目次

2.6.6　毒性試験の概要文 5
2.6.6.1　まとめ 5
2.6.6.1.1　エフガルチギモド 5
2.6.6.1.2　rHuPH20 7
2.6.6.2　単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.1　エフガルチギモド 10
2.6.6.2.2　rHuPH20 11
2.6.6.2.2.1　サルを用いた単回静脈内又は皮下投与試験 11
2.6.6.3　反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.1　エフガルチギモド 11
2.6.6.3.1.1　サルを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.2　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.3　エフガルチギモドの 11 週間反復静脈内投与による T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験 17
2.6.6.3.2　rHuPH20 21
2.6.6.3.2.1　サルを用いた 7 日間反復静脈内又は皮下投与毒性試験 21
2.6.6.3.2.2　サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験 21
2.6.6.4　遺伝毒性試験 22
2.6.6.4.1　エフガルチギモド 22
2.6.6.4.2　rHuPH20 23
2.6.6.5　がん原性試験 23
2.6.6.5.1　エフガルチギモド 23
2.6.6.5.2　rHuPH20 23
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 23
2.6.6.6.1　エフガルチギモド 23
2.6.6.6.2　rHuPH20 23
2.6.6.6.2.1　受胎能及び初期胚発生に関する試験 23
2.6.6.6.2.2　胚・胎児発生に関する試験 24
2.6.6.6.2.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 25
2.6.6.6.2.4　幼若動物を用いた試験 26
2.6.6.7　局所刺激性試験 31
2.6.6.7.1　エフガルチギモド 31
2.6.6.7.1.1　ウサギを用いたエフガルチギモドの局所刺激試験 31
2.6.6.7.2　rHuPH20 32
2.6.6.8　その他の毒性試験 33
2.6.6.8.1　エフガルチギモド 33
2.6.6.8.1.1　不純物の毒性評価 33
2.6.6.8.2　rHuPH20 37
2.6.6.8.2.1　生殖発生毒性試験における抗 rHuPH20 抗体の検討 37
2.6.6.8.2.2　組織交差反応性試験 46
2.6.6.8.2.3　遺伝子発現解析試験 48

2.6.6.9　考察及び結論 53
2.6.6.9.1　エフガルチギモド 53
2.6.6.9.2　rHuPH20 55
2.6.6.9.3　全体の結論 57
2.6.6.10　参考文献 58

表目次

表 2.6.6-1　エフガルチギモドと rHuPH20 の配合剤の非臨床毒性試験一覧 6
表 2.6.6-2　rHuPH20 の主要な非臨床毒性試験一覧 8
表 2.6.6-3　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験の試験デザイン 12
表 2.6.6-4　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験の主な所見 12
表 2.6.6-5　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験における初回投与後（Days 1～7）及び最終投与後（Days 85～91）のエフガルチギモド（単独又は rHuPH20 混合）の TK パラメータ（平均値 ± SD） 16
表 2.6.6-6　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験における抗エフガルチギモド抗体陽性例数 17
表 2.6.6-7　カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与 TDAR 試験の試験デザイン 18
表 2.6.6-8　カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与 TDAR 試験の主な所見 19
表 2.6.6-9　カニクイザルにエフガルチギモドを週 1 回 3 週間静脈内投与したときの TK パラメータ（平均値 ± SD）(TDAR 試験) 20
表 2.6.6-10　PND 7、28 及び 42 の幼若マウスに rHuPH20 を連日又は週 1 回皮下投与したときの平均血漿中ヒアルロニダーゼ活性値 28
表 2.6.6-11　ウサギを用いたエフガルチギモドの局所刺激試験の試験デザイン 32
表 2.6.6-12　不純物評価の対象とした 12 週間反復皮下投与毒性試験 34
表 2.6.6-13　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験における不純物の濃度とヒトにおける推定最大摂取量の比較 36
表 2.6.6-14　抗 rHuPH20 抗体評価のための試験デザイン 38
表 2.6.6-15　rHuPH20 の投与スケジュール 38
表 2.6.6-16　免疫感作条件 1 のデザイン 39
表 2.6.6-17　免疫感作条件 2 のデザイン 39
表 2.6.6-18　免疫感作条件 3 のデザイン 40

図目次

図 2.6.6-1　雄ウサギの授胎能及び生殖能に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響評価に関する試験の概要 41
図 2.6.6-2　受胎能、EFD 及び出生後の発達に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響評価に関する試験の概要 43
図 2.6.6-3　F0 母動物の抗 rHuPH20 抗体価（中央値 ± 範囲） 45
図 2.6.6-4　F1 児の抗 rHuPH20 抗体価（中央値 ± 範囲） 46

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）
A_{280}	Absorbance at 280 nm	波長 280 nm における吸光度
DPF	Dose proportion factor	–
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
DG	Day of gestation	妊娠日数
DL	Day of lactation	授乳日数
DS	Drug substance	原薬
ECLIA	Electro-chemiluminescence 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
F	Female	雌
Fc	Fragment, crystallized	–
FcRn	Neonatal Fc receptor	胎児性 Fc 受容体
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HA	Hyaluronic acid/hyaluronan	ヒアルロン酸
HCP	Host cell protein	宿主細胞由来タンパク質
HED	Human equivalent dose	ヒト等価用量
HYAL1, 2, 3, 4, 5	Hyaluronidase 1, 2, 3, 4, 5	ヒアルロニダーゼ 1、2、3、4、5
IFNɣ	Interferon gamma	インターフェロン ガンマ
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgGAM	Immunoglobulins G, A, and M	免疫グロブリン G、A 及び M
IHC	Immunohistochemical	免疫組織化学
IM	Intramuscular	筋肉内
IV	Intravenous	静脈内
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
M	Male	雄
NA	Not applicable	該当せず
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PD	Pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態、薬物動態学
PND	Postnatal day	生後日数
PPND	Pre/postnatal development	出生前及び出生後の発生並びに母体

略語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
		の機能
q7d	Once weekly	週 1 回
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	定量ポリメラーゼ連鎖反応
R	Accumulation factor	蓄積係数
rHuPH20	Recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
rMuHyal5	Recombinant murine hyaluronidase 5	遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ 5
rMuPH20	Recombinant murine hyaluronidase PH20	遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ PH20
RNA-Seq	Deep RNA sequencing	深部 RNA 配列決定
Rb anti-rHuPH20 pAbs	Rabbit anti-rHuPH20 polyclonal antibodies	ウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体
rRbPH20	Recombinant rabbit hyaluronidase PH20	遺伝子組換えウサギヒアルロニダーゼ PH20
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SC	Subcutaneous	皮下
SD	Standard deviation	標準偏差
SPAM1	Sperm adhesion molecule 1	精子接着分子 1
TDAR	T-cell dependent antibody response	T 細胞依存性抗体産生
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{last}	Time of last quantifiable concentration	最終測定可能時間

