] (Day 15)										
Number Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Spleen										
Absolute (g)	6.79	4.99	49	109	51	97	129	145*	106	149*
Body Weight ratio (%)	0.248	0.186	40	112*	43	106	117	170*	100	171*
Brain Weight ratio (%)	10.114	8.018	59	105	56	100	146	151*	116	160*
Gross Pathology										
Number Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
Histopathology										
Number Examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
Liver										
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
Mandibular lymph node										
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2
Spleen										
Red pulp, hypercellularity	0	0	2	0	2	2	1	2	3	0
White pulp, hypocellularity	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Eosinophilic material	0	1	1	1	1	1	2	1	2	1
Sterum and marrow										
Erythromyeloid hyperplasia	1	0	2	1	3	3	3	2	2	2
Electron Microscopy										
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunocytochemistry										
Kidney										
Fine granules	0	0	0	0	3	1	3	3	3	2
Course granules	0	0	1	0	1	3	1	0	2	1
Spleen, B follicles										
Horse IgG	0	0	3	3	NE	NE	NE	NE	3	3
Monkey IgG	3	3	3	3	NE	NE	NE	NE	3	3
Complement C3c	3	3	3	3	NE	NE	NE	NE	3	3
Anti-horse IgG antibodies	Absent	Absent	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 7227-[redacted]-035 (continued)

Dose[a] (mg/kg/day)	0 (Control)		0 (placebo)[b]		20		40		80	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Postdose Evaluation[h]										
Number Evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Hematology										
Erythrocyte count (10^{12}/L)	6.42	6.23	5.88	6.00	5.90	5.87	5.80	5.75	5.38*	5.75
Hemoglobin (g/L)	128	124	121	119	122	112	120*	114	118*	119
Mean corpuscular volume (fL)	69.0	71.5	71.6	69.0	72.2	68.4	72.6	71.9	79.7*	75.0
Clinical Chemistry										
Albumin (g/L) (Day 21)	40	44	41	39	41	38	39	35	36*	38
Histopathology										
Liver										
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Mandibular lymph node										
Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Spleen										
Eosinophilic material	0	1	0	2	2	0	0	3	2	3
Sterum and marrow										
Erythromyeloid hyperplasia	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0
Immunocytochemistry										
Kidney										
Fine granules	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3
Course granules	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Spleen, B follicles										
Horse IgG	0	0	3	3	NE	NE	NE	NE	3	3
Monkey IgG	3	3	3	3	NE	NE	NE	NE	3	3
Complement C3c	3	3	3	3	NE	NE	NE	NE	3	3
Anti-horse IgG antibodies (Day 42)	Absent	Absent	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present

2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity

Study Number: 7227-[redacted]-035 (continued)

Dose[a] (mg/kg/day)	0 (Control)		0 (placebo)[b]		20		40		80	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F

*p <0.05, significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
- = No noteworthy findings; AUC_{24} = Area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours (1 day); F = Female; GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immunoglobulin, anti-thymocyte globulin (equine); IgG = Immunoglobulin G; M = Male; NE = Not evaluated; NS = Not sampled; USP = United States Pharmacopeia.
a. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
b. Normal horse IgG; 80 mg/kg/day
c. Due to unanticipated cryoprecipitation in some samples, only a description of pharmacokinetic trends was possible.
d. One female died on Day 1 shortly after the end of infusion; postmortem findings were consistent with anaphylaxis. This animal was replaced and the replacement animal completed the study. One female was moribund and euthanized on Day 8; morbidity was attributed to severe anemia.
e. Group means are shown for controls. Percent differences from vehicle controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.
f. Based on visual inspection.
g. Values on Day 14 unless otherwise indicated.
h. Values on Day 42 unless otherwise indicated.

