目次

2.4　非臨床試験の概括評価....5
2.4.1　非臨床試験計画概略....5
2.4.1.1　エフガルチギモド....5
2.4.1.2　rHuPH20....6
2.4.2　薬理試験....8
2.4.2.1　エフガルチギモド....8
2.4.2.1.1　効力を裏付ける試験....8
2.4.2.1.1.1　In vitro 薬理試験....8
2.4.2.1.1.2　In vivo 薬理試験....8
2.4.2.1.2　副次的薬理試験....8
2.4.2.1.3　安全性薬理試験....8
2.4.2.1.4　薬力学的薬物相互作用....8
2.4.2.2　rHuPH20....9
2.4.2.2.1　効力を裏付ける試験....9
2.4.2.2.2　副次的薬理試験及び安全性薬理試験....10
2.4.3　薬物動態試験....10
2.4.3.1　エフガルチギモド....10
2.4.3.1.1　分析法....10
2.4.3.1.2　吸収....10
2.4.3.1.3　分布....11
2.4.3.1.4　代謝....11
2.4.3.1.5　排泄....11
2.4.3.1.6　薬物動態学的薬物相互作用試験....11
2.4.3.1.7　その他の薬物動態試験....11
2.4.3.1.8　動物とヒトの全身曝露量の比較....12
2.4.3.2　rHuPH20....12
2.4.3.2.1　分析法....12
2.4.3.2.2　吸収....13
2.4.3.2.2.1　単回投与 PK 試験....13
2.4.3.2.2.2　反復投与 TK 試験....13
2.4.3.2.3　分布....14
2.4.3.2.4　代謝....15
2.4.3.2.5　排泄....15
2.4.3.2.6　薬物動態学的薬物相互作用....15
2.4.3.2.7　動物とヒトの全身曝露量の比較....15
2.4.4　毒性試験....15
2.4.4.1　エフガルチギモド....15
2.4.4.1.1　単回投与毒性試験....15
2.4.4.1.2　反復投与毒性試験....16
2.4.4.1.3　遺伝毒性試験....17
2.4.4.1.4　がん原性試験....17

2.4.4.1.5　生殖発生毒性試験 17
2.4.4.1.6　局所刺激性試験 17
2.4.4.1.7　その他の毒性試験 18
2.4.4.2　rHuPH20 18
2.4.4.2.1　単回投与毒性試験 19
2.4.4.2.2　反復投与毒性試験 19
2.4.4.2.3　遺伝毒性試験 20
2.4.4.2.4　がん原性試験 20
2.4.4.2.5　生殖発生毒性試験 20
2.4.4.2.6　局所刺激性試験 22
2.4.4.2.7　その他の毒性試験 22
2.4.4.2.7.1　生殖発生毒性試験での抗 rHuPH20 抗体の評価 22
2.4.4.2.7.2　組織交差反応性試験 23
2.4.4.2.7.3　遺伝子発現解析試験 23
2.4.5　総括及び結論 23
2.4.5.1　エフガルチギモド 23
2.4.5.2　rHuPH20 25
2.4.5.3　結論 27
2.4.6　参考文献 28

表目次

表 2.4-1　rHuPH20 の薬理試験の概要 9

略語及び用語の定義

略語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ABDEG	antibody that enhances IgG degradation	−
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to t hours	0 時間から t 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time of last quantifiable concentration	0 時間から最終定量可能濃度到達時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
COVID-19	—	新型コロナウイルス感染症
DG	day of gestation	妊娠日数
DL	day of lactation	授乳日数
ECL	electrochemiluminescence	電気化学発光
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay	電気化学発光免疫測定法
EFD	embryo fetal development	胚・胎児発生
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
EU	European Union	欧州連合
Fc	fragment, crystallized	−
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
gMG	generalized myasthenia gravis	全身型重症筋無力症
HA	hyaluronic acid/hyaluronan	ヒアルロン酸
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
hIgG	human IgG	ヒト IgG
ID	Intradermal	皮内
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IVIg	intravenous immunoglobulin	免疫グロブリン大量静注
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
K_m	Michaelis-Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand white	ニュージーランドホワイト
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態、薬物動態学
PND	postnatal day	生後日数
PPND	pre/postnatal development	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能
q7d	once weekly	週 1 回
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	定量ポリメラーゼ連鎖反応
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
rMuHyal5	recombinant murine hyaluronidase 5	遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ 5
rMuPH20	recombinant murine hyaluronidase PH20	遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ PH20
RNA-Seq	deep RNA sequencing	深部 RNA 配列決定
rRbPH20	recombinant rabbit hyaluronidase PH20	遺伝子組換えウサギヒアルロニダーゼ

略語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
		PH20
RT-qPCR	reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SC	subcutaneous	皮下
SPAM1	sperm adhesion molecule 1	精子接着分子 1
TDAR	T-cell dependent antibody response	T 細胞依存性抗体産生
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
Tg32	human FcRn transgenic (mice)	ヒト FcRn トランスジェニック（マウス）
t_{max}	time of maximum concentration	最高血清（血漿）中濃度到達時間
US	United States of America	米国

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

胎児性Fc受容体（FcRn）阻害薬のエフガルチギモド　アルファ（遺伝子組換え）（以下、エフガルチギモド：開発コード ARGX-113）は、FcRn の天然リガンドであるヒト免疫グロブリン（Ig）G1 抗体 Fc フラグメントであり、一連の修飾（ABDEG™変異）により、pH6.0 及び pH7.4 の両条件下で FcRn に対する結合親和性が高くなるように設計されている。エフガルチギモドは内因性 IgG の FcRn への結合を競合阻害し、内因性 IgG のリサイクルを阻害して、IgG の分解を促進する。

エフガルチギモド点滴静注製剤（販売名：ウィフガート点滴静注 400mg）は、US、日本及び EU で以下の効能・効果で新有効成分含有医薬品として承認されている。

- US：抗アセチルコリン受容体抗体陽性の成人全身型重症筋無力症（BLA761195）
- 日本：全身型重症筋無力症（ステロイド剤又はステロイド剤以外の免疫抑制剤が十分に奏効しない場合に限る）（30400AMX00013000）。
- EU：抗アセチルコリン受容体抗体陽性の成人全身型重症筋無力症（EMEA/H/C/005849）

エフガルチギモド皮下注製剤はエフガルチギモド及びボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）（以下、rHuPH20）を含有する新医療用配合剤である。rHuPH20 は皮下投与したときに併用薬の吸収及び拡散を促進させる作用を有し、rHuPH20 を配合することでより多くの液量を皮下投与することができる。本申請の目的は、全身型重症筋無力症（gMG）を適応とした、rHuPH20 を新有効成分として含有するエフガルチギモド皮下注製剤の医薬品製造販売承認である。

2.4.1.1　エフガルチギモド

エフガルチギモドの静脈内投与での非臨床試験データパッケージについては、エフガルチギモド点滴静注製剤の製造販売承認申請時に提出済みである。非臨床薬理試験では、エフガルチギモドが FcRn に結合し、病原性自己抗体を含む血中 IgG 濃度を減少させ、動物モデルでの疾患の徴候を軽減することが示された（ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD2.6.2.2）。内因性 IgM 及び IgA の恒常性は FcRn に依存していないため、エフガルチギモドは T 細胞及び B 細胞の活性を抑制させることなく、内因性 IgM 及び IgA 濃度に影響を及ぼさない（2.4.4.1.2）。さらに、エフガルチギモドはアルブミンと FcRn との相互作用を阻害しないため、血清アルブミン濃度にも影響を及ぼさない。

今回の皮下注製剤の承認申請に際して、エフガルチギモド単独（エフガルチギモド SC）又はエフガルチギモドに rHuPH20 を用時混合（エフガルチギモド SC + rHuPH20）して皮下投与したときの非臨床 PK 及び毒性試験を実施した。なお、エフガルチギモド SC + rHuPH20 は、臨床で使用されている皮下投与製剤と類似した組成であった（2.6.6.8.1）。

自己免疫疾患に対してエフガルチギモドと同様の作用機序を有する治療法として IVIg がある。IVIg は FcRn へ結合し内因性 IgG を競合阻害して有効性を示すと考えられている（Peter, 2020）。IVIg 療法既治療中の gMG 患者に対するエフガルチギモド治療の可能性及び

IVIg がエフガルチギモドを投与した gMG 患者に対するレスキュー薬となりうるかについて Tg マウスを用いて検討した（2.4.2.1.4）。

また、エフガルチギモドを静脈内投与した試験では、エフガルチギモドを単独又は rHuPH20 と混合して皮下投与したときよりも全身曝露量が高かったことから、エフガルチギモドの静脈内投与で実施した試験成績に基づいて、エフガルチギモドを単独及び rHuPH20 を配合して皮下投与したときの潜在的な全身毒性を評価することは可能であると考えている。したがって、今回の皮下注製剤の承認申請に際しては、新たにエフガルチギモド単独又は rHuPH20 を配合して皮下投与した試験を実施した。さらに、エフガルチギモド単独で静脈内及び筋肉内投与による局所刺激性試験を実施した。筋肉内投与は投与過誤の可能性のある投与経路として選択した。

エフガルチギモドの非臨床開発は ICH S6（R1）ガイドラインに準拠し、ICH M3（R2）ガイドラインを考慮して実施した。全ての主要な非臨床毒性試験（2.6.7.1）は、OECD 加盟国内の試験施設で、GLP に従って実施した。

エフガルチギモド皮下注製剤の臨床での使用を支持するため、以下の新たな非臨床試験を本申請に際して実施した。

- Tg32 マウスを用い、IVIg とエフガルチギモドを併用したときの PK/PD 試験を実施した（2.4.2.1.4）。
- カニクイザルにエフガルチギモド単独で 20 mg/kg の用量で単回皮下投与したときと静脈内投与したときの PK の比較及び rHuPH20 混合 12 週間反復皮下投与毒性試験の TK を実施した（2.4.3.1.2）。これらの試験を支持するための定量法を開発しバリデートした（2.4.3.1.1）。
- 毒性試験での用量の適切性を確認するために、トランスレーショナル母集団 PK/PD モデルを開発した（2.4.3.1.7）。
- カニクイザルを用いた rHuPH20 混合 12 週間反復皮下投与毒性試験（GLP 遵守、2.4.4.1.2）及びウサギを用いた局所刺激性試験（単回投与、GLP 遵守、2.4.4.1.6）を実施した。抗エフガルチギモド抗体産生についても評価した。
- COVID-19 のパンデミックとワクチン接種の重要性を踏まえ、モデル抗原である KLH に対する T 細胞依存性抗体産生（TDAR）に対して、エフガルチギモドが及ぼす影響について評価するため、カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験（GLP 遵守、2.4.4.1.2）を実施した。

rHuPH20 は血中にほとんど検出されないため、カニクイザルを用いた rHuPH20 混合 12 週間反復皮下投与毒性試験では rHuPH20 の PK 及び抗 rHuPH20 抗体を評価しなかった。妥当性の根拠は、2.4.5.1 に示す。

