目次

2.6.4　薬物動態試験の概要文 6
2.6.4.1　まとめ 6
2.6.4.1.1　エフガルチギモド 6
2.6.4.1.2　rHuPH20 7
2.6.4.2　分析法 9
2.6.4.2.1　カニクイザル血清中エフガルチギモド濃度分析法 9
2.6.4.2.2　血清中抗エフガルチギモド抗体 10
2.6.4.2.3　インターフェロンγ分析法 11
2.6.4.2.4　マウス及びカニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ活性定量法 11
2.6.4.2.5　^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性定量法 12
2.6.4.2.6　血漿中抗 rHuPH20 抗体定量法及びその特徴 12
2.6.4.2.6.1　抗 rHuPH20 抗体定量法 12
2.6.4.2.6.2　PH20 パラログに対する抗 rHuPH20 抗体の交差反応性の評価 12
2.6.4.2.6.3　抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性の測定 12
2.6.4.3　吸収 13
2.6.4.3.1　エフガルチギモド 13
2.6.4.3.1.1　カニクイザルを用いた単回皮下及び静脈内投与 PK 試験 13
2.6.4.3.1.2　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）でのエフガルチギモドの TK 15
2.6.4.3.1.3　ヒトとサルの曝露量の比較及び安全域 15
2.6.4.3.2　rHuPH20 17
2.6.4.3.2.1　単回投与 PK 試験 17
2.6.4.3.2.2　反復投与 TK 試験 21
2.6.4.3.2.3　ヒトと動物の曝露量の比較及び安全域 26
2.6.4.4　分布 27
2.6.4.4.1　エフガルチギモド 27
2.6.4.4.2　rHuPH20 27
2.6.4.4.2.1　マウスに rHuPH20 を皮内投与したときの皮膚、リンパ及び血漿中 rHuPH20 の分布 27
2.6.4.4.2.2　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内投与したときの PK 及び組織分布 27
2.6.4.4.2.3　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回静脈内投与したときの PK 及び組織分布 28
2.6.4.4.2.4　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内又は皮下投与したときの PK 及び組織分布 29
2.6.4.5　代謝 30
2.6.4.5.1　エフガルチギモド 30
2.6.4.5.2　rHuPH20 30
2.6.4.6　排泄 30
2.6.4.6.1　エフガルチギモド 30
2.6.4.6.2　rHuPH20 30
2.6.4.6.2.1　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内投与したときの排泄 30
2.6.4.6.2.2　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回静脈内投与したときの排泄 30
2.6.4.6.2.3　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内又は皮下投与したときの排泄 31

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用 31
2.6.4.7.1　エフガルチギモド 31
2.6.4.7.2　rHuPH20 31
2.6.4.8　その他の薬物動態試験 31
2.6.4.8.1　エフガルチギモド 31
2.6.4.8.2　rHuPH20 33
2.6.4.9　考察及び結論 33
2.6.4.9.1　エフガルチギモド 33
2.6.4.9.2　rHuPH20 34
2.6.4.10　参考文献 37

表目次

表 2.6.4-1　カニクイザル血清中エフガルチギモド濃度分析法 10
表 2.6.4-2　カニクイザル血清中エフガルチギモドの安定性 10
表 2.6.4-3　カニクイザルにエフガルチギモド単独で 20 mg/kg の用量で単回静脈内及び皮下投与したときの血清中エフガルチギモドの PK パラメータ 14
表 2.6.4-4　雌雄カニクイザルにエフガルチギモドを週 1 回 26 週間反復持続（0.5 時間）静脈内投与したときの TK パラメータ（平均値±SD） 16
表 2.6.4-5　カニクイザル 26 週間反復静脈内投与毒性試験でのサル曝露量とヒト曝露量（ARGX-113-1907 試験）との比 17
表 2.6.4-6　CD-1 マウスに rHuPH20 を静脈内投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ平均値 18
表 2.6.4-7　試験デザイン（R07060 試験） 19
表 2.6.4-8　雌カニクイザル（n=3/群）に rHuPH20 を静脈内投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ（NCA） 19
表 2.6.4-9　雌カニクイザル（n=3/群）に rHuPH20 を皮下投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ（NCA） 20
表 2.6.4-10　サルに rHuPH20 を単回静脈内投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ（1-コンパートメントモデル解析） 20
表 2.6.4-11　カニクイザルに rHuPH20（5 mg/kg）を 1 日 1 回反復静脈内又は皮下投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の TK パラメータ 22
表 2.6.4-12　カニクイザルに rHuPH20（2 mg/kg）を週 1 回反復皮下投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の TK パラメータ 23
表 2.6.4-13　皮下投与後 15 日での抗 rHuPH20 抗体価 26
表 2.6.4-14　rHuPH20 の毒性試験の NOAEL に基づく安全域 26
表 2.6.4-15　CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20（1.33 µg/例）を皮内投与したときの血漿中 PK パラメータ 28
表 2.6.4-16　CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を静脈内投与したときの血漿 PK パラメータ 29
表 2.6.4-17　CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を皮内又は皮下投与したときの血漿 PK パラメータ 29

図目次

図 2.6.4-1　カニクイザルにエフガルチギモドを 20 mg/kg の用量で単回静脈内又は皮下投与したときの血清中エフガルチギモド濃度推移（平均値±SD）.....14
図 2.6.4-2　雌カニクイザルに rHuPH20 を単回静脈内投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値.....21
図 2.6.4-3　雌カニクイザルに rHuPH20 を単回皮下投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値.....21
図 2.6.4-4　用量及び試験日で補正したカニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ中和活性値（中央値）.....24
図 2.6.4-5　用量及び試験日で補正したカニクイザル血漿中抗 rHuPH20 抗体価（中央値）.25
図 2.6.4-6　エフガルチギモドのトランスレーショナル母集団 PK/PD モデル.....32

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）
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}th}$	area under the concentration-time curve 0 to t hours	0 から t 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint	0 から最終定量可能時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity	0 から無限時間までの濃度-時間曲線下面積
bHA	biotinylated hyaluronan/hyaluronic acid	ビオチン化ヒアルロン酸
C	concentration	濃度
CL	systemic clearance	全身クリアランス
CL_2	clearance for the linear elimination pathway	線形消失経路のクリアランス
C_{max}	maximum observed concentration	最高血清（血漿）中濃度
C_{trough}	concentration at the end of a dosing interval before the next administration	トラフ濃度
DG	day of gestation	妊娠日数
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
ELISpot	enzyme-linked immunospot	酵素免疫スポット
Fc	fragment, crystallized	–
FcRn	neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
FDA	Food and Drug Administration	アメリカ食品医薬品局
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
HA	hyaluronic acid/hyaluronan	ヒアルロン酸
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
ISR	incurred sample reanalysis	–
IV	intravenous	静脈内
IVIg	intravenous immunoglobulin	免疫グロブリン大量静注
K_D	dissociation constant	解離定数
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
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンタ
NCA	noncompartmental PK analysis	ノンコンパートメント PK 解析
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PPND	pre- and postnatal developmental	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase PH20	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）

略語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
SA-HRP	streptavidin-linked horseradish peroxidase	ストレプトアビジン–西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
$t_{1/2,eff}$	effective elimination half-life	有効消失半減期
$t_{1/2,z}$	terminal elimination half-life	終末相消失半減期
TCA	trichloroacetic acid precipitable	トリクロロ酢酸
TDAR	T-cell dependent antibody response	T 細胞依存性抗体産生
Tg32	human FcRn transgenic (mice)	ヒト FcRn トランスジェニック（マウス）
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
t_{max}	time of maximum concentration	最高血清（血漿）中濃度到達時間
TMB	tetramethyl benzidine	テトラメチルベンジジン
ULOQ	upper limit of quantitation	定量上限
USP	United States Pharmacopoeia	米国薬局方
V	volume of distribution	分布容積
V_{max}	maximal velocity	最大速度
V_{ss}	volume of distribution al steady-slate	定常状態における分布容積

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

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 IgG1 抗体 Fc フラグメントであり、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、静脈内投与で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）の効能・効果で新有効成分含有医薬品として国内で既に承認されており、静脈内投与での非臨床薬物動態試験結果については、ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料で提出済みである。

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配合薬の吸収及び拡散を促進する作用を有し、製剤に 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。

本申請では、ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4 から新たに追加したエフガルチギモド PK 及び TK 試験並びに rHuPH20 の PK 及び TK 試験について述べる。なお、rHuPH20 を皮内又は皮下投与したとき、血漿中にヒアルロニダーゼ活性がほとんど認められないため、エフガルチギモド及び rHuPH20 を混合して投与した非臨床試験では rHuPH20 の PK を評価しなかった。

PK 試験の概要を 2.6.5 に示し、TK 試験の概要を 2.6.6 又は 2.6.7 に示す。

2.6.4.1.1　エフガルチギモド

カニクイザルにエフガルチギモドを 20 mg/kg の用量で単回皮下投与したときの PK と単回静脈内投与したときの PK を比較した（ARGX-NC-092）。さらに、カニクイザルを用いた rHuPH20（0 又は 2000 U/mL）を混合したエフガルチギモドの週 1 回 12 週間反復皮下投与毒性試験（GLP 遵守、[redacted]36930）を実施し、TK を評価した（2.6.6）。

さらに、エフガルチギモドの FcRn への結合特性がカニクイザルとヒトで類似していることから、カニクイザルにエフガルチギモドを静脈内投与し T 細胞依存性抗体産生（TDAR）を評価し（[redacted] 8459761）、その TK を測定した（[redacted] 8426700）。TK 結果は、2.6.6 及び 2.6.7 に示す。

ヒト FcRn トランスジェニックマウス（Tg32 マウス）を用いて 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。（121510_IVFC_Phase3）。結果は、2.6.2.5 に示す。

[redacted]36930 試験及び [redacted] 8459761 試験での血清中エフガルチギモド濃度及び [redacted] 8459761 試験でのインターフェロン γ 濃度の分析法を新たに開発し、バリデートした（2.6.4.2）。

さらに、エフガルチギモドの薬理作用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での血清中エフガルチギモド PK と pH7.4 での FcRn への標的結合を介した総 IgG 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（20_021.TPKPD.F）。試験の概要を 2.6.4.8 に示す。

本申請に際して実施したマウス及び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 PK は、提出済みの PK（ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4）と類似していた。カニクイザルにエフガルチギモドを皮下投与したときの PK の特徴を以下に記す。

- カニクイザル血清中エフガルチギモドの AUC 及び C_{max} は、用量に応じて増加した。
- エフガルチギモドの PK は rHuPH20 による影響をほとんど受けず、エフガルチギモドを皮下投与したときの t_{max} は 8～48 時間であった。
- エフガルチギモド単独で皮下投与したときのバイオアベイラビリティは約 50%であった。
- カニクイザル血清中エフガルチギモド濃度推移から有効消失半減期（$t_{1/2,eff}$）及び終末相消失半減期（$t_{1/2,z}$）を算出したところ、終末相は総曝露量のわずかな部分しか占めていないことから、エフガルチギモドの消失と蓄積には $t_{½,eff}$ が寄与していると考えられた。
- 評価した用量及び期間では、反復皮下投与により血清中エフガルチギモド濃度に明らかな蓄積は認められなかった。
- 曝露量に一貫した雌雄差は認められなかった。

本申請に際して追加した薬物動態試験の概要表を 2.6.5 に示す。

2.6.4.1.2　rHuPH20

rHuPH20 の用量（mg/kg）は、平均比活性（110000 U/mg）を用いて U/kg に換算して併記した。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。

マウス及びカニクイザルを用いて、rHuPH20 の静脈内及び皮下投与 PK 試験を実施した。ヒアルロン酸（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）、マウス及びカニクイザルは 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。

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。

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。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も評価した。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。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 1.5～3.9%であった。臨床相当用量の rHuPH20 をサルに単回静脈内又は皮下投与、マウスに単回静脈内投与したとき、血漿中 rHuPH20 は速やかに消失し、サルに単回皮下投与したときの全身曝露量は限定的であった。

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 7 日間反復静脈内又は皮下投与したときの TK を評価した。rHuPH20 を静脈内投与したときの V_{ss} は小さく、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 の曝露量はわずかに低かった。$AUC_{0\text{-}last}$ の比較では、Day 1 及び 7 のバイオアベイラビリティは、それぞれ 5.44 及び 5.74%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では曝露量は低かった。

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 TK を評価した。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 群は 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 週間後に概ね検出された。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 の反復投与により概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。

マウスを用いた rHuPH20 の皮下投与生殖発生毒性試験の一環として、DG 6～15 に 1 日 1 回、3 mg/kg（330000 U/kg）、9 mg/kg（990000 U/kg）及び 18 mg/kg（1980000 U/kg）の用量で皮下投与したときの TK を評価した。rHuPH20 の全身曝露量は、検討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/日の用量で、C_{max} 平均値は DG 6 ではそれぞれ 3.4、30.5 及び 49.6 U/mL、DG 15 ではそれぞれ 20.9、17.1 及び 99.2 U/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ 平均値は DG 6 ではそれぞれ 5.5、45.3 及び 120.0 U·h/mL、DG 15 ではそれぞれ 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。抗 rHuPH20 抗体については、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。

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。雌無胸腺 NCr nu/nu マウスの左背部に rHuPH20 を 2000 U/mL（3520 U/kg、0.032 mg/kg、又は 80 U に相当）で 40 µL 皮内投与した。投与部位の皮膚でのヒアルロニダーゼ活性値は投与後 1～15 分で最大となり、その後急速に減少した。ヒアルロニダーゼ活性値は投与後 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、rHuPH20 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 2000 U/mL）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 8000 U/mL）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 2000 U/mL）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。これらの分布試験での組織中放射能を LSC 又は QWBA で測定した。3 試験とも放射能は投与後 2～5 分で組織に分布し、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、糞中に回収された割合は少なかった。投与された総放射能量は、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。

結論として、マウス及びサルに臨床相当用量の rHuPH20 を静脈内投与したとき、rHuPH20 は血中から速やかに消失し、皮内又は皮下投与したときの全身曝露量は限られていた。抗 rHuPH20 抗体価及びヒアルロニダーゼ中和活性は用量に応じて増加したが、血漿中ヒアルロニダーゼ活性は数ヵ月にわたって測定可能であった。さらに、マウスに皮内投与したとき、投与部位の皮膚で認められた一過性のヒアルロニダーゼ活性は、ヒトに rHuPH20 を皮下投与したときの拡散効果を表していると考えられた。

上述の結果から、マウス及びサルに rHuPH20 を皮内又は皮下投与したとき、血漿中ヒアルロニダーゼ活性がほとんど認められなかったため、エフガルチギモド及び rHuPH20 を混合して投与した非臨床試験では rHuPH20 の PK を評価しなかった。

2.6.4.2　分析法

2.6.4.2.1　カニクイザル血清中エフガルチギモド濃度分析法

添付資料番号：4.2.2.1-1（[redacted]37229）、4.2.2.1-2（[redacted] 8426700）

カニクイザルを用いたエフガルチギモド単独での単回皮下又は静脈内投与 PK 試験（GLP 非遵守、ARGX-NC-092）の血清中エフガルチギモド濃度の分析には、ELISA を用い、分析法の精度、正確性、希釈線形性、凍結融解及び短期安定性を確認した［ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.2.1-2（ARGX-NC-002）］。

カニクイザルを用いた rHuPH20（0 又は 2000 U/mL）を混合したエフガルチギモドの週 1 回 12 週間反復皮下投与毒性試験（GLP 遵守、[redacted]36930）の血清中エフガルチギモド濃度の分析には ELISA 法を用いた（[redacted]37229）。産生細胞株 [redacted] に由来する製剤バッチ [redacted] を標準物質として検量線を作成し、投与に用いた高濃度原薬バッチ [redacted] の濃度を定量した。本法は、生物学的分析法バリデーションに関する FDA ガイドライン（FDA, 2018）に従い、精度及び正確性、感度、選択性、希釈直線性／フック効果、凍結融解並びに 12 ヵ月までの長期安定性を評価した。ISR を実施し、基準を満たした。

カニクイザルを用いた TDAR 試験（GLP 遵守、[redacted] 8459761）の血清中エフガルチギモド濃度をバリデート済みの ECLIA を用いて測定した（[redacted] 8426700）。投与に用いた製剤バッチ [redacted] を標準物質とした。本法は、生物学的分析法バリデーションに関する FDA

ガイドライン（FDA, 2018）に従い、精度及び正確性、感度、選択性、希釈直線性／フック効果、凍結融解並びに 6 ヵ月までの長期安定性を評価した。ISR を実施し、基準を満たした。

本申請で新たに実施した分析法バリデーションの概要を表 2.6.4-1 及び表 2.6.4-2 に示す。

表 2.6.4-1　カニクイザル血清中エフガルチギモド濃度分析法

Species	Validation Report Number	% Matrix [a]	Working Range at 100% Serum (ng/mL)	Precision [b] (%CV)	Accuracy [b] (%)
Cynomolgus monkey	[redacted]37229	1%	125-8000	≤12.1 (intra-assay) ≤12.7 (inter-assay overall)	93.7% to 102.7%
Cynomolgus monkey	[redacted]8426700	10%	20.0-1500	≤17.9 (intra-assay) ≤14.1 (inter-assay overall)	94.8% to 111.8%

CV=coefficient of variation
a) the % serum in the respective buffer that is the minimally required dilution for the assay.
b) Accuracy and precision were reported differently in the respective reports. The details are given in brackets for explanation as appropriate.

表 2.6.4-2　カニクイザル血清中エフガルチギモドの安定性

Stability Type	Species/ Validation Report Number	Temperature	Investigated Period	Stable
Short term	Cynomolgus monkey/ [redacted]37229	RT and 4°C to 8°C	0 and 24 hours for stability QC ([redacted] and [redacted] ng/mL, [redacted] µg/mL)	Yes
	Cynomolgus monkey/ [redacted]8426700	RT	0 and 24 hours for stability QC ([redacted] and [redacted] ng/mL)	Yes
Long term	Cynomolgus monkey/ [redacted]37229	≤-80°C	0 hour, 8 weeks, 6, 9, and 12 months for stability QC ([redacted] and [redacted] ng/mL, [redacted] µg/mL)	Yes
	Cynomolgus monkey/ [redacted]8426700	≤-80°C	0 hour, 3, and 6 months for stability QC ([redacted] and [redacted] ng/mL, [redacted] µg/mL)	Yes
Freeze/ thaw	Cynomolgus monkey/ [redacted]37229	≤-80°C [a]	0 (no freeze/thaw cycle), 1, and 3 freeze/thaw cycles for stability QC ([redacted] and [redacted] ng/mL, [redacted] µg/mL)	Yes
	Cynomolgus monkey/ [redacted]8426700	≤-80°C [a]	0 (no freeze/thaw cycle), 4, and 6 freeze/thaw cycles for stability QC ([redacted] and [redacted] ng/mL)	Yes

QC=quality control; RT=room temperature
a) All samples were frozen for at least 24 hours before thawing and freezing again.

2.6.4.2.2　血清中抗エフガルチギモド抗体

バリデートしたエフガルチギモドに対するカニクイザル血清中抗エフガルチギモド抗体測定法［ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.2.1-12（AXU19877-19877X-B）］を用いて、エフガルチギモド及び rHuPH20（0 又は 2000 U/mL）を混合した週 1 回 12 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]36930）での抗エフガルチギモド抗体を測定した。本測定では、血清中に 146～338 µg/mL のエフガルチギモド存在下で、500～1000 ng/mL の抗エフガルチギモド抗体を検出できる。

[redacted]36930 試験での抗エフガルチギモド抗体測定用検体の血清中エフガルチギモドの C_{trough} 平均値は drug tolerance（146 µg/mL）未満で、抗エフガルチギモド抗体は定量限界（500 ng/mL）未満であった。したがって、[redacted]36930 試験の血清中エフガルチギモド濃度は、抗エフガルチギモド抗体による影響を受けていないと示唆された。

TDAR 試験（[redacted] 8459761）で抗エフガルチギモド抗体測定用に血液を採取したが、PD 結果から PK が抗エフガルチギモド抗体による影響を受けていないと考えられたため、抗エフガルチギモド抗体の測定は実施しなかった。

2.6.4.2.3　インターフェロン γ 分析法

添付資料番号：4.2.2.1-3（[redacted] 8459-762）

カニクイザルを用いた TDAR 試験（[redacted] 8459761）でのキーホールリンペットヘモシアニンに対する T 細胞を介した免疫応答を評価するため、インターフェロン γ を ELISpot 法で測定した。

ELISpot 法は、単一細胞レベルでサイトカイン分泌細胞の個数を計測する高感度免疫測定法である。この測定法では、細胞を特異的キャプチャー抗体でコートされたウェル表面上で刺激有り又は無しの条件で培養し、細胞から分泌されたサイトカインをキャプチャー抗体に結合させた。インキュベーション後に細胞を除去し、ELISA と同様の手順で検出用抗体を添加し、[redacted] 社（ドイツ）の ELISpot リーダーで分泌細胞の個数を計測した。

2.6.4.2.4　マウス及びカニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ活性定量法

添付資料番号：4.2.2.1-4（R09017）、4.2.2.1-5（R09148）、4.2.2.1-6（R05094）、4.2.2.1-7（R09147）、4.2.2.1-8（10213）、4.2.2.1-9（R06037）

マウス血漿中 rHuPH20 の測定では、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定量し、血漿中安定性を評価した（R09017、R09148)。この方法では、マイクロタイタープレート上にコーティングした bHA を試料中に存在する rHuPH20 と一定時間反応させて消化させ、プレートを洗浄し、残りの未切断／結合 bHA をストレプトアビジン–西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体（SA-HRP）によって検出した。固定した SA-HRP に発色基質の 3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン（TMB）を反応させヒアルロニダーゼ活性に逆比例するように溶液を発色させ、マルチウェルマイクロタイタープレート分光光度計を用いて、各ウェルでの 450 nm での光学密度を測定した。

マウス血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の定量範囲は、0.00625～0.200 U/mL（LLOQ～ULOQ）である。バリデーション及び安定性データは 2.6.5.2 に示す。

カニクイザル血漿中 rHuPH20 の測定では、血漿中安定性の評価を含め、[redacted] 比濁法を用いてヒアルロニダーゼ活性値として定量法をバリデートした（R05094、R09147、R06037、10213)。この方法は、HA が酸性血清中で不溶性沈殿物を形成する性質に基づいている。血漿又は血清試料を HA とインキュベートし、これを rHuPH20 で消化させ、酸性化して未消化の HA を沈殿させた。得られた混濁度は 640 nm で測定した。HA のヒアルロニダーゼ活性に起因する濁度の減少をヒアルロニダーゼ活性値とした。

カニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の定量範囲は 10～100 U/mL（LLOQ～ULOQ）である。バリデーション及び安定性データは 2.6.5.2 に示す。

2.6.4.2.5　^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性定量法

添付資料番号：4.2.2.1-10（12214-A）、4.2.2.3-2（13128）

^{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 ^{125}I-rHuPH20 に由来するヒアルロニダーゼ活性を測定するため、改良比濁法を用いて定量法をバリデートした。未消化の HA を塩化セチルピリジニウムにより沈殿させたことを除き、上述のカニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ活性定量法と同様にヒアルロニダーゼ活性を定量した。バリデーション結果は 2.6.5.2 に示す。

2.6.4.2.6　血漿中抗 rHuPH20 抗体定量法及びその特徴

2.6.4.2.6.1　抗 rHuPH20 抗体定量法

添付資料番号：4.2.2.1-11（18072）、4.2.2.1-12（13072）、4.2.2.1-13（R09059）

マウス及びウサギ血漿中抗 rHuPH20 抗体を測定するため、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）を用いて、定量法をバリデートした（18072、13072）。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（R09059）でのカニクイザル血漿中抗 rHuPH20 抗体を検出するために、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。抗 rHuPH20 抗体を ELISA プレートに固定した rHuPH20 に結合させた。ビオチン化 rHuPH20 を SA-HRP で検出し、TMB 基質溶液で可視化した。波長補正を 650 nm に設定し、450 nm での吸光度を測定した。

バリデーション及び安定性データは 2.6.5.2 に示す。

2.6.4.2.6.2　PH20 パラログに対する抗 rHuPH20 抗体の交差反応性の評価

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。

2.6.4.2.6.3　抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性の測定

添付資料番号：4.2.2.1-14（13162）、4.2.2.1-15（13083）、4.2.2.1-16（13163）、4.2.2.1-17（R09061）

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（13162、13083、13163、R09061）。この方法は、HA が酸性血清中で不溶性の沈殿物が形成されることに基づいている。HA とインキュベートした血漿試料を rHuPH20 で消化させ、酸性化して未消化の HA を沈殿させた。ヒアルロニダーゼ活性は 640 nm での濁度と逆相関した。抗 rHuPH20 抗体によ

るヒアルロニダーゼ中和活性はヒアルロニダーゼ活性を低下させ、混濁度を増加させる。相対混濁度があらかじめ定めた閾値を超えた場合、検体は抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性陽性と判定した。

個々のバリデーション結果の要約を 2.6.5.2 に示す。

2.6.4.3　吸収

2.6.4.3.1　エフガルチギモド

げっ歯類及びウサギに静脈内投与したときのエフガルチギモド PK 試験概要は、それぞれウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD2.6.4.3.1.1 及び CTD2.6.4.3.1.2 で提出済みである。

エフガルチギモドはカニクイザル及びヒトの FcRn への結合特性が類似していることから、カニクイザル PK はヒト PK に最も関連性が高いと考えられた（ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.2.2.2.2）。エフガルチギモド単独での PK は、単回及び反復静脈内投与で評価した（ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD2.6.4.3.1.3）。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の PK を評価した（ARGX-NC-092）。さらに、カニクイザルを用いたエフガルチギモド単独又は rHuPH20 を混合した 12 週間反復皮下投与毒性試験（GLP 遵守）での TK を評価した（[redacted]36930）。

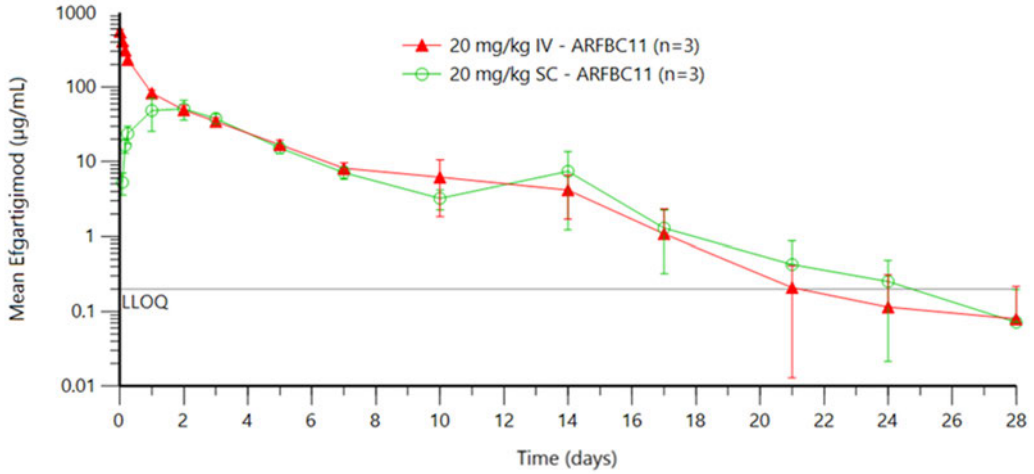
GLP 遵守の毒性試験でのエフガルチギモド TK は、検証済みソフトウェア [redacted] バージョン [redacted] 以上（[redacted], [redacted], US）を用いて、ノンコンパートメント解析により評価した。

2.6.4.3.1.1　カニクイザルを用いた単回皮下及び静脈内投与 PK 試験

添付資料番号：4.2.2.2-1（ARGX-NC-092）

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の PK を評価した。カニクイザルに皮下投与したときの血清中エフガルチギモド濃度は投与後 24～48 時間に最大となり、皮下投与したときの C_{max} は静脈内投与したときの C_{max} の 0.1 倍であった。それ以降は、皮下投与及び静脈内投与ともに同様の血清中濃度推移を示した（図 2.6.4-1）。

図 2.6.4-1　カニクイザルにエフガルチギモドを 20 mg/kg の用量で単回静脈内又は皮下投与したときの血清中エフガルチギモド濃度推移（平均値±SD）



Source: ARGX-NC-092
ARFCB11=efgartigimod clone; SC=subcutaneous; IV=intravenous; LLOQ=lower limit of quantitation; n=number of animals; SD=standard deviation

カニクイザルにエフガルチギモドを皮下投与したときの血清中濃度推移から $t_{1/2,eff}$ 及び $t_{1/2,z}$ を算出した。投与後 24 時間から 168 又は 240 時間までの血清中エフガルチギモド濃度から算出した $t_{1/2,eff}$ は 46.2 時間であった。終末相の血清中エフガルチギモド濃度推移から算出した $t_{1/2,z}$ は 160 時間であった。

$AUC_{0\text{-}168h}$ は $AUC_{0\text{-}inf}$ の約 80%で、終末相は総曝露量のわずかな部分しか占めていないことから、静脈内投与したときと同様に、エフガルチギモドの消失と蓄積には $t_{1/2,eff}$ が寄与していると考えられる。

カニクイザルにエフガルチギモド単独で 20 mg/kg の用量で皮下投与したときのバイオアベイラビリティは約 50%であった（表 2.6.4-3）。

表 2.6.4-3　カニクイザルにエフガルチギモド単独で 20 mg/kg の用量で単回静脈内及び皮下投与したときの血清中エフガルチギモドの PK パラメータ

Species	**Cynomolgus Monkey**	
Dose (mg/kg)	**20 IV**	**20 SC (without rHuPH20)**
No. per group/sex	**3M**	**3M**
C_{max} (µg/mL)	554±37.6	53.2±18.7
t_{max} (h)	0.08 (0.08-0.08)	48 (24-48)
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·h/mL)	9124±1018	4676±1113
$AUC_{0\text{-}last}$ (µg·h/mL)	10327±1693	5868±1652
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	10501±1614	5969±1634
CL(/F) (mL/h/kg)	1.93±0.284	3.53±0.991
$t_{½,eff}$ (h)	44.7±1.96	46.2±5.88
$t_{½,z}$ (h)	96.9±28.8	160±120
V_{ss} (mL/kg)	138±8.79	NA

Source: ARGX-NC-092
$AUC_{0\text{-}xh}$=area under the concentration-time curve (AUC) from time zero to x hours postdose; $AUC_{0\text{-}inf}$=AUC from time zero to infinity; $AUC_{0\text{-}last}$=AUC from time 0 to the last quantifiable concentration; CL(/F)=(apparent) systemic clearance; C_{max}=maximum observed concentration; IV=intravenous; M=male; NA=not assessable; no.=number; PK=pharmacokinetics; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20; SC=subcutaneous; SD=standard

deviation; $t_{½,eff}$=effective elimination half-life; $t_{½,z}$=terminal elimination half-life; t_{max}=time of C_{max}; V_{ss}=volume of distribution at steady-state
Note: Values are arithmetic means (±SD) except median (min-max) for t_{max}.

2.6.4.3.1.2　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）でのエフガルチギモドの TK

添付資料番号：4.2.3.2-1（[redacted]36930）

カニクイザルにエフガルチギモドを 30 及び 100 mg/kg の用量で rHuPH20（0、2000 U/mL）を混合して週 1 回 12 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.2）での 1 群 5 例（用量及び性別）から試料を採取し、バリデートされた ELISA 法（[redacted]37229）を用いて血清中エフガルチギモド濃度を測定した。TK パラメータを 2.6.7.3 に示す。

初回及び最終投与の投与前、投与後 8、24、48、72 及び 144 時間後に血清試料を採取した。初回及び最終投与以外の全ての投与日で、投与前及び投与後 24 時間に血清試料を採取した。[redacted]36930 試験での血清中エフガルチギモド濃度の測定は、曝露を確認するために実施した。したがって、本試験の TK パラメータについては慎重に解釈する必要がある。

カニクイザルにエフガルチギモドを 30 及び 100 mg/kg の用量で rHuPH20（2000 U/mL）を混合して皮下投与したとき、初回及び最終投与後ともに C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ は用量に応じて増加した。用量比例係数は 0.78～1.03 であった。性差は認められず、明らかな血清中濃度の蓄積は認められなかった。

カニクイザルに rHuPH20（2000 U/mL）を混合したエフガルチギモドを 100 mg/kg の用量で皮下投与したとき、平均 t_{max} は雌雄ともに最終投与後 8～24 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ は雄／雌でそれぞれ 585/402 µg/mL 及び 34030/22182 µg·h/mL であった。エフガルチギモド単独で 100 mg/kg の用量で皮下投与したとき、平均 t_{max} は雌雄ともに最終投与後 8～16 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ は雄／雌でそれぞれ 377/378 µg/mL 及び 25143/19973 µg·h/mL であった。

要約すると、カニクイザルにエフガルチギモドを皮下投与したとき、C_{max} 及び AUC は用量に依存して増加した。曝露量に雌雄差は認められず、反復皮下投与による蓄積も認められなかった。カニクイザルにエフガルチギモドを皮下投与したときの PK 特性は、静脈内投与したときの PK 特性に類似していた。rHuPH20 はエフガルチギモドの PK にほとんど影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.4.3.1.3　ヒトとサルの曝露量の比較及び安全域

添付資料番号：4.2.2.7-2（[redacted]22046）

サルとヒトの曝露量を比較して曝露量比を算出した（表 2.6.4-5）。

ARGX-113-1907 試験では、50 名の外国人健康被験者にエフガルチギモド単独（10 mg/kg）で週 1 回計 4 回静脈内又は rHuPH20 含有エフガルチギモド 1000 mg*を皮下投与した。この臨床試験では PK 用に頻回採血したため、PK を精度良く評価できていると考えられ、静脈内及び皮下投与でのヒトの曝露量として ARGX-113-1907 試験の PK データを用いた。なお、エフガルチギモドを日本人被験者に投与した試験では、頻回採血による PK は評価していないが、母集団 PK 解析では外国人と日本人との間に明らかな PK の違いは認められなかった（2.7.2）。

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）］での 100 mg/kg（NOAEL）を 12 回投与後の TK データ（Day 85～Day 92）を用いた。この投与期間中に曝露量が最大に達したことから、抗エフガルチギモド抗体の影響をほとんど受けていないと考えられた。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 についてはヒト AUC の算出法と同じ台形法（Linear up-log down）を用いて再計算した（[redacted]22046）。サル TK パラメータを表 2.6.4-4 に示す。

表 2.6.4-4　雌雄カニクイザルにエフガルチギモドを週 1 回 26 週間反復持続（0.5 時間）静脈内投与したときの TK パラメータ（平均値±SD）

Dose (mg/kg)	10	30	100	10	30	100
Sex and no. per group	6M	6M	6M	6F	6F	6F
Main study Days 85 to 92 (after the 12th dose)						
Sex and no. per group	5M [a]	6M	6M	3F [b]	6F	6F
C_{max} (µg/mL)	207±31.6	707±284	2653±414	148±106	696±74.3	2563±333
t_{max} (h)	0.90±0.89	1.50±2.45	0.50±0	2.50±3.46	0.50±0	0.83±0.82
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·h/mL)	2637±474	8076±958	30481±10767	2871±402	6969±1691	32130±5858
DPF	NA	1.02	1.16	NA	0.81	1.12
R	1.05	1.00	1.24	1.14	0.97	1.30

Source: ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.3.2-3 ([redacted]33260) for administration and sampling scheme, C_{max} and t_{max}; [redacted]22046 for remaining parameters.
$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time zero to t_{last} , the last quantifiable serum concentration >LLOQ (12.5 ng/mL), day 92 (168 hours) was the last sampling timepoint; C_{max}=maximum observed concentration; DPF=dose proportion factor; F=female; LLOQ=lower limit of quantification; M=male; no.=number; NA=not applicable; R=accumulation factor based on AUC;SD=standard deviation; t_{max}=time of C_{max}; TK=toxicokinetics

a) Data from 1 male (M18) were excluded from PK analysis from day 85 onwards [ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.3.2-3 ([redacted]33260)].
b) Data from 3 females (F21, F23, F24) were excluded from PK analysis from day 85 onwards[ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.3.2-3 ([redacted]33260)].

* 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。

カニクイザル 26 週間反復静脈内投与毒性試験でのサル曝露量と ARGX-113-1907 試験でのヒト曝露量との比を表 2.6.4-5 に示す。

表 2.6.4-5　カニクイザル 26 週間反復静脈内投与毒性試験でのサル曝露量とヒト曝露量（ARGX-113-1907 試験）との比

	Efgartigimod (10 mg/kg) IV (ARGX-113-1907)	**Efgartigimod (1000 mg) + rHuPH20 SC (ARGX-113-1907)**
AUC_{tau} (µg.h/mL)	6918	5841
C_{max} (µg/mL)	226	50
Fold multiple over AUC_{tau} 26-week IV toxicity study [a]	5	5
Fold multiple over C_{max} 26-week IV toxicity study [a]	12	52

Source: ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 4.2.3.2-3 ([redacted]33260), [redacted]22046, ARGX-113-1907
AUC_{tau}=area under the curve during dosing interval tau (ie, 168 hours); C_{max}=maximum observed concentration; IV=intravenous; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20; SC=subcutaneous
a) Fold multiple based on the average on male and female cynomolgus monkey. C_{max} and $AUC_{0\text{-}168\ h}$ were 2653 and 2563 µg/mL and 30481 and 32130 µg·h/mL in male and female, respectively.

サルに静脈内投与したときの曝露量は、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して、C_{max} 比で 12 又は 52 倍、AUC 比でいずれも 5 倍であった。ヒトにエフガルチギモドを皮下投与した場合も、静脈内投与したときと同様に十分な安全域が確保できていると考えられた。

2.6.4.3.2　rHuPH20

2.6.4.3.2.1　単回投与 PK 試験

2.6.4.3.2.1.1　CD-1 マウスを用いた単回静脈内投与 PK 試験

添付資料番号：4.2.2.2-2（R09023）

CD-1 マウスに rHuPH20 を静脈内投与したときの PK を評価した。CD-1 マウスに rHuPH20 を 0.4 mg/kg（44000 U/kg 又は 8784 U/mL）の用量で静脈内投与したとき、投与前、投与後 1、5、10、30 及び 60 分、2 及び 3 時間（各時点 6 例）に血液を採取し、2.6.4.2.4 に示す定量法を用いてヒアルロニダーゼ活性を測定した。血漿中ヒアルロニダーゼ活性は、静脈内投与後速やかに減少し、活性値は投与後 30 分までに LLOQ（0.681 U/mL; 6.19 ng/mL）未満となった。静脈内投与直後の最高血漿中ヒアルロニダーゼ活性値（$C_{initial}$）の平均値は 1176 ng/mL（119 U/mL）であった。PK パラメータは平均血漿中ヒアルロニダーゼ活性値を用いてノンコンパートメント PK 解析（NCA）により算出した（表 2.6.4-6）。

血漿中ヒアルロニダーゼ活性の $t_{1/2}$ は 2.3 分（0.038 時間）と推定され、マウスでは rHuPH20 は血中から速やかに消失した。

表 2.6.4-6　CD-1 マウスに rHuPH20 を静脈内投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ平均値

$t_{1/2}$ (h)	$C_{initial}$ (ng/mL)	C_0 (ng/mL)	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng·h/mL)	CL (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	MRT (h)
0.038	1176	1975	79.6	5440	160	0.030

Abbreviations: $AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; C_0 = plasma concentration back-extrapolated to time 0; $C_{initial}$ = observed maximum plasma concentration; CL = systemic clearance; MRT = mean residence time; $t_{½}$ = elimination half-life; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

2.6.4.3.2.1.2　雌カニクイザルを用いた単回静脈内及び皮下投与 PK 試験

添付資料番号：4.2.2.2-3（R07060）

雌カニクイザルに rHuPH20 を静脈内及び皮下投与したときの PK を評価した。カニクイザル（3 例/群）に、rHuPH20 を表 2.6.4-7 に示す用量で静脈内（伏在静脈）又は皮下（背部の肩甲骨間領域）に投与した。静脈内投与前、投与後 1、2.5、5、10、15、20、及び 60 分並びに皮下投与前、投与後 0.25、0.5、1、4、8 及び 24 時間に血液を採取し、2.6.4.2.4 に示す[redacted]比濁法を用いてヒアルロニダーゼ活性を測定した。

ヒアルロニダーゼ活性値の PK 解析には、NCA 及びコンパートメントモデリングの両方を用いた。静脈内投与したときの平均ヒアルロニダーゼ活性値–時間プロファイルから算出し用量補正した rHuPH20 の曝露量は非線形 PK を示した。高用量（15 及び 30 mg/kg）を静脈内投与したとき、最終採血時点が投与後 1 時間であったため、NCA で外挿により推定した AUC が $AUC_{0-\infty}$の 25%以上を占めた。活性値–時間プロファイルが十分でないデータを用いて NCA により算出した PK パラメータは慎重に解釈する必要があるため、C_{max} 及び AUC_{0-last} を除き、静脈内投与したときの NCA により算出した PK パラメータは本 CTD では示さなかった。皮下投与したときの曝露量は 1 mg/kg では用量が低すぎて十分な評価ができなかったが、3～30 mg/kg では用量に応じて増加した。NCA により得られた静脈内及び皮下投与したときの PK パラメータをそれぞれ表 2.6.4-8 及び表 2.6.4-9 に示す。

[redacted]（[redacted]）を用いて、全ての静脈内投与したときの用量からのデータを同時に適合させるために、線形クリアランス及び非線形クリアランスを有する 1-コンパートメントモデルを開発した。

クリアランスは以下のように定義した：

$$CL_{total} = [V_{max} / (K_m + C)] + CL_2$$

CL_{total} は全身クリアランス、V_{max} は非線形クリアランス過程での最大速度、K_m はミカエリス・メンテン定数、C は血漿中ヒアルロニダーゼ活性値、CL_2 は平行線形消失経路を表すクリアランスを示す。皮下投与したとき、全ての用量での血漿中ヒアルロニダーゼ活性値は、一次吸収及び消失過程を有する 1-コンパートメントモデルで表すことができた。図 2.6.4-2 及び図 2.6.4-3 は、それぞれ、静脈内及び皮下投与したときのヒアルロニダーゼ活性値–時間プロファイルを示す。静脈内投与に関するモデル推定パラメータを表 2.6.4-10 に要約する。消失過程の非線形部分は飽和が寄与しており、主に静脈内投与で血漿中ヒアルロニダーゼ活性値が K_m（1118 U/mL）に近似した場合に観察され、容量に制限された機序によると考えられた。皮下投与したときのヒアルロニダーゼ活性値は K_m 未満であった。

ヒアルロニダーゼ活性値は、静脈内及び皮下投与したとき用量に応じて増加した。皮下投与したときと比較して、同じ用量を静脈内投与したときの最大活性は約 300～500 倍であった（表 2.6.4-8 及び表 2.6.4-9）。ヒアルロニダーゼ活性値の $t_{1/2}$ は 0.3 mg/kg を静脈内投与したとき約 5 分、3、10 又は 30 mg/kg を皮下投与したとき 10.3～15.7 時間であった。皮下からの吸収が律速となり、静脈内投与したときと比較して皮下投与したときの $t_{1/2}$ は長いと示唆された。非線形 PK のため、NCA により算出した AUC を用いて絶対バイオアベイラビリティを正確に算出することはできなかった。1-コンパートメントモデルを用いて、雌カニクイザルに 3、10 又は 30 mg/kg を皮下投与したときの絶対バイオアベイラビリティは、それぞれ 3.9、1.8 又は 1.5%で、全身曝露量は低かった。

表 2.6.4-7　試験デザイン（R07060 試験）

Treatment Phase	Group	Route	Dosing Day	Dose (mg/kg)	Dose (U/kg)
A	1	IV	D1	0.3	33000
	2	IV	D1	3	330000
B	1	IV	D2	30	3300000
	2	IV	D2	15	1650000
C	1	SC	D3	1	110000
	2	SC	D3	3	330000
D	1	SC	D5	10	1100000
	2	SC	D5	30	3300000

Note: Doses in U/kg were calculated for each study from an average specific activity of rHuPH20 of 110000 U/mg

表 2.6.4-8　雌カニクイザル（n=3/群）に rHuPH20 を静脈内投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ（NCA）

PK Parameters [a]	rHuPH20 Dose (mg/kg)			
	0.3	3	15	30
C_{max} (U/mL)	1242.5 ± 180.1	13393.3 ± 1160.1	60700.0 ± 6300.6	129750.0 ± 22551.3
$AUC_{0–last}$ (U·h/mL)	174.5 ± 47.4	6724.0 ± 1249.2	43997.3 ± 5722.4	106166.7 ± 17492.9
T_{last} (h)	0.5	1.0	1.0	1.0
$AUC_{0–\infty}$ (U·h/mL)	177.9 ± 49.5	7201.3 ± 1139.4	93194.9 ± 15961.0	290481.3 ± 59342.6
CL (mL/h/kg)	207.7 ± 65.6	49.1 ± 7.3	19.0 ± 3.0	12.3 ± 2.5
V_{ss} (mL/kg)	23.4 ± 2.4	19.4 ± 5.6	29.3 ± 3.8	26.5 ± 4.9
MRT (h)	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.2 ± 0.3

Abbreviations: $AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_{0-last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to last measurable timepoint (T_{last}); CL = clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; MRT = mean residence time; NR = not reported; V_{ss} = volume at steady-state.
a)　Parameter values presented as mean ± standard deviation.