2.6.7.8A Genotoxicity: In Vitro (AMES)

Report Title: Evaluation of ATGAM in the Preincubation Mutagenesis Assay in Bacteria (Ames Assay)

Report No: 7228-[redacted]-058

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
Species/Strains: *Salmonella typhimurium/TA-97A, TA-98, TA-100, TA-102 and TA-1535; Escherichia coli/ WP2 uvrA*
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Vehicles: DMSO or Saline **For Test Article:** hATG
For Positive Controls: 2AA, 2NF, NaN_3, 4NPD, CHP,
Treatment: Plate incorporation for 48 hours with and without metabolic activation
Cytotoxic Effects: Severe cytotoxicity at 1667 µg/plate (Experiment I) and 1250 µg/plate (Experiment II) (without metabolizing system)
Genotoxic Effects: None

Number of Independent Assays: 2
Number of Replicate Cultures: 3

Study Number: [redacted]-131
Sponsor Reference Number: Not reported
Lot Number: Lot [redacted]
GLP Compliance: Yes

S9 Batch Number: Lot [redacted]
Date of Treatment: [redacted]19

Test Article	Dose (µg/plate)	Preliminary Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3± SD)			
		With Metabolic Activation		Without Metabolic Activation	
		TA-100	WP2 uvrA	TA-100	WP2 uvrA
hATG	5000	181	37	0	0
hATG	2500	184	26	0	0
hATG	1250	193	25	0	0
hATG	417	176	31	166	0
hATG	139	178	32	146	0
hATG	46	177	19	155	0
hATG	15	192	19	149	5
hATG	5	191	20	180	1
hATG	1.7	181	15	154	11
hATG	0.57	178	19	165	6
Negative Control		181 161 185	29 23 22	170 158 145	18 18 18
Positive Control		1058	158	862	265

Test Article	Dose (µg/plate)	Preliminary Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3± SD)			
		With Metabolic Activation		Without Metabolic Activation	
		TA-100	WP2 uvrA	TA-100	WP2 uvrA

GLP = Good Laboratory Practice; NA = Not applicable; S9 = Postmitochondrial supernatant;
2AA = 2-aminoanthracene; 2NF= 2-nitrofluorene; NaN_3= sodium azide; 4NPD= 4-nitro-o-phenylenediamine; CHP= cumene hydroperoxide; ENNG= 1-ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine; DMSO= dimethylsulfoxide
Positive control compounds: TA-100= 2AA (1 µg/plate) with activation, 2NF (5 µg/plate) without activation; WP2 uvrA= 2AA (4 µg/plate) with activation, ENNG (2 µg/plate) without activation

Test Article	Dose (µg/plate)	Definitive Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3± SD)				
		Salmonella typhimurium				
		TA-97A	TA-98	TA-100	TA-102	TA-1535
Without Metabolic Activation						
hATG	1667	0	0	0	0	0
hATG	556	132	20	159	165	14
hATG	185	124	16	153	170	9
hATG	62	139	21	161	204	13
hATG	21	132	18	154	186	11
Positive Control*		598	946	952	598	485
Solvent Control		138	21	150	202	11
With Metabolic Activation						
hATG	5000	180	30	175	227	15
hATG	1667	190	24	179	288	13
hATG	556	199	28	172	310	13
hATG	185	214	27	167	330	11
hATG	62	190	29	164	311	14
Positive Control*		802	689	935	1039	114
Solvent Control		193	30	174	332	13
Without Metabolic Activation						
hATG	1250	0	0	0	0	0
hATG	625	149	26	173	190	11
hATG	313	153	32	162	213	12
hATG	156	164	27	158	216	12
hATG	78	163	24	157	232	13
Positive Control*		709	936	1054	767	380
Solvent Control		158	25	157	233	10

Test Article	Dose (µg/plate)	Definitive Assay Revertant Colony Counts (Mean of 3± SD)				
		Salmonella typhimurium				
		TA-97A	TA-98	TA-100	TA-102	TA-1535
With Metabolic Activation						
hATG	5000	223	37	191	279	14
hATG	2500	206	22	195	309	13
hATG	1250	203	34	190	327	19
hATG	625	202	35	179	322	15
hATG	313	210	37	172	317	18
Positive Control*		809	738	873	1202	163
Solvent Control		225	34	184	349	15

∗ Strain-specific positive control compounds were used at appropriate concentrations, based on dose-response data, as follows:
2AA (with activation at 4 µg/plate in TA-102 and at 1 µg/plate in all other strains), 4NPD at (10 µg/plate without activation in TA-97A), 2NF (5 µg/plate without activation in TA-98 and TA-100) , NaN_3 (2 µg/plate without activation in TA-1535), CHP (100 µg/plate without activation in TA-102)

2.6.7.8B Genotoxicity: In Vitro

Report Title: Evaluation of ATGAM in the In Vitro Chromosome Aberration Assay in Chinese Hamster Ovary (CHO-WBL) Cells