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

2.6.6.1.1　エフガルチギモド

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、胎児性Fc受容体（FcRn）の天然リガンドであるヒト免疫グロブリン（Ig）G1 抗体 Fc フラグメントであり、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FcRnに結合して、内因性IgG-FcRn結合を競合的に阻害することによって、IgGのリサイクルを妨げIgGの分解を促進させる。エフガルチギモドは、FcRnのアルブミン結合部位とは異なる部位で FcRn に結合するため、アルブミンの恒常性には影響しないと考えられる。さらに、FcRn は IgG リサイクルを特異的に阻害するため、エフガルチギモドによるFcRnの遮断は、他の免疫グロブリンには影響しないと考えられる。

エフガルチギモドの静脈内投与用製剤は日本において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）を適応として、ウィフガート点滴静注400mg（以下、エフガルチギモド点滴静注製剤）という販売名で承認されている。

エフガルチギモド皮下注製剤はエフガルチギモドにボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）（以下、rHuPH20）を新有効成分として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。rHuPH20は、投与部位で拡散を誘導する濃度では吸収されないため、全身に対する作用に寄与しないと考えられている（Kang, 2021）。

エフガルチギモドの静脈内投与での毒性プロファイルについては、エフガルチギモド点滴静注製剤の初回製造販売承認申請時に提出済みである。これまでに提出された非臨床試験成績が本申請の裏付けとして同等に適用可能であると考えられることから、既承認であるエフガルチギモド点滴静注製剤の製造販売承認申請時に提出したモジュール4も参考にする。

エフガルチギモドの全身・局所毒性、標的臓器、可逆性及び TK プロファイルの評価は、静脈内及び皮下投与の経路で評価した。また、エフガルチギモドを静脈内投与した試験では、エフガルチギモドを単独又は rHuPH20 と混合して皮下投与した場合よりも全身曝露量が高かったことから、エフガルチギモドを皮下投与した場合の潜在的な全身毒性を評価することは可能であると考えている。したがって、エフガルチギモドの 26 週間静脈内反復投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）の曝露量を用いて、ヒトの曝露量と比較し安全域を算出した（2.6.4.3.1.3）。非臨床試験では、皮下投与用のエフガルチギモド（エフガルチギモド SC）を使用し、これを使用前に rHuPH20 と混合したところ、臨床で使用されている皮下投与製剤（2.6.6.8.1.1）と非常に類似した組成が得られた。

本申請に際して実施したエフガルチギモドに関する3つの非臨床安全性試験は以下のとおりである。

- rHuPH20 を混合した場合と混合しない場合のカニクイザルを用いたエフガルチギモドの 12 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.2、[redacted]36930）
- カニクイザルを用いたエフガルチギモドの 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験（2.6.6.3.1.3、[redacted] 8459761）
- エフガルチギモド及び rHuPH20 との混合投与による皮下及び筋肉内投与後のウサギにおける局所刺激試験（2.6.6.7.1.1、[redacted]37107）

試験はすべて、GLP に遵守して、OECD 加盟国内の GLP 認定試験施設で実施した（2.6.7.1）。毒性試験に使用した原薬ロットは、臨床試験で使用したエフガルチギモドロットを代表すると考えられた（2.6.6.8.1.1）。

カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]36930）及びカニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験（[redacted] 8459761）では、PD 効果を測定することによりエフガルチギモドの曝露量をモニタリングした。（2.6.6.3）。

抗エフガルチギモド抗体を 12 週間反復皮下投与毒性試験（[redacted]36930）でモニターした。また、TDAR 試験（[redacted] 8459761）では、試験の解釈に影響を及ぼすような免疫原性を示唆する徴候が認められなかったことから、抗エフガルチギモド抗体の評価は実施しなかった。

非臨床安全性試験の概要を 2.6.7.1 に、関連する TK データの概要を 2.6.7.3 に示す。また、本申請の毒性試験の一覧を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1　エフガルチギモドと rHuPH20 の配合剤の非臨床毒性試験一覧

Type of study/duration	Species/ strain	Method of administration	Dose (mg/kg)	GLP	Location Study number
Single-dose toxicity					
This section was not updated					
Repeat-dose toxicity					
12 weeks + 12 weeks post-treatment observation	Monkey/ cynomolgus	SC	0 (vehicle with 0.01 mg/kg rHuPH20), 30 and 100 with 0.01 mg/kg rHuPH20 q7d 100 q7d	Yes	Module 4.2.3.2-1, [redacted]36930 Clarification of archiving: Amendment to final reports Module 4.2.3.7.7-1, ARGX-PTBA-0223
Evaluation of TDAR response 11 weeks + 9 week recovery	Monkey/ cynomolgus	IV	0 (vehicle), 100 q7d	Yes	Module 4.2.3.2-2, [redacted] 8459761
Genotoxicity					
Not performed	NA	NA	NA	NA	NA
Carcinogenicity					
Not performed	NA	NA	NA	NA	NA

Type of study/duration	Species/ strain	Method of administration	Dose (mg/kg)	GLP	Location Study number
Reproductive and Developmental Toxicity					
This section was not updated					
Local tolerance					
Local tolerance of efgartigimod with rHuPH20 with 48, 96 hours and 14 days post treatment observation	Rabbit/ New Zealand White	SC and IM	1 mL/animal 0 (vehicle with rHuPH20 (2000 U/mL) SC 1 mL/animal (180 mg) SC with 2000 U/mL rHuPH20 0,25 mL/animal 0 (vehicle with rHuPH20 (2000 U/mL) IM 0.25 mL/animal (45 mg) IM with 2000 U/mL rHuPH20	Yes	Module 4.2.3.6-1 [redacted]37107 Clarification of archiving: Amendment to final reports Module 4.2.3.7.7-1, ARGX-PTBA-0223

ARGX-113=efgartigimod; GLP=Good Laboratory Practice; IM=intramuscular; IV=intravenous; NA=not applicable; NOAEL=no observed adverse effect level; q7d=once weekly; rHuPH20= recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous; TDAR=T-cell dependent antibody response.
Note: For repeat-dose toxicity, the highest NOAEL is underlined.
Studies [redacted]36930 and [redacted]37107 were conducted at [redacted], formerly known as [redacted], Germany. This test facility has ceased study conduct operations and study related archive has been transferred (amendment to report ARGX-PTBA-0223).
Study [redacted]8459761 was conducted at [redacted], United Kingdom.
All studies, study phases and archiving was and is conducted in GLP certified test facilities in OECD member states.

カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.2、[redacted]36930、最高用量：100 mg/kg、投与頻度：週 1 回、エフガルチギモド SC 単独又は rHuPH20 と混合（エフガルチギモド SC＋rHuPH20）及び静脈内投与用エフガルチギモド（エフガルチギモド IV）を用いた 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験（2.6.6.3.1.3、[redacted] 8459761、最高用量：100 mg/kg、投与頻度：週 1 回）の無毒性量（NOAEL）はいずれも最高用量であった。ウサギを用いた局所刺激性試験（2.6.6.7.1.1、[redacted]37107）は rHuPH20 と混合したエフガルチギモド SC を皮下投与又は筋肉内投与によって評価したが、いずれの投与経路でも局所刺激性の徴候は認められなかった。

本申請に際し、新たに実施した毒性試験成績では安全性に関する懸念はみられず、エフガルチギモド及び rHuPH20 皮下併用剤の臨床使用に際して、問題となる影響は認められなかった。

2.6.6.1.2　rHuPH20

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

皮下投与による rHuPH20 の安全性を担保するために、マウス及びサルを用いて非臨床毒性試験を実施した。rHuPH20 の重要な試験として、週 1 回の皮下投与によるサルの 39 週間反復投与毒性試験、皮下連日投与によるマウスの胚・胎児発生に関する試験（EFD 試験）並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（PPND 試験）、連日投与又は週 1 回皮下投与による幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験（8 ヵ月間反復投与）を実施した。これらの試験は、ICH ガイドラインに準拠し、GLP に従って実施した。加えて、サルを用いた連日静脈内又は皮下投与による 7 日間反復投与毒性試験及びマウスを用いた用量設定試験（連日皮下投与による EFD 試験及び連日又は週 1 回皮下投与による幼若動物を用いた毒性試験）を実施した。さらに、抗 rHuPH20 抗体の内在性 PH20 に対する交差反応性を、生殖発生毒性試験、組織交差反応性試験及び遺伝子発現試験の中で評価した。

いずれの動物種においてもヒアルロン酸（HA）が発現しており、構造に差はないことから（Hascall, 2017）、マウスとカニクイザルは rHuPH20 の評価に対して薬理学的に適切な動物種と考えられた。rHuPH20 は可溶型のヒト PH20 であり、ヒト PH20 と同一の配列を有するが、完全長ヒト PH20 に存在する C 末端グリコシル - ホスファチジル - イノシトールアンカーが欠損している。ヒト PH20 は、カニクイザル、ウサギ、マウス PH20 とそれぞれ 89%、71%、58%の配列同一性を有している（NCBI の Basic Local Alignment Search Tool による）。カニクイザルは、ヒトの配列と同一性が高いことから、他の動物種と比較して免疫原性が低いことが期待されたため、反復投与毒性試験の供試動物種として選択した。マウスは EFD 試験及び PPND 試験に使用し、薬理試験にも使用された。ウサギは、母体 IgG の胎盤移行時期がヒトと類似していることから（DeSesso, 2012）、受胎能、EFD 及び出生児の成長・成熟に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響を評価するために計画された試験で使用した。これらのウサギの試験では、rHuPH20 は抗 rHuPH20 抗体産生の有無を評価する目的のみで投与していたため、rHuPH20 の曝露量は評価しなかった。rHuPH20 の毒性試験の概要を表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2　rHuPH20 の主要な非臨床毒性試験一覧

Study Type and Duration	Route of Administration	Species/Strain	GLP	Study Number Location
Single-dose toxicity [a]				
Not performed	NA	NA	NA	NA
Repeat-Dose Toxicity				
7-day repeat-dose toxicity & toxicokinetics	IV and SC once daily	Monkey/ Cynomolgus	Yes	R08056 4.2.3.2-3
39-week repeat-dose toxicity & toxicokinetics Pivotal	SC once weekly	Monkey/ Cynomolgus	Yes	R09050 4.2.3.2-4
Genotoxicity				
Not performed	NA	NA	NA	NA
Carcinogenicity				
Not performed	NA	NA	NA	NA
Reproductive and Developmental Toxicity				
Fertility and early embryonic development [b]				
Not performed	NA	NA	NA	NA
Embryo-fetal development (EFD)				
EFD, Dose range-finding	SC, once daily DG 6-15	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	No	R07046 4.2.3.5.2-1
EFD, Pivotal	SC, once daily DG 6-15	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Yes	R08176 4.2.3.5.2-2

Study Type and Duration	Route of Administration	Species/Strain	GLP	Study Number Location
Pre- and postnatal development (PPND)				
PPND, Pivotal	SC, once daily DG 6-22 or DL 20	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Yes	R09058 4.2.3.5.3-1
Juvenile animal				
6-week repeat-dose toxicity & toxicokinetics Dose range-finding	SC, once daily or weekly, PND 7-42	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	No	13123 4.2.3.5.4-1
Juvenile life-time toxicity Pivotal	SC, PND 7-30, once daily, then weekly until PND 129 or PND 241	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Yes	15028 4.2.3.5.4-2
Local tolerance [c]				
Not performed	NA	NA	NA	NA

DG= day of presumed gestation; FEED= fertility and early embryonic development; GLP= Good Laboratory Practice; IV= intravenous; DL= day of lactation; PND= postnatal; PPND= Pre- and postnatal developmental, rHuPH20= recombinant humat1 hyaluronidase PH20; SC= subcutaneous.

a Dedicated studies dose not be conducted. Single dose toxicity was assessed based on results of a PK study [R07060 (4.2.2.2-3)] and a 7-day repeated-dose study [R08056 (4.2.3.2-3)].

b Dedicated FEED studies were not performed. The effect of rHuPH20 on fertility was evaluated based on the results of a 39-week subcutaneous repeated dose study in cynomolgus monkeys. Specialized fertility endpoints were included: menstrual monitoring in females and testicular volume, semen analysis (sperm concentration, motility and morphology), testosterone and luteinizing hormone levels in males.

c Local tolerance was assessed as part of the repeat-dose toxicity and developmental and reproductive toxicity studies.

カニクイザルを用いた 7 日間連日反復投与試験（静脈内及び皮下投与）及び 4 週間の休薬期間を設けた 39 週間週 1 回反復投与試験（皮下投与）で rHuPH20 の反復投与毒性を評価した。これらの試験では全身毒性及び投与部位の局所刺激性に関して、rHuPH20 は最高用量まで良好な忍容性を示した。39 週間反復投与試験では、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性と関連した rHuPH20 曝露量の減少が認められた。投与部位の皮下では血管周囲に可逆的で軽微な有害ではないリンパ形質細胞浸潤が認められた以外に、いずれの評価パラメータにおいても rHuPH20 投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。7 日間及び 39 週間の反復投与毒性試験のいずれにおいても、rHuPH20 の投与によると考えられる有害作用は認められなかった。