表 2.6.4-9 雌カニクイザル（n=3/群）に rHuPH20 を皮下投与したときのヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ（NCA）

PK Parameters[a]	rHuPH20 Dose (mg/kg)			
	1	3	10	30
C_{max} (U/mL)	11.0 ± 10.4	26.4 ± 5.8	140.5 ± 118.7	480.2 ± 253.0
T_{max} (h)	2.5 ± 2.1	3.3 ± 4.0	4.3 ± 3.5	4.0 ± 0.0
$AUC_{0-\infty}$ (U·h/mL)	NC	562.0 ± 140.0	1585.0 ± 276.5	6102.0 ± 1981.0
CL/F (mL/h/kg)	NC	639.5 ± 159.3	749.0 ± 145.0	615.1 ± 210.4
MRT (h)	NC	23.0 ± 16.0	18.0 ± 16.0	14.0 ± 4.3

$AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; CL/F = apparent clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; MRT = mean residence time; NC = not calculated; T_{max} = time to maximum observed plasma concentration.
a) Parameter values presented as mean ± standard deviation.

表 2.6.4-10 サルに rHuPH20 を単回静脈内投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の PK パラメータ（1-コンパートメントモデル解析）

PK Parameters[a]	Value
CL_2 (mL/h/kg)	9.3 ± 1.3
V_{max} (U/h/kg)	2.7 ± 0.1
K_m (U/mL)	1118.0 ± 146 .0
V (mL/kg)	25.7 ± 0.1

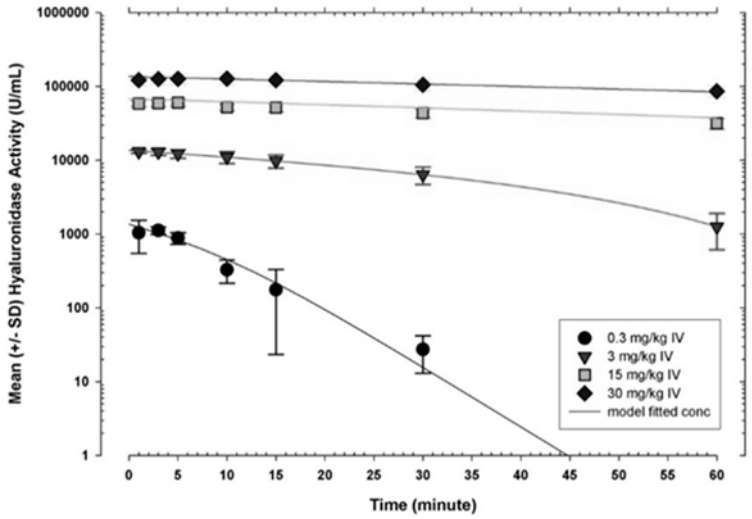
CL_2 = clearance for the linear elimination pathway; Km = Michaelis-Menten constant; V = volume of distribution;V_{max} = maximal velocity.
a) Parameter values presented as mean ± SD.

副次 PK パラメータ

Parameters	0.3 mg/kg	3 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
k_{el} (1/h)	5.3	1.2	0.5	0.5
CL_{total} (mL/h/kg)	135.1	30.5	13.8	11.6
$AUC_{0-\infty}$(U·h/mL)[a]	244.2	10821.8	119482.0	285229.0

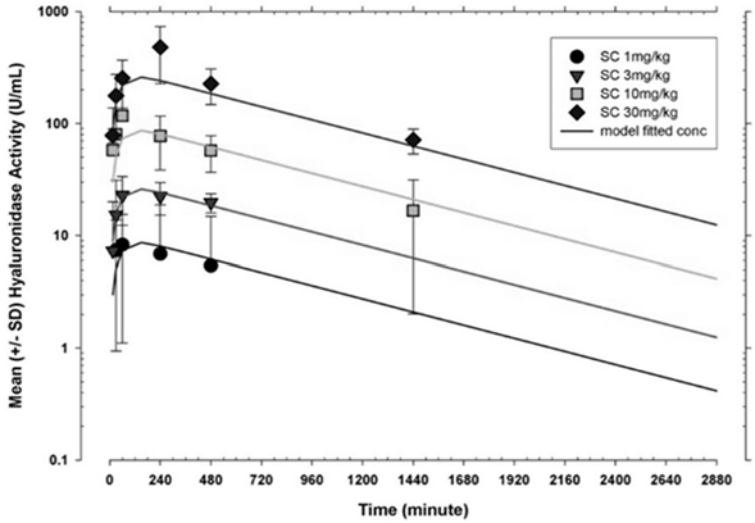
k_{el} = elimination rate constant; CL_{total} = nonlinear CL + CL_2 ; $AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma concentration versus time curve from time 0 to infinity.
a) $AUC_{0-\infty}$ in U·h/mL were calculated using an average specific activity of rHuPH20 of 110000 U/mg

図 2.6.4-2　雌カニクイザルに rHuPH20 を単回静脈内投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値



Symbols represent mean rHuPH20 activity, errors bars represent SD and lines represent model-fitted profiles.

図 2.6.4-3　雌カニクイザルに rHuPH20 を単回皮下投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値



Symbols represent mean rHuPH20 activity, errors bars represent standard deviation and lines represent model fitted profiles.

2.6.4.3.2.2　反復投与 TK 試験

2.6.4.3.2.2.1　サルを用いた 7 日間反復投与毒性試験での TK

添付資料番号：4.2.3.2-3（R08056）

サル 7 日間反復投与毒性試験で rHuPH20 を静脈内及び皮下投与したときの TK を評価した。カニクイザル（雌雄各 2 例/群）に rHuPH20 を 5 mg/kg（550000 U/kg 又は 1.11×10^6 U/mL）の用量で 1 日 1 回、7 日間反復静脈内又は皮下投与した。静脈内投与後 Day 1 及び 7 の投与後 1、5、10、30、60、120 及び 240 分並びに最終投与後 24 時間の Day 8 に採血した。また、皮下投与後 Day 1 及び 7 の投与後 0.5、1、2、4、8、12 及び 24 時間に採血し、2.6.4.2.4 に示す[redacted] 比濁法を用いてヒアルロニダーゼ活性を測定した。

個体別血漿中ヒアルロニダーゼ活性値を用いて NCA により TK パラメータを算出し、その平均値を表 2.6.4-11 に示す。静脈内投与したときの V_{ss} は小さく、皮下投与したときの t_{max} の中央値は 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、7 日間反復投与後に曝露量のわずかな減少が認められた。rHuPH20 の全身曝露量は、静脈内投与したときと比較して皮下投与で低く、AUC_{0-last} を用いて算出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、それぞれ 5.44 及び 5.74%であった。

表 2.6.4-11　カニクイザルに rHuPH20（5 mg/kg）を 1 日 1 回反復静脈内又は皮下投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の TK パラメータ

	IV		SC	
TK Parameter	**Day 1**	**Day 7**	**Day 1**	**Day 7**
Mean AUC_{0-last} (U·h/mL)	11800.0	8733.0	641.7	501.7
Mean $AUC_{0-\infty}$ (U·h/mL)	11883	8800	NC	NC
Mean C_{max} (U/mL)	NR	NR	200.0	115.0
Median T_{max} (min)	NR	NC	60.0	60.0
Mean V_{ss} (mL/kg)	17.0	16.7	NR	NR

$AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma activity-time curve from time 0 to infinity; AUC_{0-last} = area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum observed plasma concentration; NR = not reported; T_{max} = time to maximum observed plasma concentration; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

2.6.4.3.2.2.2　サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験での TK

添付資料番号：4.2.3.2-4（R09050）

サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験での TK を評価した。本試験では、カニクイザル（雌雄各 6 例/群）に溶媒（ヒスチジン 10 mmol/L、NaCl 130 mmol/L、pH6.0）又は rHuPH20 を 0.02 mg/kg（2200 U/kg）、0.2 mg/kg（22000 U/kg）及び 2 mg/kg（220000 U/kg）の用量で週 1 回皮下投与した。投与前及び Day 1 の投与後 0.25、0.5、1、2、4、6、12 及び 16 時間並びに Week 3、13、27 及び 39 の最終日（Day 21、85、183 及び 267）に採血し、2.6.4.2.4 に示す[redacted] 比濁法を用いてヒアルロニダーゼ活性を測定した。抗 rHuPH20 抗体及びヒアルロニダーゼ中和活性については、馴化期間中（Day -6）及び投与期間中の Day 7、14、42、70、95、123、140、154、182、210、238、266、274、295 及び 302 に採血し、2.6.4.2.6.1 及び 2.6.4.2.6.3 に示した分析法を用いて測定した。

サルでのヒアルロニダーゼ活性の背景値を補正するため、Day 1 の投与前の血漿中ヒアルロニダーゼ活性［約 10～25 U/mL（110～275 ng/mL に相当）］を、投与後の全ての測定時点から差し引いた。雌雄とも対照（平均 0.00～2.42 U/mL）、0.02 mg/kg（平均 0.00～1.22 U/mL）

及び 0.2 mg/kg（平均 0.00～2.86 U/mL）の群でのベースライン補正した Day 1、21、85、183 及び 267 の投与後 2 時間のヒアルロニダーゼ活性値は、低値又は LLOQ（< 10 U/mL）未満であった。最高用量である 2 mg/kg 群では、血漿中ヒアルロニダーゼ活性が Day 1～85 まで増加し、その後 Day 185 及び 267 に低下した。2 mg/kg 群の個体別活性値を用いて NCA により TK パラメータを算出した（表 2.6.4-12）。雌雄ともに Day 85 に C_{max} が確認された。Day 267 では、雄のヒアルロニダーゼ活性値は LLOQ 未満であった。雌の活性は定量可能であったが、Day 1 より低かった。図 2.6.4-4 及び図 2.6.4-5 に示すように、2 mg/kg の反復投与による曝露量の減少は、Day 267 の血漿中のヒアルロニダーゼ中和活性と一致していた。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と相関し、概ね経時的に増加した。抗 rHuPH20 抗体と曝露量の関係についての考察は 2.6.6 に示す。抗 rHuPH20 抗体は投与開始後 6 週までに全群で検出され、ヒアルロニダーゼ中和活性は投与開始後 13 週までに概ね検出された。

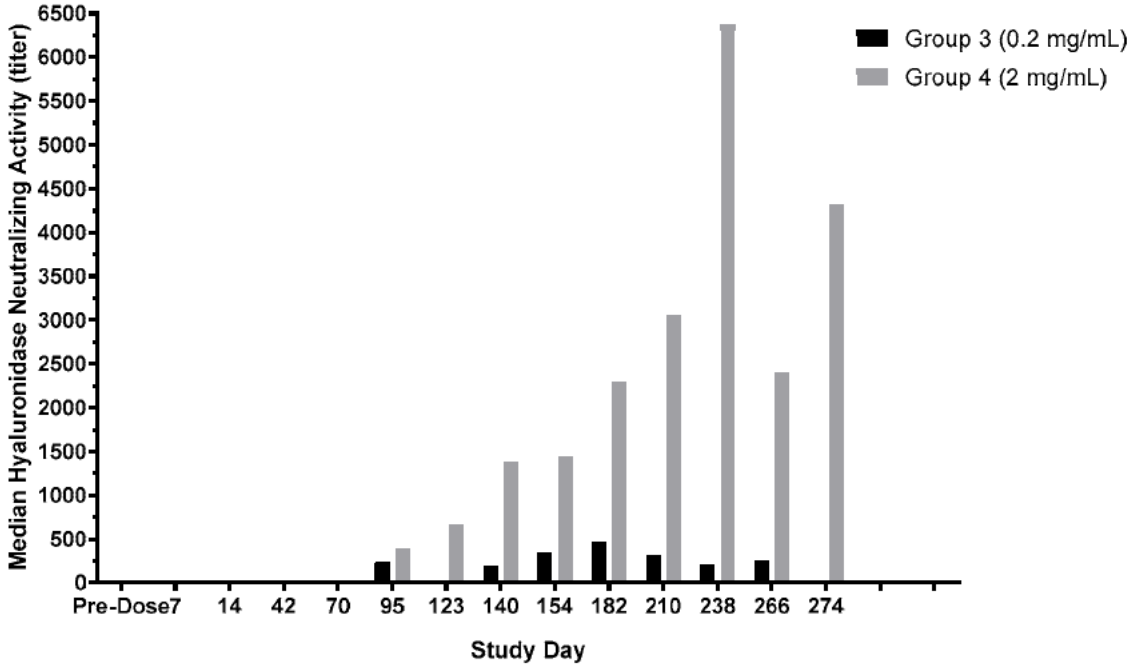
結論として、カニクイザルに週 1 回 39 週間反復皮下投与したとき、rHuPH20 の血中での曝露が確認された。試験後期の血漿中ヒアルロニダーゼ活性の減少は、反復投与による抗 rHuPH20 抗体価及びヒアルロニダーゼ中和活性の増加と相関していた。

表 2.6.4-12　カニクイザルに rHuPH20（2 mg/kg）を週 1 回反復皮下投与したときの血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の TK パラメータ

TK Parameter	Male				Female			
	Day 1	Day 85	Day 183	Day 267	Day 1	Day 85	Day 183	Day 267
$AUC_{0–last}$, (U·h/mL)	20.5	177.0	89.6	NC	47.8	395.0	467.0	56.2
C_{max} (U/mL)	12.5	28.8	12.0	NC	20.8	64.7	64.2	10.0
Median T_{max} (h)	2.0	6.0	4.0	NC	2.0	4.0	4.0	4.0

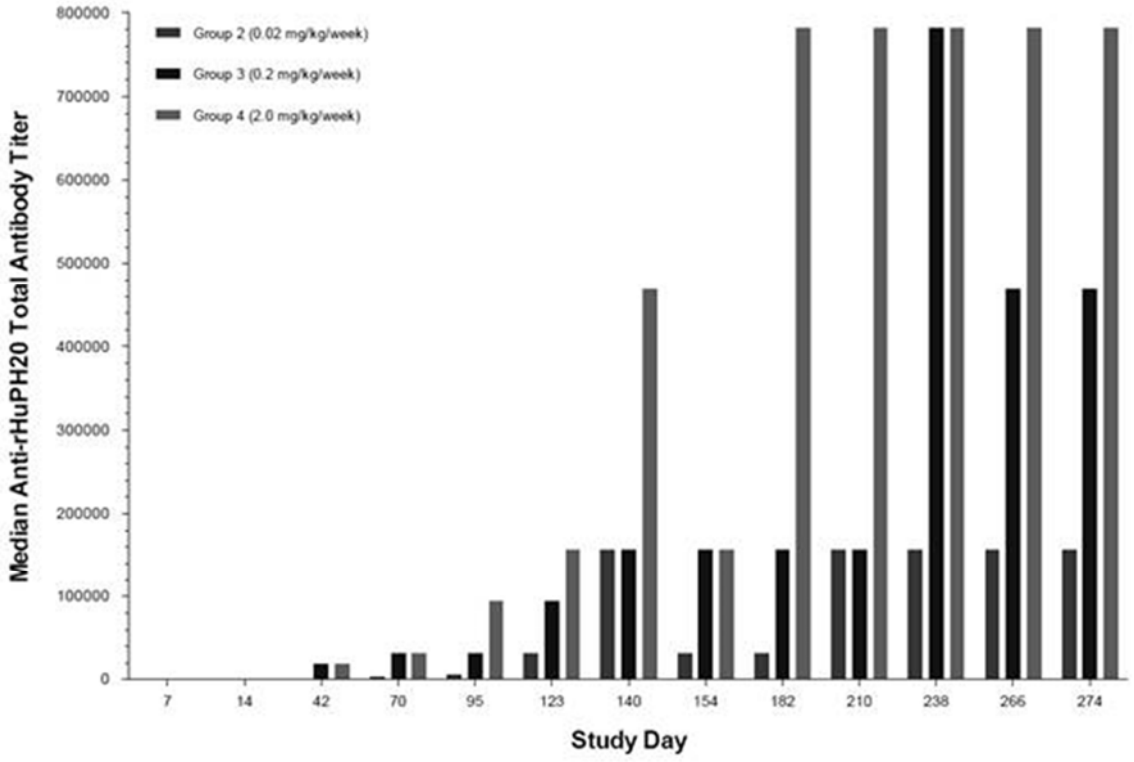
$AUC_{0\text{-}last}$= area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measurable time point; C_{max} = maximum observed plasma activity; NC = not calculated; T_{max} = time to maximum observed plasma activity; U = units of hyaluronidase activity.

図 2.6.4-4　用量及び試験日で補正したカニクイザル血漿中ヒアルロニダーゼ中和活性値（中央値）



Note: Since median values for all Group 1 (0 mg/kg/week) and 2 (0.02 mg/kg/week) time points were zero, they wew excluded from the graph depicted above.

図 2.6.4-5　用量及び試験日で補正したカニクイザル血漿中抗 rHuPH20 抗体価（中央値）



Note: Since median values for all Group 1 (0 mg/kg/week) time points were zero, they were excluded from the graph depicted above.

2.6.4.3.2.2.3　マウス皮下投与 EFD 試験の TK での血漿中ヒアルロニダーゼ活性値及び抗 rHuPH20 抗体価

添付資料番号：4.2.3.5.2-2（R08176）

妊娠マウスを用いた EFD 試験で、ヒアルロニダーゼ活性及び抗 rHuPH20 抗体の産生を評価した。妊娠マウスの DG 6～15 に rHuPH20 を 3（330000 U/kg；43272 U/mL）、9（990000 U/kg；216360 U/mL）又は 18 mg/kg（1980000 U/kg；432720 U/mL）の用量で 1 日 1 回皮下投与した。投与後約 30 分、2、4、8 及び 24 時間に母動物の大静脈から採血し（n=3/時点）、比濁分析法（2.6.4.2.4）によりヒアルロニダーゼ活性を測定した。rHuPH20 の全身曝露量は概ね用量に応じて増加した。血漿中ヒアルロニダーゼ活性の t_{max} は、試験を通して 0.5～2 時間であった。3、9 及び 18 mg/kg 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。平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ 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 U·h/mL であった。さらに、血漿検体のサブセット（3、9 及び 18 mg/kg、投与後 8 及び 24 時間、n=3/時点）についても、ブリッジング ECL アッセイを用いて抗 rHuPH20 抗体の有無を後向き解析した（2.6.4.2.6.1）。全てのマウスで抗 rHuPH20 抗体は、DG 6 では陰性（抗体価 50 未満）、DG 15 では陽性（抗体価 200～3200000 以上）で、抗体価に明らかな用量依存性は認められなかった（表 2.6.4-13）。

表 2.6.4-13　皮下投与後 15 日での抗 rHuPH20 抗体価

Dose	Antibody Titer Range	Antibody Titer Median
3 mg/kg	1:200 –1:1600000	1:12500
9 mg/kg	1:2500 –1:1600000	1:12500
18 mg/kg	1:2500 – ≥1:3200000	1:62500

2.6.4.3.2.3　ヒトと動物の曝露量の比較及び安全域

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 の血中での曝露が確認された。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 HED に基づき算出した。反復投与毒性試験、EFD 試験及び PPND 試験における NOAEL、HED 及び安全域を表 2.6.4-14 に示す。それぞれの NOAEL は、エフガルチギモド皮下注製剤での rHuPH20 の臨床用量である 11200 U の約 168～1109 倍であった。

表 2.6.4-14　rHuPH20 の毒性試験の NOAEL に基づく安全域

Species/ Strain	Study/ Route of Administration/ Frequency	NOAEL mg/kg, (U/kg)	HED mg/kg[a] (U/kg)	Duration of Study	Safety Margin[b]
					11200 U
Monkey/ Cynomolgus	7-day repeat-dose toxicity[c] IV or SC, once daily	5 (IV and SC) (550000)	1.61 (177419)	7 days	1109
	39-week repeat-dose toxicity[d] SC, once weekly	2 (220000)	0.65 (70968)	39 weeks	444
Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Embryo-fetal development SC, once daily[e]	3 (330000)	0.24 (26829)	18 days	168
		18 (1980000)	1.46 (160976)	18 days	1006
	Pre/postnatal development SC, once daily[f]	9 (990000)	0.73 (80488)	21 days	503
	Life-time repeat-dose toxicity study in juvenile mice, SC once daily[g]	1 (110000)	0.081 (8943)	34 weeks	56

a) An HED based on allometric scaling was determined by dividing the NOAEL by a scaling factor of 3.1 for cynomolgus monkeys or 12.3 for mice (FDA, 2005).
b) The HED (U/kg) was multiplied by 70 kg (patient body weight) to determine total U, then divided by the human dose of 11200 U of rHuPH20 to determine the safety margin.
c) Source: R08056. There were no adverse effects, and the NOAEL was the highest dose tested.
d) Source: R09050. There were no adverse effects, and the NOAEL was the highest dose tested.
e) Source: R08176. rHuPH20 was embryo-fetotoxic at ≥ 9 mg/kg/dose as demonstrated by increased resorptions, decreased litter size, and decreased fetal weight. There were no maternal adverse effects at the highest dose tested, 18 mg/kg/dose.
f) Source: R09058. There were no adverse effects, and the NOAEL was the highest dose tested.
g) Source: R15028.

Abbreviations: HED=human equivalent dose; IV=intravenous; NOAEL=no-observed-adverse-effect-level; SC=subcutaneous; U=units.