Report No: 7228-[redacted]-097

Test for Induction of: Chromosome aberrations
Test Cells: Chinese Hamster Ovary (CHO-WBL) Cells
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Vehicles: Serum-free culture medium
Positive Controls: MMC (without S9), CP (with S9)
Treatment: 6-hour treatment with and without metabolic activation, 24-hour treatment without metabolic activation, and 48-hour treatment without metabolic activation
Cytotoxic Effects: Parallel Cytotoxicity
Genotoxic Effects: None

Number of Independent Assays: 1
Number of Replicate Cultures: 2
Number of Cells Analyzed/Culture: 100
Test Article: hATG

Study Number: [redacted]-484
Sponsor Reference Number: NA
Lot Number: [redacted] (thimerosol free)
GLP Compliance: Yes
S9 Batch Number: Lot [redacted]
Date(s) of Treatment: [redacted]19[redacted]

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed for Aberrations	Ng	%CA	C.C X 10^6	PE ratio
6-Hour Treatment With Metabolic Activation						
hATG	5000	200	3	1	1.23	7/400
hATG	2500	200	2	0.5	1.46	5/400
hATG	1250	200	2	0.5	1.58	7/400
CP	5	100	84	82	NA	NA
Medium		200	4	1.5	1.43	6/400
6-Hour Treatment Without Metabolic Activation						
hATG	5000	200	3	0.5	2.38	8/400
hATG	2500	200	4	1.5	1.63	13/400
hATG	1250	200	1	0	2.00	8/400
Medium		200	3	1	2.37	8/400
24-Hour Treatment Without Metabolic Activation						
hATG	5000	200	1	0	1.04	12/400
hATG	2500	200	2	0	1.12	5/400
hATG	1250	200	3	0.5	1.10	9/400
MMC	0.125	100	65	55	NA	NA
Medium		200	5	1	2.45	9/400

Test Article	Dose (μg/mL)	Total Cells Analyzed for Aberrations	Ng	%CA	C.C X 10^6	PE ratio
48-Hour Treatment Without Metabolic Activation						
hATG	2500	200	6	2	1.07	5/400
hATG	1250	200	4	1	1.27	6/500
hATG	625	200	5	1.5	2.06	5/400
Medium		200	5	1	2.65	2/400

GLP = Good Laboratory Practice; NA = Not applicable; S9 = Post mitochondrial supernatant.
MMC= Mitomycin-C; CP= Cyclophosphamide; Medium= Untreated culture medium
Ng= No. of cells with aberrations (including gaps); %CA= % cells with aberrations (excluding gaps); C.C X 10^6 = cell count (millions) , average of two count x 82 x 14 (mL); PE Ratio= Ratio of no. of cells with polyploidy (including endoreduplication) to total no. of cells (400)

2.6.7.8C Genotoxicity: In Vitro

Report Title: Evaluation of ATGAM in the In Vitro Chromosome Aberration Assay in Human Peripheral Lymphocytes

Report No: 7228-[redacted]-056

Test for Induction of: Chromosome Aberrations
Test Cells: Human Peripheral Lymphocytes, 1 male donor, 1 female donor
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
Vehicles: Serum-free culture medium
Positive Controls: MMC (without S9), CP (with S9)
Treatment: 3-hour treatment with and without metabolic activation, 24-hour treatment without metabolic activation, and 48-hour treatment without metabolic activation
Cytotoxic Effects: Parallel cytotoxicity
Genotoxic Effects: None

Number of Independent Assays: 1
Number of Replicate Cultures: 2
Number of Cells Analyzed/Culture: 100
Test Article: hATG

Study Number: [redacted]-245
Sponsor Reference Number: NA
Lot Number: [redacted] (thimerosal free)
GLP Compliance: Yes
S9 Batch Number: Lot [redacted]
Date(s) of Treatment: [redacted]19[redacted]