rHuPH20 では、独立した局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性は、サルを用いた反復投与毒性試験、マウスを用いた生殖発生毒性試験又は抗 rHuPH20 抗体が雌雄ウサギの生殖発生に及ぼす影響を検討するために実施した試験の中で評価した。一部の試験で投与部位に軽微な変化が認められたが、有害作用ではないと考えられた。全体として、供試動物への rHuPH20 の静脈内及び皮下投与は忍容性が良好であり、いずれの毒性試験においても局所刺激性を示唆する変化は認められなかった。

rHuPH20 の生殖発生毒性試験として、CD-1 マウスを用いた EFD 試験のための用量設定試験、EFD 試験及び PPND 試験を実施した。妊娠マウスに妊娠 6 日（DG 6）から DG 15 まで 1 日 1 回皮下投与した EFD 試験では rHuPH20 は 9 mg/kg/dose 以上の用量で胚・胎児毒性を示し、吸収胚の増加、同腹児数の減少、胎児重量の減少が認められた。その他に EFD に対する影響は認められなかった。妊娠マウスに DG 6 から DG 22 又は授乳 20 日（DL 20）まで 1 日 1 回皮下投与した PPND 試験では、9 mg/kg/dose（最高用量）まで母動物の生殖能並びに F1 出生児の生存率、性成熟、学習・記憶能及び生殖能に有害な影響は認められなかった。

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

幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験では、rHuPH20 を 1 mg/kg/dose の用量で PND 7 から PND 30 まで 1 日 1 回皮下投与した。その後は PND 129（幼若動物評価サブセット）又は PND 241（慢性毒性評価サブセット）まで週 1 回投与した。慢性毒性評価サブセットの雌雄マウスの投与部位で認められた軽微～中等度の有害ではない病理組織学的所見（主として、皮下組織の混合細胞性炎症を伴うこともある皮下組織内の混合細胞浸潤）を除き、rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。rHuPH20 を投与したすべてのマウスで抗 rHuPH20 抗体の産生がみられ、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性及び遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）に対する交差反応性が高頻度に認められた。1 mg/kg/dose の rHuPH20 又は抗 rHuPH20 抗体による神経行動学的評価、生殖能、胎児評価又はその他の毒性評価エンドポイントおいて有害作用は認められなかった。

内在性 PH20 は、受精時の卵母細胞への精子侵入を容易にするために、精子表面に豊富に局在する（Lin, 1994）。したがって、抗 rHuPH20 抗体は内在性 PH20 と反応する可能性があることから、内在性 PH20 に対する抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響の有無について検討する目的で、一連の補足的な生殖発生毒性試験を実施した。CD-1 マウスを用いた PPND 試験（GLP 不適合）では、妊娠中及び授乳中の母動物並びに F1 児（胎児及び出生児）の血中抗 rHuPH20 抗体を測定した。本試験では、母動物の妊娠後期から F1 児が成熟動物に至る発達・成長過程を通じて、F1 児で抗 rHuPH20 抗体の曝露が確認された。雌雄の受胎能（EFD 及び出生後の評価を含む）に対する抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響を評価するために、ニュージーランド白色（NZW）ウサギを用いた 2 つの試験を実施した。これらの試験では、雌雄の受胎能、EFD 並びに出生児の発達及び生殖能に対する抗 rHuPH20 抗体の影響は認められなかった。

抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響をさらに検討するために、組織交差反応性試験を実施し、抗 rHuPH20 抗体がヒト組織に結合する可能性を評価した。さらに、マウス、ウサギ、ヒト組織における精子接着分子 1（SPAM1）/PH20 の遺伝子発現を、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）及び深部 RNA 配列決定（RNA-Seq）法を用いた一連の試験で評価し、PH20 の局在を確認した。これらの試験では、様々な発達段階のマウス、ウサギ及びヒトの組織の評価から、SPAM1/PH20 は主として成熟雄の生殖器官に発現していることが確認された。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 エフガルチギモド

新たな試験は実施していない。

2.6.6.2.2　rHuPH20

2.6.6.2.2.1　サルを用いた単回静脈内又は皮下投与試験

rHuPH20 の単回投与毒性試験は実施しなかったが、雌カニクイザルを用いた PK 試験（R07060）では、rHuPH20 を最高 30 mg/kg（3300000 U/kg）の用量で単回静脈内又は皮下投与したときの忍容性は良好であった。また、カニクイザルを用いた 7 日間反復投与毒性試験（R08056）では、rHuPH20 を 5 mg/kg（550000 U/kg）の用量で 1 日 1 回静脈内又は皮下投与しても、全身及び投与部位に rHuPH20 投与によると考えられる影響は認められなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

2.6.6.3.1　エフガルチギモド

2.6.6.3.1.1　サルを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験

エフガルチギモドの静脈内投与用製剤の申請時に提出したエフガルチギモドの 26 週間静脈内反復投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）の曝露量を用いて、ヒトの曝露量と比較した曝露量比を算出した（2.6.4.3.1.3）。

2.6.6.3.1.2　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-1（[redacted]36930）

エフガルチギモド SC の反復投与毒性試験（GLP 遵守）は、エフガルチギモド SC を単独又は rHuPH20 と混合して、週 1 回の頻度で皮下投与した。カニクイザルの雌雄各 20 例に、被験物質又は溶媒を 12 週間投与した。一部の動物について 12 週間の回復期間を設け、回復性を評価した（表 2.6.6-3）。各動物に、2000 U/mL の rHuPH20 と混合したエフガルチギモド SC の 30 又は 100 mg/kg、若しくは rHuPH20 を含まないエフガルチギモド SC の 100 mg/kg（溶媒：2000 U/mL の rHuPH20 を含む調製用緩衝液）の用量で、合計 13 回皮下投与した。なお、rHuPH20 の投与量は 0.01 mg/kg であった。週 1 回の投与頻度は臨床治療レジメンに合わせた。

溶媒対照群の投与液及び被験物質の調製に用いた緩衝液（pH6.0）の組成は、ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩一水和物（20 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）及びポリソルベート 20［0.03%（w/v）］であった。本製剤は、申請製剤（pH6.0）［L-ヒスチジン/L-ヒスチジン塩酸塩（20 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、ポリソルベート 20（0.04% w/v）］+ rHuPH20（2000 U/mL）と同様であった。

表 2.6.6-3　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験の試験デザイン

Group	Efgartigimod SC dose (mg/kg) q7d	Number of doses	Number and sex of animals			
			Main study		Recovery period	
			M	F	M	F
1	0 [a]	13	5	5	2	2
2	30 [a]	13	5	5	2	2
3	100 [a]	13	5	5	2	2
4	100	13	5	5	2	2
			Necropsy: Day 86		Necropsy: Day 169	

Source: [redacted]36930
ADA=anti-drug antibody; F=female; M=male; No.=number; q7d=once every 7 days (once weekly); rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous
Notes: Of the 5 animals indicated for the Main study, 3 animals were necropsied and 2 went into the recovery period. A total of 5M and 5F animals were allocated per dose group.
Blood samples for TK were taken on Days 1-7 prior to dosing and at 8, 24, 48, 72, 144 h after dosing, on Days 8/9, 15/16, 22/23, 29/30, 36/37, 43/44, 50/51, 57/58, 64/65, 71/72, 78/79, and 85/86 before and 24 h after each dose (all animals), and finally on Days 85-91 (recovery animals only) at 8, 48, 72, and 144 h after the last test-item administration. Blood for determination of ADA in serum was collected prior to each SC injection. Pharmacodynamics (total IgG) was not determined.
Histopathology was conducted for 3M/3F for the main study phase and 2M/2F for the recovery period .
The highest test concentration was 180 mg efgartigimod per mL. The administration volume was 0.56 mL/kg b.w./administration.
a Comixed with 0.01 mg/kg rHuPH20.