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　エフガルチギモド

ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4.4 で提出しており、新たな試験は実施していない。

2.6.4.4.2　rHuPH20

2.6.4.4.2.1　マウスに rHuPH20 を皮内投与したときの皮膚、リンパ及び血漿中 rHuPH20 の分布

添付資料番号：4.2.2.3-4（R08127）

マウスを用いて rHuPH20 の局所分布試験を実施し、皮内投与後の皮膚、血漿及び局所リンパ中のヒアルロニダーゼ活性値を測定した。

雌 NCr nu/nu マウスに 2000 U/mL（3520 U/kg に相当；0.032 mg/kg; 80 U）の rHuPH20 を 40 µL の容量で左背部に皮内投与した。投与後 0.0167、0.25、0.5、1、4、8 及び 24 時間に、血漿、投与側のプールした浅頸、腋窩、上腕及び鼠径リンパ節を含む局所リンパ節並びに皮膚試料を採取した。2.6.4.2.4 に示す分析法を用いて試料中ヒアルロニダーゼ活性を測定した。

投与部位である皮膚試料中のヒアルロニダーゼ活性値は皮内投与後 1～15 分に最大となり、その後急速に減少した。ヒアルロニダーゼ活性値は投与後 4 時間では LLOQ（約 0.7 U/mL 又は 0.02 U/mg 皮膚）未満であった。観察された最大活性値は 10.1～23.0 U/mL（0.15～0.31 U/mg）であった（n=5/時点）。皮膚での rHuPH20 の平均 $t_{1/2}$ 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値は低く、最大活性値（n=5/時点）は 0.65～3.3 U/mL（0.01～0.072 U/mg リンパ）であった。血漿試料の大部分（40 検体中 39 検体）でヒアルロニダーゼ活性が認められなかった。

上述の結果から、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。

2.6.4.4.2.2　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内投与したときの PK 及び組織分布

添付資料番号：4.2.2.1-10（12214-A）、4.2.2.3-1（12214-B）

雌雄 CD-1 マウスでの rHuPH20 の組織分布を評価した。^{125}I-rHuPH20 を約 1.33 µg/例の用量でマウスの左背部に単回皮内投与した。^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性は約 8000 U/mg、放射能投与量は約 6 µCi/例、放射活性は 8.31×10^6 dpm/µg 又は 3.74 µCi/µg であった。投与後 5、15 及び 30 分、1、2、8、12、24 及び 48 時間（雌雄各 1 例/時点）に末梢血液及び組織を採取し、LSC により放射能を測定した。採取した組織は、皮膚（投与部位）、脳、眼、胆嚢／胆汁（内容物）、腎臓、心臓、大腸、小腸、肝臓、肺、リンパ節（腸間膜、鼠径部及び腋窩）、卵巣、脾臓、精巣、甲状腺／副甲状腺、膀胱（存在する場合は壁及び内容物）、子宮及び屍体であった。

個体別血漿及び組織中放射能濃度を用いて NCA により PK パラメータを算出した。血漿 PK パラメータを表 2.6.4-15 に示す。C_{max} は投与後 1 時間で、雄及び雌でそれぞれ 66.8 及び 94.8 ng eq/g であった。検出された放射能の 25%は TCA 沈殿物であった。その後、放射能濃

度は減少し、最終採取時点の投与後 48 時間では雄及び雌でそれぞれ 0.521 及び 0.369 ng eq/g であった。$t_{1/2}$ 平均値は雌で 5.88 時間であったが、雄では消失相が不明確（NCA で R^2<0.8）であったため算出しなかった。血液／血漿中放射能濃度比は雄及び雌でそれぞれ 0.80～1.00 及び 0.76～1.04 であった。放射能は投与後 5 分までに組織中に分布した。放射能濃度は、皮膚（投与部位）で最も高く、雄の投与後 5 分で 7724 ng eq/g 及び雌の投与後 15 分で 10142 ng eq/g で、経時的に減少した。投与初期の時点では左鼠径リンパ節及び左腋窩リンパ節で放射能濃度が高く、リンパ節を介して消失することが示唆された。小腸での放射能濃度が最も低く、投与後 1 時間に雄及び雌でそれぞれ 18.0 及び 17.5 ng eq/g であった。投与放射能に対する割合は、皮膚（投与部位）、肝臓、腎臓、甲状腺/副甲状腺で高かった。

表 2.6.4-15　CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20（1.33 μg/例）を皮内投与したときの血漿中 PK パラメータ

Parameters	Males	Females
$t_{½}$ (h)	RNR	RNR
T_{max} (h)	1.0	1.0
C_{max} (ng eq/g)	68.8	94.8
$AUC_{0-\infty}$ (ng eq·h/g)	320.0	436.0

$AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 to time extrapolated to infinity; C_{max} = observed maximum radioactivity concentration; ng eq/g=radioactive equivalent concentrations; RNR = Results not reported (R^2 < 0.8); $t_{½}$ = elimination half-life; T_{max} = time at which maximum concentration of radioactivity was observed.

2.6.4.4.2.3　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回静脈内投与したときの PK 及び組織分布

添付資料番号：4.2.2.3-2（13128）

LSC 及び QWBA を用いて、雌雄 CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回静脈内投与したときの組織分布を評価した。マウスに ^{125}I-rHuPH20 を 4 μg/例の用量で尾静脈から静脈内投与した。^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性値は約 2000 U/mL、放射能投与量は約 18 μCi/例及び放射活性は 6.43×10^6 dpm/μg 又は 2.89 μCi/μg であった。投与後 2、5、10、15、30 分、1、2、8、24、48 時間（雌雄各 1 例/時点）に末梢血液及び組織を採取し、放射能を LSC により測定した。採取した組織は、脳、眼、胆嚢／胆汁（内容物）、腎臓、大腸及び小腸壁、肝臓、肺、リンパ節（腸間膜及び鼠径部）、骨格筋（背側）、心筋、卵巣、皮膚、脾臓、精巣、甲状腺／副甲状腺、膀胱（存在する場合は壁及び内容物）、子宮及び屍体であった。

個体別血漿及び組織中放射能濃度を用いて NCA により PK パラメータを算出した。血漿 PK パラメータを表 2.6.4-16 に示す。静脈内投与初期の血漿中最高放射能濃度（$C_{initial}$）は、雄及び雌でそれぞれ投与後 30 及び 2 分であった。^{125}I-rHuPH20 中のタンパク質の TCA 沈殿に次いで、主に上清（57.58%）中に高い放射能が回収された。上清中の放射能の多くは遊離ヨウ素で、^{125}I-rHuPH20 は沈殿画分にあると推定された。その後放射能濃度は減少し、最終採取時点の投与後 48 時間の血漿中放射能濃度は雄及び雌でそれぞれ 0.46 及び 2.44 ng eq/g であった。血液／血漿中濃度比は雄及び雌でそれぞれ 0.76～1.02 及び 0.62～1.05 であった。組織中放射能は ^{125}I-rHuPH20 投与後 2 分までに各組織に分布した。放射能濃度は甲状腺／副甲状腺で最も高く、投与後 8 時間の値は雄及び雌で 29067 及び 19885 ng eq/g で、^{125}I-rHuPH20 のヨウ素が遊離し、甲状腺／副甲状腺に蓄積したと考えられた。次いで肺、肝臓及び胆嚢/胆汁の順で高い放射能濃度を示した。脳中放射能濃度が最も低く、投与後 30 分の雄

及び投与後 2 分の雌でそれぞれ 10.7 及び 17.3 ng eq/g であった。投与放射能に対する割合は、肝臓、肺、膀胱内容物で高かった。

表 2.6.4-16　CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を静脈内投与したときの血漿 PK パラメータ

Sex	$t_{1/2}$ (h)	$C_{initial}$ (ng eq/g)	C_0 (ng eq/g)	$AUC_{(0-\infty)}$ (h·ng eq/g)
Male	3.54	247	251	1147
Female	4.04	1514	2070	1898

$AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; C_0 = plasma radioactivity concentration back-extrapolated to time 0; $C_{initial}$ = observed maximum plasma radioactivity concentration; $t_{½}$ = elimination half-life.

2.6.4.4.2.4　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内又は皮下投与したときの PK 及び組織分布

添付資料番号：4.2.2.3-3（13184）

雌雄 CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内又は皮下投与したときの組織分布を評価した。マウスに ^{125}I-rHuPH20 を約 1.73 µg/例の用量で、左背部へ皮内又は皮下投与した。^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性は約 2000 U/mL、放射能投与量は約 5 µCi/例、放射活性は 6.55×10^6 dpm/µg 又は 2.95 µCi/µg であった。投与後 2、5、10、15、30、45 分後、1、2、8、24 時間（雌雄各 1 例/時点）に末梢血液及び組織を採取し、LSC により測定した。採取した組織は、脳、眼、胆嚢／胆汁（内容物）、腎臓、投与部位（皮膚及び筋肉）、大腸及び小腸壁（及び内容物）、肝臓、肺、リンパ節（腸間膜、鼠径部及び腋窩）、筋肉（脚内転筋）、卵巣、脾臓、精巣、甲状腺／副甲状腺、膀胱（存在する場合は壁及び内容物）、子宮、及び屍体であった。

個体別血漿及び組織中放射能濃度を用いて NCA により PK パラメータを算出した。血漿 PK パラメータを表 2.6.4-17 に示す。血漿中放射能濃度は、t_{max} 後に減少し、最終採取時点の投与後 24 時間まで検出された。血液／血漿中放射能濃度比は、雄の皮内及び皮下投与でそれぞれ 0.83～1.00 及び 0.87～1.01 で、雌の皮内及び皮下投与でそれぞれ 0.84～1.00 及び 0.99～1.01 であった。雌雄ともにいずれの投与経路でも、放射能は投与後 2 分までに組織に分布し、投与部位（皮膚及び筋肉）で最も高い放射能が認められた。皮内投与後 2 分に雄及び雌ともに C_{max} に達し、それぞれ 12369 及び 196755 ng eq/g であった。雄及び雌に皮下投与後 30 及び 15 分に C_{max} に達し、それぞれ 6489 及び 8654 ng eq/g であった。投与初期の時点では左鼠径リンパ節で放射能濃度が最も高く、リンパ節を介して消失することが示唆された。脳中放射能濃度が最も低く、雄及び雌に皮内投与後 45 分及び 2 時間に C_{max} に達し、それぞれ 3.84 及び 6.06 ng eq/g であった。皮下投与したとき、雄では脳（投与後 45 分の C_{max} 5.97 ng eq/g）、雌では大腸（投与後 45 分の C_{max} 15.2 ng eq/g）での放射能が最も低かった。投与放射能に対する割合は、投与部位（皮膚及び筋肉）、肝臓、腎臓で高かった。

表 2.6.4-17　CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を皮内又は皮下投与したときの血漿 PK パラメータ

Parameters	ID Route		SC Route	
	Males	Females	Males	Females
$t_{1/2}$ (h)	4.4	4.5	4.5	4.5
T_{max} (h)	0.8	1.0	0.8	0.8

Parameters	ID Route		SC Route	
	Males	Females	Males	Females
C_{max} (ng eq/g)	76.8	100.0	106.0	84.2
$AUC_{0-\infty}$ (h·ng eq/g)	858.0	572.0	560.0	947.0

$AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 to time extrapolated to infinity; C_{max} = observed maximum plasma concentration; $t_{½}$ = elimination half-life; T_{max} = time at which maximum plasma radioactivity concentration is observed.

2.6.4.5　代謝

2.6.4.5.1　エフガルチギモド

ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4.5 で提出しており、新たな試験は実施していない。

2.6.4.5.2　rHuPH20

ICH S6（R1）ガイドラインによると、バイオテクノロジー応用医薬品の主な代謝経路は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解であることが知られており、一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ないとされている。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。

2.6.4.6　排泄

2.6.4.6.1　エフガルチギモド

ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4.6 で提出しており、新たな試験は実施していない。

2.6.4.6.2　rHuPH20

2.6.4.6.2.1　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内投与したときの排泄

添付資料番号：4.2.2.3-1（12214-B）

雌雄 CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を約 1.33 µg/例の用量で単回皮内投与した。^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性は 8000 U/mL、放射能投与量は約 6 µCi/例、放射活性は 8.31×10^{6} dpm/µg 又は 3.74 µCi/µg であった。排泄について検討するため、投与後 0-6、6-12、12-24、24-36 及び 36-48 時間（48 時間サブセット）に雌雄各 1 例から尿及び糞を採取した。ケージ洗浄液も 48 時間のサブセットで測定した。^{125}I-rHuPH20 の排泄は速やかで、投与放射能の大部分（70～80%）は尿及びケージ洗浄液（ケージに付着した乾燥尿）中から回収され、少量（15%）が糞中から回収された。

2.6.4.6.2.2　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回静脈内投与したときの排泄

添付資料番号：4.2.2.3-2（13128）

雌雄 CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を 4 µg/例の用量で尾静脈から単回静脈内投与した。^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性は約 2000 U/mL、放射能投与量は約 18 µCi/例及び放射活

性は 6.43×10^6 dpm/μg 又は 2.89 μCi/μg であった。投与後、0-6、6-12、12-24、24-36 及び 36-48 時間（48 時間サブセット）で雌雄各 1 例から尿及び糞を採取した。ケージ洗浄液も 48 時間のサブセットで測定した。さらに、同じ ^{125}I-rHuPH20 を投与した別の群（雌雄各 1 例）では、投与後 5 分のみ QWBA により放射能濃度を測定した。放射能の排泄は速やかで、投与放射能の大部分（70～80%）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（15～16%）が糞中に回収された。全ての試料で TCA 沈殿の上清中での放射能の割合が高く、特に尿（96～97%）で高かった。尿中に排泄された放射能は、主に遊離ヨウ素であることが示唆された。QWBA によって得られた放射能濃度は、投与後 5 分での LSC の値とほぼ同等であった。

2.6.4.6.2.3　マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内又は皮下投与したときの排泄

添付資料番号：4.2.2.3-3（13184）

雌雄 CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を約 1.73μg/例の用量で、左背部へ単回皮内又は皮下投与した。^{125}I-rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性は 2000 U/mL、放射能投与量は約 5 μCi/例、放射活性は 6.55×10^6 dpm/μg 又は 2.95 μCi/μg であった。投与後 0-6、6-12、12-24、24-36 及び 36-48 時間（48 時間サブセット）で、雌雄各 1 例から尿及び糞を採取した。48 時間サブセットのケージ洗浄液についても放射能を測定した。放射能の排泄は速やかで、投与放射能の大部分（>98%）が尿中及びケージ洗浄液（ケージ壁に付着した乾燥尿）に回収され、両投与経路ともに少量（4～12%）が糞中に回収された。

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1　エフガルチギモド

添付資料番号：4.2.1.4-1（121510_IVFC_Phase3）

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。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）、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）及び 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：連続投与）の血漿中エフガルチギモド濃度推移は同様であった。試験の概要を 2.6.2.5 に示す。

2.6.4.7.2　rHuPH20

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。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

2.6.4.8.1　エフガルチギモド

添付資料番号：4.2.2.7-1（20_021.TPKPD.F）

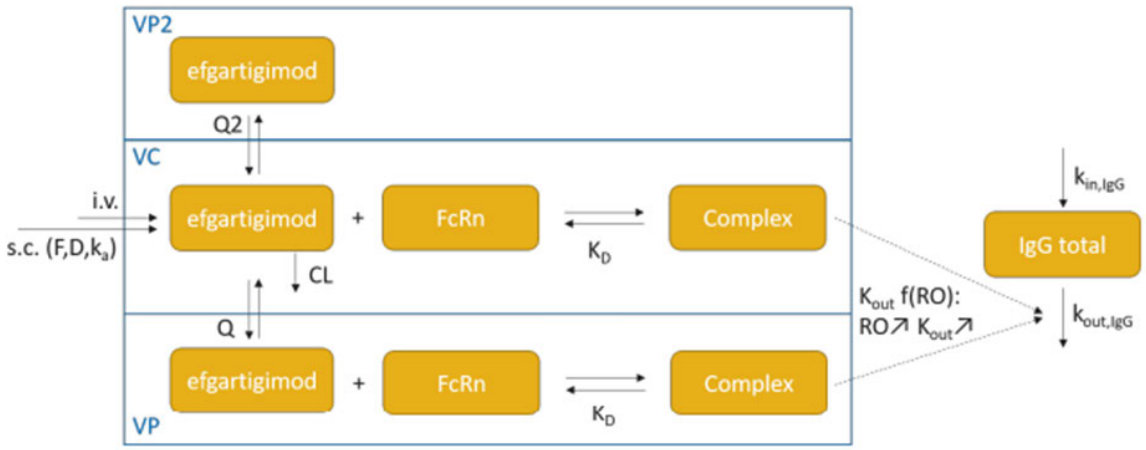
エフガルチギモドの薬理作用での種差を検討するため、マウス、ラット、ウサギ、カニクイザル及びヒト血清中エフガルチギモド PK と pH7.4 でのエフガルチギモドの FcRn への標

的結合を介した総 IgG 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。

トランスレーショナル母集団 PK/PD モデルの開発に先立ち、pH7.4 での FcRn への結合活性及び健康被験者にエフガルチギモド単独で単回及び反復静脈内及び皮下投与したデータ（ARGX-113-1501、ARGX-113-1702）を用いてヒト母集団 PK/PD モデルを開発した。

トランスレーショナル母集団 PK/PD モデルでは、総 IgG 濃度の減少を促進させる指標として pH7.4 でのエフガルチギモドによる FcRn 占有率を用いて、血清中エフガルチギモド及び総 IgG 濃度のプロファイルをいずれの用量でも同時に記述できた。エフガルチギモド PK は pH7.4 での FcRn への結合で特徴づけられた。非結合型エフガルチギモドのクリアランスは比較的大きかった。結合型エフガルチギモドは FcRn から解離して非結合型エフガルチギモドとなって消失するまでは維持された。エフガルチギモドの投与を中止すると、結合型エフガルチギモド濃度は、測定可能な非結合型エフガルチギモド濃度と同様に減少することが推測された。エフガルチギモド PD も pH7.4 での FcRn への結合で特徴づけられた。中枢及び末梢コンパートメントでのエフガルチギモドによる FcRn 占有率に応じて IgG の消失速度定数は増加し、総 IgG 濃度は減少した。トランスレーショナル母集団 PK/PD モデルの概略を図 2.6.4-6 に示す。

図 2.6.4-6　エフガルチギモドのトランスレーショナル母集団 PK/PD モデル



Source: 20_021.TPKPD.F
Note: Efgartigimod enters the central compartment after IV or SC administration. For the latter, a sequential zero order (with duration D) and first order (with rate constant k_a) process was implemented with estimated bioavailability F. Free drug is cleared from the central compartment with clearance CL. Free drug can distribute to a first and second peripheral compartment with intercompartmental flows Q and Q2 and volumes VP and VP2, respectively. Target binding occurs in the central and first peripheral compartments, with binding assumed at steady-state with dissociation constant K_D. The resulting predicted receptor occupancy (RO) at pH7.4 drives the increase in the elimination rate constant of total IgG. Total IgG is described using a turnover model with estimated synthesis rate $k_{in,IgG}$ and elimination rate constant in absence of drug $k_{out,IgG}$.

ヒト母集団 PK/PD モデルを基に、エフガルチギモド単独でマウス、ラット及びウサギに単回又は反復静脈内投与したとき並びにカニクイザルに単回及び反復静脈内及び皮下投与したときの PK/PD プロファイルを記述した。構造モデルはヒト母集団 PK/PD モデルと同一とし、関連するパラメータは本モデルでの推定値に固定した。

トランスレーショナル母集団 PK/PD モデルのパラメータは、4.1.1.7-1, 20_021.TPKPD.F, Table 2.0:1 に示す。予測された pH7.4 での FcRn 占有率と PD 効果との関係は、4.1.1.7-1, 20_021.TPKPD.F, Figure 8.2:53 に示す。サル及びヒトにエフガルチギモドを週 1 回異なる用量で 12 週間反復投与後の投与間隔内の予測された平均非結合型エフガルチギモド濃度、pH7.4 での FcRn 占有率及び平均 PD 効果の関係を 2.6.5.16 に示す。

種差については、体重と PK を用いたアロメトリックスケーリング及び pH7.4 でのエフガルチギモドの FcRn への結合に対する種特異的な in vitro 親和性で概ね説明可能であった。さらに、詳細な種差について説明するため、動物種によって IgG のベースラインレベルが大きく異なることから種特異的な IgG 合成率及びこのモデルでの変量効果による種特異的な PK パラメータを用いて解析した。このトランスレーショナル母集団 PK/PD モデルから、げっ歯類ではエフガルチギモドのクリアランスが大きく分布容積が小さいこと、サルでは FcRn の結合能が高く皮下からの吸収が他の動物種と異なることが示された。

上述した PK の種差を考慮すると、いずれの動物でもこのモデルによりエフガルチギモド投与後の総 IgG 濃度推移を十分予測可能であった。薬効パラメータの再推定なしでデータを十分に記述できたため、このモデルにより PD の予測は可能と判断した。In vivo K_D、FcRn 占有率と薬効の関係及びエフガルチギモドによる相加的な IgG の消失速度に対する母集団値をトランスレーショナル母集団 PK/PD モデルの推定値として固定した。ヒトから動物への外挿には in vitro K_D が重要で、in vitro K_D の種差をモデルに組み込むことで、いずれの動物の PK/PD もよく記述された。PD 効果（ベースラインに対する%IgG）は FcRn 占有率の関数として記述され、エフガルチギモドが FcRn を 85%以上占有したとき、IgG はベースラインに対して約 50%減少することが予測された。

要約すると、pH7.4 での FcRn 結合を考慮に入れると、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。

2.6.4.8.2　rHuPH20

その他の PK 試験は実施しなかった。

2.6.4.9　考察及び結論

2.6.4.9.1　エフガルチギモド

エフガルチギモド皮下注製剤の開発を支持し、皮下投与後の吸収を評価するために、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 PK 試験を実施した。さらに、カニクイザルにエフガルチギモドに rHuPH20 を混合した 12 週間反復皮下投与毒性試験での TK も評価した。

カニクイザルにエフガルチギモドを皮下投与（エフガルチギモド＋rHuPH20 で 0、30 又は 100 mg/kg、エフガルチギモド単独で 100 mg/kg）したとき、t_{max} は投与後 8～48 時間であった。C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加し、性差及びエフガルチギモドの蓄積は認められなかった。カニクイザルにエフガルチギモド単独で皮下投与したときの絶対バイオアベイラビリティは約 50%と推定された。

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（GLP 遵守）では、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。

サル静脈内投与時の曝露量は、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。ヒトにエフガルチギモドを皮下投与したとき、静脈内投与したときと同様に十分な安全域が確保できていると考えられた。

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 濃度とエフガルチギモド PK 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。

2.6.4.9.2 rHuPH20

マウス及びカニクイザルを用いて、静脈内、皮下又は皮内投与したときの PK 及び TK 試験を実施した。

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。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も評価した。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。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 1.5～3.9%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。

マウス及びサルに単回静脈内投与又は皮下投与したとき、rHuPH20 は血中から速やかに消失し、サルに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。

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 7 日間反復静脈内又は皮下投与したときの TK を評価した。rHuPH20 を静脈内投与したときの V_{ss} は小さく、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 の曝露量はわずかに低かった。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 5.74%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 TK を評価した。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 群は 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後 13 週間に概ね検出された。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 の反復投与により概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。

マウスを用いた皮下投与による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。rHuPH20 の全身曝露量は、概ね用量に応じて増加した。3、9 及び 18 mg/kg 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。$AUC_{0\text{-}24h}$ 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。

反復投与 TK 試験では、皮下投与したときの 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。

マウス及びサルを用いた高用量での反復投与毒性試験では、rHuPH20 の血中での曝露が確認された。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 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、エフガルチギモド皮下注製剤でのヒトでの rHuPH20 の用量である 11200 U の約 168～1109 倍であった。

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。雌無胸腺 NCr nu/nu マウスの左背部に rHuPH20 を 2000 U/mL（3520 U/kg、0.032 mg/kg、又は 80 U に相当）で 40 µL 皮内投与した。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 2000 U/mL）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 8000 U/mL）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 2000 U/mL）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。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。マウスに ^{125}I-rHuPH20を皮内投与した分布試験では、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、血中では無視できる程度であった。

結論として、マウス及びサルに静脈内投与したとき血漿中ヒアルロニダーゼ活性のクリアランスに飽和が認められ、臨床相当用量をマウス及びサルに皮内又は皮下投与したときの全身曝露量は限られていた。抗 rHuPH20 抗体価及びヒアルロニダーゼ中和活性は用量に応じて増加したが、サル血漿中ヒアルロニダーゼ活性は数ヶ月にわたって測定可能であった。さらに、マウスに皮内投与したとき、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ことは、ヒトに rHuPH20 を皮下投与したときの拡散効果を表していると考えられた。

2.6.4.10　参考文献

FDA. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. May 2018. Accessed: May 2022. https://www.fda.gov/media/70858/download

FDA. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Pharmacology and Toxicology. July 2005. Accessed: March 2023. https://www.fda.gov/media/72309/download

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.