Test Article	Dose (µg/mL)	Total Cells Analyzed for Aberrations	Ng	%CA	MI ratio	PE ratio
3-Hour Treatment With Metabolic Activation from a female donor						
hATG	5000	200	9	3	34/1000	109/400
hATG	2500	200	1	0.5	51/1000	105/400
hATG	1250	200	3	1.5	50/1000	89/400
CP	20	100	59	53	NA	NA
Medium	0	200	1	0	96/1000	1/400
3-Hour Treatment Without Metabolic Activation from a female donor						
hATG	5000	200	6	2	34/1000	72/400
hATG	2500	200	6	2	46/1000	87/400
hATG	1250	200	3	1	36/1000	68/400
Medium	0	200	2	1	99/1000	0/100
24-Hour Treatment Without Metabolic Activation from a female donor						
hATG	1250	200	2	1	37/1000	71/400
hATG	625	200	6	2.5	55/1000	102/400
hATG	312.5	200	2	1	61/1000	108/400
MMC	0.5	100	85	85	NA	NA
Medium	0	200	7	2	82/1000	2/400

Test Article	Dose (μg/mL)	Total Cells Analyzed for Aberrations	Ng	%CA	MI ratio	PE ratio
48-Hour Treatment Without Metabolic Activation from a female donor						
hATG	625	200	5	1.5	40/1000	109/400
hATG	312.5	200	3	1.5	47/1000	91/400
hATG	156.3	200	3	1.5	53/1000	104/100
Medium	0	200	0	0	95/1000	1/400
3-Hour Treatment With Metabolic Activation from a male donor						
hATG	5000	200	4	1	56/1000	64/400
hATG	2500	200	0	0	50/1000	47/400
hATG	1250	200	3	0.5	77/1000	50/400
CP	20	100	71	64	NA	NA
Medium	0	200	1	0.5	76/1000	2/400
3-Hour Treatment Without Metabolic Activation from a male donor						
hATG	5000	200	4	2	61/1000	38/400
hATG	2500	200	2	1	73/1000	48/400
hATG	1250	200	3	0.5	84/1000	55/400
Medium	0	200	2	0.5	105/1000	1/400
24-Hour Treatment Without Metabolic Activation from a male donor						
hATG	1250	200	4	2	90/1000	43/400
hATG	625	200	2	1	70/1000	85/400
hATG	312.5	200	1	0	84/1000	42/400
MMC	0.5	100	78	78	NA	NA
Medium	0	200	1	0	143/1000	0/400
48-Hour Treatment Without Metabolic Activation from a male donor						
hATG	625	200	4	1	43/1000	102/400
hATG	312.5	200	4	2	41/1000	72/400
hATG	156.3	200	4	2	48/1000	66/400
Medium	0	200	2	0.5	106/1000	0/400

MMC= Mitomycin-C; CP= Cyclophosphamide; Medium= Untreated culture medium
Ng= No. of cells with aberrations (including gaps); %CA= % Cells with aberrations (excluding gaps); MI Ratio= Ratio of no. of metaphases to total no. of cells scored (1000); PE Ratio= Ratio of no. of cells with polyploidy (including endoreduplication) to total no. of cells (400)

2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies — Test Article: hATG

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)/ Test Article Lot Number	Dosing Period	Doses[a] (mg/kg/day)	Number/Sex/ Group	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Monkey/ Cynomolgus	Intravenous; once daily. (Physiological Saline/50 mg/mL; stabilized with 0.3 M glycine [pH 6.8]; preserved with 0.01% thimerosal). Bulk Lot [redacted]	GD 20-35	10, 20, 40	3F	No maternal deaths. Genital bleeding, decreased body weight, and decreased food consumption in one dam at 40 mg/kg/day prior to miscarriage on GD 40. Fetal death or miscarriage occurred in all dams at 40 mg/kg/day during GD 30-GD 40 and in 1 dam at 20 mg/kg/day on GD 35. No effects on body weight, morphology, or placental weight in 3 live fetuses at 10 mg/kg/day or in 2 live fetuses at 20 mg/kg/day. No external findings in live or dead fetuses in any dose group.	1470-[redacted]-022 Yes

F = Female; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine);
a. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

2.6.7.12A Reproductive and Developmental Toxicity – Male Fertility

Report Title: A Male Fertility Study in Cynomolgus Monkeys Treated Intravenously with ATGAM®

Test Article: hATG

Design Similar to ICH 4.1.1: Yes
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: **M:** 5-9 years
F: ≥3 years
Date of First Dose: Not available

Dosing Period: **M:** 14 days prior to cohabitation
F: Not dosed
Day of Mating (F): Days 11 to 15 after menstruation
Day of Cesarean Section: GD 80-82
Method of Administration: Intravenous; once daily.
Vehicle/Formulation: Physiological saline/50 mg/mL; stabilized with 0.3M glycine (pH 6.8); preserved with 0.01% thimerosal.