2.4.1.2　rHuPH20

rHuPH20 は、ヒアルロン酸（HA）を脱重合するグリコシル化一本鎖タンパク質である。rHuPH20 は、ヒトヒアルロニダーゼ PH20 の可溶型であり、ヒトヒアルロニダーゼ PH20 と同一の配列を有するが、C 末端のグリコシル - ホスファチジル - イノシトールアンカーを欠失している。rHuPH20 は、米国で市販されている Hylenex recombinant (hyaluronidase human injection)（以下、HYLENEX）の薬理活性成分であり、形質導入したチャイニーズハムス

ター卵巣細胞で産生される。HYLENEX の適応は、皮下輸液投与による水分補給、他の皮下投与薬物の拡散及び吸収促進並びに皮下尿路造影時の放射線不透過性造影剤の吸収改善のためのアジュバントとしての使用である。

HA は、吸湿性の非分岐直鎖グリコサミノグリカンであり、眼の硝子体、臍帯、滑液、心臓弁、皮膚、骨格組織などの多くの組織の細胞外又は細胞周囲マトリックスに偏在する構造成分であり、結合するタンパク質との相互作用により様々な生物学的プロセスを調節する（Dicker, 2014）。70 kg のヒトの HA 量は約 15 g と推定され、そのうちの 30%は 1 日でターンオーバーする（Laurent, 1991）。HA は局所及びリンパ節でヒアルロニダーゼによって分解され、残りは類洞肝内皮及び腎臓で除去される（Laurent, 1991）。HA の細胞内移行と分解は、受容体を介したエンドサイトーシス並びにリソソームのヒアルロニダーゼ及びエキソグリコシダーゼの細胞内作用によって生じる（Harris, 2004; Laurent, 1991）。

ヒアルロニダーゼ PH20 は、N-アセチルグルコサミンの C1 位とグルクロン酸の C4 位の間の β-1,4 結合の加水分解により HA を脱重合し、最終的に四糖と六糖を生成する（Frost, 2007）。HA の脱重合により細胞外マトリックスのゲル状相の粘性が一過性に低下することから、ヒアルロニダーゼ PH20 は一時的に拡散を促進する（Hechter, 1947; Holborow, 1951; Bywaters, 1951）。ヒアルロニダーゼ PH20 を他の薬物と併用皮下投与すると、薬物の拡散及び吸収が増加する（Frost, 2007）。薬物の拡散の程度は、ヒアルロニダーゼ PH20 の用量及び投与薬物の容量に依存する（Hechter, 1947; Frost, 2007）。

rHuPH20 の皮下投与での臨床使用を支持するための非臨床試験を実施した。

rHuPH20 の効力を裏付ける試験を、マウス、ラット及びミニブタを用いて実施した。いずれの動物種においても HA が発現しており、構造に差はないことから（Hascall, 2017）、薬理学的に適切な動物種と考えられた。マウスに rHuPH20 を皮内投与し、拡散促進作用及び皮膚再構築を評価した。ラットに rHuPH20 を皮内投与し、局所皮膚反応を評価した。ブタに rHuPH20 を皮下投与し、硬結及び投与部位の評価を行った。

副次的薬理試験は実施していない。安全性薬理はサルを用いた反復投与毒性試験の中で評価した。

マウス及びサルに rHuPH20 を単回及び反復投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK 及び TK、抗 rHuPH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性並びに抗 rHuPH20 抗体の交差反応性を評価した。マウスに ^{125}I-rHuPH20 を静脈内、皮内又は皮下投与したときの組織分布及び排泄も評価した。

非臨床毒性試験として、サルを用いた最長 39 週間の皮下反復投与毒性試験、マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験（EFD 試験）、マウス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試験（PPND 試験）及び幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験を GLP に準拠して実施した。また、雄授胎能、雌受胎能、EFD 及び PPND に対する抗 rHuPH20 抗体の影響をウサギで評価した。組織交差反応性試験では、これらの抗体がヒト組織に結合する可能性を評価した。また、マウス、ウサギ、ヒト組織における精子接着分子 I（SPAM1：PH20 をコードする遺伝子）／PH20 の遺伝子発現を、逆転写酵素定量ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）及び深部 RNA 配列決定（RNA-Seq）方法を用いた一連の試験（GLP 不適合）で測定し、雄性生殖器における PH20 の局在を確認した。

rHuPH20 の用量（mg/kg）は、平均比活性（110000 U/mg）を用いて U/kg に換算し併記した。rHuPH20 の全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は、ヒアルロニダーゼ活性値としてそれぞれ U/mL 及び U·h/mL で表し、試験間で比較できるようにした。^{125}I-rHuPH20 を用いた試験を除き、報告書で他の単位が用いられている場合はこれらの単位に換算した。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　エフガルチギモド

2.4.2.1.1　効力を裏付ける試験

FcRn は主に IgG 輸送と恒常性維持に関与する多機能分子である。飲作用による IgG の取り込みに続いて、IgG の Fc 部分は初期の酸性エンドソーム（pH<6.5）で高い親和性で FcRn と結合する。FcRn との結合は、IgG のリソソームによる分解を妨げ、細胞表面への輸送とリサイクルを容易にする。細胞外間隙の中性に近い pH7.4 では、IgG は FcRn 複合体から放出されると報告されている（Ulrichts, 2018）。

2.4.2.1.1.1　In vitro 薬理試験

新たな試験は実施していない。

2.4.2.1.1.2　In vivo 薬理試験

カニクイザルにエフガルチギモド単独で 20 mg/kg の用量で単回皮下投与したとき、単回静脈内投与したときと同様に血清中総 IgG 濃度の減少がみられた。いずれの投与経路でもエフガルチギモド投与後 5～7 日に PD 効果が最大となった。この試験結果より、エフガルチギモドは皮下投与でも十分な薬理作用が得られることが示された（2.6.2.2.1）。

新たに実施したメタ解析では、pH7.4 でのエフガルチギモドの FcRn への標的結合を介した総 IgG 濃度と曝露量の関係を記述したトランスレーショナル母集団 PK/PD モデルを開発した。いずれの動物もこのモデルで PK/PD の挙動が説明可能であった（2.4.3.1.7）。

2.4.2.1.2　副次的薬理試験

新たな試験は実施していない。

2.4.2.1.3　安全性薬理試験

新たな試験は実施していない。

2.4.2.1.4　薬力学的薬物相互作用

Tg32 マウスを用いて IVIg 及びトレーサー抗体とエフガルチギモドの間の薬力学的薬物相互作用を評価した。エフガルチギモドと IVIg を同時に投与したとき（試験 1：同時投与）及びエフガルチギモド投与後 2 日に IVIg を投与したとき（試験 2：連続投与）の結果は、ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.2.5 で提出済みである。新たに実施した試験 3 では、hIgG とトレーサー抗体で前処置した Tg32 マウスに hIgG（IVIg 2 g/kg、腹腔内）投与後 3 日にエフガルチギモド（20 mg/kg、静脈内）を投与した。

Tg32 マウスに IVIg 投与後 3 日にエフガルチギモドを投与したとき（試験 3）、IVIg 投与はエフガルチギモドの PK プロファイルに影響を及ぼさなかった。一方、エフガルチギモドによりマウスの hIgG 曝露量はわずかに減少した。

提出済みの試験 1 及び試験 2 の結果に加えて今回実施した試験 3 の結果は、IVIg 投与後のどのタイミングでもエフガルチギモドによる治療を開始できることを示唆している。さらに、エフガルチギモドで治療した患者のレスキュー療法として IVIg を用いることが可能であると考えられた。

2.4.2.2　rHuPH20

2.4.2.2.1　効力を裏付ける試験

NCr nu/nu マウス及び Sprague Dawley ラットでは、皮内の構造がヒトの皮下スペースと類似しており、皮内投与は色素拡散を可視化しやすいことから、投与経路として皮内投与を選択した。トレーサー色素の拡散を用いた手法は、ヌードマウス皮膚でのヒアルロニダーゼの薬理活性の評価法として確立されている（Frost, 2007）。また、ユカタン系ミニブタは、皮膚がヒトと解剖学的に類似しており、臨床相当容量の治療用タンパク質を投与可能な十分な体重及び大きさであることから、皮下投与試験の動物種として選択した（Kang, 2013）。rHuPH20 の薬理試験の概要を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1　rHuPH20 の薬理試験の概要

Type of Study	Test System	Method of Administration	Report
Primary Pharmacodynamics			
Dye dispersion/dermal reconstitution	Mouse/NCr nu/nu	ID	R08103
Dye dispersion	Mouse/NCr nu/nu	ID	R09022
Dye dispersion	Mouse/NCr nu/nu	ID	R09109
Local skin reaction assessment	Rat/Sprague Dawley	ID	R09090
Induration assessment	Pig/Yucatan Mini	SC	11018
Induration assessment	Pig/Yucatan Mini	SC	11028
Local infusion site evaluation	Pig/Yucatan Mini	SC	11125
Secondary Pharmacodynamics			
Secondary pharmacodynamics studies were not conducted.			
Safety Pharmacology			
Safety pharmacology was assessed as part of the pivotal repeat-dose toxicity studies. A summary of the safety pharmacology findings is provided in the toxicology written summaries (Section 2.6.6).			

ID = intradermal; SC = subcutaneous.
[a] Primary pharmacodynamics studies were non-GLP.