この試験では各投与の 2~4 時間後の投与部位の肉眼的観察（Draize スコアリング）、一般状態観察、生死、体重、摂餌量、摂水量、剖検時の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。

エフガルチギモドの TK パラメータ及び確認された抗エフガルチギモド抗体産生を含む主要な試験結果を 2.6.7.7.A に要約した。以下に特記すべき所見を要約した（表 2.6.6-4）。

表 2.6.6-4　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験の主な所見

Species/ sex	Dose (mg/kg)	Mortality	Noteworthy findings
Cynomolgus monkey/ male and female	0 (EFG) + 0.01 mg/kg rHuPH20	0/10	No cases of morbidity **Main study:** **Injection site[a]:** swelling (0/10), oedema (0/10), erythema (0/10) **Pathology[b]:** IS haemorrhagic (SC) and or thickened (4/6); spleen enlarged (0/6); Ln enlarged: 1-2 (0/6), 3-5 (0/6) **Histopathology[c]: IS**: SC hemorrhage mim-mo (3/6); SC infiltrations: lymphocytic mim (0/6) neutrophilic mim (0/6), eosinophilic mim (0/6), dermis infiltrations: lymphocytic mim (0/6); SC eosinophilic, proteinaceous, acellular material mim-mo (0/6); **Spleen**: hyperplasia lymphoid, mim (4/6), moma (1/6), **Ln**: Histiocytosis mim-mo (12/12) , hyperplasia mim (11/12) mo (0/12), infiltrations neutrophilic mim (1/12), eosinophilic mim (4/12). **Recovery:** Local changes had completely recovered by the end of the recovery period. No pathology findings. Histopathology of IS was completely recovered. Reported changes in histopathology in spleen and Ln remained similar.

Species/ sex	Dose (mg/kg)	Mortality	Noteworthy findings
	30 (EFG) + 0.01 mg/kg rHuPH20	0/10	No cases of morbidity **Main study:** **Injection site:** swelling (0/10), oedema (0/10), erythema (0/10) **Pathology:** IS haemorrhagic (SC) and or thickened (3/6); spleen enlarged (2/6); Ln enlarged: 1-2 (1/6), 3-5 (1/6) **Histopathology: IS**: SC hemorrhage mim-mo (2/6); SC infiltrations: lymphocytic mim (4/6) neutrophilic mim (0/6), eosinophilic mim (0/6), dermis infiltrations: lymphocytic mim (3/6); SC eosinophilic, proteinaceous, acellular material mim-mo (0/6); **Spleen:** hyperplasia lymphoid, mim (3/6), moma (1/6); **Ln:** Histiocytosis mim (12/12), hyperplasia mim (10/12) mo (2/12), infiltrations neutrophilic mim (0/12), eosinophilic mim (3/12). **Recovery:** Local changes had completely recovered by the end of the recovery period. Pathology findings were limited (Ln enlarged: 1-2 (1/4)). Histopathology of IS was almost completely recovered (lymphocytic infiltration mim (1/4)). Reported changes in histopathology in spleen and Ln remained similar.
	100 (EFG) + 0.01 mg/kg rHuPH20	0/10	No cases of morbidity **Main study:** **Injection site:** swelling (2/10), oedema (0/10), erythema (0/10) **Pathology:** IS haemorrhagic (SC) and or thickened (4/6); spleen enlarged (1/6); Ln enlarged: 1-2 (0/6), 3-5 (1/6) **Histopathology: IS**: hemorrhage SC mim-mo (4/6); SC infiltrations: lymphocytic mim (5/6) neutrophilic mim (5/6), eosinophilic mim (0/6), dermis infiltrations: lymphocytic mim (5/6); SC eosinophilic, proteinaceous, acellular material mim-mod (6/6); **Spleen:** hyperplasia lymphoid, mim (6/6), moma (0/6); **Ln:** Histiocytosis mim (12/12), hyperplasia mim (10/12) mo (2/12), infiltrations neutrophilic mim (0/12), eosinophilic mim (5/12). **Recovery:** Local changes had completely recovered by the end of the recovery period. Pathology findings were limited (Ln enlarged: 1-2 (2/4)). Histopathology of IS was completely recovered. Reported changes in histopathology in spleen and Ln remained similar, in addition, spleen hyperplasia lymphoid, moma (1/4), hyperplasia red pulp mim (1/4) were reported.
	100 (EFG)	0/10	No cases of morbidity **Main study:** **Injection site:** swelling (4/10), oedema (8/10), erythema (0/10) **Pathology:** IS haemorrhagic (SC) and or thickened (5/6); spleen enlarged (0/6); Ln enlarged: 1-2 (1/6), 3-5 (0/6) **Histopathology: IS**: hemorrhage SC mim-mo (1/6); SC infiltrations: lymphocytic mim (6/6) neutrophilic mim (3/6), eosinophilic mim (2/6), dermis infiltrations: lymphocytic mim (6/6); SC eosinophilic, proteinaceous, acellular material mim-mo (4/6); **Spleen:** hyperplasia lymphoid, mim (5/6), moma (0/6); **Ln:** Histiocytosis mim-mo (10/12), hyperplasia mim (10/12) mo (0/12), infiltrations neutrophilic mim (0/12), eosinophilic mim (5/12). **Recovery:** Local changes had completely recovered by the end of the recovery period. No pathology findings. Histopathology of IS was almost completely recovered (SC infiltrations lymphocytic mim (1/4), dermis infiltration lymphohistiocytic mim (1/4)). Reported changes in histopathology in spleen and Ln remained similar.
NOAEL: 100 mg/kg SC q7d			

Species/ sex	Dose (mg/kg)	Mortality	Noteworthy findings
Target organ of toxicity: None			

Source: [redacted]36930
IS=injection site; EFG=efgartigimod; F=female; Ln=lymph node; M=male; mim=minimal-mild; mo=moderate; moma=moderate-marked; q7d=once weekly; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous
a Swelling was assigned as part of the clinical observations on off-treatment days ([redacted]36930, Table 1-2). Oedema, erythema, were part of local tolerance assessments according to Draize 2-4 hours after injection ([redacted]36930, Table 1-3).
b [redacted]36930, Table 5. Data for Ln were categorized for easier review into (i) number of affected Ln 1-2, (ii) number of affected Ln 3-5.
c [redacted]36930, Section 6.1 Histopathological report, microscopic findings by severity (pages 454 – 572). Note that only 3M and 3F animals were examined for histopathology. Presented data for Ln are derived from cervical Ln and mesenteric Ln, the only Ln where data for all dose groups are available for comparison. Data are presented as number of findings / total examined per dose group (3M/3F times 2 Ln per animal = 12 Ln examined per main study dose group, 2M/2F times 2 Ln per animal = 8 Ln examined per recovery dose group).