Kang DW, Bittner B, Sugarman BJ, Zepeda ML, Printz MA. 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.

目次

2.6.5　薬物動態試験概要表 2
2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表 2
2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験 7
2.6.5.2.1　分析方法及びバリデーション試験：エフガルチギモド 7
2.6.5.2.2　分析方法及びバリデーション試験：インターフェロンγ 8
2.6.5.2.3　分析方法及びバリデーション試験：rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性 9
2.6.5.2.4　分析方法及びバリデーション試験：抗 rHuPH20 抗体 12
2.6.5.2.5　分析方法及びバリデーション試験：抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性 17
2.6.5.3　薬物動態試験：吸収：単回投与 20
2.6.5.4　薬物動態試験：吸収：反復投与 24
2.6.5.5　薬物動態試験：分布 35
2.6.5.6　薬物動態試験：たん白結合 44
2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 44
2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験 44
2.6.5.9　薬物動態試験：代謝：In Vivo 44
2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：In Vitro 44
2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路 44
2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 44
2.6.5.13　薬物動態試験：排泄 44
2.6.5.14　薬物動態試験：排泄：胆汁中 48
2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用 48
2.6.5.16　薬物動態試験：その他 49

2.6.5　薬物動態試験概要表

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表

			Test article: efgartigimod		
Type of study	**Test system**	**Method of administration**	**Testing facility**	**Study number**	**Location**
Absorption/ General Pharmacokinetics/toxicokinetics					
Single-dose PK/PD study	Monkey	IV (bolus) SC	[redacted] [a], [redacted], Germany; assayed and reported by argenx, Zwijnaarde, Belgium	ARGX-NC-092 (including [redacted]34856)	4.2.2.2-1
12 weeks + 12 weeks post-treatment observation	Monkey	SC (with or without rHuPH20)	[redacted] [a], [redacted], Germany	[redacted]36930	4.2.3.2-1
TDAR	Monkey	IV slow bolus, q7d	[redacted], England	[redacted] 8459761	4.2.3.2-2
Distribution					
Not performed					
Metabolism					
Not performed					
Excretion					
Not performed					
Pharmacokinetic drug interactions					
Not performed					
Other					
Translational PK/PD FcRn binding model	NA	NA	[redacted], The Netherlands	20_021.TPKPD.F	4.2.2.7-1
Amendment to final reports to estimate AUCs by linear-up, logarithmic-down trapezoidal method.	various	various	[redacted], The Netherlands	[redacted]22046 Linked to main study reports [redacted]33981, [redacted]36930, [redacted]35984, [redacted]35986, [redacted]35989; [redacted]35988; [redacted]32188; [redacted]31554; [redacted]33260; [redacted]36930	4.2.2.7-2

AUC=area under the concentration-time curve; FcRn= neonatal Fc receptor; IV=intravenous; NA=not applicable; PD=pharmacodynamic; PK=pharmacokinetics; q7d=once every 7 days (once weekly); rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20; SC=subcutaneous; TDAR= T-cell dependent antibody response.

a) Formerly [redacted]

Overview		Test Article: rHuPH20		
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location in CTD**
Analytical Methods and Validation Reports				
Determination of Hyaluronidase Activity of rHuPH20				
Quantitative Determination of Hyaluronidase Activity in Mouse Plasma Using a Microplate-Based Method with a Biotinylated Hyaluronic Acid Substrate	Mouse, Swiss Webster/ Plasma	[redacted], USA	R09017	4.2.2.1-4
Evaluation of the Stability of rHuPH20 in Diluted Mouse Plasma Using a Microplate-Based Method with a Biotinylated Hyaluronic Acid Substrate	Mouse (strain nonspecified)/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	R09148	4.2.2.1-5
Partial Validation of a Method for the Determination of Hyaluronidase Activity in Cynomolgus Monkey Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ K_3EDTA Plasma	[redacted], USA	R05094	4.2.2.1-6
Partial Validation of a Method for the Determination of Hyaluronidase Activity in Cynomolgus Monkey K_2EDTA Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	R09147	4.2.2.1-7
Evaluation of the Extended Stability of rHuPH20 in Cynomolgus Monkey Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA Plasma and K_3EDTA Plasma	[redacted], USA	10213	4.2.2.1-8
Evaluation of the Extended Frozen Stability and the Freeze/Thaw Stability of rHuPH20 in Cynomolgus Monkey Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ K_3EDTA Plasma	[redacted], USA	R06037	4.2.2.1-9
Determination of Hyaluronidase Activity of ^{125}I-Labelled rHuPH20				
Method Development, Validation and Analysis of Enzyme Activity of ^{125}I-labelled Hyaluronidase (Non-GLP)	Buffer	[redacted], Canada	12214-A	4.2.2.1-10
Enzyme Activity of ^{125}I-labelled Hyaluronidase (Non-GLP)	Buffer	[redacted], Canada	13128 Appendix 3	4.2.2.3-2
Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase [and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion (Non-GLP)]	Mouse, CD-1/ Whole Blood and Plasma	[redacted], Canada	13128	4.2.2.3-2
Enzyme Activity of ^{125}I-labelled Hyaluronidase (Non-GLP) (Non-GLP)	Buffer	[redacted], Canada	13184 Appendix 3	4.2.2.3-3
Determination of Anti-rHuPH20 Antibodies				
Method [redacted]: Validation Report for [redacted]: an Electrochemiluminescent Immunoassay for the Detection of Anti-rHuPH20 Antibodies in Mouse Plasma	Mouse (strain nonspecified) / K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	18072	4.2.2.1-11
Assessment of CD-1 Mouse K_2EDTA Plasma in a Validated Method for the Electrochemiluminescent Detection of Antibodies to rHuPH20 and Testing of Samples from Study 12096	Mouse, CD-1/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	12096 (Appendix 33)	4.2.3.7.7-2
Method [redacted]: Validation of an Electrochemiluminescent Immunoassay to Detect Antibodies to rHuPH20 in Rabbit EDTA Plasma	Rabbit, NZW/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	13072	4.2.2.1-12
Method [redacted]:	Monkey, Cynomolgus/	[redacted]	R09059	4.2.2.1-13

Overview		Test Article: rHuPH20		
Type of Study	**Test System**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location in CTD**
Validation Report for the Qualitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K_2EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	K_2EDTA Plasma	[redacted], USA		
Method [redacted] (modified): Assessment of Cynomolgus EDTA Plasma in a Validated Method for the Electrochemiluminescent Detection of Antibodies to rHuPH20	Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	R09050, Attachment 8	4.2.3.2-4
Determination of Neutralizing Antibodies				
Method [redacted]: Qualification of a Turbidimetric Method for rHuPH20-Neutralizing Activity in Mouse Plasma	Mouse (strain nonspecified)/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	13162	4.2.2.1-14
Method [redacted]: Qualification of a Method for the Qualitative Determination of rHuPH20 nAbs in Rabbit Plasma Using Spectrophotometric Detection	Rabbit (strain nonspecified)/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	13083	4.2.2.1-15
Method [redacted]: Qualification of a Turbidimetric Method for rRbPH20-Neutralizing Activity in Rabbit Plasma	Rabbit, NZW/ K_2EDTA Plasma	[redacted], USA	13163	4.2.2.1-16
Method [redacted]: Method for the Determination of Neutralizing Activity Titer Against Hyaluronidase in Cynomolgus Monkey Plasma	Monkey, Cynomolgus/ K_3EDTA Plasma	[redacted], USA	R09061	4.2.2.1-17

EDTA= ethylenediaminetetraacetic acid; nAbs= neutralizing antibodies; NZW= New Zealand White; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20; rRbPH20= recombinant rabbit hyaluronidase PH20.

Nonclinical Studies					
Overview			**Test Article: rHuPH20**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Admin.**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location in CTD**
Absorption					
Single Dose					
Evaluation of the Pharmacokinetics of Two Halozyme Test Articles ([redacted] and [redacted]) Following a Single Intravenous Dose in CD-1 Mice (Non-GLP)	Mouse, CD-1	Intravenous	[redacted], USA	R09023	4.2.2.2-2
A Multi-Dose Pharmacokinetics Study of rHuPH20 Administered by Intravenous and Subcutaneous Injection in Female Cynomolgus Monkeys (Non-GLP)	Monkey, Cynomolgus	Intravenous Subcutaneous	[redacted], USA	R07060	4.2.2.2-3
Repeat Dose					
A 7-Day Repeat Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys (GLP)	Monkey, Cynomolgus	Intravenous Subcutaneous	[redacted], USA	R08056	4.2.3.2-3
A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase (GLP)	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous	[redacted], USA	R09050	4.2.3.2-4
Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice (GLP)	Mouse, CRL:CD-1(ICR)	Subcutaneous	[redacted], USA	R08176	4.2.3.5.2-2
Distribution					
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-rHuPH20 (Non-GLP)	Mouse, CD-1	Intradermal	[redacted], Canada	12214-B	4.2.2.3-1
[Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and] Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion (Non-GLP)	Mouse, CD-1	Intravenous	[redacted], Canada	13128	4.2.2.3-2
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-rHuPH20 (Non-GLP)	Mouse, CD-1	Intradermal Subcutaneous	[redacted], Canada	13184	4.2.2.3-3
Biodistribution of rHuPH20 in the Skin, Lymphatics and Plasma after Intradermal Administration in the Mouse (Non-GLP)	Mouse, NCr nu/nu athymic	Intradermal	Halozyme Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	R08127	4.2.2.3-4
Metabolism	No studies were conducted.				
Excretion	No studies were conducted.				
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following single Intradermal Injection of ^{125}I-rHuPH20 (Non-GLP)	Mouse, CD-1	Intradermal	[redacted], Canada	12214-B	4.2.2.3-1
[Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and] Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion (Non-GLP)	Mouse, CD-1	Intravenous	[redacted], Canada	13128	4.2.2.3-2
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of	Mouse, CD-1	Intradermal Subcutaneous	[redacted], Canada	13184	4.2.2.3-3

Nonclinical Studies					
Overview			**Test Article: rHuPH20**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Admin.**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location in CTD**
^{125}I-rHuPH20 (Non-GLP)					
Pharmacokinetic Drug Interactions	No studies were conducted.				
Other	No studies were conducted.				

rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20.

2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験

2.6.5.2.1　分析方法及びバリデーション試験：エフガルチギモド

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Utilized	Noteworthy Findings (Precision and Accuracy Validation)	GLP	Location, Study Number
Determination of efgartigimod – bioanalytical PK assays							
Monkey/ cynomolgus serum	efgartigimod	125 to 8000 ng/mL in 100% serum	Antibody sandwich ELISA	The principle of the assay is described in the footnote [a]	Reference batch; [redacted]/Cell line [redacted] Matrix: 1% LLOQ: 125 ng/mL Accuracy: 93.7%–102.7% Precision: ≤12.1%CV (intra-assay) ≤12.7%CV (inter-assay) Selectivity confirmed No hook effect, dilutional linearity demonstrated up to 1:1562500 (including MRD) Stability (no apparent degradation) confirmed: At room temperature or at 4°C to 8°C for 24 hours, after 3 freeze/thaw cycles at −80°C, and long-term stability for at least 12 months at −80°C	Yes	4.2.2.1-1, [redacted]37229 Method applied in: [redacted]36930
Monkey/ cynomolgus serum	efgartigimod	20 to 1500 ng/mL in 100% serum	ECLIA on [redacted] platform	The principle of the assay is described in the footnote [b]	Reference batch: [redacted] Matrix: 10% LLOQ: 20 ng/mL Accuracy: 94.8%–111.8% Precision: ≤17.9%CV (intra-assay) ≤14.1%CV (inter-assay) Selectivity confirmed No hook effect, dilutional linearity demonstrated up to 1:400000 (including MRD) Stability (no apparent degradation) confirmed: At room temperature for 24 hours, after 6 freeze/thaw cycles at −80°C, and long-term stability for at least 6 months at −80°C	No	4.2.2.1-2, [redacted] 8426700 Method applied in: [redacted] 8459761

CV=percent coefficient of variation; ECLIA=electrochemiluminescence immunoassay; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; Fc=crystallizable fragment; GLP=Good Laboratory Practice; HRP=horseradish peroxide; IgG=immunoglobulin G; LLOQ=lower limit of quantification; MRD=minimum required dilution; [redacted]=[redacted]; PK=pharmacokinetics

a) Principle of the serum PK assay: A microtiter plate was coated with 2D11-mFc, which is a chimeric molecule consisting of efgartigimod-specific binding clone 2D11 and an mFc-tail. After blocking, samples were pipetted into the wells. After washing, the secondary antibody, an HRP-conjugated F(ab')2 anti-human IgG Fc specific was added to the wells. After washing, HRP bound in the complex was visualized by substrate solution. After stopping, the enzymatic reaction with sulfuric acid, the intensity of the resulting color was determined colorimetrically at 450 nm. The color intensity was proportional to the concentration of efgartigimod in the sample.
b) A streptavidin coated 96-well [redacted] small spot plate is coated with biotin labeled 2D11, a VHH specifically binding to efgartigimod. After a wash step, calibrators, QC's and samples are added to the assay plate in duplicate and incubated for 1 hour. After washing the plate, efgartigimod can be detected by incubating with an efgartigimod specific [redacted]. After washing, levels of efgartigimod are visualized with an [redacted] reader following a [redacted] minute incubation step in [redacted] buffer [redacted]. The electrochemiluminescence (ECL) counts are proportional to the concentration of efgartigimod in the sample.

2.6.5.2.2 分析方法及びバリデーション試験：インターフェロンγ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Utilized	Noteworthy Findings	GLP	Location, Study Number
Non-human primate PBMCs	IFNγ	NA	[redacted] IFNγ ELISpot Assay	The principle of the assay is described in the footnote [a]	PHA Concentration: 1.5 µg/mL Assay background: ≤0.5 number of spots/well ULOD: 509 spot number / well, well saturation: 60% Precision: ≤30%CV (intra-assay) ≤30%CV (inter-assay) Quantifiable sample stability could not be assessed due to an technical error. However, stability can be inferred from literature. Qualitative cellular function observed up to 6 months	No	4.2.2.1-3, [redacted] 8459-762 Method applied in: [redacted] 8459761

CV=percent coefficient of variation; ELISpot=enzyme-linked immunospot; GLP=Good Laboratory Practice; IFNγ =interferon gamma; NA=not applicable; PHA=phytohaemagglutinin; PMBCs=peripheral blood mononuclear cells; ULOD=upper limit of detection

a) The ELISpot assay is a highly sensitive immunoassay that measures the frequency of cytokine-secreting cells at the single-cell level. Cells are cultured on a surface coated with a specific capture antibody in the presence or absence of stimuli. Proteins, such as cytokines, that are secreted by the cells are captured by the specific antibodies on the surface. After an appropriate incubation time, cells are removed and the secreted molecule is detected using a detection antibody in a similar procedure to that employed by the ELISA and read using the [redacted] ELISpot reader.

2.6.5.2.3　分析方法及びバリデーション試験：rHuPH20 のヒアルロニダーゼ活性

<table>
<tr><th>Species/ Matrix</th><th>Analyte</th><th>Calibration Range</th><th>Type of Assay</th><th>Validation / Qualification Parameters</th><th>GLP</th><th>Report No</th></tr>
<tr><td colspan="7">Determination of Hyaluronidase Activity of rHuPH20</td></tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Microtiter Plate-Based Enzyme Assay in Mouse Plasma</td></tr>
<tr><td>Mouse, Swiss Webster/ Plasma</td><td>rHuPH20</td><td>0.00625 - 0.200 U/mL</td><td>Microplate-based method using biotinylated HA substrate</td><td>
<table>
<tr><th>Qualification Parameter</th><th>Acceptance Criteria</th><th>N</th><th>Results</th></tr>
<tr><td>Interday runs</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Precision</td><td>± [redacted] %CV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] % to [redacted] %</td></tr>
<tr><td>Accuracy</td><td>± [redacted] %DEV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] % to [redacted] %</td></tr>
<tr><td>LLOQ Precision</td><td>± [redacted] %CV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>LLOQ Accuracy</td><td>± [redacted] %DEV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>Intraday runs</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Precision</td><td>± [redacted] %CV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] % to [redacted] %</td></tr>
<tr><td>Accuracy</td><td>± [redacted] %DEV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] % to [redacted] %</td></tr>
<tr><td>LLOQ Precision</td><td>± [redacted] %CV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>LLOQ Accuracy</td><td>± [redacted] %DEV</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td colspan="4">Specificity</td></tr>
<tr><td colspan="2">[redacted] ([redacted]) lots of blank plasma samples were assayed following a [redacted]-fold dilution in assay diluent.</td><td colspan="2">All [redacted] samples yielded values below the lowest standard.</td></tr>
</table>
LLOQ = Lower limit of quantitation (0.00625 U/mL).
QC concentrations: [redacted] U/mL; [redacted] U/mL; [redacted] U/mL; [redacted] U/mL.

Stability Results
<table>
<tr><td>Stability at room temperature</td><td>QC samples ([redacted] and [redacted] U/mL) were stable in mouse plasma after thawing for 4 h at room temperature.</td></tr>
<tr><td>Stability at -70°C</td><td>QC samples ([redacted] and [redacted] U/mL) were stable in mouse plasma after storage at -70°C for up to 73 days.</td></tr>
<tr><td>Freeze / thaw stability</td><td>QC samples ([redacted] and [redacted] U/mL) were stable in mouse plasma after 3 freeze (-70°C) / thaw cycles.</td></tr>
</table>
Acceptance criteria: %DEV of mean within ± [redacted]% at each QC level.</td><td>Yes</td><td>R09017</td></tr>
<tr><td>Mouse (strain nonspecified)/ K2EDTA Plasma</td><td>rHuPH20</td><td>0.00625 - 0.200 U/mL</td><td>Microplate-based method using biotinylated HA substrate</td><td>Stability Results for rHuPH20 in Mouse K_2EDTA Plasma
<table>
<tr><td>Stability at ambient temperature</td><td>QC samples ([redacted] and [redacted] U/mL) were stable in mouse K_2EDTA plasma after dilution ([redacted]-fold) with assay diluent and storage on ice for up to 6 h.</td></tr>
</table>
Acceptance criteria: %DEV of mean within ± [redacted]% at each QC level.</td><td>Yes</td><td>R09148</td></tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Turbidimetric Method with Spectrophotometric Detection</td></tr>
<tr><td>Monkey,</td><td>rHuPH20</td><td>10 – 100 U/mL</td><td>Turbidimetric</td><td></td><td>Yes</td><td>R05094</td></tr>
</table>

Species/ Matrix	Analyte	Calibration Range	Type of Assay	Validation / Qualification Parameters	GLP	Report No
Cynomolgus/ K_3EDTA Plasma			method with spectrophoto-metric detection	**Validation Parameter** / **Acceptance Criteria** / **N** / **Results** **Intraday validation run** Precision: ± [redacted] %CV; [redacted]; [redacted] % to [redacted] % Accuracy: ± [redacted] %DEV; [redacted]; [redacted] % to [redacted] % QC concentration: [redacted] U/mL; [redacted] U/mL; [redacted] U/mL.		
Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA Plasma	rHuPH20	10 – 100 U/mL	Turbidimetric method with spectrophoto-metric detection	**Validation Parameter** / **Acceptance Criteria** / **N** / **Results** **Intraday validation run** Precision: ± [redacted] %CV; [redacted]; [redacted] % to [redacted] % Accuracy: ± [redacted] %DEV; [redacted]; [redacted] % to [redacted] % **Specificity** [redacted] ([redacted]) lots of K_2EDTA plasma and a pool of all six lots were evaluated in a matrix blank test run. — No quantifiable hyaluronidase activity was detected in any of the [redacted] lots or pooled lot. QC concentration: [redacted] U/mL; [redacted] U/mL; [redacted] U/mL.	Yes	R09147
Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA /K_3EDTA Plasma	rHuPH20	10 – 100 U/mL	Turbidimetric method with spectrophoto-metric detection	**Stability Results for rHuPH20 in Monkey K_3EDTA Plasma** Stability at ambient temperature — QC samples ([redacted], [redacted] and [redacted] U/mL) were stable in K_3EDTA plasma after thawing for 7 h at ambient temperature. Stability at -20°C — QC samples ([redacted], [redacted]0 and [redacted] U/mL) were stable in K_3EDTA plasma after storage at -20°C for 28 days. Stability at -70°C — QC samples ([redacted], [redacted] and [redacted] U/mL) were stable in K_3EDTA plasma after storage at -70°C for 147 days. Freeze / thaw stability — QC samples ([redacted], [redacted] and [redacted] U/mL) were stable in K_3EDTA plasma after 7 freeze (-70°C) / thaw cycles. Acceptance criteria: %DEV of mean within ± [redacted]% at each level and for each anticoagulant. **Stability Results for rHuPH20 in rHuPH20 Monkey K_2EDTA Plasma** Stability at ambient temperature — QC samples ([redacted], [redacted] and [redacted] U/mL) were stable in K_2EDTA plasma after thawing for 7 h at ambient temperature. Stability at -20°C — QC samples ([redacted], [redacted] and [redacted] U/mL) were stable in K_2EDTA plasma after storage at -20°C for 27 days. Stability at -70°C — QC samples ([redacted], [redacted] and [redacted]0 U/mL) were stable in K_2EDTA plasma after storage at -70°C for 304 days. Acceptance criteria: %DEV of mean within ± [redacted]% at each level and for each anticoagulant.	No	10213 R06037
Determination of Hyaluronidase Activity of ^{125}-I-Labelled rHuPH20						

<table>
<tr><th>Species/ Matrix</th><th>Analyte</th><th>Calibration Range</th><th>Type of Assay</th><th>Validation / Qualification Parameters</th><th>GLP</th><th>Report No</th></tr>
<tr><td colspan="7">Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase</td></tr>
<tr><td>Mouse, CD-1/ Whole Blood and Plasma</td><td>^{125}I-labelled rHuPH20</td><td>0.6 - 3.0 U/mL</td><td>Turbidimetric method</td><td>
<table>
<tr><th>Sample</th><th>Time point (min)</th><th>Mean % in Pellet</th><th>Mean % in Supernatant</th></tr>
<tr><td>Blank Blood</td><td>0</td><td rowspan="6">[redacted]</td><td rowspan="6">[redacted]</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Stability in Blood</td><td>2</td></tr>
<tr><td>30</td></tr>
<tr><td>Blank Plasma</td><td>0</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Stability in Plasma</td><td>2</td></tr>
<tr><td>30</td></tr>
</table>
</td><td>No</td><td>13128</td></tr>
</table>

CV= coefficient of variation; DEV=deviation; EDTA= ethylenediaminetetraacetic acid; HA= hyaluronic acid or hyaluronan; LLOQ=lower limit of quantitation; QC= quality control; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20.