これらの試験では、皮内でのトリパンブルー色素拡散の評価により、rHuPH20の投与は局所において一過性に拡散を促進させることが示された。rHuPH20の皮内又は皮下投与後の投与部位に病理組織学的変化は認められなかった。

マウスに rHuPH20 を皮内投与したところ、用量に応じた色素拡散面積の増大が溶媒対照群と比較して認められた。rHuPH20（4 U）の皮内投与による拡散促進作用は投与後 6 時間まで認められたが、投与後 18 時間には皮下組織の拡散バリアの再構築がみられた（2.6.2.2.2.1）。マウスに rHuPH20（0.04～1200 U）を皮内投与したところ、遠位部に投与した色素の拡散への影響はみられなかったことから、rHuPH20の拡散促進作用は局所性であることが示された（2.6.2.2.2.2）。rHuPH20（80 U）の皮内における拡散促進作用は、事前に静脈内投与した抗 rHuPH20 抗体による影響を受けなかった（2.6.2.2.2.3）。

ラットに rHuPH20 を皮内投与後、投与部位の病理組織学的検査を実施したところ、rHuPH20 に関連した局所皮膚反応は認められなかった（2.6.2.2.2.4）。

ブタを用いて、rHuPH20（2240～100000 U）の存在下又は非存在下で大量のヒト免疫グロブリン G（IgG；50～300 mL）を皮下投与したときの投与部位の皮膚反応を評価した。rHuPH20の皮下投与により、投与部位の腫脹の軽減、拡散容積の増大、皮膚の柔軟性及び血流量の維持が認められ、大量の IgG 皮下投与に関連した硬結の発現頻度が低下した（2.6.2.2.2.5、2.6.2.2.2.6、2.6.2.2.2.7）。

以上、マウス、ラット及びブタを用いた薬理試験の結果から、rHuPH20は局所において一過性に拡散を促進する酵素であり、併用薬の皮下投与を容易にすることが示された。

2.4.2.2.2　副次的薬理試験及び安全性薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

rHuPH20 の独立した安全性薬理試験は実施していないが、カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験（R09050）の中で評価した結果、最高2 mg/kg/doseの用量で安全性薬理パラメータ（中枢神経系症状、心電図、心拍数、血圧及び呼吸数）に有害作用は認められなかった（2.6.6.3.2.2）。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　エフガルチギモド

2.4.3.1.1　分析法

カニクイザル血清中エフガルチギモド濃度を ELISA 又は ECLIA により測定した。詳細は 2.6.4.2.1 及び 2.6.5.2 に示す。さらに、抗エフガルチギモド抗体産生による PK への影響について評価するため、抗エフガルチギモド抗体の測定法を確立した（2.6.4.2.2）。

2.4.3.1.2　吸収

カニクイザルにエフガルチギモド単独で単回皮下投与したとき、静脈内投与で観察された重要な PK 特性が確認された（2.6.4.3.1）。

サルを用いた rHuPH20 混合 12 週間反復皮下投与毒性試験では、性差は認められず、明らかな蓄積は認められなかった。rHuPH20 は、エフガルチギモドの TK にほとんど影響を及ぼさなかった（2.6.6.3.1.2）。

カニクイザルの 11 週間反復静脈内投与 TDAR 試験の TK を評価した。AUC 及び C_{max} は用量に応じて増加した。性差は認められず、明らかな蓄積は認められなかった（2.6.6.3.1.3）。

2.4.3.1.3　分布

実施せず。ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.4.3.3 にその理由を示す。

2.4.3.1.4　代謝

実施せず。ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.4.3.4 にその理由を示す。

2.4.3.1.5　排泄

ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.4.3.5 で提出しており、新たな試験は実施していない。

2.4.3.1.6　薬物動態学的薬物相互作用試験

エフガルチギモドがモノクローナル抗体医薬又は IVIg の PK に影響を及ぼす可能性を否定できない。そこで、Tg32 マウスを用いて IVIg 投与後 3 日にエフガルチギモドを投与したときの PK/PD 試験を実施した。試験の詳細は、2.4.2.1.4 に示す。

2.4.3.1.7　その他の薬物動態試験

エフガルチギモドの薬理作用での種差を検討するため、マウス、ラット、ウサギ、カニクイザル及びヒト血清中エフガルチギモド PK と pH7.4 でのエフガルチギモドの FcRn への標的結合を介した総 IgG 濃度との関係を記述したトランスレーショナル母集団 PK/PD モデルを開発した（2.6.4.8）。このモデルでは、エフガルチギモドの PK プロファイルの特徴である二相性の消失相を示し、いずれの動物でも PK/PD の挙動を一貫して説明可能であった。

このモデルでは、総 IgG 濃度の減少と FcRn 占有率がよく相関していた。カニクイザルの場合、トランスレーショナル PK/PD モデルに基づくと、エフガルチギモドを 100 mg/kg の用量で週 1 回静脈内投与したとき、エフガルチギモドによる FcRn 占有率は 97%であることが推定された。この結果から、総 IgG 濃度はベースライン濃度と比較して 28.4%になることが推定され、静脈内投与毒性試験で検討した最高用量 100 mg/kg が適切な用量であることが確認された。エフガルチギモド単独を皮下投与したときのバイオアベイラビリティは 50%であった（2.6.4.3.1）。エフガルチギモドの PK が線形であることを考慮すると、エフガルチギモドを 100 mg/kg の用量で皮下投与したときの曝露量は、50 mg/kg の用量で静脈内投与したときの曝露量と同様であることを意味しており、FcRn 占有率は 91.4%を超えることが示唆された（2.6.5.16）。

2.4.3.1.8　動物とヒトの全身曝露量の比較

ヒト PK データとサル TK データを比較して曝露量比を算出した（2.6.4.3.1.3）。ヒトの曝露量として、健康被験者に週 1 回計 4 回エフガルチギモド単独で 10 mg/kg 静脈内投与又は rHuPH20 含有エフガルチギモドを 1000 mg*皮下投与したときの PK データ（ARGX-113-1907）を用いた。サルの曝露量として、カニクイザル 26 週間反復静脈内投与毒性試験［ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.3.2-3（[redacted]33260）］の 100 mg/kg（NOAEL）の TK データを用いた。なお、サルとヒトの曝露量比をできるだけ正確に算出するため、サル AUC については台形法（Linear up-log down）を用いて再計算した（[redacted]22046）。サル静脈内投与時の曝露量とヒトにエフガルチギモドを静脈内又は皮下投与したときの曝露量との比は、C_{max} 比で 12 又は 52 倍、AUC 比でいずれも 5 倍であった。

エフガルチギモドの毒性試験では、臨床使用に際して懸念される毒性所見が認められなかったことから、バイオテクノロジー応用医薬品としては十分な安全域が確保できていると考えられた。

2.4.3.2　rHuPH20

2.4.3.2.1　分析法

マウス血漿中 rHuPH20 を測定するため、ビオチン化 HA（bHA）基質を用いた発色法により rHuPH20 に関連したヒアルロニダーゼ活性を測定し、血漿中安定性を評価した。カニクイザル血漿中 rHuPH20 を測定するため、血漿中安定性の評価を含め、[redacted] [redacted] 比濁法を用いてカニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ活性定量法をバリデートした（2.6.4.2.4）。

^{125}I-rHuPH20 を用いて、PK 及び組織分布を評価した。マウス血漿中の ^{125}I-rHuPH20 に由来する rHuPH20 を測定するため、改良比濁法を用いてマウス血漿中ヒアルロニダーゼ活性定量法をバリデートした（2.6.4.2.5）。

マウス及びウサギ血漿中抗 rHuPH20 抗体を測定するため、ECLIA を用いて、定量法をバリデートした（2.6.4.2.6.1）。この方法では、1) 初期スクリーニング、2) 確認試験、3) 相対力価の測定（確認試験で陽性と判定された試料のみ）の多段階で評価した。

カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験でのカニクイザル血漿中抗 rHuPH20 抗体を測定するために、定性的ブリッジング ELISA を用いて定量法をバリデートした（2.6.4.2.6.1）。

サンドイッチフォーマット ECL アッセイを用いて、マウス及びウサギで抗 rHuPH20 抗体の PH20 パラログの組換え型に対する交差反応性を評価した。マウスでは精子関連ヒアルロニダーゼであるマウス PH20 及びマウス Hyal5 を、ウサギではウサギ PH20 を評価した。いずれの定量法も特性は評価したが、バリデーションは実施しなかった（2.6.4.2.6.2）。

---

* 本申請ではエフガルチギモド IV 10 mg/kg からエフガルチギモド PH20 SC 1000 mg へのブリッジングを行うことを基本戦略とした。エフガルチギモド PH20 SC 1000 mg を投与する試験計画であった ARGX-113-1907 試験ではエフガルチギモドとして 1006.5 mg（エフガルチギモド濃度が [redacted] mg/mL の製剤を用いて [redacted] mL）、ARGX-113-2001 試験及び ARGX-113-2002 試験では 1008 mg（エフガルチギモド濃度が 180 mg/mL の製剤を用いて 5.6 mL）が投与されたが、本項では試験計画及び報告書の記載に従って 1000 mg と記載した。なお、推奨用量として、主要試験である ARGX-113-2001 試験で投与された用量に基づき 1008 mg を選択した。

マウス、ウサギ及びサル血漿中抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性を測定するため、[redacted] 比濁法を用いて定量法をバリデートした（2.6.4.2.6.3）。

2.4.3.2.2　吸収

2.4.3.2.2.1　単回投与 PK 試験

CD-1 マウス及びカニクイザルに rHuPH20 をそれぞれ 0.4 及び 0.3 mg/kg（それぞれ 44000 及び 33000 U/kg）の用量で単回静脈内投与したとき、血中からの rHuPH20 の消失は速やかで、血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の $t_{1/2}$ は、マウスで約 2 分、カニクイザルで約 5 分であった（2.6.4.3.2.1）。カニクイザルではさらに 3、15 又は 30 mg/kg（330000、1650000 又は 3300000 U/kg）で単回静脈内投与したとき、線形及び飽和クリアランスの非線形過程を有する 1-コンパートメントモデルで記述される非線形 PK プロファイルを示した。飽和クリアランスの非線形過程の K_m は、1118 U/mL と推定された。

雌カニクイザルに rHuPH20 を 1、3、10 又は 30 mg/kg（110000、330000、1100000 又は 3300000 U/kg）を単回皮下投与したときの rHuPH20 の全身曝露について評価した。3～30 mg/kg の範囲で曝露量は用量に応じて増加したが、1 mg/kg では曝露量が低すぎて十分な評価ができなかった。1-コンパートメントモデルを用いて高用量（3、10 及び 30 mg/kg）の曝露量から推定したバイオアベイラビリティは、それぞれ 3.9、1.8 及び 1.5%であった。皮下投与した試験の最高用量でも、血漿中ヒアルロニダーゼ活性値は K_m（1118 U/mL）未満であった。

マウス及びサルに rHuPH20 をそれぞれ 0.4 及び 0.3 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、rHuPH20 は血中から速やかに消失した。サルに rHuPH20 を単回皮下投与したときの、投与量に対する全身曝露量は低かった。