死亡例又は瀕死例は認められなかった。

エフガルチギモド SC と rHuPH20 の混合投与群では、脾臓及びリンパ節の腫大が散発的に認められたが、エフガルチギモドの用量との間に明らかな関連性は認められなかった。これらの所見は回復期間終了時にも限定的であったが散発的に認められた。

溶媒対照群（rHuPH20）又はエフガルチギモド SC 単独投与群では、投与部位の変化以外に病理組織学的所見は認められなかった。

溶媒対照群を含むすべての試験群で脾臓及びリンパ節で認められた用量依存性のない病理組織学的所見として、両組織のリンパ球過形成及びリンパ節の組織球の増加、好中球又は好酸球性細胞浸潤が軽微から軽度に認められた。回復期間終了時検査で認められた免疫系組織の病理組織学的変化は、ほとんどが軽微から軽度であり、投与期間終了時に認められた変化と概ね類似していた。

投与部位では、投与日に一過性の浮腫が認められたが、大部分は rHuPH20 を含まないエフガルチギモド SC 単独投与群であった。投与日以外の一般状態観察では投与部位の腫脹がみられることは稀であった。浮腫及び腫脹は、大部分が投与日及び投与翌日に認められ、持続期間は短かった（1 例が 3 日間の腫脹を認めた以外は、すべて 1 日間のみであった）。紅斑/発赤又は痂皮は認められなかった。複数の所見が発現した例でも、所見の重症度は増悪しなかった。剖検では、反復投与に関連すると考えられる影響として、対照群を含む全群で投与部位に出血又は肥厚が認められた。

投与部位の病理組織学的検査では、大部分が皮下、まれに真皮に、リンパ球、好中球及び好酸球の細胞浸潤が認められた。これらは軽微から軽度であり、用量の増加に伴って発現頻度が増加した。エフガルチギモド SC の 100 mg/kg と rHuPH20 混合投与群又はエフガルチギモド SC の 100 mg/kg 単独投与群の投与部位に、好酸性のタンパク様無細胞性物質が認められたが、これは投与後に沈着した被験物質の遺残物と解釈された。

回復期間終了時の投与部位では肉眼的及び病理組織学的所見は完全に回復していた。

したがって、カニクイザルに rHuPH20 単独（溶媒対照）、エフガルチギモド SC 単独、又は rHuPH20 と混合したエフガルチギモド SC を反復皮下投与したところ、投与部位における局所刺激性の徴候は認められなかったと結論された。

エフガルチギモドの全身曝露を評価した。TK の結果を 2.6.7.7.A に要約した。試験報告書中に記載した TK 評価に加えて、台形法（Linear up-log down）を用いて AUC を再推定した（[redacted]22046)。この方法は、曝露の最も正確な推定を提供すると考えられる。結果を表 2.6.6-5 に示す。

エフガルチギモドの血清中濃度は、バリデートされた ELISA 法を用いて測定した（2.6.4.2.1)。初回（Day 1）及び最終投与（Day 85）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すべての投与日で、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、TK パラメータを評価するためではなく曝露を確認するために実施されたので、得られた TK パラメータについては慎重に解釈する必要がある。動物数は Day 1～Day 7 は n=5、Day 85～Day 91 は n=2 であった。

以下の結論が得られた：

- Day 1～Day 85 の投与期間中に全投与群でエフガルチギモドの曝露が確認された。その後、血清中エフガルチギモド濃度は低下したが、t_{last}（Day 91 の最終採血時点）でも全投与群で測定可能であった。
- エフガルチギモドの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ は、用量に応じて増加した。
- 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。
- 経時的なエフガルチギモドの蓄積は認められなかった。

無毒性量における最終投与後（13 回目のエフガルチギモド皮下投与、Day 85）のエフガルチギモドの全身曝露量を以下に示す。

- エフガルチギモド SC を 2000 U/mL の rHuPH20（0.01 mg/kg）と混合した 100 mg/kg では、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ はそれぞれ、雄/雌で 585/402 µg/mL 及び 34030/22182 µg·h/mL であった。
- エフガルチギモド SC の 100 mg/kg では、雄／雌の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ はそれぞれ 377／378 µg/mL 及び 25143／19973 µg·h/mL であった。

表 2.6.6-5　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験における初回投与後（Days 1～7）及び最終投与後（Days 85～91）のエフガルチギモド（単独又は rHuPH20 混合）の TK パラメータ（平均値 ± SD）

Efgartigimod Dose (mg/kg) q7d	**30 [a]**	**100 [a]**	**100**	**30 [a]**	**100 [a]**	**100**
Gender and No. per Group	**3+2M**	**3+2M**	**3+2M**	**3+2F**	**3+2F**	**3+2F**
Days 1 to 7 (n=5/sex/group)						
C_{max} (µg/mL)	215±33.9	435±107	259±44.7	201±26.0	461±158	234±94.7
t_{max} (h)	8.0±0.0	11.2±7.2	38.4±13.1	8.0±0.0	11.2±7.2	43.2±10.7
$AUC_{0\text{-}tlast}$ (µg·h/mL)	8551±1761	22357±2995	19270±3396	8328±1061	21741±2898	17498±4825
$AUC_{0\text{-}tlast}$/dose (µg·h/mL)	285±58.7	224±30.0	193±34.0	278±35.4	217±29.0	175±48.3
DPF	NA	0.78	0.68 [b]	NA	0.78	0.63 [b]
Days 85 to 91 (n = 2/sex/group)						
C_{max} (µg/mL)	534	585	377	208	402	378
t_{max} (h)	24.0	16.0	8.0	16.0	8.0	16.0
$AUC_{0\text{-}tlast}$ (µg·h/mL)	12011	34030	25143	6488	22182	19973
$AUC_{0\text{-}tlast}$/dose (µg·h/mL)	400	340	251	216	222	200
DPF	NA	0.85	0.63 [b]	NA	1.03	0.92 [b]
R	1.40	1.52	1.30	0.78	1.02	1.14

Source: [redacted] 36930 for administration and sampling scheme and C_{max} and t_{max}; [redacted] 22046 for all other parameters
$AUC_{0\text{-}tlast}$= AUC from time 0 to the last quantifiable time-point; C_{max}=maximum observed concentration; DPF=dose proportion factor; F=female; M=male; n=number of animals, subjects or samples; NA=not applicable; q7d=once every 7 days (once weekly); R=accumulation factor; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SD=standard deviation, TK=toxicokinetics; t_{max}=time of C_{max}
Notes: Values reported are arithmetic mean±SD. No SD presented in case n equals 2.
a Comixed with 0.01 mg/kg rHuPH20.
b DPF calculated relative to 30 mg/kg efgartigimod SC comixed with rHuPH20.