2.6.5.2.4　分析方法及びバリデーション試験：抗 rHuPH20 抗体

Method [redacted]: Bridging Electrochemiluminescent (ECL) immunoassay in Mouse Plasma

Mouse/ (strain nonspecified) K_2EDTA Plasma	Anti-rHuPH20 antibodies	-	Electrochemi-luminescent (ECL) immunoassay	[see nested table]	Yes	18072

Validation Parameter	**Acceptance Criteria**	**Results**
Precision and Specificity	≤[redacted]%CV between replicate response for each control. PC Inter- and Intraassay %CV of mean responses ≤[redacted]%	Interassay: ≤[redacted]% Intraassay: ≤[redacted]%
Screening cut point ([redacted]% FPER)	Report normalization factor.	[redacted]%
Confirmatory cut point ([redacted]% FPER)	Report confirmatory result.	[redacted]%
Selectivity	Mean response for ≥[redacted]% of the tested spiked lots should be within [redacted]-[redacted]% recovery of the reference response at each level analyzed. At least [redacted] individual spiked lots must confirm positive using a [redacted]% false positive error rate confirmatory cut-point.	Pass [redacted] individual spiked lots confirm positive using a [redacted]% false positive error rate confirmatory cut-point.
Robustness	The assessment will be considered passing if the precision assessment passes.	Pass
Sensitivity	Method Sensitivity should be [redacted] ng/mL or better	≤[redacted] ng/mL
Drug tolerance	Report result for [redacted] µg/mL of antibody. The method is drug tolerant up to [redacted] µg/mL rHuPH20 without decreasing the signal below the cut point.	[redacted] µg/mL at [redacted] µg/mL of antibody

Stability Results

Stability at room temperature (15 to 30°C)	Anti-rHuPH20 antibodies (concentration of [redacted], [redacted], and [redacted] µg/mL) were stable in mouse K_2EDTA plasma for 24 h at 15-30°C.
Stability at 2 to 8°C	Anti-rHuPH20 antibodies (concentration of [redacted], [redacted], and

<table>
<tr><td colspan="6">Method [redacted]: Bridging Electrochemiluminescent (ECL) immunoassay in Mouse Plasma</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>
<table>
<tr><td></td><td>[redacted] µg/mL) were stable in mouse K₂EDTA plasma for 24 h at 2-8°C.</td></tr>
<tr><td>Freeze / thaw stability</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies (concentration of [redacted], [redacted], and [redacted] µg/mL) were stable in mouse K₂EDTA plasma after 8 freeze / thaw cycles.</td></tr>
</table>
Acceptance criteria: ±[redacted]% of the difference from reference value.
</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Mouse, CD-1/ K₂EDTA Plasma</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies</td><td>-</td><td>Electrochemi-luminescent (ECL) immunoassay</td><td>
<table>
<tr><td colspan="2">Validation Parameter</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Interday precision</td><td>N</td><td>CV%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Mouse</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Human</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td colspan="4">Intraday precision</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Mouse</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]17%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Human</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td colspan="2">Specificity</td><td>N</td><td>% Inhibition</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Mouse</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Human</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td colspan="2">Cut point</td><td colspan="2">Calculated cut point factor [redacted]; number of false positive samples was [redacted]%.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Selectivity</td><td colspan="2">Eighteen out of eighteen spiked samples were within the targeted range (±[redacted]% of response in pool), meeting the criteria of at least [redacted]% of the</td></tr>
</table>
</td><td>No</td><td>12096 App. 33</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Bridging Electrochemiluminescent (ECL) immunoassay in Mouse Plasma</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>
<table>
<tr><td></td><td>positive spikes within range.</td></tr>
<tr><td>Sensitivity</td><td>The calculated cut point was below the lowest level of [redacted] ng/mL for each run, thus sensitivity is determined to be below [redacted] ng/mL which exceeds the industry standard of [redacted] ng/mL. As this is intended as a screening method for high level anti-rHuPH20 antibody responses, the MRD of the matrix was set at [redacted].</td></tr>
</table>
QC concentration at MRD: Low = [redacted] ng/mL; Med = [redacted] ng/mL; High = [redacted] ng/mL.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Bridging Electrochemiluminescent (ECL) immunoassay in Rabbit Plasma</td></tr>
<tr><td>Rabbit, NZW/ K_2EDTA Plasma</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies</td><td>-</td><td>Electrochemi-luminescent (ECL) immunoassay</td><td>
<table>
<tr><th>Validation Parameter</th><th>Acceptance Criteria</th><th>N</th><th>Results (%CV)</th></tr>
<tr><td colspan="4">Intraassay Precision</td></tr>
<tr><td>[redacted] µg/mL</td><td rowspan="4">≤ [redacted] %CV</td><td rowspan="4">[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] µg/mL</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] µg/mL</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td colspan="4">Interassay[a] Precision</td></tr>
<tr><td>[redacted] µg/mL</td><td rowspan="4">≤ [redacted] %CV</td><td rowspan="4">[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] µg/mL</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] µg/mL</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>neg. control</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>Cut point</td><td colspan="3">The method employs a floating cut point using a tier 1 normalization factor (NF) of [redacted]. For tier [redacted] (titer) cut point, the NF of [redacted] or the alternate NF of [redacted] could be employed.</td></tr>
<tr><td>Specificity (% Inhibition)</td><td colspan="3">An inhibited sample must be at least [redacted] % less than the respective uninhibited sample for the sample to be confirmed positive for anti-rHuPH20 antibodies.</td></tr>
<tr><td>Selectivity</td><td>≥ [redacted] % of recovery samples within ± 30% of the level determined in neg. base pool</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] observations within ± [redacted] % recovery</td></tr>
<tr><td>Sensitivity</td><td>< [redacted] ng/mL</td><td>[redacted]</td><td>< [redacted] ng/mL</td></tr>
<tr><td>Drug Tolerance</td><td colspan="3">The method can tolerate drug concentrations up to [redacted] µg/mL rHuPH20 without decreasing the signal below the cut point.</td></tr>
</table>
[a] It should be noted that the difference between positive control levels is approximately [redacted] %. (There is a [redacted] % difference between the mean PCL and PCM results and a [redacted] % difference between the mean PCM and PCH results.) This indicates that the interassay %CV criterion could be expanded to [redacted] % with no negative impact on precision.
Stability Results</td><td>No</td><td>13072</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Bridging Electrochemiluminescent (ECL) immunoassay in Mouse Plasma</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>
<table>
<tr><td>Stability at room temperature (15 to 30°C)</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies (concentration of [redacted], [redacted] and [redacted] µg/mL) were stable in rabbit K_2EDTA plasma for up to 24 h at 15-30°C.</td></tr>
<tr><td>Stability at 2 to 8°C</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies (concentration of [redacted], [redacted] and [redacted] µg/mL) were stable in rabbit K_2EDTA plasma for up to 24 h at 2-8°C.</td></tr>
<tr><td>Freeze / thaw stability</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies (concentration of [redacted], [redacted] and [redacted] µg/mL) were stable in rabbit K_2EDTA plasma for up to 8 freeze / thaw cycles.</td></tr>
</table>
Acceptance criteria: within ± [redacted] % of the difference from reference sample and %CV between runs (if applicable) ≤ [redacted] %.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Partial bridging ELISA in monkey plasma</td></tr>
<tr><td>Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA Plasma</td><td>Anti-rHuPH20 antibodies</td><td>-</td><td>ELISA</td><td>
<table>
<tr><th>Validation Parameter</th><th>Acceptance Range (OD)</th><th>N</th><th>CV%</th></tr>
<tr><td colspan="4">Interday precision of positive control</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Precision</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted] - [redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted] - [redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted] - [redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td colspan="4">Intraday precision of positive control</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Precision</td><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted] - [redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted] - [redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
<tr><td>[redacted] ng/mL</td><td>[redacted] - [redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted] %</td></tr>
</table>
<u>Negative control (cynomolgus plasma samples) cut point:</u> mean OD of [redacted] normal cynomolgus monkey plasma samples plus [redacted] times the standard deviation. OD cutpoint range of acceptance is [redacted] - [redacted]
<u>Non-specific binding control:</u> Matrix diluent is used to monitor the background of biotinylated rHuPH20 and streptavidin-HRP. The OD values must be less than or equal to [redacted].
<u>Assay sensitivity:</u> [redacted] ng/mL.
<u>Drug Interference:</u> Almost complete reduction in signal with addition of [redacted] ng/mL of rHuPH20 to the positive control at [redacted], [redacted] and [redacted] ng/mL.
<u>Specificity cut point:</u> Not feasible for this assay.

Stability Results of Positive Controls
<table>
<tr><td>Bench-Top Stability 24 h</td><td>The surrogate positive control sample is stable for 24 h at ambient temperature.</td></tr>
<tr><td>Freeze / thaw stability</td><td>The surrogate positive control sample is stable through 5 freeze / thaw cycles between ambient temperature and -70°C ± 10°C.</td></tr>
</table></td><td>No</td><td>R09059</td></tr>
</table>

Method [redacted]: Bridging Electrochemiluminescent (ECL) immunoassay in Mouse Plasma

Monkey, Cynomolgus/ K_2EDTA Plasma	Anti-rHuPH20 antibodies	-	Electrochemi-luminescent (ECL) immunoassay	**Validation Parameter**		
				Interday precision	**N**	**CV%**
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey neg. control	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human neg. control	[redacted]	[redacted]%
				Intraday precision		
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted].0%
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey neg. control	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human neg. control	[redacted]	[redacted]%
				Specificity	**N**	**% Inhibition**
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Cynomolgus Monkey neg. control	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human [redacted] ng/mL	[redacted]	[redacted]%
				Human neg. control	[redacted]	[redacted]%
				Cut point	Calculated cut point factor in this study was [redacted] compared to factor of [redacted] determined in human EDTA plasma; number of false positive samples was [redacted]%.	
				Selectivity	Sixteen out of twenty spiked samples were within the targeted range (± [redacted]% of response in the neg. pool), meeting the criteria of at least [redacted]% of the positive spikes within range.	
				Sensitivity	The calculated cut point was below the lowest level of [redacted] ng/mL for each run, thus sensitivity is determined to be below [redacted] ng/mL which exceeds the industry standard of [redacted] ng/mL.	
						No
						R09050 Att. 8

CV= coefficient of variation; DEV=deviation; EDTA= ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay; MRD= minimum required dilution; nAbs= neutralizing antibodies; QC= quality control; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20.

2.6.5.2.5 分析方法及びバリデーション試験：抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性

<table>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Turbidimetric method with spectrophotometric detection in mouse plasma</td></tr>
<tr>
<td>Mouse/ (strain nonspecified) K_3EDTA Plasma</td>
<td>rHuPH20 nAb</td>
<td>-</td>
<td>Turbidimetric method with spectrophoto-metric detection</td>
<td>
<table>
<tr><th>Qualification Parameter</th><th></th><th>N</th><th>CV% [a]</th></tr>
<tr><td colspan="4">Intraday Precision[b]</td></tr>
<tr><td rowspan="4">nAb positive controls</td><td>no-hyaluronate</td><td rowspan="8">[redacted]</td><td>NA</td></tr>
<tr><td>no-incubation</td><td>[redacted]% to [redacted]%</td></tr>
<tr><td>no-enzyme control</td><td>[redacted]% to [redacted]%</td></tr>
<tr><td>rHuPH20-spiked</td><td>[redacted]% to [redacted]%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Negative controls</td><td>no-hyaluronate</td><td>NA</td></tr>
<tr><td>no-incubation</td><td>[redacted]% to [redacted]%</td></tr>
<tr><td>no-enzyme</td><td>[redacted]% to [redacted]%</td></tr>
<tr><td>rHuPH20-spiked</td><td>[redacted]% to [redacted]%</td></tr>
</table>
[a] Acceptable intraday precision is indicated by a %CV within [redacted]% for all samples except the no-hyaluronate controls, which give near-zero OD640 values.
[b] [redacted] runs [redacted] replicates.

<u>Relative turbidities for rHuPH20-nAb positive control:</u>
averaged to [redacted]% (± SD [redacted]%), resulting in a threshold of [redacted]%.
<u>Relative turbidities for blank serum samples</u>:
samples < [redacted]%, indicating no nAb presence in the blank plasma.
The runs were acceptable.
</td>
<td>No</td>
<td>13162</td>
</tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Turbidimetric method with spectrophotometric detection in rabbit plasma</td></tr>
<tr>
<td>Rabbit (strain nonspecified)/ K_2EDTA Plasma</td>
<td>rHuPH20 nAb</td>
<td>-</td>
<td>Turbidimetric method with spectrophoto-metric detection</td>
<td>
<table>
<tr><th>Qualification Parameter</th><th></th><th>N</th><th>CV%[a]</th></tr>
<tr><td colspan="4">Intraday Precision[b]</td></tr>
<tr><td rowspan="4">nAb positive controls</td><td>no-hyaluronate</td><td rowspan="8">[redacted]</td><td>NA</td></tr>
<tr><td>no-incubation</td><td>[redacted]% [redacted]%</td></tr>
<tr><td>no-enzyme</td><td>[redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>rHuPH20-spiked</td><td>[redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Negative controls</td><td>no-hyaluronate</td><td>NA</td></tr>
<tr><td>no-incubation</td><td>[redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>no-enzyme</td><td>[redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>rHuPH20-spiked</td><td>[redacted]%, [redacted]%</td></tr>
</table>
[a] Acceptable intraday precision is indicated by a %CV within [redacted]% for all samples except
</td>
<td>No</td>
<td>13083</td>
</tr>
</table>

<table>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Turbidimetric method with spectrophotometric detection in mouse plasma</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>the no-hyaluronate controls, which give near-zero responses.
[b] [redacted] runs [redacted] replicates.

<u>Relative turbidities for rHuPH20-nAb positive control:</u>
averaged to [redacted]% (± SD [redacted]%), resulting in a threshold of [redacted]%.
<u>Relative turbidities for blank serum samples</u>:
< [redacted]%, indicating no nAb presence in the blank plasma.
The runs were acceptable.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Turbidimetric method with spectrophotometric detection in rabbit plasma</td></tr>
<tr><td>Rabbit, NZW/ K_2EDTA Plasma</td><td>rRbPH20 nAb</td><td>-</td><td>Turbidimetric method with spectrophoto-metric detection</td><td>
<table>
<tr><th colspan="2">Qualification Parameter</th><th>N</th><th>%CV</th></tr>
<tr><td colspan="4">Intraday Precision[a]</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Anti-rRbPH20 IgG-spiked positive controls</td><td>no-hyaluronate</td><td rowspan="8">[redacted]</td><td>NA</td></tr>
<tr><td>no-incubation</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>no-enzyme</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>rRbPH20-spiked</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Negative controls</td><td>no-hyaluronate</td><td>NA</td></tr>
<tr><td>no-incubation</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>no-enzyme</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>rRbPH20-spiked</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
</table>
[a] [redacted] runs [redacted] replicates.
<u>Relative turbidity of anti-rRbPH20 IgG positive controls:</u>
averaged to [redacted]% (± SD [redacted]%), resulting in a threshold of [redacted]%.
<u>Relative turbidities for blank serum samples ([redacted] runs, [redacted] replicates):</u>
< [redacted]% (indicating no nAb presence in the blank plasma)
The runs were acceptable.</td><td>No</td><td>13163</td></tr>
<tr><td colspan="7">Method [redacted]: Turbidimetric method with spectrophotometric detection in monkey plasma</td></tr>
<tr><td>Monkey, Cynomolgus/ Plasma Rabbit/ Antisera</td><td>Neutrali-zing antibody titer (IC_{50})</td><td></td><td>Turbidimetric method with spectrophoto-metric detection</td><td>Screen assay cut-off differentiated between plasma samples that contain hyaluronidase neutralizing activity from those that do not
<table>
<tr><th>Qualification Parameter</th><th>N</th><th>CV%</th></tr>
<tr><td colspan="3">Intraassay Precision of Neutralizing Hyaluronidase Activity Titer (IC_{50}) Determination</td></tr>
<tr><td>Cynomolgus monkey plasma</td><td rowspan="2">[redacted]</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td>Rabbit antiserum</td><td>[redacted]%, [redacted]%, [redacted]%</td></tr>
<tr><td colspan="3">Interassay Precision</td></tr>
<tr><td>Cynomolgus monkey plasma</td><td rowspan="2">[redacted]</td><td>[redacted]%</td></tr>
<tr><td>Rabbit antiserum</td><td>[redacted]%</td></tr>
</table>
The acceptance range for the IC_{50} value of the positive control was set as [redacted] - [redacted] (mean ± [redacted]%), based on the interassay precision results. The IC_{50} titer of the positive control can be</td><td>No</td><td>R09061</td></tr>
</table>

Method [redacted]: Turbidimetric method with spectrophotometric detection in mouse plasma						
				reliably determined with one of two starting dilutions ([redacted] and [redacted]).		

CV= coefficient of variation; EDTA= ethylenediaminetetraacetic acid; IC_{50}=50% inhibition concentration; nAbs= neutralizing antibodies; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20; rRbPH20= recombinant rabbit hyaluronidase PH20; SD=standard deviation.

2.6.5.3　薬物動態試験：吸収：単回投与

Basic IV and SC PK After a Single Dose Across Nonrodent Species		
Test article:	efgartigimod	
Location in CTD:	4.2.2.2-1	
Study no.	ARGX-NC-092	
Species	Monkey/cynomolgus	
Sex (M/F)/no. of animals:	3M	3M
Dose (mg/kg) and route of administration:	20 IV	20 SC (without rHuPH20)
Feeding condition:	Fed	
Vehicle/formulation:	IV formulation: efgartigimod as 20 mg/mL in 25 mmol/L sodium phosphate, 100 mmol/L sodium chloride, 150 mmol/L L-arginine HCl, 0.02% (w/v) polysorbate 80, pH6.7 SC formulation: efgartigimod at 150 mg/mL in 20 mmol/L histidine, 60 mmol/L sucrose, 100 mmol/L NaCl, 0.04% PS20, pH6.0	
Method of administration:	1 × IV injection (dose/approx. 15 seconds), 1 mL/kg 1 × SC injection (dose 20 mg/kg)	
Sample:	Serum	
Sampling time points	Day 1 (n=3/sex/group): Predose and at 5 minutes, 2, 4, and 6 h postdose Day 2: 24 h postdose Days 3, 4, 6, 8, 11, 15, 18, 22, 25, and 29	
Analyte:	Efgartigimod (batches [redacted])	
Assay:	ELISA, Qualified assay ARGX-NC-002	
PK parameters:	**Main study** **(days 1 to 28; n=3/sex/group; mean ±SD)**	
C_{max} (µg/mL)	554±37.6	53.2±18.7
t_{max} (h)	0.08 (0.08-0.08)	48 (24-48)
$t_{1/2,eff}$ (h)	44.7±1.96	46.2±5.88
$t_{1/2,z}$ (h)	96.9±28.8	160±119.8
CL(/F) (mL/h/kg)	1.93±0.284	3.53 ±0.991
$AUC_{0\text{-}168\ h}$ (µg·h/mL)	9124±1018	4676±1113
$AUC_{0\text{-}last}$ (µg·h/mL)	10327±1693	5868±1652
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	10501±1614	5969 ±1634
V_z/F (mL/kg)	NA	918±914

$AUC_{0\text{-}168\ h}$= area under the concentration-time curve (AUC) from time 0 to 168 hours postdose; $AUC_{0\text{-}inf}$=AUC from time 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}last}$=AUC from time 0 to the last quantifiable concentration; CL(/F)=(apparent) systemic clearance; C_{max}=maximum observed concentration; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; F=female; IV=intravenous; M=male; n=number of animals or samples; NA=not applicable; no.=number; PK=pharmacokinetic(s); PS20=polysorbate 20; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20; SC=subcutaneous; SD=standard deviation; $t_{1/2,eff}$=effective elimination half-life; $t_{1/2,z}$=terminal elimination half-life; t_{max}=time of C_{max}; V_z/F=apparent volume of distribution; w/v=weight per volume.

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。R09023 試験及び ^{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、rHuPH20 の平均比活性（110000 U/mg）を用いて換算した。

Pharmacokinetic Parameters of rHuPH20 ([redacted]) Following a Single Intravenous Administration in the Mouse	
Report Title: **Evaluation of the Pharmacokinetics of Two Halozyme Test Articles ([redacted] and [redacted]) Following a Single Intravenous Dose in CD-1 Mice**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.2-2 **Report No.** R09023
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 6/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: NA	
Method of Administration: Intravenous	
Dose: Single dose of 0.433 mg/kg[redacted]	
Sample: Plasma	
Analyte: rHuPH20	
Specific Activity: 110000 U/mg for[redacted]	
Assay: Enzyme activity assay	
Sampling Time: Pre-dose, 1, 5, 10, 30 minutes and 1, 2 and 3 h post-dose	

PK Parameters:	**PK Parameters for rHuPH20 ([redacted]) After IV administration**
C_0 (ng/mL)	1975.0
C_{max} (ng/mL)	1176.0
$AUC_{(0\text{-inf})}$ (ng·h/mL)	79.6
CL (mL/h/kg)	5440.0
V_{ss} (mL/kg)	160.0
MRT (h)	0.030
$t_{½}$ (h)	0.038

$AUC_{(0\text{-inf})}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; CL = systemic clearance; C_0 = plasma concentration back-extrapolated to time 0; C_{max} = maximum plasma concentration; IV = intravenous; MRT = mean residence time; $t_{½}$ = elimination half-life; Vss = volume at steady-state.