2.4.3.2.2.2　反復投与 TK 試験

カニクイザルを用いた 7 日間反復投与毒性試験の一環として、rHuPH20 を 5 mg/kg（550000 U/kg）の用量で 1 日 1 回反復静脈内又は皮下投与したときの TK を評価した（2.6.6.3.2.1）。静脈内投与したときの Day 1 及び 7 の V_{ss} は、それぞれ 17.0 及び 16.7 mL/kg であった。皮下投与したときの t_{max} 中央値は 1 時間であった。静脈内及び皮下投与のいずれの投与経路でも、Day 1 と比較して Day 7 の曝露量は約 25%減少した。皮下投与したときの Day 1 及び 7 のバイオアベイラビリティは、$AUC_{0\text{-last}}$ の比較で、それぞれ 5.44 及び 5.75%で、rHuPH20 を皮下投与したときの全身曝露量は限定的で、静脈内投与と比較して皮下投与したときの曝露量は低かった。

カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験の一環として、rHuPH20 を 0.02 、0.2 又は 2 mg/kg（2200、22000、220000 U/kg）の用量で週 1 回反復皮下投与したときの rHuPH20 の TK を評価した（2.6.6.3.2.2）。試験期間を通して、ベースライン補正したヒアルロニダーゼ活性値は、雌雄ともに 0.02 mg/kg 群及び 0.2 mg/kg 群で LLOQ（< 10 U/mL）未満で、2 mg/kg 群のみ血漿中にヒアルロニダーゼ活性が検出された。抗 rHuPH20 抗体価は、投与開始から 6 週間後に全群で検出され、ヒアルロニダーゼ中和活性は投与開始から 13 週間後におおむね検出された。抗 rHuPH20 抗体価及びヒアルロニダーゼ中和活性はいずれも用量に相関し、rHuPH20 の反復投与によりおおむね経時的に増加した。2 mg/kg 群では、抗

rHuPH20抗体及びヒアルロニダーゼ中和活性が認められたにもかかわらず、雄では少なくとも6ヵ月間、雌では9ヵ月間血漿中ヒアルロニダーゼ活性が認められた。しかし、皮下投与したとき rHuPH20 の大部分が投与部位に分布し、rHuPH20 の全身曝露量は低いと考えられた。

CD-1 マウスを用いた皮下投与生殖発生毒性試験の一環として、rHuPH20 の TK を評価した。rHuPH20 は、DG 6～15 に 1 日 1 回、3、9 又は 18 mg/kg（330000 、990000 又は 1980000 U/kg）の用量で皮下投与した（2.6.6.6.2.2）。rHuPH20 の全身曝露量は、試験した用量範囲で概ね用量に応じて増加した。3、9 及び 18 mg/kg の用量での C_{max} 平均値は、DG 6 でそれぞれ 3.4、30.5 及び 49.6 U/mL、DG 15 でそれぞれ 20.9、17.1 及び 99.2 U/mL であった。$AUC_{0\text{-}24}$ 平均値は、DG 6 でそれぞれ 5.5、45.3 及び 120.0 U·h/mL、DG 15 でそれぞれ 55.1、79.0 及び 363.0 U·h/mL であった。

抗 rHuPH20 抗体について、血漿試料のサブセットの後向き解析も実施した。いずれのマウスでも DG 6 で抗 rHuPH20 抗体陰性（抗体価 50 未満）、DG 15 で陽性（抗体価 200～3200000 以上）であった。

カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与 TK 試験では、rHuPH20 の全身曝露は限定的であり、抗 rHuPH20 抗体産生による曝露量の減少が認められた。マウスを用いた EFD 試験では抗 rHuPH20 抗体が検出されたが、用量に応じて曝露量は増加した。

2.4.3.2.3　分布

マウスの皮内スペースはヒト皮下スペースと類似していることから、ヒアルロニダーゼによる薬物拡散作用のモデルとして、マウスに rHuPH20 を皮内投与して局所分布を評価した（Bookbinder, 2006）。雌無胸腺 NCr nu/nu マウスの左背部に rHuPH20 を 2000 U/mL（0.032 mg/kg 又は 80 U/例に相当）で 40 µL 皮内投与した（2.6.4.4.2）。投与部位の皮膚でヒアルロニダーゼ活性が認められ、投与後 1～15 分で最大値を示し、その後急速に減少した。ヒアルロニダーゼ活性は投与後 4 時間で LLOQ（約 0.7 U/mL 又は 0.02 U/mg 皮膚）未満であった。皮膚での rHuPH20 の $t_{1/2}$ は 12.9 分と推定された。リンパ節でのヒアルロニダーゼ活性は低く、ほとんどの血漿試料（40 検体中 39 検体）でヒアルロニダーゼ活性は認められなかった。この結果から、マウスに rHuPH20 を皮内投与したとき、投与部位の皮膚で一過性のヒアルロニダーゼ活性が認められたものの、全身曝露量はわずかであることが示唆された。

CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を 4 µg/例（18 µCi/例；ヒアルロニダーゼ活性 200 U/例）で単回静脈内投与、^{125}I-rHuPH20 を 1.33 µg/例（6 µCi/例；ヒアルロニダーゼ活性 400 U/例）で単回皮内投与又は ^{125}I-rHuPH20 を 1.73 µg/例（5 µCi/例；ヒアルロニダーゼ活性 100 U/例）で単回皮内又は皮下投与したときの rHuPH20 の組織分布を評価した（2.6.4.4.2）。これらの分布試験での放射能を LSC で測定した。3 試験とも放射能は投与後 2～5 分に組織に分布し、放射能の排泄は速やかであった。投与放射能の大部分は尿及びケージ洗浄液（ケージ壁に付着した乾燥尿）中に回収され、少量が糞中に回収された。投与放射能に対する割合は、投与部位を除いて、肝臓、肺、膀胱内容物、腎臓及び甲状腺/副甲状腺で高かった。

2.4.3.2.4　代謝

rHuPH20はバイオテクノロジー応用医薬品に該当するため、rHuPH20の独立した代謝試験を実施していない（2.6.4.5.2）。

2.4.3.2.5　排泄

rHuPH20 の排泄試験は、分布試験（2.4.3.2.3）の中で評価した。放射能の大部分は尿及び糞中に回収された（2.6.4.6.2）。

2.4.3.2.6　薬物動態学的薬物相互作用

rHuPH20 の PK に対する他の薬剤の影響を評価するための試験及び rHuPH20 を用いた薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.4.3.2.7　動物とヒトの全身曝露量の比較

高用量で実施した rHuPH20 のマウス及びサルを用いた反復投与毒性試験では、rHuPH20 の全身曝露が確認された。一方、臨床用量（11200 U）では rHuPH20 はヒト血中で LLOQ 未満であり、本申請に際して rHuPH20 のヒト PK は評価しなかった（2.5.3）。したがって、安全域の推定値は、曝露パラメータの代わりに mg/kg（U/kg）及びヒト等価用量（HED）に基づき算出した。反復投与毒性試験、EFD 試験及び PPND 試験での NOAEL は、エフガルチギモド PH20 SC でのヒトでの rHuPH20 の用量である 11200 U の約 168～1109 倍であった（2.6.4.3.2.3）。

2.4.4　毒性試験

2.4.4.1　エフガルチギモド

ラット及びカニクイザルにそれぞれ最大 100 mg/kg までの用量のエフガルチギモドを、最長 4 週間（ラット）又は 26 週間（カニクイザル）にわたり静脈内投与した反復投与毒性試験の成績は、エフガルチギモド点滴静注製剤の製造販売承認申請時に提出されており、臨床使用に際して懸念される毒性所見は認められなかった。これらの試験では、エフガルチギモド投与によって IgA、IgM 及びアルブミンの低下は認められず、リンパ球イムノフェノタイピングを含む血液学的検査でも異常を示唆する徴候も認められなかった。

毒性試験に用いた最高用量の 100 mg/kg は、受容体占有率が約 97%となる用量であることから（2.4.3.1.7）、最大薬理作用が発揮されていると考えられるため、最高用量として妥当であると考えられる。週 1 回の投与頻度は臨床の投与頻度を反映している。静脈内投与は最も過酷な全身曝露をもたらすこと及び皮下投与は臨床でのエフガルチギモド皮下投与用製剤で意図された投与経路であることからそれぞれ選択した。また、筋肉内投与は皮下投与する際に投与過誤の可能性のある投与経路として選択した。

2.4.4.1.1　単回投与毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.4.4.1.2　反復投与毒性試験

エフガルチギモドの曝露量は静脈内投与したとき最も高くなる。rHuPH20は適切な用量では局所投与しても投与部からほとんど吸収されず、その分布と作用は局所的であることが示されている（Kang, 2021）。したがって、カニクイザルにエフガルチギモドを静脈内投与した 26 週間反復投与毒性試験（エフガルチギモド点滴静注製剤の製造販売承認申請時に提出済み）は、エフガルチギモドの全身毒性を把握する上で最も適切な試験であると考えられた。エフガルチギモドの無毒性量（NOAEL）は 100 mg/kg q7d（試験した最高用量）であった。

エフガルチギモドを単独又は rHuPH20 を混合して、週 1 回の頻度で皮下投与したカニクイザルを用いた 12 週間反復投与毒性試験の成績を以下に示す。

- 雌雄カニクイザルに rHuPH20 単独（対照群：2000 U/mL）、エフガルチギモド SC 単独（100 mg/kg）又はエフガルチギモド SC（30 及び 100 mg/kg）＋rHuPH20（2000 U/mL）をそれぞれ週 1 回の投与頻度で 12 週間にわたり皮下投与した後、12 週間休薬した。rHuPH20は、エフガルチギモドの局所での拡散及び皮下からの吸収を促進する目的で用時混合した。

- エフガルチギモドSCの調製に用いた緩衝液（pH6.0）の組成は、L-ヒスチジン、塩化ナトリウム、ショ糖、L-メチオニン及びポリソルベート 20 であった（2.6.6.3.1.2）。本製剤は、臨床で使用される製剤を代表するものと考えられた。不純物を評価した結果、ヒトへの使用に対するリスクは確認されなかった（2.4.4.1.7）。

- 全身毒性を示唆する毒性所見はみられず、忍容性は良好であった。対照群及び回復群を含む全ての試験群で脾臓及びリンパ節で用量依存性のない病理組織学的変化がみられたことから、これら所見は当該動物種の背景所見である可能性が最も高い。さらにこれらの変化が背景所見として報告されていること（Ols, 2020; Chamanza, 2010）、及びカニクイザルにエフガルチギモドを 100 mg/kg の用量で静脈内投与した 26 週間反復投与毒性試験（エフガルチギモド点滴静注製剤の初回製造販売承認申請添付資料）又はrHuPH20 を 45000 U/回を投与した霊長類では認められなかったこと（Frost, 2007）からも支持されるものと考えられる。なお、皮下投与後のカニクイザルにおけるヒトタンパク質に対する反応性変化である可能性も考えられた（2.6.6.9）（Ols, 2020; Everds, 2019）。対照群を除く全用量群の動物で検出された抗エフガルチギモド抗体と上記所見との明らかな関連性は認められなかった。局所刺激性については 2.4.4.1.6 で考察する。