Study Number: 1470-[redacted]-025
Lot Number: [redacted]
GLP Compliance: Yes[a]

Special Features: Serum testosterone; semen analysis
No Observed Adverse Effect Level:
Male Systemic Toxicity: 20 mg/kg/day
Male Fertility and Early Embryonic Development: 40 mg/kg/day

Dose[b] (mg/kg/day)	**0 (Control)[c]**	**10**	**20**	**40**
Sex	**M**	**M**	**M**	**M**
Number of Animals	5	5	5	5
Males				
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations				
Pale oral mucosa	0	0	0	2
Sedation	0	0	0	1
Crouching	0	0	0	1
Decreased activity	0	0	0	1
Body Weight (kg)[d]	5.304	+1	+1	-2
Body Weight gain (kg; Terminal – Day 0 weight)	0.134	0.102	0.094	-0.204
Food Consumption[e]	-	-	-	Decreased[f]
Number of Males Mated (Confirmed)	5	5	5	5
Number of Fertile Males	4	2	3	4
Necropsy Observations	-	-	-	-
Sperm Motility (% motile cells)	78.52	72.42	79.28	75.78
Sperm Count (million sperm/mL semen)	4.596	3.832	7.700	5.414

2.6.7.12A Reproductive and Developmental Toxicity – Male Fertility Study Number: 1470-[redacted]-025 (continued)

Dose[b] (mg/kg/day)	0 (Control)[c]	10	20	40
Females				
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Gestation Body Weight (kg)[d]	3.303	-6	-2	-2
Gestation Food Consumption[e]	-	-	-	-
Cohabitation Length (days)	5	5	5	5
Number of Females Mated (Confirmed)[g]	10	10	10	9
Number of Pregnant Females	4	2	3	4
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Cesarean Section Observations				
Number Evaluated	4	2	3	4
Mean Number Implantations	1	1	1	1
Mean % Postimplantation Loss	0	0	0	0
Mean Number Viable Conceptuses	1	1	1	1
Fetuses				
Number Live Fetuses (total)	4	2	3	4
Mean Number Live Fetuses/Pregnant females	1	1	1	1
Mean Fetal Body Weight (g)	52	52	59	52
Sex Ratio (% males)	25	50	0	25
Fetal Observations[h]				
External Malformations				
Number Fetuses	0	0	0	0
External Variations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Visceral Malformations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Visceral Variations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Skeletal Malformations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Skeletal Variations				
Number Fetuses	0	0	2	0

2.6.7.12A Reproductive and Developmental Toxicity – Male Fertility Study Number: 1470-[redacted]-025 (continued)

Dose[b] (mg/kg/day)	0 (Control)[c]	10	20	40

- = No noteworthy findings; F = Female; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); ICH = International Conference on Harmonization; IgG = Immunoglobulin G; M = Male.

a. Performed in accordance with Good Laboratory Practice Standard (Notification No. 313, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Japan).

b. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

c. Placebo control; normal horse IgG (40 mg/kg/day).

d. Terminal body weights. Group means (kg) are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.

e. Food consumption (appetite) assessed subjectively; recorded as complete, approximately half, or very little or no intake relative to amount of food provided.

f. Decreased food consumption primarily in 2 of 5 animals.

g. Each male was paired with 2 non-treated females (one-to-one basis; 5 days duration for each pairing). Coitus confirmed visually and/or by presence of sperm in a vaginal smear.

h. Number of fetuses affected.

2.6.7.12B Reproductive and Developmental Toxicity – Female Fertility

Report Title: A Female Fertility Study in Cynomolgus Monkeys Treated Intravenously with ATGAM®

Test Article: hATG

Design Similar to ICH 4.1.1: Yes
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: **M:** ≥5 years
F: 3-8 years
Date of First Dose: Not available

Dosing Period: **M:** Not dosed **F:** 14 days beginning Day 6 after onset of menstruation
Day of Mating (F): Days 11 to 15 after menstruation
Day of Cesarean Section: GD 80-82
Method of Administration: Intravenous; once daily.