NA: not available**Pharmacokinetic Parameters of rHuPH20 Following Intravenous and Subcutaneous Administration in Female Monkeys**	
Report Title: **A Multi-Dose Pharmacokinetics Study of rHuPH20 Administered by Intravenous and Subcutaneous Injection in Female Cynomolgus Monkeys**	**Test Article: rHuPH20**
	Location in CTD: 4.2.2.2-3
	Report No. R07060
Species: Cynomolgus monkey	
Gender (M/F): Number of Animals: F: 3/group	
Feeding Condition: Fed	
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH6.0	
Method of Administration: Intravenous and subcutaneous	
Dose (mg/kg): Single IV dose: 0.3, 3, 15, 30 Single SC dose: 1, 3, 10, 30	
Sample: Plasma	
Analyte: rHuPH20	
Specific Activity: 110000 U/mg	
Assay: USP turbidimetric assay for determination of hyaluronidase activity	
Sampling Time: Samples IV: pre-dose, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 and 60 minutes post-dose Samples SC: pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 4, 8, 24 and 48 h post-dose	

	PK Parameters for rHuPH20 from Noncompartmental Analysis After IV Administration			
Dose (mg/kg)	**0.3**	**3**	**15**	**30**
Gender (M/F): Number of Animals:	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
C_{max} (U/mL)	1243.0 ± 180.0	13393.0 ± 1160.0	60700.0 ± 6300.0	129750.0 ± 22551.0
$AUC_{(0\text{-}last)}$ (U·h/mL)	174.0 ± 47.4	6724.0 ± 1249.0	43997.0 ± 5722.0	106167.0 ± 17493.0
$AUC_{(0\text{-}inf)}$ (U·h/mL)	178.0 ± 49.5	7201.0 ± 1139.0	93194.9 ± 15961.0	290481.3 ± 59343.0
CL (mL/h/kg)	207.7 ± 65.6	49.1 ± 7.3	19.0 ± 3.0	12.3 ± 2.5
V_{ss} (mL/kg)	23.4 ± 2.4	19.4 ± 5.6	29.3 ± 3.8	26.5 ± 4.9
MRT (h)	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.2 ± 0.3
V_z (mL/kg)	24.6 ± 4.6	16.4 ± 8.6	29.4 ± 3.9	26.4 ± 4.9

$AUC_{(0\text{-}last)}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to last measurable timepoint (30 minutes for 0.3 mg/kg and 60 minutes for 3, 15, and 30 mg/kg doses); $AUC_{(0\text{-}inf)}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; CL = absolute clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; IV = intravenous; MRT = mean residence time; SC = subcutaneous; V_{ss} = volume at steady-state; V_z = volume of distribution.

	PK Parameters for rHuPH20 from Noncompartmental Analysis After SC Administration			
Dose (mg/kg)	**1**	**3**	**10**	**30**
Gender (M/F): Number of Animals:	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
C_{max} (U/mL)	11.0 ± 10.4	26.4 ± 5.8	140.5 ± 118.7	480.2 ± 252.9

	PK Parameters for rHuPH20 from Noncompartmental Analysis After SC Administration			
Dose (mg/kg)	**1**	**3**	**10**	**30**
Gender (M/F): Number of Animals:	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
t_{max} (h)	2.5 ± 2.1	3.3 ± 4.0	4.3 ± 3.5	4.0 ± 0.0
$AUC_{(0–inf)}$ (U·h/mL)	NC	562.0 ± 140.0	1585.0 ± 276.0	6102.0 ± 1981.0
CL/F (mL/h/kg)	NC	639.5 ± 159.3	748.8 ± 145.0	615.1 ± 210.4
MRT (h)	NC	22.9 ± 16.0	17.7 ± 16.0	13.9 ± 4.3
V_z/F (mL/kg)	NC	13171.0 ± 6835.5	11827.8 ± 9179.3	9613.7 ± 5866.4

$AUC_{(0-inf)}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; CL/F = apparent clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; MRT = mean residence time; NC = not calculated; SC = subcutaneous; t_{max} = time to maximal plasma concentration; V_z/F = apparent volume of distribution.

2.6.5.4　薬物動態試験：吸収：反復投与

エフガルチギモドに rHuPH20 を混合して反復皮下投与したときの PK については、カニクイザル 12 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]36930）の一部として実施した。TK 結果は、2.6.7.7.A に示す。

カニクイザルに 100 mg/kg の用量でエフガルチギモドを反復静脈内投与して T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験を実施した（[redacted]8459761）。TK 結果は、2.6.7.7.B に示す。

Monkey: 7-Day Repeat-Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study	
Report Title: **A 7-Day Repeat-Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.3.2-3 **Report No.** R08056
Species: Cynomolgus monkey	
Gender (M/F)/Number of Animals: M: 2/group, F: 2/group	
Feeding Condition: Fed	
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH6.0	
Method of Administration: Intravenous and subcutaneous	
Dose: 5 mg/kg/day for 7 days (550000 U/kg; 1.10×10^6 U/mL)	
Sample: Plasma	
Analyte: rHuPH20	
Specific Activity: 110000 U/mg	
Assay: USP turbidimetric assay for determination of hyaluronidase activity	
Sampling Time: Samples IV: 1, 5, 10, 30, 60, 120 and 240 minutes post-dose on Days 1 and 7 and 24 h after last dose on Day 8 Samples SC: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h post-dose on Days 1 and 7	

	TK Parameters for rHuPH20 After IV or SC Administration			
Dose / Route of Administration	**5 mg/kg/day IV**		**5 mg/kg/day SC**	
Gender (M/F): Number of Animals:	**M: 2 / F: 2**	**M: 2 / F: 2**	**M: 2 / F: 2**	**M: 2 / F: 2**
TK Parameters:	**Day 1**	**Day 7**	**Day 1**	**Day 7**
C_{max} (U/mL)	NC	NC	200.0	115.0
$AUC_{(0\text{-last})}$ (U·h/mL)	11800.0	8733.0	641.7	501.7
$AUC_{(0\text{-inf})}$ (U·h/mL)	11883.0	8800.0	NC	NC
t_{max} (min)[a]	NC	NC	60.0	60.0
V_{ss} (mL/kg)	17.0	16.7	NC	NC

$AUC_{(0\text{-}last)}$ = area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measureable timepoint; $AUC_{(0–inf)}$ = area under the plasma activity-time curve from time 0 to infinity; C_{max} = maximum observed plasma concentration; IV = intravenous; t_{max} = time to maximum observed plasma concentration; NC = not calculated; SC = subcutaneous; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.
[a] Median value.

Monkey: 39-Week Repeat-Dose Subcutaneous Toxicity Study rHuPH20 Toxicokinetic Parameters	
Report Title: **A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase**	**Test Article: rHuPH20**
	Location in CTD: 4.2.3.2-4
	Report No. R09050
Species: Cynomolgus monkey	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 6/group, F: 6/group	
Feeding Condition: Fasted prior to blood collection	
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH6.0	
Method of Administration: Subcutaneous once weekly	
Dose (mg/kg):0, 0.02, 0.2, 2	
Sample: Plasma	
Analyte: rHuPH20	
Specific Activity: 110000 U/mg	
Assay: Hyaluronidase enzyme activity assay ([redacted] turbidimetric assay)	
Sampling Time: Blood samples: pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, and 16 h (Day 2 following dose administration on Day 1) post-dose on Day 1, end of Week 3, 13, 27, and 39 (Day 21, 85, 183, and 267, respectively) ADA and hyaluronidase neutralizing activity blood samples: once during acclimation (Day -6) and during dosing period on Days 7, 14, 42, 70, 95, 123, 140, 154, 182, 210, 238, 266, 274, 295, and 302	

	TK Parameters from Noncompartmental Analysis Following Once Weekly SC Administration of 2.0 mg/kg[b] rHuPH20							
	Male				**Female**			
TK Parameters:	**Day 1**	**Day 85**	**Day 183**	**Day 267**	**Day 1**	**Day 85**	**Day 183**	**Day 267**
C_{max} (U/mL)	12.5	28.8	12.0	NC	20.8	64.7	64.2	10.0
$AUC_{(0\text{-last})}$ (U·h/mL)	20.5	177.0	89.6	NC	47.8	395.0	467.0	56.2
t_{max} (min)[a]	2.0	6.0	4.0	NC	2.0	4.0	4.0	4.0

$AUC_{(0\text{-last})}$ = area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measureable timepoint; C_{max} = maximum observed plasma concentration; NC = not calculated; SC = subcutaneous; t_{max} = time to maximum observed plasma concentration.
[a] Median value.

[b] No TK analysis were performed for Group 1 (0 mg/kg/week rHuPH20), Group 2 (0.02 mg/kg/week rHuPH20) and Group 3 (0.2 mg/kg/week rHuPH20) as the majority of monkey plasma samples had hyaluronidase activity levels which were either low or below the quantifiable assay limit (i.e. < 10 U/mL). **Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis Using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Neutralizing Activity**

Report Title:	**Quantitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K2EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** **Determination of the Titer of Hyaluronidase Neutralizing Activity in Plasma Specimens from a "39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase"**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.3.2-4 **Report No.** R09050, Appendix 12 and Appendix 9
Study System:	Determination of anti-drug antibodies and hyaluronidase-neutralizing activity in monkey K_2EDTA plasma samples	
Test System and Method:	Anti-rHuPH20 antibodies: ELISA assay (R09050, Appendix 12) Determination of hyaluronidase-neutralizing activity to rHuPH20: activity assay (Report No. R09050, Appendix 9)	

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**	**0.02**	**0.2**	**2**
Gender/ Number of animals:	**M: 6 / F: 6**	**M: 6 / F: 6**	**M: 6 / F: 6**	**M: 6 / F: 6**
Day 7 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/10	0/12	0/12	2/12
Endpoint Titer	<10	<10	<10	10
Neutralizing Ab	0/0	0/0	0/0	0/2
Dilution Titer Results	-	-	-	-
Day 14 (Incidences)				
Screening assay pos[a]	1/12	3/12	3/12	8/12
Endpoint Titer	10	10 - 50	10 - 50	10 - 250 (50 – 1250)[§]
Neutralizing Ab	0/1	0/3	0/3	0/8
Dilution Titer Results	-	-	-	-
Day 42 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	11/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	10 - 6250	250 - 156250 (6250 - 156250)[§]	6250 - 31250 (250 - 156250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	0/11	0/12	0/12
Dilution Titer Results	-	-	-	-
Day 70 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	10 - 156250	1250 - 156250 (31250 - 781250)[§]	31250 (6250 - 781250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	0/12	1/12	0/12
Dilution Titer Results	-	-	1156	-

Dose (mg/kg/week)	0 (Control)	0.02	0.2	2
Day 95 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	50 - 31250	1250 - 156250 (6250 - 156250)[§]	156250 (6,250 - 781250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	2/12	8/12	8/12
Dilution Titer Results	-	96 - 121	145 - 1724	241 - 1288
Day 123 (Incidences)				
Screening assay pos.a	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	1250 - 156250	1250 - 156250 (31250 - 781250)[§]	781,250 (6250 - 3906250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	4/12	4/12[b]	9/12
Dilution Titer Results	-	123 - 162	218 - 2,044	367 - 9950
Day 140 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6250 - 781250	31250 - 156250 (31250 - 781250)[§]	156250 - 781250 (31250 - 19531250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	1/12	6/12	10/12
Dilution Titer Results	-	166	389 - 3824	751 - 11050
Day 154 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6250 - 156250	6250 - 3906250 (31250 - 781250)[§]	156250 - 781250 (31250 - 3906250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	3/12c	8/12	8/12
Dilution Titer Results	-	263 - 308	109 - 6340	822 - 11800
Day 182 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6250 - 156250	6250 - 781250 (156,250 - 19531250)[§]	156250 - 781250 (31,250 - 19531250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	4/12	7/12	9/12
Dilution Titer Results	-	141 - 456	331 - 9815	976 - 15420
Day 210 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6250 - 3906250	6,250 - 3,906,250 (31250 - 781250)[§]	156250 - 781250 (31250 - 3906250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	4/12	7/12	10/12
Dilution Titer Results	-	174 - 730	277 - 12,100	1529 - 26630
Day 238 (Incidences)				

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**	**0.02**	**0.2**	**2**
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	11/11
Endpoint Titer	<10	31250 - 781250	6250 - 3906250 781250[§]	31250 - 781250 (156250 - 19531250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	2/12	7/12[d]	11/11[e]
Dilution Titer Results	-	221 - 320	411 - 14760	1982 - 50950
Day 266 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6250 - 19531250	31250 - 19531250 (156250 - 781250)[§]	156250 - 781250 (31250 - 19531,250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	5/12	7/12	7/12
Dilution Titer Results	-	270 - 1218	146 - 13370	2106 - 27660
Day 274 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/8	8/8	8/8	7/7
Endpoint Titer	<10	31250 - 3906250	31250 - 3906250 (156250 - 3906250)[§]	156250 - 781250 (156250 - 3902650)[§]
Neutralizing Ab	0/0	2/8[f]	3/8	5/7 g
Dilution Titer Results	-	323	177 - 1149	3380 - 22960
Day 296 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/4	4/4	4/4	4/4
Endpoint Titer	<10	6250 - 781250	156250 -3906250	3906250 (6250 - 19531250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	1/4	2/4	1/4
Dilution Titer Results	-	102	2631 - 5784	23850
Day 302 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/4	4/4	4/4	4/4
Endpoint Titer	<10	6250 - 156250	156250 - 3906250	3906250 (6250 - 3906250)[§]
Neutralizing Ab	0/0	1/4	3/4	2/4
Dilution Titer Results	-	70	228 - 7328	5137 - 26380

[a] An initial screen was performed using a ten-fold sample dilution; the specimens that exceeded the cut-point threshold were deemed reactive (positive if ≥10). Since most optical density values observed during the screening process far exceeded the cut point, it was decided that confirmatory testing was unneeded and analysis of reactive samples was performed directly using a titer format.
[b] Sample #34 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.
[c] Sample #21 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.
[d] Sample #26 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.

[e] At Day 238 a neutralizing titer value for sample #42 (25210) was detected but there is no titer value for the initial screen for this sample on Day 238 available; sample #37 had an initial screen value of 156250 but no neutralizing titer determination was performed for #37.
[f] Sample #13 was originally deemed negative with an OD value equal to the cut-off OD; no neutralizing titer determination was performed. The cut-off OD was later re-calculated for correct number of significant figures, resulting in an OD decrease by 0.001. The sample is therefore considered positive for hyaluronidase neutralizing activity, with its OD value exceeding the re-calculated cut-off by 0.001.
[g] At Day 274 a neutralizing titer value for sample #42 (22960) was detected but there is no titer value for the initial screen for this sample on Day 274 available; samples #39, #43 and #47 had an initial screen value but no neutralizing titer determination was performed for these samples.
§ Deviated sample; sample exceeded 5 freeze/thaw cycles (6 total)
- Titer not determined. Samples were deemed negative during the initial screen.

Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Electrochemiluminescent (ECL) Detection		
Report Title:	**Assessment of Cynomolgus EDTA Plasma in a Validated Method for the Electrochemiluminescent Detection of Antibodies to rHuPH20**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.3.2-4 **Report No.** R09050, Attachment 8
Study System:	Determination of anti-drug antibodies in monkey K_2EDTA plasma samples	

Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**	**0.02**	**0.2**	**2**
Day 7 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	ND	ND	0/1
Endpoint Titer	-	-	-	-
Day 14 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	ND	ND	2/6[a]
Endpoint Titer	-	-	-	320
Day 42 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	1/1	ND	ND
Endpoint Titer	-	2560	-	-
Day 70 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	1/1	1/1	2/3[b]
Endpoint Titer	-	10240	>81920	655,360
Day 95 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	2/2	2/2
Endpoint Titer	-	-	327680 - 1310720	327680
Day 123 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	1/1	ND	2/2
Endpoint Titer	-	163840	-	81920 - 5242880
Day 140 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	ND	4/4
Endpoint Titer	-	-	-	327680 - 2621440[c]
Day 154 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	1/2	1/1
Endpoint Titer	-	-	1310720	2621440
Day 182 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	2/2	ND	ND
Endpoint Titer	-	40960 - 163840	-	-

- Titer not determined.
ND = Screening assay not determined.

Dose (mg/kg/week)	0 (Control)	0.02	0.2	2
Day 210 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	1/1	1/1	2/2
Endpoint Titer	-	163840	1310720	327680 - 655360
Day 238 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	1/1	1/2
Endpoint Titer	-	-	5242880	41943040
Day 266 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	2/2	0/1	2/3[d]
Endpoint Titer	-	>40960 - 327680	-	2621440
Day 274 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	1/1	ND	1/1
Endpoint Titer	-	20480	-	-
Day 296 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	0/1	ND
Endpoint Titer	-	-	-	-

[a] Sample # 40 was detected positive but no endpoint titer was determined.
[b] Sample # 41 was detected positive but no endpoint titer was determined; sample #43 was evaluated but no result was reported.
[c] Anticipated titer value of 2621440 for sample #41.
[d] Sample # 42 was detected positive but no endpoint titer was determined; sample #45 was evaluated but no result was reported.

Mouse: Embryo-Fetal Developmental Subcutaneous Toxicity Study rHuPH20 Toxicokinetic Parameters	
Report Title: **Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice**	**Test Article: rHuPH20**
	Location in CTD: 4.2.3.5.2-2
	Report No. R08176
Species: Crl: CD-1(ICR) mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: F: 25/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: -	
Method of Administration: Subcutaneous	
Dose: Daily dose of 3 (330000 U/kg; 43272 U/mL), 9 (990000 U/kg; 216360 U/mL) or 18 mg/kg (1980000 U/kg; 432720 U/mL) on Days 6 through 15 of gestation	
Sample: Plasma	
Analyte: rHuPH20	
Specific Activity: 110000 U/mg	
Assay: [redacted] turbidimetric assay for hyaluronidase activity	
Sampling Time: 30 minutes and 2, 4, 8 and 24 h post-dose	

	TK Parameters for rHuPH20 After SC Administration on Days 6 Through 15 of Gestation					
Dose (mg/kg)	**3**		**9**		**18**	
PK Parameters:	**Day 6**	**Day 15**	**Day 6**	**Day 15**	**Day 6**	**Day 15**
C_{max} (U/mL)	3.4	20.9	30.5	17.1	49.6	99.2
$AUC_{(0-24)}$ (U·h/mL)	5.5	55.1	45.3	79.0	120.0	363.0
t_{max} (h)	0.5	0.5	0.5	2.0	0.5	2.0

$AUC_{(0-24)}$ = area under the plasma activity-time curve from time 0 to 24 h (the last collection timepoint); C_{max} = maximum observed plasma concentration; t_{max} = time to maximum observed plasma concentration; SC = subcutaneous.

Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Electrochemiluminescent (ECL) Bridging Immunoassay		
Report Title:	**Non-GLP Characterization of Anti-rHuPH20 Binding Antibodies from Mouse Embryo Fetal Developmental Toxicity Study**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.3.5.2-2 **Report No.** R08176, Amendment No. 3
Study System:	Retrospective determination of anti-drug antibodies in mouse plasma samples	

Dose (mg/kg)	**3**	**9**	**18**
Gestation Day 6 (Incidences)			
Pre-dose			
Confirmatory assay pos.	0/3	0/3	0/3
Endpoint Titer	-[a]	-	-
Gestation Day 15 (Incidences)			
Pre-dose			
Confirmatory assay pos.	3/3	3/3	3/3
Endpoint Titer	12500; 62500; 1600000	12500; 12500; 12500	12500; 62500; ≥3200000[b]
8 h			
Confirmatory assay pos.	3/3	3/3	2/2
Endpoint Titer	200; ≥1600[c]; 62500	2500; 2500; 2500	2500; ≥3200000[d]
24 h			
Confirmatory assay pos.	3/3	3/3	3/3
Endpoint Titer	200; 2500; 12500	2500; 12500; 1600000	62500; 62500; 400000

- Titer was not determined
[a] Titer was <50 in animal #4328
[b] Sample #4375 did not reach endpoint titer, repeat analysis not possible due to insufficient volume.
[c] Sample #4314 did not reach endpoint titer, repeat analysis not possible due to insufficient volume.
[d] Sample #4386 did not reach endpoint titer, repeat analysis not possible due to insufficient volume.