モデル抗原（KLH）に対する TDAR に対するエフガルチギモド（用量：100 mg/kg）投与による影響の有無について、カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験で検討した。この試験には 9 週間の回復期間を設けた（2.6.6.3.1.3）。エフガルチギモド及び溶媒対照群に投与期間の Day 28 及び Day 56 並びに回復期間の Day 29 に、KLH（10 mg/回）を皮下投与した。

- 最悪の場合を想定して、カニクイザルでは、最大の薬力学的効果（最大の IgG 減少）に達した時点（Day 28）に KLH を投与した。初回 KLH 免疫後の液性免疫（IgM、IgG）及び細胞性免疫応答にはエフガルチギモド投与群と対照群では明らかな差は認められなかった。

- 最大の薬力学的効果に達していた投与期間の Day 56 に、2 回目の KLH を接種したところ、エフガルチギモド投与群では KLH 特異的 IgG レベルが対照群よりわずかに低かった。IgM と T 細胞応答はエフガルチギモド投与によって減少しなかった。
- 総 IgG 濃度が試験開始時の濃度には完全に戻っていない時期である回復期間の Day 29 の KLH 追加接種後、エフガルチギモド投与群と溶媒対照群の間で IgG を含む全ての免疫応答は類似していたことから、エフガルチギモド投与が免疫学的機能を損なわないことが確認され、IgG の一過性の減少が唯一の影響であることが示された。
- これらのデータは、抗 FcRn モノクローナル抗体が、抗 FcRn 抗体の前又は同時に投与されたモデル抗原に対する液性免疫応答の IgG にのみに影響を及ぼすことを報告した文献データと類似していた（Nixon, 2015; Smith. 2018）。

反復投与毒性試験の結果を要約すると、カニクイザルにエフガルチギモドを単独又は rHuPH20 と混合して反復皮下投与した 12 週間反復投与毒性試験の結果は、エフガルチギモド点滴静注製剤の製造販売承認申請時に提出された反復投与毒性試験で得られた結論と同様であった。カニクイザルにエフガルチギモドを静脈内投与したときの TDAR に対する影響の有無を評価したところ、エフガルチギモドの薬理作用から予想された IgG レベルの低下を除いて、免疫応答に影響は認められなかった。

2.4.4.1.3　遺伝毒性試験

実施せず。

2.4.4.1.4　がん原性試験

実施せず。

2.4.4.1.5　生殖発生毒性試験

新たな試験は実施していない。

2.4.4.1.6　局所刺激性試験

ウサギを用いたエフガルチギモドの局所刺激試験（GLP 遵守）を実施した（2.6.6.7.1.1）。2000 U/mL の rHuPH20 と混合したエフガルチギモドを 180 mg/mL の濃度で、皮下投与では 1 mL、筋肉内投与では 0.25 mL を単回投与した。個体内比較のため、各例には溶媒対照として 2000 U/mL の rHuPH20 を含む調製用緩衝液を皮下投与では 1 mL、筋肉内投与では 0.25 mL の容量でそれぞれ投与した。局所刺激性試験における調製用緩衝液（pH6.0）の組成は、ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩一水和物（20 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）及びポリソルベート 20［0.03%（w/v）］であり、臨床で使用される製剤中のポリソルベート 20 含量率が 0.04%であることを除き、臨床用製剤で用いられている緩衝液と同様であった。この非臨床試験用投与液と臨床用製剤との処方組成のわずかな違いは、局所刺激性の評価に影響を及ぼさないと考えられる。本試験では、投与部位の肉眼的及び病理組織学的検査でもエフガルチギモド投与に関連した影響は認められず、Draize スコアスコアリングにより評価した投与部の肉眼的変化（紅斑、痂皮、浮腫）も認められなかった。

カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.2）では、反復皮下投与時の局所刺激性も併せて評価した。エフガルチギモド SC 単独（100 mg/kg）又はエフガルチギモド SC（100 mg/kg）+rHuPH20（2000 U/mL）を週 1 回の頻度で皮下投与した。調製用緩衝液は局所刺激性試験と同じであった。投与当日に一過性の浮腫と投与日以外の観察日では、一過性の腫脹が散見されたが、大部分はエフガルチギモド SC 単独投与群で認められ、エフガルチギモド SC+rHuPH20 投与群ではまれであった。一方、紅斑、痂皮その他の臨床徴候は認められず、観察の重症度は経時的に変化せず、同一動物で再発しない場合もあった。これらの観察所見は、皮下投与後の物理的な膨隆を表している可能性が最も高く、これは文献で報告されているように拡散促進剤なしで被験物質を投与した場合により顕著である（Connor, 2020）。反復投与後の投与部位の病理学的検査及び病理組織学的検査では、皮下組織及び真皮に軽微から軽度の炎症細胞浸潤を伴う出血又は肥厚が認められたが、これらの影響には回復性が認められた。これらは、免疫系機能が一過性かつ局所的に活性化したことを示す所見と考えられ（Ols, 2020）、免疫学的に外来の異種タンパク質であると認識されるヒト由来タンパク質をサルに投与した場合に予想される所見であった。軽微な炎症細胞浸潤及びその他の所見は針穿刺による外傷の影響として生理食塩液投与後でも発現する可能性がある（Ramot, 2019）。

非臨床試験成績から、エフガルチギモド皮下投与製剤によるヒトでの局所刺激性のリスクは低いと考えられる。

2.4.4.1.7　その他の毒性試験

毒性試験に用いられたバッチ中の不純物のレベルを、臨床試験に用いられた基準バッチ及び市販製剤として予定しているバッチのレベルと比較した。不純物は許容範囲内であり、非臨床毒性試験において安全性所見は認められなかった（2.6.6.8.1.1）。

2.4.4.2　rHuPH20

rHuPH20 の重要な試験として、週 1 回の皮下投与によるサルの 39 週間反復投与毒性試験、皮下連日投与によるマウスの EFD 試験及び PPND 試験、連日投与又は週 1 回皮下投与による幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験（8 ヵ月間反復投与）を実施した。これらの試験は、ICH ガイドラインに準拠し、GLP に遵守して実施した。加えて、サルを用いた連日静脈内又は皮下投与による 7 日間反復投与毒性試験、マウスを用いた連日皮下投与による EFD 用量設定試験及び幼若マウスを用いた連日又は週 1 回皮下投与による用量設定試験を実施した。さらに、抗 rHuPH20 抗体の内在性 PH20 に対する交差反応性を、生殖発生毒性試験、組織交差反応性試験及び遺伝子発現試験の中で評価した。ウサギは、母体 IgG の胎盤移行時期がヒトと類似していることから（DeSesso, 2012）、受胎能、EFD 及び出生児の成長・成熟に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響を評価するために計画された試験で使用した。これらのウサギの試験では、rHuPH20 は抗 rHuPH20 抗体産生の有無を評価する目的で投与していたため、rHuPH20 の曝露量は評価しなかった。

HA はいずれの動物種においても発現しており、構造に差はないことから（Hascall, 2017）、マウスとカニクイザルは rHuPH20 の評価に薬理学的に適切な動物種であると考えられたため選択した。

ヒト PH20 は、カニクイザル、ウサギ、マウス PH20 とそれぞれ 89%、71%、58%の配列同一性を有している（NCBI の Basic Local Alignment Search Tool による）。カニクイザルは、ヒトの配列と同一性が高いことから、他の動物種と比較して免疫原性が低いことが期待されたため、反復投与毒性試験の供試動物種として選択した。マウスは EFD 試験及び PPND 試験に使用し、rHuPH20 の薬理試験にも使用された。

2.4.4.2.1　単回投与毒性試験

rHuPH20 の単回投与毒性試験は実施しなかったが、雌カニクイザルを用いた PK 試験（2.6.4.3.2.1.2）では、rHuPH20 を最高 30 mg/kg（3300000 U/kg）の用量で単回静脈内又は皮下投与したときの忍容性は良好であった。また、カニクイザルを用いた 7 日間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.1）では、rHuPH20 を 5 mg/kg（550000 U/kg）の用量で 1 日 1 回静脈内又は皮下投与しても、全身及び投与部位に rHuPH20 投与によると考えられる影響は認められなかった。

2.4.4.2.2　反復投与毒性試験

カニクイザルを用いた 7 日間連日反復投与試験（静脈内又は皮下投与）及び 4 週間の休薬期間を設けた 39 週間週 1 回反復投与試験（皮下投与）で rHuPH20 の反復投与毒性を評価した。これらの試験では全身毒性及び投与部位の局所刺激性に関して、rHuPH20 は最高用量（5 mg/kg/dose）まで良好な忍容性を示した。7 日間又は 39 週間反復投与毒性試験のいずれにおいても、死亡及び rHuPH20 の有害作用は認められなかった。

7 日間反復投与毒性試験では、カニクイザル（雌雄各 2 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照）及び 5 mg/kg/dose（550000 U/dose）の用量で 7 日間連日静脈内又は皮下投与した（2.6.6.3.2.1）。静脈内投与後では血漿中に高いヒアルロニダーゼ活性が認められ、平均 C_{max} は Day 1 及び 7 でそれぞれ 200.0 及び 115.0 U/mL、$AUC_{0\text{-last}}$ はそれぞれ 11800.0 及び 8733.0 U·h/mL であった。一方、皮下投与後の曝露量は低く、Day 1 及び 7 の平均 $AUC_{0\text{-last}}$ はそれぞれ 641.7 及び 501.7 U·h/mL であった。抗 rHuPH20 抗体を測定しなかったが、静脈内及び皮下投与による 7 日間の連日投与後に AUC の減少（約 25%）が認められた。しかし、全身曝露が概ね一貫して認められたことから、本試験は rHuPH20 の高用量の静脈内及び皮下投与に関連する潜在的リスクを評価するのに適切であったと考えている。以上のように、rHuPH20 を 5 mg/kg/dose の用量で、7 日間にわたり静脈内又は皮下投与したときの忍容性は良好であった。

4 週間の回復期間を設けた 39 週間反復投与毒性試験では、カニクイザル（雌雄各 6 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照）、0.02、0.2 及び 2 mg/kg/dose（2200、22000 及び 220000 U/kg/dose）の用量で週 1 回、39 週間にわたり反復皮下投与した（2.6.6.3.2.1）。投与部位に認められた病理組織学的変化を除いて、rHuPH20 投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。投与部位では、rHuPH20 投与に関連すると考えられる変化として、皮下の血管周囲に軽微なリンパ形質細胞浸潤が、2 mg/kg/dose 群では雌雄でそれぞれ 4/4 例に、0.2 mg/kg/dose 群では雌雄でそれぞれ 1/4 例に認められたが、4 週間の回復期間終了後には、2 mg/kg/dose 群の雄 2 例中 1 例及び雌 2 例中 0 例でみられたのみであったことから、回復性が示された。さらに、所見の重症度は軽微であったことから、有害ではないと考えられた。