Study Number: 1470-[redacted]-024
Lot Number: [redacted]
GLP Compliance: Yes[a]

Vehicle/Formulation: Physiological saline/50 mg/mL; stabilized with 0.3M glycine (pH 6.8); preserved with 0.01% thimerosal.
Special Features: Serum progesterone, 17β-estradiol, and prolactin measurement
No Observed Adverse Effect Level:
Female Systemic Toxicity: 10 mg/kg/day
Female Fertility and Early Embryonic Development: 40 mg/kg/day

Dose[b] (mg/kg/day)	**0 (Control)[c]**	**10**	**20**	**40**
Sex	**F**	**F**	**F**	**F**
Number of Animals	5	5	5	5
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	1[d]
Clinical Observations				
Pale oral mucosa	0	0	2	3
Sedation	0	0	0	1
Decreased activity	0	0	2	2
Premating Body Weight (kg)[e]	2.880	+8	-13	-4
Gestation Body Weight (kg)[f]	3.687	-5	-32	-9
Gestation Food Consumption[g]	-	-	-	Decreased[h]
Menstrual Cycle Length (days)				
Acclimation period	30.4	27.4	29.8	29.6
After dosing period(s)	50	28	51	30
Cohabitation Length (days)[i]	5	5	5	5
Number of Females Mated (Confirmed)	5	5	5	5
Serum hormone levels				
Progesterone	-	-	-	-
17β-estradiol	-	-	-	-
Prolactin	-	-	-	-

2.6.7.12B Reproductive and Developmental Toxicity – Female Fertility Study Number 1470-[redacted]-024 (continued)

Dose[b] (mg/kg/day)	0 (Control)[c]	10	20	40
Number of Pregnant Females	3	3	1	2
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Necropsy Observations				
Number Evaluated	0	0	0	1[d]
Pale color, multiple organs	0	0	0	1
Discoloration, bone marrow	0	0	0	1
Atrophy, thymus	0	0	0	1
Enlarged, adrenal gland (bilateral)	0	0	0	1
Cesarean Section Observations				
Number Evaluated	3	3	1	2
Mean Number Corpora Lutea	1	1	1	1
Mean Number Implantations	1	1	1	1
Mean % Preimplantation Loss	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	0	0	0	0
Mean Number Viable Conceptuses	1	1	1	1
Fetuses				
Number Live Fetuses (total)	3	3	1	2
Mean Number Live Fetuses/Pregnant female	1	1	1	1
Mean Fetal Body Weight (g)	54	46	43	58
Sex Ratio (% males)	33	67	0	100
Fetal Observations[j]				
External Malformations				
Number Fetuses	0	0	0	0
External Variations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Visceral Malformations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Visceral Variations				
Number Fetuses	0	0	0	0
Skeletal Malformations				
Number Fetuses	0	0	0	0

2.6.7.12B Reproductive and Developmental Toxicity – Female Fertility — Study Number 1470-[redacted]-024 (continued)

Dose[b] (mg/kg/day)	0 (Control)[c]	10	20	40
Skeletal Variations				
Number Fetuses	0	0	0	2
Cervical rib (unilateral)	0	0	0	1
Lumbar rib (bilateral)	0	0	0	1

- = No noteworthy findings; F = Female; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); ICH = International Conference on Harmonisation; IgG = Immunoglobulin G; M = Male.
a. Performed in accordance with Good Laboratory Practice Standard (Notification No. 313, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Japan).
b. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
c. Placebo control; normal horse IgG (40 mg/kg/day)
d. Animal died 11 days after end of dosing period. Emaciation, dehydration, pale color in the brain, heart, lung, spleen, liver and kidneys, discoloration of bone marrow, atrophy of the thymus, and swelling of adrenal glands were found at necropsy.
e. Day of dose initiation (prior to dosing). Group means (kg) are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.
f. Terminal body weight. Group means (kg) are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.
g. Food consumption (appetite) assessed subjectively; recorded as complete, approximately half, or very little or no intake relative to amount of food provided.
h. Decreased food consumption primarily in 1 of 5 animals.
i. Each female was paired with one male for 5 days. Females not pregnant were paired with a second male for another 5-day mating period. Mean cohabitation length was not recorded.
j. Number of fetuses affected.