抗エフガルチギモド抗体はバリデートされた測定法（2.6.4.2.2）を用いて測定した。30 例のサルから得られた 219 の試験サンプルについて測定した。抗エフガルチギモド抗体の発現例数を表 2.6.6-6 に要約し、2.6.7.7.A に詳細を示す。

表 2.6.6-6　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験における抗エフガルチギモド抗体陽性例数

Number of ADA positive animals /total number of animals in the group								
Dose (mg/kg q7d)	0		30 efgartigimod SC comixed with rHuPH20		100 efgartigimod SC comixed with rHuPH20		100 efgartigimod SC	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Treatment period (5 animals/sex/group)								
Day 1 to Day 85	NA	NA	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	4/5

Source: [redacted]36930 page 71-73 and page 926 and following.
ADA=anti-drug antibody; SC=subcutaneous; F=female; M=male; q7d=once weekly; NA: not analyzed.
Note: No ADA samples were taken during the recovery period. Dose of rHuPH20 was 0.01 mg/kg.

抗エフガルチギモド抗体は、概ね Day 29 の時点で認められた。動物番号 13、23、及び 31 の 3 例では全投与日のサンプルを測定したところ、Day 15 の時点で抗エフガルチギモド抗体が検出された。1 例（動物番号 34）は Day 57 でエフガルチギモドに対する抗エフガルチギモド抗体を認めた。陽性を示したサルのうち 7 例は、1 時点のみでエフガルチギモドに対する抗エフガルチギモド抗体を認めた。用量と抗エフガルチギモド抗体の産生に明らかな相関性は認められなかった。抗エフガルチギモド抗体産生による血清エフガルチギモド濃度に対する明らかな影響が認められなかったため、TK パラメータの平均値計算から抗エフガルチギモド抗体陽性例を除外しなかった。

要約すると、rHuPH20 と混合したエフガルチギモド SC をカニクイザルに反復皮下投与したところ、100 mg/kg q7d までの用量では良好な忍容性を示した。

カニクイザルにおけるエフガルチギモド SC の全身毒性に関する NOAEL は、試験した最高用量であるエフガルチギモド SC 100 mg/kg q7d 及びエフガルチギモド 100 mg/kg q7d + rHuPH20 （0.01 mg/kg）であった。

2.6.6.3.1.3　エフガルチギモドの 11 週間反復静脈内投与による T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験

添付資料番号: 4.2.3.2-2 （[redacted] 8459761）

KLH を用いた T 細胞依存性の抗体産生に及ぼすエフガルチギモドの影響の有無について、カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与 TDAR 試験で検討した。

カニクイザルの雌雄各 3 例に、投与容量は 0.55 mL/kg とし、エフガルチギモドを 0（調製用緩衝液）又は 100 mg/kg の用量で週 1 回の頻度で静脈内投与（計 12 回）した。エフガルチギモド及び溶媒対照群に投与期間の Day 28 及び Day 56 並びに回復期間の Day 29 に、KLH（10 mg/回）を皮下投与した（表 2.6.6-7）。

溶媒対照群の投与液及び被験物質の調製に用いた緩衝液（pH6.0）の組成は、ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩一水和物（20 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）、ポリソルベート 80［0.04%（w/v)］であった。

投与液中エフガルチギモド濃度は 180 mg/mL であった。9 週間の回復期間を設け、全例で所見の回復性を評価した（剖検は実施せず）。

表 2.6.6-7　カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与 TDAR 試験の試験デザイン

Group	IV bolus dose (mg/kg) q7d	No. of doses	Number and sex of animals				
			Main study (dosing phase Day 1-77)		Recovery period (recovery phase Day 1-64)		Total number of animals
			M	F	M	F	(M+F)
1 (control)	0	12	3	3	3	3	6
2 (high)	100	12	3	3	3	3	6
			No necropsy		No necropsy		

Source: [redacted] 8459761
ADA=anti-drug antibody; ELISpot=enzyme-linked immunospot; F=female; Ig=immunoglobulin, IV=intravenous; KLH=keyhole limpet hemocyanin; M=male; no.=number; PD=pharmacodynamic; q7d= once every 7 days (once weekly); SC=subcutaneous; TDAR=T-cell dependent antibody response
Note: As there was no necropsy, the main study animals rolled over to the recovery period (i.e. the animals in the main study and recovery period were the same). The dosing phase lasted 77 days. The first day of the dosing phase was identified as Day 1 of the dosing phase. The recovery phase lasted 64 days. The first day of the recovery phase was identified as Day 1 of the recovery phase. A total of 3M and 3F animals were allocated per dose group.
KLH was injected SC on dosing Days 28 and 56 during the dosing phase and on recovery Day 29.
Efgartigimod was administered q7d starting on dosing Day 1 and ending on dosing Day 77.
Blood sampling occurred during the dosing and recovery phase for the following measurements: anti-KLH IgG and IgM, ELISpot Analysis, total IgG (PD marker), efgartigimod serum concentration.
ADA were not measured because concentration time curves seemed unchanged.

主要な試験結果を 2.6.7.7.B に要約した。以下に特記すべき所見を要約した（表 2.6.6-8）。

表 2.6.6-8 カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与 TDAR 試験の主な所見

Species/sex	Dose (mg/kg)	Mortality	Noteworthy findings
Cynomolgus monkey/ male and female	0	0/6	**PD:** NA (data presented as change vs control) • No cases of morbidity
	100	0/6	**PD:** transient decrease of total IgG level (average max decrease of 0.4-fold compared to pre-dose by dosing Day 8) • No cases of morbidity • No signs of local intolerance were noted at the administration sites **Anti-KLH IgM:** no changes compared to placebo treated animals with the exception of male animals at Day 43 (5x higher mean anti-KLH levels compared to controls) **Anti-KLH IgG:** 2-9 fold lower mean anti-KLH IgG titers after second KLH administration compared to controls (dosing Days 56, 71,77) **T-cell responses (ELISpot):** within the assay variability, no differences between efgartigimod-treated animals and controls **Recovery:** average total IgG levels returned to baseline levels. Higher anti-KLH IgM titers compared to controls were noted for males treated with 100 mg/kg efgartigimod at recovery Day 44. No differences in anti-KLH IgG titers or ELISpot responses were noted after the third KLH administration on Day 29 of the recovery period between efgartigimod treated animals and controls
NOAEL$_{\text{general toxicity}}$: 100 mg/kg/day IV (bolus injection) **NOAEL TDAR:** 100 mg/kg/day IV (bolus injection), only findings were expected reduction of total IgG (expected pharmacology)			