週 1 回反復皮下投与による rHuPH20 の全身曝露は 2 mg/kg/dose 群で限定的に認められた。血漿中ヒアルロニダーゼ活性値は 0.02 及び 0.2 mg/kg/dose 群ではほとんどのサンプルで定量下限未満であったが、2 mg/kg/dose 群では少なくとも雄で 6 ヵ月間、雌では 9 ヵ月間認められた。2 mg/kg/dose 群では、Day 1～85 に血漿中ヒアルロニダーゼ活性が増加し、その後 Day 183 及び 267 に減少した。rHuPH20 投与群の雌雄で最高 C_{max} は Day 85 に観察された。2 mg/kg/dose 群の雄では、Day 1 及び Day 183 の平均 C_{max} はそれぞれ 12.5 及び 12.0 U/mL、Day 1 及び 183 の平均 $AUC_{0–last}$ はそれぞれ 20.5 及び 89.6 U·h/mL であった。Day 267 の雄ではヒアルロニダーゼ活性は LLOQ 未満であったが、雌では Day 267 まで測定可能であった。2 mg/kg/dose 群の雌では、Day 1 及び 267 の平均 C_{max} はそれぞれ 20.8 及び 10.0 U/mL、Day 1 及び 267 の平均 $AUC_{0–last}$ はそれぞれ 47.8 及び 56.2 U·h/mL であった。反復皮下投与後にみられた rHuPH20 曝露量の減少は、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性と関連していたが、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性に関連した有害作用は認められなかった。本試験における NOAEL は 2 mg/kg/dose であった。

以上のように、カニクイザルを用いた 7 日間又は 39 週間反復投与毒性試験では、rHuPH20 の投与によると考えられる有害な影響は認められなかった。

2.4.4.2.3　遺伝毒性試験

rHuPH20 は天然アミノ酸から構成されるタンパク質であることから、ICH S6（R1）ガイドラインに準拠して、rHuPH20 の遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.2.4　がん原性試験

rHuPH20 のがん原性試験は実施しなかった

「医薬品のがん原性試験に関するガイダンスの改正に係る前向き評価への参加協力依頼の改訂について（協力依頼）」（平成 28 年 2 月 17 日付　事務連絡）の付録 1「がん原性評価文書で検討する証拠の重み付（WOE）の要素」を参考に考察した結果、rHuPH20 にはがん原性に関して懸念されるリスクはないと考えている。すなわち、幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験（2.6.6.6.2.4.2）を含む反復投与毒性試験では、細胞肥大、びまん性又は限局性の細胞過形成、持続性の組織傷害又は慢性炎症、前腫瘍性病変並びに腫瘍は認められなかった。さらに、非臨床試験及び臨床試験において、内因性ホルモンの攪乱や免疫抑制に関連すると考えられる明らかな影響も認められなかった。したがって、非臨床試験成績、ヒトに臨床予定用量で皮下投与した時の血中 rHuPH20 は LLOQ 未満であること（2.5.3）、並びに rHuPH20 及びヒアルロニダーゼの広範な臨床使用経験での安全性プロファイルに基づき、rHuPH20 の皮下投与によるがん原性リスクは低いと考えられる。

2.4.4.2.5　生殖発生毒性試験

rHuPH20 の受胎能及び初期胚発生に関する試験は実施しなかった。雌雄の受胎能及び胎児発生に対する影響の有無について、幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験（2.6.6.6.2.4.2）で評価した結果、交配及び受胎能、精子検査パラメータ（精子の運動性、濃度及び形態）、臓器重量、卵巣及び子宮のパラメータ、胎児関連パラメータ、剖検並びに病理組織学的検査に rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。さらに、受胎能への影響について、サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.2.2）の

成績に基づいて評価した。サルに rHuPH20 を最高 2 mg/kg/dose（220000 U/kg/dose）の用量で週 1 回 39 週間皮下投与したところ、雄の精巣サイズ、精子検査（精子の濃度、運動性及び形態）及び黄体形成ホルモン値、雌の月経周期並びに雌雄生殖器の病理組織学的検査に rHuPH20 投与によると考えられる影響は認められなかった。

CD-1 マウスを用いて rHuPH20 の EFD 試験のための用量設定試験、EFD 試験及び PPND 試験を実施した。EFD 試験のための用量設定試験（2.6.6.6.2.2.1）では、妊娠マウスに（雌 8 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照）、1、3、10 及び 30 mg/kg/dose（110000、330000、1100000 及び 3300000 U/kg/dose）の用量で妊娠 6～15 日（DG 6～15）に連日皮下投与した結果、30 mg/kg/dose 群で rHuPH20 投与に関連して母動物の体重減少、体重増加抑制、吸収胚数の増加、胎児体重の減少及び脾臓の腫大が認められた。EFD 試験（2.6.6.6.2.2.2）では、妊娠 CD-1 マウス（主試験群：雌 25 例/群、TK 群：雌 36 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照）、3、9 及び 18 mg/kg/dose（330000、990000 及び 1980000 U/kg/dose）の用量で DG 6～15 に連日皮下投与したところ、9 mg/kg/dose 以上の用量で胚・胎児毒性を示し、吸収胚の増加、同腹児数の減少、胎児重量の減少が認められた。その他に EFD に対する影響は認められなかった。本 EFD 試験の TK 解析の結果、DG 6 における 3、9 及び 18 mg/kg/dose 投与群の C_{max} はそれぞれ 3.4、30.5 及び 49.6 U/mL であり、$AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 5.5、45.3 及び 120 U·h/mL であった。また、DG 15 における 3、9 及び 18 mg/kg/dose 投与群の C_{max} はそれぞれ 20.9、17.1 及び 99.2 U/mL であり、$AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 55.1、79.0 及び 363 U·h/mL であった。DG 6 及び 15 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、概ね用量に依存して増加した。

観察された胚・胎児毒性の発現に関連する可能性がある機序としては、rHuPH20 による胚内の HA の分解による可能性が考えられる。HA は胎児心臓の cardiac jelly を構成する重要な成分であり、胚発生過程における心臓の器官形成に重要であるが、ヒアルロニダーゼはこの HA を脱重合する。HA 合成酵素欠損マウスを用いた研究（Camenisch, 2000）及び HA を分解した全胚を用いた研究（Baldwin, 1994）から、正常な心臓の器官形成において、特異的な時期における HA の重要性が示されている。EFD 試験では、rHuPH20 の全身曝露が認められており、本試験の NOAEL である 3 mg/kg/dose（330000 U/kg）は、ヒトの臨床用量（11200 U）の約 168 倍（2.6.4.3.2.3）であり、広い安全域を有していた。皮下投与での rHuPH20 の臨床用量では全身曝露が LLOQ を上回る可能性が低いことから、臨床使用において EFD に対して有害な影響が生じるリスクは低いと考えられる。

PPND 試験では、妊娠 CD-1 マウス（雌 25 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照）、3、6 及び 9 mg/kg/dose（330000、660000 及び 990000 U/kg）の用量で DG 6～DG 22（自然分娩に供しなかったマウス）又は DG 6～授乳 20 日（DL 20）（自然分娩マウス）に連日皮下投与したところ、9 mg/kg/dose まで母動物の生殖能並びに F1 出生児の生存率、性成熟、学習・記憶能及び生殖能に有害な影響は認められなかった（2.6.6.6.2.3.1）。

幼若マウスを用いた用量設定試験では幼若マウスでは、rHuPH20 を 1、3、9 mg/kg/dose の用量で、出生後 7～42 日目（PND 7～42）に 1 日 1 回又は週 1 回皮下投与したところ、忍容性は良好であり、いずれの用量においても有害作用は認められなかった（2.6.6.6.2.4.1）。

幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験では、rHuPH20 を 0（溶媒対照）及び 1 mg/kg/dose（110000 U/kg/dose）の用量で、PND 7～30 に連日皮下投与した後、幼若動物評価サブセットでは PND 129 まで、慢性毒性評価サブセットでは PND 241 まで週 1 回投与し

た（2.6.6.6.2.4.2）。慢性毒性評価サブセットの雌雄マウスの投与部位で認められた軽微～中等度の有害ではない病理組織学的所見（主として、皮下組織の混合細胞性炎症を伴うこともある皮下組織内の混合細胞浸潤）を除き、rHuPH20投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。rHuPH20 を投与したすべてのマウスで抗 rHuPH20 抗体の産生がみられ、rHuPH20 に対する中和活性及び遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）に対する交差反応性が高頻度に認められた。1 mg/kg/dose の rHuPH20 又は抗 rHuPH20抗体による神経行動学的評価、生殖能、胎児評価、又はその他の毒性評価エンドポイントおいて有害作用は認められなかった。

2.4.4.2.6　局所刺激性試験

rHuPH20の局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性の評価は、サルを用いた反復投与毒性試験（2.6.6.3.2）及びマウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験（2.6.6.6.2、2.6.6.8.2.1）で実施した。サルでは投与部位の皮下の血管周囲に軽微で可逆的なリンパ形質細胞浸潤が認められ、ウサギでは一過性の紅斑が認められたが、有害作用ではないと考えられた。全体として、供試動物への rHuPH20 の静脈内及び皮下投与は忍容性が良好であり、いずれの毒性試験においても局所刺激性を示唆する変化は認められなかった。

2.4.4.2.7　その他の毒性試験

抗 rHuPH20 抗体は内在性 PH20 と反応する可能性があるため、抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響を包括的に特徴づける試験を実施した。PH20 は精子先体に関連して成熟した雄性生殖器官で発現していることから（Martin-DeLeon, 2006）、受胎能及び次世代の成長に対する抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響を生殖発生毒性試験で評価した。また、内因性 PH20 発現状態を確認するために、組織交差反応性試験及び遺伝子発現試験を行った。

2.4.4.2.7.1　生殖発生毒性試験での抗 rHuPH20 抗体の評価

CD-1 マウスを用いた PPND 試験（GLP 不適合）では、妊娠中及び授乳中の母動物並びにF1 児（胎児及び出生児）の血中抗 rHuPH20 抗体を測定した（2.6.6.8.2.1.1）。重要な PPND 試験と同じ用量を用いて、妊娠マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照）、3、6 及び 9 mg/kg/dose（330000、660000 及び 990000 U/kg）の用量で連日皮下投与したところ、rHuPH20 を投与した F0 母動物の F1 出生児に抗 rHuPH20 抗体が検出された。交差反応性に関する検討では、F0 母動物、F1 胎児及び F1 出生児の抗 rHuPH20 抗体が遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）に対して交差反応性を示した。以上のように、F1 児では、妊娠後期から成熟に至るまでの発生・発達段階を通して、抗 rHuPH20 抗体の曝露が認められた。