2.6.7.13A Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development

Report Title: Eleven-day Reproductive and Developmental Toxicity and Teratogenicity Study in Sprague-Dawley rats (Study No. [redacted]-01)

Test Article: hATG

Design Similar to ICH 4.1.3: Yes
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley
Initial Age: 12 Weeks
Date of First Dose: Not available

Dosing Period: GD7-17
Day of Mating: GD 0[a]
Day of Cesarean Section: GD 20
Method of Administration: Intravenous; once daily.
Vehicle/Formulation: Physiological saline/50 mg/mL; stabilized with 0.3M glycine (pH 6.8); preserved with 0.01% thimerosal.

Study Number: 1470-[redacted]-003
Lot Number: [redacted]
GLP Compliance: No

Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level:
Maternal Females: 100 mg/kg/day
Fetuses: 50 mg/kg/day

Dose[b] (mg/kg/day)	0 (Control)[c]	0 (Placebo)[d]	25	50	100
Maternal Females					
Number of Animals	13	13	13	13	13
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0
Number Pregnant	13	13	13	13	13
Number Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Body Weight (g)[e]	414.7	1	-1	-1	1
Body Weight Change (g)[e]	144.2	4	-3	-4	3
Corrected Maternal Body Weight Change (g)[e]	65.6	3	-7	-7	-3
Food Consumption (g)	-	-	-	-	-
Uterine Weight (g)[e]	78.7	5	1	-2	8
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Number Evaluated	13	13	13	13	13
Cesarean Section Observations					
Number Evaluated	13	13	13	13	13
Mean Number Corpora Lutea	18.0	17.8	16.5	17.1	17.8
Mean Number Implantations	15.5	16.7	15.5	15.2	16.7
Mean % Preimplantation Loss	13.9	6.2	6.1	11.1	6.2
Mean % Postimplantation Loss	2.5	5.4	1.5	3.6	3.5

2.6.7.13A Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development **Study Number:** 1470-[redacted]-003 (continued)

Dose[b] (mg/kg/day)	0 (Control)[c]	0 (Placebo)[d]	25	50	100
Mean Number Viable Conceptuses	15.1	15.8	15.2	14.6	16.1
Mean Number Early Resorptions	0.4	0.9	0.2	0.6	0.6
Mean Number Late Resorptions	0	0	0	0	0
Fetuses					
Number Fetuses /Litters Evaluated	102/13	104/13	100/13	98/13	107/13
Mean Number Live Fetuses	15.1	15.8	15.2	14.6	16.1
Mean Fetal Body Weight (M/F; g)	3.20/3.05	3.28/3.13	3.35/3.21	3.34/3.26	3.39/3.20
Sex Ratios (% males)	57.1	49.4	49.9	43.6	49.9
Fetal Observations					
External Malformations	-	-	-	-	-
External Variations	-	-	-	-	-
Visceral Malformations	-	-	-	-	-
Visceral Variations	-	-	-	-	-
Skeletal Malformations	-	-	-	-	-
Skeletal Variations					
Male Live Fetuses					
Number Fetuses /Litters Evaluated	58/13	53/13	54/13	47/13	55/13
Hypoplasia, Cervical Vertebrae Arches	6	10	6	6	15
Female Live Fetuses					
Number Fetuses /Litters Evaluated	44/11	51/13	46/13	51/13	52/13
Hypoplasia, Cervical Vertebrae Arches	3	9	6	5	23*

*p <0.01 significantly different from control based on appropriate pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
- = No noteworthy findings; F = Female; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); ICH = International Conference on Harmonisation; IgG = Immunogloblun G; M = Males; NA = Not applicable.
a. One male and one female cohabited overnight on the evening of vaginal proestrus. Copulation confirmed the next morning by presence of sperm in vaginal smear. Day of sperm-positive smear designated as GD 0.
b. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.
c. Physiologic saline.
d. Normal horse IgG at 100 mg/kg/day
e. Terminal body weight data. Group means are shown for controls. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences.