2.6.5.5　薬物動態試験：分布

エフガルチギモドについては、独立した分布試験を実施していない。ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4.4 にその理由を示す。

Pilot Study: Tissue Distribution Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse	
Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-rHuPH20**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-1 **Report No.** 12214-B
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 10/group, F: 10/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	
Method of Administration: Intradermal	
Dose: Single dose of 1.33 µg/animal (6 µCi/animal; enzyme activity of 8000 U/mL)	
Radionuclide: [^{125}I]	
Specific Activity of Test Item in Formulation: 8.31×10^6 dpm/µg or 3.74 µCi/µg for ^{125}I-rHuPH20	
Assay: Liquid scintillation counting	
Sampling Time: 5, 15, and 30 minutes and 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48 h post-dose	

Tissue/Organs	**t_{max} (h)**		**C_{max} (ng eq/g)**		**$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)**		**$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)**		**$t_{½}$ (h)**	
	Male	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Blood	1	1	66.3	89.7	309.0	425.0	RNR	427.0	RNR	5.7
Plasma	1	1	68.8	94.8	320.0	436.0	RNR	440.0	RNR	5.9
Gall bladder/bile	2	1	59.5	107.0	331.0	393.0	386.0	409.0	36.8	2.7
Heart	1	1	18.7	25.5	85.9	123.0	RNR	125.0	RNR	11.8
Kidney	1	1	67.6	71.5	365.0	344.0	401	RNR	19.5	RNR
Large intestine	4	1	19.4	21.2	156.0	126.0	RNR	128.0	RNR	6.6
Liver	1	1	24.4	30.2	133.0	180.0	RNR	189.0	RNR	13.5
Lungs	1	1	35.3	50.9	188.0	272.0	RNR	281.0	RNR	13.2
Lymph nodes left axillary	0.0833	1	134.0	216	290.0	738.0	RNR	760.0	RNR	10.8
Lymph nodes right axillary	1	1	33.0	52.6	101.0	250.0	RNR	263.0	RNR	2.6
Lymph nodes left inguinal	0.5	2	261	70.3	565.0	825.0	592.0	RNR	12.7	RNR
Lymph nodes right inguinal	2	4	25.2	66.3	76.0	641.0	RNR	646.0	RNR	2.9
Lymph nodes mesenteric	1	1	25.0	28.5	194.0	182.0	RNR	187.0	RNR	11.4
Ovaries	NA	1	NA	32.4	NA	164.0	NA	168.0	NA	4.0
Small intestine	1	1	18.0	17.5	163.0	178.0	167.0	181.0	7.5	7.5
Skin injection site	0.0833	0.25	7724.0	10143.0	8842.0	18010.0	9364.0	18326.0	14.8	9.5
Spleen	1	1	28.5	39.9	198.0	248.0	RNR	252.0	RNR	11.0

Tissue/Organs	t_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)		$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)		$t_{½}$ (h)	
	Male	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Testes	2	NA	18.2	NA	140.0	NA	RNR	NA	RNR	NA
Thyroid/parathyroid gland	8	24	4821.0	9945.0	197972.0	318908.0	NR	NR	NR	NR
Urinary bladder	4	1	135.0	76.2	1,097.0	479.0	RNR	482.0	RNR	5.63
Uterus	NA	1	NA	61.0	NA	349.0	NA	353.0	NA	10.6

$AUC_{(0-inf)}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; $AUC_{(0-t)}$ = area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to the time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed, using the linear or linear/log trapezoidal method; C_{max} = observed maximum plasma radioactivity concentration; t_{max} = time after dosing at which the maximum observed concentration was observed; $t_{½}$ = elimination half-life.
NA = Not applicable; NR = Not reportable.
RNR = Result not reported because the $AUC_{(0-inf)}$ was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800.

Pilot Study: Tissue Distribution Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-Labelled Hyaluronidase in the Mouse	
Report Title: Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-2 **Report No.** 13128
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 10/group, F: 10/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	
Method of Administration: Intravenous	
Dose: Single dose of 4 µg/animal (11.5 µCi/animal; enzyme activity of 2000 U/mL which is considered as clinically-relevant dose)	
Radionuclide: [^{125}I]	
Specific Activity of Test Item in Formulation: 6.43×10^6 dpm/µg or 2.89 µCi/µg for ^{125}I-rHuPH20	
Assay: Liquid scintillation counting and quantitative whole body autoradiography (QWBA)	
Sampling Time: 2, 5, 10, 15, and 30 minutes and 1, 2, 8, 24, and 48 h post-dose (one animal/sex/timepoint)	

PK Parameters of Total Radioactivity in ^{125}I-Labelled rHuPH20 in Tissue Samples (Liquid scintillation counting)

Tissue/Organs	t_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)		$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)		$t_{½}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Blood	0.5	0.033	245.0	933.0	1127.0	1900.0	1132.0	1924.0	7.9	6.8
Plasma	0.5	0.033	247.0	1514.0	1136.0	1874.0	1147.0	1898.0	3.5	4.0
Brain	0.5	0.033	10.7	17.3	47.6	69.3	48.6	70.6	12.2	6.9
Eyes	0.5	0.5	53.7	69.5	311.0	428.0	315.0	432.0	3.6	6.2
Gall bladder/bile	0.25	0.167	548	993.0	2201.0	2900.0	2240.0	2947.0	11.1	10.7
Heart	0.5	0.033	67.8	110.0	319.0	622.0	324.0	632.0	10.1	7.3
Kidney	0.5	0.5	212.0	260.0	1255.0	1357.0	1382.0	1424.0	18.6	8.7
Large intestine	0.5	0.5	38.2	71.9	265.0	416.0	268.0	428.0	6.4	7.7
Liver	0.167	0.083	2262.0	2634.0	2634.0	3517.0	2986.0	RNR	20.1	RNR
Lungs	0.5	0.167	2353.0	3123.0	8235.0	9661.0	8386.0	9742.0	9.4	7.1
Lymph nodes inguinal	0.5	8	100.0	358.0	268.0	4369.0	283.0	RNR	1.8	RNR
Lymph nodes mesenteric	0.5	0.5	64.9	137.0	341.0	871.0	355.0	884.0	5.0	7.0
Muscle	1	0.5	65.4	37.3	133.0	245.0	138.0	256.0	1.6	12.5
Ovaries	NA	0.033	NA	246.0	NA	820.0	NA	830.0	NA	6.1
Small intestine	0.5	0.5	54.2	67.6	308.0	522.0	312.0	537.0	9.9	8.8
Skin	1	8	128.0	214.0	702.0	3108.0	743.0	RNR	14.9	RNR
Spleen	0.167	0.167	474.0	591.0	1874.0	2501.0	2146.0	2708.0	20.1	14.0
Testes	2	NA	67.3	NA	429.0	NA	430.0	NA	5.6	NA
Thyroid/parathyroid gland	8	8	29067.0	19885.0	956726.0	554033.0	1176107.0	RNR	19.9	RNR

PK Parameters of Total Radioactivity in ^{125}I-Labelled rHuPH20 in Tissue Samples (Liquid scintillation counting)										
Tissue/Organs	**t_{max} (h)**		**C_{max} (ng eq/g)**		**$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)**		**$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)**		**$t_{½}$ (h)**	
	Male	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Urinary bladder	1	1	215.0	214.0	850.0	1763.0	855.0	1778.0	8.1	6.2
Uterus	NA	0.5	NA	190.0	NA	1378.0	NA	1409.0	NA	8.2

$AUC_{(0-inf)}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; $AUC_{(0-t)}$ = area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to the time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed, using the linear or linear/log trapezoidal method; C_{max} = observed maximum plasma radioactivity concentration; t_{max} = time after dosing at which the maximum observed concentration was observed; $t_{½}$ = elimination half-life.
NA = Not applicable.
RNR = Result not reported because the $AUC_{(0-inf)}$ was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800.

Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)		
Report Title: **Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**		**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-2 **Report No.** 13128

Tissue / Organs	**Concentrations of Total Radioactivity (ng eq/g)**	
	5 Minutes	
	M: 1	**F: 1**
Brain	7.3	7.0
Eye	13.7	15.2
Gall bladder/bile (content)	313.6[a]	79.2[a]
Kidney	109.4	124.8
Large intestine wall	35.2[a]	14.8
Liver	1403.0[b]	1798.2[b]
Lung	1880.4[b]	233.9
Lymph node (inguinal)	NQ	NQ
Lymph node (mesenteric)	35.0	31.6
Myocardium	80.1	74.8
Ovary	NA	135.9[a]
Skeletal muscle (dorsal)	16.0	18.3
Skin	22.8	19.6
Small intestine wall	22.0	25.2
Spleen	282.4	378.0
Testis	14.4	NA
Thyroid/parathyroid gland	214.7	NQ
Urinary bladder wall	21.7	14.3
Urinary bladder content	21.7	12.6
Uterus	NA	34.2

NA = Not applicable; NQ = Non-quantifiable.
[a] Suspect contamination by flair.
[b] Outside the calibration curve range.

Pilot Study: Tissue Distribution Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse	
Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-rHuPH20**	**Test Article: rHuPH20**
	Location in CTD: 4.2.2.3-3
	Report No. 13184
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 11/group, F: 11/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	
Method of Administration: Intradermal or subcutaneous	
Dose: Single dose intradermal or subcutaneous injection: 1.73 µg/animal (5 µCi/animal; enzyme activity of 2000 U/mL which is considered as clinically-relevant dose)	
Radionuclide: [^{125}I]	
Specific Activity of Test Item in Formulation: 6.55 x 10^6 dpm/µg for ^{125}I-rHuPH20	
Assay: Liquid scintillation counting	
Sampling Time: 2, 5, 10, 15, 20, 30, and 45 minutes and 1, 2, 4, and 24 h post-dose (1 animal/sex/timepoint/group)	

Tissue/Organs	**Pharmacokinetics of Total Radioactivity Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20**									
	t_{max} (h)		**C_{max} (ng eq/g)**		**$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)**		**$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)**		**$t_{½}$ (h)**	
	Male	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
Blood	0.75	1	73.3	97.6	810	530	820	541	4.3	4.5
Plasma	0.75	1	76.8	100	845	559	858	572	4.4	4.5
Brain	0.75	2	3.8	6.1	8.9	31.6	RNR	32.2	RNR	4.1
Eyes	2	1	17.9	26.1	206	168	208	171	4.0	4.4
Gall bladder/bile	4	0.75	94.1	112	1,213	743	NE	801	NE	6.4
Heart	0.75	1	22.7	27.0	196	148	201	153	4.8	5.0
Kidney	1	0.75	82.4	84.5	729	483	778	540	6.4	7.5
Injection site (skin)	0.133	0.117	12369	19675	22270	50306	25410	58050	9.4	9.5
Injection site (underlying muscle)	0.133	0.117	1695	3544	1028	1,449	RNR	RNR	RNR	RNR
Large intestine	0.75	1	14.1	21.6	186	134	190	142	5.0	6.1
Liver	0.75	1	25.2	34.1	274	233	286	248	5.6	5.8
Lungs	0.75	1	43.5	57.0	452	319	463	331	4.8	4.8
Lymph nodes mesenteric	0.75	1	19.1	35.8	236	238	240	244	4.4	4.9
Lymph nodes left inguinal	0.333	0.5	364	479	455	2311	RNR	2446	RNR	6.2
Lymph nodes right inguinal	2	2	36.0	131	90.6	1186	NE	1212	NE	4.5
Lymph nodes left axillary	0.75	0.5	20.7	197	230	905	RNR	949	RNR	5.4
Lymph nodes right axillary	0.75	0.75	19.6	50.9	61.4	112	RNR	RNR	RNR	RNR
Muscle	0.133	1	19.8	18.0	29.4	52.2	RNR	RNR	RNR	RNR
Ovaries	NA	0.75	NA	38.3	NA	229	NA	236	NA	5.1
Small intestine	2	1	17.4	23.7	222	225	228	232	5.1	5.2

Tissue/Organs	Pharmacokinetics of Total Radioactivity Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20									
	t_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)		$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)		$t_{½}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Spleen	0.75	1	27.9	53.0	306	290	312	297	4.6	4.7
Testes	4	NA	19.8	NA	269	NA	NE	NA	NE	NA
Thyroid/parathyroid gland	4	24	3518	12487	54949	185822	NE	NE	NE	NE
Urinary bladder	1	2	60.5	412	700	1928	708	1935	4.0	3.0
Uterus	NA	0.75	NA	76.2	NA	395	NA	404	NA	4.2

$AUC_{(0-inf)}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; $AUC_{(0-t)}$ = area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to the time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed, using the linear or linear/log trapezoidal method; C_{max} = observed maximum plasma radioactivity concentration; t_{max} = time after dosing at which the maximum observed concentration was observed; $t_{½}$ = elimination half-life.
NA = Not applicable; NE = Parameter not estimable from data set.
RNR = Result not reported because the $AUC_{(0-inf)}$ was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800.

Tissue/Organs	Pharmacokinetics of Total Radioactivity Following Single Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20									
	t_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		$AUC_{(0-t)}$ (ng eq·h/g)		$AUC_{(0-inf)}$ (ng eq·h/g)		$t_{½}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Blood	0.75	0.75	104	84.5	525	122	536	RNR	4.4	RNR
Plasma	0.75	0.75	106	84.2	547	932	560	947	4.5	4.5
Brain	0.75	2	6.0	48.9	10.2	102	12.2	102	1.3	3.0
Eyes	0.75	2	26.6	26.0	160	219	163	224	4.0	4.5
Gall bladder/bile	1	2	83.2	113	194	1268	RNR	1298	RNR	4.7
Heart	0.75	0.75	31.6	30.2	148	211	152	219	4.6	5.2
Kidney	0.75	0.75	111	88.2	600	590	649	642	6.2	6.5
Injection site (skin)	0.5	0.25	6488	8654	14010	14511	15443	RNR	7.9	RNR
Injection site (underlying muscle)	0.183	0.333	5520	2476	3436	7338	RNR	7386	RNR	3.7
Large intestine	0.75	0.75	22.1	15.2	134	152	137	167	4.7	7.3
Liver	0.75	0.75	34.6	30.6	193	305	203	330	5.5	6.6
Lungs	0.75	0.75	60.8	49.0	323	416	332	434	4.7	5.4
Lymph nodes mesenteric	0.75	0.75	31.6	40.8	202	268	207	278	4.5	5.3
Lymph nodes left inguinal	0.5	0.75	493	266	865	2368	897	2391	6.6	3.8
Lymph nodes right inguinal	4	2	35.7	241	474	686	NE	NE	NE	NE
Lymph nodes left axillary	1	1	75.7	117	604	610	616	626	4.4	4.9
Lymph nodes right axillary	0.5	1	115	80.4	172	201	RNR	RNR	RNR	RNR
Muscle	0.75	1	13.2	18.8	28.3	50.6	RNR	RNR	RNR	RNR
Ovaries	NA	0.75	NA	35.5	NA	256	NA	264	NA	5.0
Small intestine	1	4	26.2	26.9	146	360	155	NE	6.0	NE
Spleen	2	1	39.2	42.3	273	414	279	423	4.4	4.8
Testes	2	NA	22.8	NA	205	NA	208	NA	4.2	NA
Thyroid/parathyroid gland	4	24	3761	14767	71569	243430	NE	NE	NE	NE
Urinary bladder	2	0.75	142	128	834	1065	841	1,147	3.4	7.1
Uterus	NA	0.75	NA	77.7	NA	523	NA	621	NA	8.6

$AUC_{(0-inf)}$ = area under the plasma radioactivity concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; $AUC_{(0-t)}$ = area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to the time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed, using the linear or linear/log trapezoidal method; C_{max} = observed maximum plasma radioactivity concentration; t_{max} = time after dosing at which the maximum observed concentration was observed; $t_{½}$ = elimination half-life.
NA = Not applicable; NE = Parameter not estimable from data set.
RNR = Result not reported because the $AUC_{(0-inf)}$ was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800.

Biodistribution Following Intradermal Administration of rHuPH20 in the Mouse	
Report Title: **Biodistribution of rHuPH20 in the Skin, Lymphatics and Plasma after Intradermal Administration in the Mouse**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-4 **Report No.** R08127
Species: NCr nu/nu athymic mice	
Gender (M/F): Number of Animals: F: 5 animals euthanized per timepoint	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, 1 mg/mL human serum albumin, pH 6.5	
Method of Administration: Intradermal and intravenous (maximum plasma control group)	
Dose: Single dose of 2000 U/mL (4000 U/kg; 0.032 mg/kg[a])	
Specific Activity: 110000 U/mg	
Assay: Hyaluronidase enzyme activity assay (biotinylated HA method)	
Sampling Time: 0.0167, 0.25, 0.5, 1, 4, 8, and 24 h post-dose	

Tissue/Organs	**C_{max} (U/mL)**	**$t_{½}$ (minutes)**
Plasma	BLQ	ND
Lymph nodes[a]	0.65 - 3.3	ND
Skin	10.1 - 23.0	12.9
Control group (untreated animals)	BLQ	ND
Control group IV administration	17.4	ND

BLQ = Below the limit of quantification (~ 0.7 U/mL); C_{max} = maximum observed activity (values above represent range from 5 animals and across all the timepoints); IV = intravenous; ND = not determined; $t_{½}$ = elimination half-life.

[a] Lymph nodes include pooled cervical, axillary, brachial and inguinal lymph nodes on the site of injection. Values are based on the specific activity of rHuPH20 and study-specific average weight of the mouse.

2.6.5.6　薬物動態試験：たん白結合

エフガルチギモド及び rHuPH20 はタンパク製剤であり、独立した蛋白結合試験を実施していない。

2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

エフガルチギモドについては、ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.5.7 で提出しており、新たな試験は実施していない。

rHuPH20 については、妊娠マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験の一環として、TK を評価した（2.6.6.6.2）。

2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験

エフガルチギモド及び rHuPH20 は、いずれもその他の分布試験は実施していない。

2.6.5.9　薬物動態試験：代謝：In Vivo

エフガルチギモド及び rHuPH20 は、いずれもバイオテクノロジー応用医薬品に該当するため、独立した in vivo 代謝試験を実施していない。

2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：In Vitro

エフガルチギモド及び rHuPH20 は、いずれもバイオテクノロジー応用医薬品に該当するため、独立した in vitro 代謝試験を実施していない。

2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路

エフガルチギモド及び rHuPH20 は、いずれもバイオテクノロジー応用医薬品に該当する。バイオテクノロジー応用医薬品の主な代謝経路は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解であることが知られている。

2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

エフガルチギモド及び rHuPH20 は、いずれもバイオテクノロジー応用医薬品に該当するため、独立した薬物代謝酵素の誘導／阻害試験を実施していない。

2.6.5.13　薬物動態試験：排泄

エフガルチギモドについては、ウィフガート点滴静注 400mg 申請資料 CTD 2.6.4.6 で提出しており、新たな試験は実施していない。

Pilot Study: Excretion Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse	
Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-rHuPH20**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-1 **Report Number:** 12214-B
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 1/group, F: 1/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	
Method of Administration: Intradermal	
Dose: Single dose of 1.33 µg/animal (6 µCi/animal; enzyme activity of 8000 U/mL)	
Radionuclide: [^{125}I]	
Specific Activity: 8.31×10^6 dpm/µg	
Assay: Liquid scintillation counting	
Sampling Time: 6, 12, 24, 36 and 48 h post-dose	

	Total Recoveries of Radioactivity Through 48 h Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)	
Excretion Route	**Male**	**Female**
Urine	64.4	21.5
Cage wash	16.4	50.0
Feces	16.1	12.8
Total (urine + cage wash + feces)	96.8	84.2
Additional information: Determination of PK and tissue distribution		

Pilot Study: Excretion Following Single Intravenous Administration of ^{125}I -Hyaluronidase in the Mouse	
Report Title: **Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-2 **Report Number:** 13128
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 1/group, F: 1/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	
Method of Administration: Intravenous	
Dose: Single dose of 4 µg/animal (11.5 µCi/animal; enzyme activity of 2000 U/mL)	
Radionuclide: [^{125}I]	
Specific Activity: 6.43 × 10^6 dpm/µg or 2.89 µCi/µg for ^{125}I-rHuPH20	
Assay: Liquid scintillation counting and QWBA	
Sampling Time: 6, 12, 24, 36 and 48 h post-dose	

	Total Recoveries of Radioactivity Through 48 h Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)	
Excretion Route	**Male**	**Female**
Urine	64.4	38.0
Cage wash	16.4	31.7
Feces	17.4	15.4
Tissues + carcass	2.1	5.1
Total	100.2	90.0
Additional information: Determination of PK and tissue distribution		

Pilot Study: Excretion Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-Labelled Hyaluronidase in the Mouse	
Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-rHuPH20**	**Test Article: rHuPH20** **Location in CTD:** 4.2.2.3-3 **Report Number:** 13184
Species: CD-1 mouse	
Gender (M/F): Number of Animals: M: 1/group, F: 1/group	
Feeding Condition: ad libitum	
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4	
Method of Administration: Intradermal or subcutaneous	
Dose: Single dose intradermal or subcutaneous injection: 1.73 µg/animal	
Radionuclide: [^{125}I]	
Specific Activity: 5 µCi/µg	
Assay: Liquid scintillation counting	
Sampling Time: 2, 6, 12 and 24 h post-dose	

	Total Recoveries of Radioactivity Through 24 h Following a Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)	
Excretion Route	**Male**	**Female**
Urine	48.5	54.1[a]
Cage wash	48.3	39.4
Feces	5.0	5.5
Tissues + carcass	6.0	7.6
Total	107.8	106.6
Additional information: Determination of PK and tissue distribution		

[a] Urine paper added.

	Total Recoveries of Radioactivity Through 24 h Following a Single Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)	
Excretion Route	**Male**	**Female**
Urine	99.8	90.5[a]
Cage wash	17.7	11.3
Feces	6.7	12.3
Tissues + Carcass	6.9	11.1
Total	131.1	125.1
Additional information: Determination of PK and tissue distribution		

[a] Urine paper added.

2.6.5.14　薬物動態試験：排泄：胆汁中

エフガルチギモド及び rHuPH20 について、いずれも胆汁中排泄試験は実施していない。エフガルチギモド及び rHuPH20 は、いずれもバイオテクノロジー応用医薬品に該当する。バイオテクノロジー応用医薬品の主な代謝経路は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解であることが知られており、一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ないとされている。

2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用

エフガルチギモド及び rHuPH20 について、いずれも薬物相互作用試験を実施していない。

2.6.5.16 薬物動態試験：その他

					Test article: efgartigimod
Translational PK/PD FcRn Binding Model					
Location in CTD:	4.2.2.7-1				
Study no.	20_021.TPKPD.F				
Prediction of the average unbound efgartigimod concentration within a dosing interval and corresponding average predicted effects after 12 weeks of different weekly efgartigimod doses in a typical monkey and healthy volunteer.					
Species	**IV dose, q7d [a] (mg/kg)**	**Efgartigimod (mg/L)**	**pH7.4 RO (%)**	**Drug Effect (%)**	**IgG relative to baseline (%)**
Monkey	0.1	0.147	8.1	0	100
Monkey	0.3	0.444	20.4	0	100
Monkey	1	1.52	43.1	0.6	98.3
Monkey	3	4.59	64.4	8.5	79.2
Monkey	10	15.4	81.4	31.5	50.8
Monkey	30	46.1	91.4	57.5	36.1
Monkey	100	154	97	81.1	28.4
Monkey [b]	300 [b]	461 [b]	99 [b]	92.7 [b]	25.8 [b]
Human	0.1	0.325	24.4	0	100
Human	0.3	0.976	47.5	0.7	97.9
Human	1	3.25	73.1	12.5	72.3
Human	3	9.74	88.3	42.4	43.1
Human	10	32.5	96.1	74.9	30
Human	30	97.4	98.6	90.5	26.2
Human [b]	100 [b]	325 [b]	99.6 [b]	97 [b]	24.9 [b]
Human [b]	300 [b]	974 [b]	99.9 [b]	99 [b]	24.5 [b]

Source: 20_021_TPKPD.F, Table 8.2:9.
FcRn= neonatal Fc receptor; Ig=immunoglobulin; IV=intravenous; q7d=once weekly; RO=receptor occupancy; PD=pharmacodynamic; PK=pharmacokinetics.
a) A broad dose range was simulated to illustrate the model behavior.
b) Results for simulated doses that are higher than the available data range should be interpreted with caution given extrapolation uncertainties.

rHuPH20 について、その他の薬物動態試験は実施していない。