ウサギでは雌雄の受胎能（EFD 及び出生後の評価を含む）に対する抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響の有無について評価する試験ために 2 試験を実施した。これらの試験では抗 rHuPH20 抗体を産生させるために rHuPH20 を 0.76 mg/kg/dose で週 1 回皮下投与した。雄授胎能試験では、rHuPH20 を投与した全ての雄で交配前及び交配中に持続的な抗 rHuPH20 抗体産生が認められ、抗体価は精子検査及び授胎能の評価期間を通して維持された。精子検査及び交配した無処置雌の帝王切開による評価では、抗 rHuPH20 抗体に起因する有害な影響は認められなかったことから、交配前の抗 rHuPH20 抗体の持続的曝露は雄の生殖能、交尾

行動又は授胎能に影響を及ぼさないと考えられた（2.6.6.8.2.1.3）。雌受胎能試験では、rHuPH20 を投与した全ての母動物で交配前及び妊娠期間中に高い抗 rHuPH20 抗体価が認められたが、母動物の交尾行動及び受胎能に影響はみられなかった。母動物から胎児への抗 rHuPH20 抗体の移行が DG 20 にみられたが、出生児の離乳前及び離乳後の発達、成熟及び生殖能に影響を及ぼさなかった。（2.6.6.8.2.1.4）。さらに、これらの試験では、雌雄ウサギの抗 rHuPH20 抗体は rRbPH20 に対する交差反応性及び中和活性を示したことから、ウサギは抗 rHuPH20 抗体の安全性評価に適切な動物種であったと考えられる。

2.4.4.2.7.2　組織交差反応性試験

ヒト組織における rHuPH20 の抗 rHuPH20 抗体の内因性ヒト PH20 への結合能を評価するため組織交差反応性試験を実施した。先に実施したヒト組織交差反応性試験では、ウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体による強い特異的染色がヒト精巣の精細管でのみ認められ、ヒト食道及び結腸に局在する腸神経叢の細胞質に弱い染色を示した。（2.6.6.8.2.2.2）。一方、その後のヒト抗 rHuPH20 抗体及びヒト抗 PH20 抗体を用いたヒト組織交差反応性試験（2.6.6.8.2.2.3）では、腸神経叢組織における弱い染色は非特異的であると判断され、本試験の結果から、ヒト抗 PH20 抗体及びヒト抗 rHuPH20 抗体がヒト精巣にのみ特異的に結合することが示された。

2.4.4.2.7.3　遺伝子発現解析試験

PH20 の発現に関する文献報告の結果を確認するため、様々な成長・発達段階のマウス、ウサギ、ヒトの組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現について RT-qPCR 法及び RNA-Seq 法を用いて評価した（2.6.6.8.2.3）。RT-qPCR を用いた解析では、高いレベルの SPAM1/PH20 がマウス、ウサギ、及びヒトにおける成体雄性生殖器官にのみ発現することを示したが、その他の組織では LLOQ に近似した低いレベルの発現が観察された。しかしながら、RNA-Seq 法では、SPAM1/PH20 はマウス、ウサギ、ヒトにおける成体雄性生殖器にのみ発現し、他の組織には発現しないことが示された。以上のように、様々な成長・発達段階のマウス、ウサギ、ヒトの組織を用いた解析の結果、SPAM1/PH20 は主として成体の雄の生殖器官に発現していることが確認された。

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　エフガルチギモド

薬理

サルにエフガルチギモドを皮下投与したとき、静脈内投与と同様に IgG 濃度が減少し十分な薬理作用が得られることが示された。

カニクイザルを含む複数の動物種で、pH7.4 でのエフガルチギモドの FcRn への標的結合を介した総 IgG 濃度と曝露量の関係を記述したトランスレーショナル母集団 PK/PD モデルにより、いずれの動物でも PK/PD を一貫して記述できた。このモデル解析により、カニクイザルを用いた週 1 回反復静脈内投与毒性試験で検討した最高用量（100 mg/kg）で FcRn 占有率が概ね最大となったことから、毒性試験での用量の適切性が確認された。

Tg32 マウスを用いた IVIg とエフガルチギモドを併用した PK/PD 試験から、IVIg 投与後のどのタイミングでもエフガルチギモドによる治療を開始できることが示唆された。さらに、エフガルチギモドで治療した患者のレスキュー療法として IVIg を用いることが可能であると考えられた。

薬物動態

カニクイザルにエフガルチギモド単独で単回皮下投与したとき、静脈内投与で観察された重要な PK 特性が確認された。カニクイザルを用いた rHuPH20 混合 12 週間反復皮下投与毒性試験では、性差は認められず、明らかな蓄積は認められなかった。rHuPH20 は、エフガルチギモドの PK にほとんど影響を及ぼさなかった。

抗エフガルチギモド抗体の測定は、PK の解釈に必要と考えられた場合のみ実施した。rHuPH20 混合エフガルチギモド 12 週間反復皮下投与毒性試験で、一部のカニクイザルで免疫活性化の徴候が認められたことから抗エフガルチギモド抗体を測定したが、免疫活性化の徴候と抗エフガルチギモド抗体との関連性は認められなかった。rHuPH20 混合エフガルチギモド 12 週間反復皮下投与毒性試験結果から、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性によりエフガルチギモド PK が影響を受けていないと判断したため、非臨床試験では抗 rHuPH20 抗体を測定しなかった。

ヒトでより多くの液量を皮下投与するためには、rHuPH20 のような拡散促進剤を必要とする。一方、非臨床試験の動物種では皮下スペースの構造がヒトと異なるため、拡散促進剤がなくても多くの液量を皮下投与することができる（Frost, 2007）。カニクイザルに rHuPH20 混合エフガルチギモドを皮下投与したとき、エフガルチギモド単独投与したときと比較してエフガルチギモドの C_{max} がわずかに増加した。皮下スペースの構造がカニクイザルとヒトで異なることから、カニクイザルでみられた C_{max} の違いが臨床を反映するかは不明である。

ヒト PK データとサル TK データを比較して曝露量比を算出した。ヒトの曝露量として、健康被験者に週 1 回計 4 回エフガルチギモド単独で 10 mg/kg 静脈内投与又は rHuPH20 含有エフガルチギモドを 1000 mg 皮下投与したときの PK データ（ARGX-113-1907）を用いた。サルの曝露量として、週 1 回投与で十分に高い曝露量が得られた 26 週間反復静脈内投与毒性試験［ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.3.2-3（[redacted]33260）］の 100 mg/kg（NOAEL）の TK データを用いた。サル静脈内投与時の曝露量をヒトにエフガルチギモドを静脈内又は皮下投与したときの曝露量と比較すると、C_{max} 比で 12 又は 52 倍、AUC 比でいずれも 5 倍であった。エフガルチギモドの毒性試験では、臨床使用に際して懸念される毒性所見が認められず、バイオテクノロジー応用医薬品としては十分な安全域が確保できていると考えられた。

毒性

エフガルチギモドの静脈内投与による毒性学的並びに TK プロファイルはエフガルチギモド点滴静注製剤の製造販売承認申請時に評価されている。静脈内投与は、化合物の全身曝露に関して最も過酷な投与経路であるため、エフガルチギモドの静脈内投与で実施した試験成績に基づいて、エフガルチギモド単独で皮下投与したとき及び rHuPH20 を混合してエフガルチギモドを皮下投与したときの潜在的な全身毒性を評価することは可能であると考えている。したがって、これらのデータを皮下投与経路に橋渡しするため、カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験及びニュージーランドホワイトウサギを用いた局所刺激性試

験を実施した。さらに、KLH 免疫後のカニクイザルにおける体液性及び T 細胞応答に対するエフガルチギモド投与による影響の有無について検討するためエフガルチギモドの 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験を実施した（2.4.4.1.2 及び 2.4.4.1.6）。本申請に際し、新たに実施した毒性試験成績では安全性に関する懸念はみられず、エフガルチギモド皮下注製剤の臨床使用に際して、問題となる影響は認められなかった。

- カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験では、エフガルチギモド SC（100 mg/kg）+ rHuPH20（2000 U/mL）q7d までの用量では、カニクイザルにおいて良好な忍容性を示した。リンパ節及び脾臓で認められた変化は、カニクイザルの背景所見に関連する可能性が最も高いため、ヒトで発現する可能性は低いと考えられる。この変化が少数の動物におけるエフガルチギモドに対する免疫応答に続発する影響である可能性を完全に否定することはできない。ヒトへ適用されるバイオテクノロジー応用医薬品の多くは、動物で免疫原性を示す可能性があり、動物で抗体の産生が誘導されたということが、ヒトにおける抗体産生の可能性を予測するものではないと考えられる［ICH S6 (R1)］
- KLH 抗原に対する T 細胞依存性の抗体産生に及ぼすエフガルチギモドの影響の有無にについて評価した試験では、抗原特異的 IgM、IgG 及び T 細胞応答の増加が初回及び 2 回の追加接種後に測定可能であったことから、エフガルチギモドは KLH 初回又は追加接種後の免疫応答を阻害しないことが示された。エフガルチギモドの静脈内投与による薬力学的効果は、投与期間中に総 IgG 値の減少として認められたが、抗原特異的 IgM の増加と IgG の増加が認められたことから、エフガルチギモド治療中の急性感染への罹患やワクチン接種後には、IgG 値の経時的低下が予想されるものの、重要な液性及び細胞性免疫応答は誘発されると考えられる（Peter, 2020）。
- エフガルチギモド SC 単独又は臨床で使用されている製剤と高い類似性を有するエフガルチギモド SC+rHuPH20 投与時の局所忍容性は、認められた所見が軽微又は軽度であり、可逆的であったことから、毒性試験に使用したサル及びウサギにおいても許容可能であった（2.4.4.1.6）。したがって、臨床使用に際して、エフガルチギモド皮下投与製剤による局所刺激性のリスクは低いと考えられる。