2.6.7.13B Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development

Report Title: A Teratogenicity Study in Cynomolgus Monkeys Treated Intravenously with ATGAM®

Test Article: hATG

Design Similar to ICH 4.1.3: Yes

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Initial Age: 3-7 years
Date of First Dose: Not available
Vehicle/Formulation: Physiological Saline/50 mg/mL; stabilized with 0.3M glycine (pH 6.8); preserved with 0.01% thimerosal.
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level:
Maternal Females: 10 mg/kg/day
Fetuses: 10 mg/kg/day

Dosing Period: GD 20-35 (0, 5, 10, 20 mg/kg/day); GD 35-50 (20 mg/kg/day)
Day of Mating: GD 0[a]
Day of Cesarean Section: GD 100-102
Method of Administration: Intravenous; once daily.

Study Number: 1470-[redacted]-023
Lot Number: [redacted]
GLP Compliance: Yes[b]

Dose[c] (mg/kg/day)	**0 (Control)[d,e]**	5[e]	10[e]	20[e]	20[f]
Maternal Females					
Number of Animals	5	5	5	5	5
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	0
Number Pregnant	5	5	5	5	5
Number Aborted or With Total Resorption of Litter	0	0	0	1	0
Clinical Observations					
Genital bleeding	0	0	0	1	0
Body Weight (kg)[g]	3.846 (5)	+1 (4)	-8 (4)	+6 (2)	+2 (5)
Food Consumption[h]	-	-	-	Decreased[i]	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Number Evaluated	5	4	4	2	5
Cesarean Section Observations					
Number Evaluated	5	4	4	2	5
Mean Number Corpora Lutea	1	1	1	1	1
Mean Number Implantations	1	1	1	1	1
Mean % Preimplantation Loss	0	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	0	20	20	60	0
Mean Number Viable Conceptuses	1	0.8	0.8	0.4	1

2.6.7.13B Reproductive and Developmental Toxicity – Effects on Embryo-Fetal Development **Study Number:** 1470-[redacted]-023 (continued)

Dose[c] (mg/kg/day)	**0 (Control)[d,e]**	5[e]	10[e]	20[e]	20[f]
Fetuses					
Number Fetuses /Litters Evaluated	5/5	4/5	4/5	2/5	5/5
Number Live Fetuses	5	4	4	2	5
Number Dead Fetuses	0	1	1	3	0
Mean Fetal Body Weight (g)	126.20	123.61	127.02	126.35	122.18
Sex Ratio (% males)	80	75	75	100	40
Placental Weights (g)	44.31	46.45	44.27	39.54	41.17
Fetal Observations					
External Malformations	-	-	-	-	-
External Variations	-	-	-	-	-
Visceral Malformations	-	-	-	-	-
Visceral Variations	-	-	-	-	-
Skeletal Malformations	-	-	-	-	-
Skeletal Variations	-	-	-	-	-

- = No noteworthy findings; GD = Gestation Day; GLP = Good Laboratory Practice; hATG = Lymphocyte immune globulin, anti-thymocyte globulin (equine); ICH = International Conference on Harmonisation.

a. Females were mated for 3 days during Days 10-14 after menstruation. The middle day of that period was designated as GD 0 for bred females.

b. Performed in accordance with Good Laboratory Practice Standard (Notification No. 313, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Japan).

c. All dose levels are expressed as mg of active drug moiety per kg of body weight per day.

d. Placebo control; normal horse IgG (20 mg/kg/day)

e. Doses administered GD 20-35.

f. Doses administered GD 35-50.

g. Terminal body weight. Group mean is shown for control. Percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences. Number of pregnant animals weighed in parentheses.

h. Food consumption (appetite) assessed subjectively; recorded as complete, approximately half, or very little or no intake relative to amount of food provided.

i. Decreased food consumption primarily in 1 of 5 animals.

2.6.7.17 Other Toxicity Studies

Test Article: hATG

In Vitro

Species	Test System	Noteworthy Findings	Study Number/ GLP Compliance
Species Cross Reactivity of ATGAM®, a			
Human, monkey, pig, dog, cat, rabbit, guinea pig, rat or mouse	Blood from each species	ATGAM showed binding to human neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, platelets, but not to red blood cells. Binding to monkey blood cells was most similar to man in distribution but weaker. ATGAM binding to the blood cells of other species was much more restricted and weaker. Mouse and guinea pig blood cells showed no binding at all. ATGAM appears to have little or no cross-reactivity to non-primate lymphocytes or other blood cells.	7227-[redacted]-028/No

a: Lot Number: [redacted], [redacted], [redacted]