不純物の潜在的な毒性学的な影響の有無について評価した結果、安全性に問題は認められなかった（2.4.4.1.7）。

2.4.5.2　rHuPH20

薬理

効力を裏付ける試験の結果から、rHuPH20 は局所において一過性に拡散を促進する酵素であり、治療薬の皮下における拡散及び吸収を容易にすることが示された。マウスを用いた一連の薬理試験では、rHuPH20 を皮内投与した結果、rHuPH20 は投与局所で一過性に作用することが示され、色素の拡散は用量依存的に増加した。ラットでは、rHuPH20 を皮内投与後に投与部位の病理組織学的検査を実施した結果、rHuPH20 に関連した皮膚反応は認められなかった。ブタでは、rHuPH20 投与により、投与部位の腫脹の軽減、拡散容積の増大、皮膚の柔軟性及び血流量の維持が認められ、大量の IgG の皮下投与に関連した硬結の発現頻度が低下した。

薬物動態

マウス及びサルに rHuPH20 を単回静脈内投与したとき、血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の $t_{1/2}$ は、マウスで約 2 分、カニクイザルで約 5 分であった。サルに rHuPH20 を単回皮下投与したとき、3 mg/kg 以上の用量では用量に応じて曝露量が増加した。バイオアベイラビリティは低く、1.5～3.9%であった。マウス及びサルに rHuPH20 を単回静脈内及び皮下投与したとき、0.4 mg/kg 以下の用量で静脈内投与したときの rHuPH20 の血中からの消失は速やかで、皮下投与したときの投与量に対する全身曝露量は低かった。

サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験での rHuPH20 の TK では、血漿中ヒアルロニダーゼ活性は最高用量2.0 mg/kg/dose群でのみ検出され、雄では少なくとも6ヵ月間、雌では9ヵ月間血漿中ヒアルロニダーゼ活性が認められた。投与開始後 13 週間に抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性と関連した曝露量の減少が認められた。皮下投与したときの rHuPH20 の全身曝露量は低く、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性に関連した有害な作用は認められなかった。

マウスに rHuPH20 を皮内若しくは ^{125}I-rHuPH20（最大 1.73 µg/例）を皮内又は皮下投与したとき、投与部位の皮膚で一過性のヒアルロニダーゼ活性が認められたものの、全身曝露量はわずかであることが示された。^{125}I-rHuPH20 を静脈内投与したとき、投与後 2～5 分以内に放射能は組織に分布した。

毒性

カニクイザルを用いた rHuPH20 の反復投与毒性試験では、最高 5 mg/kg/日の用量で 7 日間又は最高 2 mg/kg/dose の用量で 39 週間皮下投与したときの忍容性は良好であり、有害な所見は認められなかった。rHuPH20 の全身曝露量は、2 mg/kg/dose の用量でのみ測定可能であった。

受胎能及び EFD の評価を幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験で評価したところ、1 mg/kg/dose の用量で受胎能及び生殖能に rHuPH20 に関連した影響は認められなかった。また、rHuPH20 の受胎能への影響をカニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験で評価したところ、最高用量の 2 mg/kg/dose まで生殖能への影響を示唆する変化は認められなかった。

rHuPH20 のマウスを用いた EFD 試験では 9 mg/kg/dose 以上の用量で胚・胎児毒性が認められたが、催奇形性はみられなかった。EFD 試験では rHuPH20 の全身曝露が認められており、さらに、臨床で使用される rHuPH20 の想定される用量である 11200 U（2.6.4.3.2.3）との比較において広い安全域（体表面積のスケーリングに基づくと約 168～1109 倍）が確保されていることから、rHuPH20 の皮下投与後のヒトの EFD への影響のリスクは低いと考えられる。マウスを用いた PPND 試験では、最高用量の 9 mg/kg/dose まで、母動物の生殖能並びに F1 出生児の生存率、性成熟、学習・記憶能及び生殖能に有害な影響は認められなかった。幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験では、神経行動学的評価、生殖能、胎児評価及び成熟までの期間に評価したその他の毒性エンドポイントに、rHuPH20 の 1 mg/kg/dose 又は抗 rHuPH20 抗体による有害作用は認められなかった。

抗 rHuPH20 抗体の影響について追加のウサギを用いた生殖発生毒性試験で評価したが、雌雄の受胎能、EFD 及び出生児の発達に有害な影響は認められなかった。組織交差反応性

試験、RT-qPCR 及び RNA-Seq 法による一連の遺伝子発現解析試験では、主に男性、並びにマウス及びウサギの成体雄の生殖器に SPAM1/PH20 の発現が認められた。

高用量で実施した rHuPH20 のマウス及びサルを用いた反復投与毒性試験では、rHuPH20 の全身曝露が確認された。一方、臨床用量（11200 U）では rHuPH20 はヒト血中で LLOQ 未満であり、本申請に際して rHuPH20 のヒト PK は評価しなかった（2.5.3）。したがって、安全域の推定値には、曝露パラメータの代わりに mg/kg（U/kg）及びヒト等価用量（HED）に基づき算出した。反復投与毒性試験、EFD 試験及び PPND 試験での NOAEL は、エフガルチギモド PH20 SC でのヒトでの rHuPH20 の用量である 11200 U の約 168～1109 倍であった。

以上をまとめると、実施された一連の非臨床試験から、rHuPH20 が一過性で局所的に作用し、他の注射薬剤の拡散及び吸収を促進することが示された。さらに、rHuPH20 を皮下投与したときのバイオアベイラビリティは低く、全身曝露は限られていた。血中の抗 rHuPH20 抗体に長期曝露されても、生殖発生パラメータに有害な影響は認められず、rHuPH20 は広い安全域を有する良好な安全性プロファイルを示した。

2.4.5.3　結論

エフガルチギモドの薬理試験では、in vitro 及び in vivo のどちらの条件下でもエフガルチギモドの作用機序に基づく薬理作用を示した。エフガルチギモドは選択性が高く、オフターゲット活性を示さなかった。臨床において皮下投与による rHuPH20 の安全な使用を支持するための rHuPH20 の非臨床試験を実施した。本申請に際し、新たに実施した rHuPH20 を混合したエフガルチギモドの毒性試験成績では安全性に関する懸念はみられず、エフガルチギモド皮下注製剤の臨床使用に際して問題となる影響は認められなかった。さらに、十分な安全域はエフガルチギモド皮下注製剤の臨床使用を支持すると考えられた。

2.4.6　参考文献

Baldwin HS, Lloyd TR, Solursh M. 1994. Hyaluronate degradation affects ventricular function of the early postlooped embryonic rat heart in situ. Circ Res 74(2):244-52.

Bookbinder L, Hofer A, Haller MF, et al. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Control Release 2006; 114: 230-241.

Bywaters EGL, Holborow EJ, Keech MK. 1951. Reconstitution of the dermal barrier after Hyaluronidase Injection. Brit Med J 1951; 2(4741): 1178 -1183.

Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr., Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. 2000. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest 106, 349–360.

Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) used in toxicity studies. Toxicol Pathol. 2010 Jun;38(4):642-57.

Connor RJ, Taverna DM, Thrall K, LaBarre MJ, Kang DW. Use of computed tomography to assess subcutaneous drug dispersion with recombinant human hyaluronidase PH20 in a swine model. J Pharmacol Toxicol Methods. 2020 Nov-Dec;106:106936.

DeSesso JM, Williams AL, Ahuja A, Bowman CJ, Hurtt ME. 2012. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. Crit Rev Toxicol 42: 185-210.

Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. Acta Biomater 2014;10(4):1558-70.

Everds NE, Reindel J, Werner J, Craven WA. Variability of spleen and mesenteric lymph node in control cynomolgus monkeys (macaca fascicularis) from nonclinical safety studies: A retrospective assessment. Toxicol Pathol. 2019;47(1):53-72.

Frost GI. Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): An enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. Expert Opin Drug Deliv. 2007 Jul;4(4):427-40.

Harris EN, Weigel JA, Weigel PH. Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). J Biol Chem 2004; 279:36201-36209.

Hascall V, Esko JD. Hyaluronan. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 16.

Hechter O. Studies on spreading factors: I. The importance of mechanical factors in hyaluronidase action in skin. J Exp Med 1947; 85(1): 77-97.

Holborow EJ, Keech MK. Hyaluronidase skin spreading effect; an analysis of repeated measurements. Brit Med J 1951; 2(4741): 1173-1178.

Howard JF Jr, Bril V, Vu T, Karam C, Peric S, Margania T, et al. ADAPT Investigator Study Group. Safety, efficacy, and tolerability of efgartigimod in patients with generalised myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol. 2021 Jul;20(7):526-536. Erratum in: Lancet Neurol. 2021; 20:526-36.

Kang D.W., Oh D.A., Fu G.Y., Anderson J.M., Zepeda M.L. Porcine model to evaluate tissue tolerability associated with subcutaneous delivery of protein. J Pharm and Tox Methods (2013) 67:140-147.

Kang DW, Bittner B, Sugarman BJ, Zepeda ML, Printz MA (2021) Dispersive effects and focused biodistribution of recombinant human hyaluronidase PH20: A locally acting and transiently active permeation enhancer. PLoS One. 2021 Jul 22;16(7): e0254765.

Laurent UBG, Reed RK. Turnover of hyaluronan in the tissues. Adv Drug Deliv Rev 1991; 7(2): 237-256.

Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. Mol Cell Endocrin 2006;250:114-121.

Nixon AE, Chen J, Sexton DJ, Muruganandam A, Bitonti A. J., Dumont J, Viswanathan M, Martik D, Wassaf D, Mezo A, Wood C. R., Biedenkapp J.C., TenHoor C. Fully human monoclonal antibody inhibitors of the neonatal fc receptor reduce circulating IgG in non-human primates. Front Immunol. 2015;6:176

Ols S, Yang L, Thompson E.A, Pushparaj P, Tran K, Liang F, Lin A, Eriksson B, Karlsson Hedestam G.B, Wyatt R.T, Loré K: Route of vaccine administration alters antigen trafficking but not innate or adaptive immunity. Cell Rep. 2020;30(12):3964-3971.e7.

Peter HH, Ochs HD, Cunningham-Rundles C, et al. Targeting FcRn for immunomodulation: Benefits, risks, and practical considerations. J Allergy Clin Immunol. 2020;146(3):479-91.

Ramot Y, Kannan K, Reddy S, Krishnappa H, Dillberger JE, Nyska A. Acute histopathologic findings related to needle puncture trauma during subcutaneous injection in the Sprague-Dawley rat model. Toxicol Pathol. 2019;47(1):93-6.

Smith B, Kiessling A, Lledo-Garcia R, Dixon KL, Christodoulou L, Catley MC, et al. Generation and characterization of a high affinity anti-human FcRn antibody, rozanolixizumab, and the effects of different molecular formats on the reduction of plasma IgG concentration. MAbs. 2018 Oct;10(7):1111-30.

Ulrichts P, Guglietta A, Dreier T, et al. Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. J Clin Invest. 2018;128(10):4372-86.

United States Food and Drug Administration NDA 21-859 (HYLENEX), approved 2 December 2005.