Source: [redacted] 8459761.
ELISpot=enzyme-linked immunospot; Ig=immunoglobulin; IV=intravenous; KLH=keyhole limpet hemocyanin; NA=not applicable, NOAEL=no observed adverse effect level; PD=pharmacodynamics; TDAR=T-cell dependent antibody response

エフガルチギモド投与群では、体重、体重増加量、摂餌量への影響は認められなかった。一般状態観察で認められた所見はエフガルチギモド投与群と溶媒対照群との間で発現頻度が同程度であったことから、毒性学的に意義のある所見ではないと判断された。エフガルチギモドの静脈内投与による薬力学的効果は、投与期間中に総 IgG 値の減少として認められたが、回復期間終了時には投与前の値に戻った。

エフガルチギモドは、KLH（10 mg）初回投与後の免疫応答の抗原特異的活性化に影響を与えなかった。エフガルチギモド投与下でも抗 KLH IgM 反応が誘発され、障害されていない T 細胞コンパートメント及び T 細胞依存性の B 細胞の活性化が示された。エフガルチギモド投与群で IgM 抗体価が高かったが、ばらつきによる可能性が高かった。エフガルチギモド投与群では免疫抗原 KLH 投与に対する明らかな二次応答が認められ、KLH 刺激時の KLH 特異的 IgG 生成はエフガルチギモドによる IgG クリアランスの増加よりも高かったことが示された。対照群と比較して、エフガルチギモド投与群では投与期間の Day 56 において抗 KLH IgG 抗体価がわずかに低下した。回復期間の Day 29 の免疫抗原 KLH の 2 回目の追加接種後、エフガルチギモド投与群と溶媒対照群の免疫応答に差異は認められなかったことから、エフガルチギモド投与が記憶免疫応答を妨害しないことが確認された。

ELISpot を用いて測定したところ、投与期間及び回復期間ともにエフガルチギモド投与による IFNγ 分泌に対する影響は認められず、免疫原に対する細胞反応が損なわれることはないことが示された。

エフガルチギモドの全身曝露を評価した。TK の結果を 2.6.7.7.B に要約する。主な結果を表 2.6.6-9 に示す。血清中エフガルチギモド濃度は、バリデートされた ECLIA 法を用いて測定した（2.6.4.2.1）。

投与期間 1、4、8 及び 11 週に投与前及び投与直後（投与終了後約 1 分）に、全例から血液サンプルを採取した。さらに、投与期間 3 週に投与前、投与直後（各投与終了後約 1 分）、投与後約 24、96、168 時間（投与期間 4 週の投与前に相当）に全例から血液サンプルを採取した。また、回復期間 3、5、7、9 週に、投与期間中の投与直後に相当する時点で全動物から血液サンプルを採取した。

以下の結論が得られた：

- 週 1 回の静脈内投与後、エフガルチギモドの曝露量は投与期間 1、3、4、8 及び 11 週を通して比較的一定に保たれており、明らかな蓄積は認められなかった。
- TK を評価した投与期間 3 週の血清中エフガルチギモド濃度は双指数関数的にゆっくり減少した。エフガルチギモドの平均 C_{max} と $AUC_{0\text{-}168h}$ の性差は 2 倍未満であった。
- エフガルチギモドを静脈内投与したとき、投与期間を通じて適切な曝露を示した。

表 2.6.6-9　カニクイザルにエフガルチギモドを週 1 回 3 週間静脈内投与したときの TK パラメータ（平均値 ± SD）(TDAR 試験)

Efgartigimod IV Dose (mg/kg) q7d	**100**	**100**
Gender and No. per Group	**3M**	**3F**
C_{max} (µg/mL)	3260±311	3330±190
t_{max} (h)	0.0166±0 [a]	0.0166±0
$AUC_{0\text{-}168\ h}$ (µg·h/mL)	32400±4490	30900±2550

Source: [redacted] 8459761.
$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time zero to t_{last}, Day 92 (168 hours) was the last sampling timepoint; C_{max}= maximum observed concentration; F=female; IV=intravenous; M=male; no.=number; q7d=once weekly; SD=standard deviation; t_{max}=time of C_{max}; TK=toxicokinetics
a Median values are presented for t_{max}(h).

PK 及び PD パラメータの値は予想範囲内であり、抗エフガルチギモド抗体がこれらの指標に影響を及ぼした可能性を示す徴候が認められなかったため、抗エフガルチギモド抗体に対する評価は実施しなかった。

要約すると、エフガルチギモドを 100 mg/kg q7d の用量で 11 週間にわたってカニクイザルに反復静脈内投与したところ、良好な忍容性を示した。エフガルチギモドは、KLH の初回投与及び追加投与後の外来抗原（KLH）に対する TDAR に影響を及ぼさなかった。エフガルチギモドの作用機序から予想されたように、抗原特異的 IgG のレベルは低下した。

TDAR 試験におけるエフガルチギモドの NOAEL は、試験した最高用量である 100 mg/kg q7d であった。

2.6.6.3.2　rHuPH20

2.6.6.3.2.1　サルを用いた 7 日間反復静脈内又は皮下投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-3（R08056）

カニクイザルに rHuPH20 を 1 日 1 回、7 日間反復静脈内又は皮下投与したときの毒性学的影響の有無及びトキシコキネティクス（TK）を評価した。カニクイザル（雌雄各 2 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mol/L 塩化ナトリウム、pH6.0）及び 5 mg/kg/dose（550000 U/kg/dose）の用量で 7 日間連日静脈内又は皮下投与した（2.6.7.6.1）。

一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査のパラメータを評価した。静脈内投与群では Day 1、2、7 及び 8 の投与後 1、5、10、30、60、120、240 分及び 24 時間に TK 測定のために採血した。皮下投与群については、Day 1、2、7 及び 8 の投与後 0.5、1、2、4、8、12 及び 24 時間に TK 測定のために採血した。Day 8 の剖検時における肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。

一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査、尿検査及び病理組織学的検査では、すべての群で、rHuPH20 投与によると考えられる影響は認められなかった。血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の TK 解析では、Day 1 及び 7 における皮下投与後の t_{max} 中央値は 1 時間であり、Day 7 における皮下又は静脈内投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ はそれぞれ 501.7 及び 8733 U･h/mL であった。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、$AUC_{0\text{–}last}$ 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。

以上のように、カニクイザルに 5 mg/kg/dose を 7 日間連日静脈内又は皮下投与したときの rHuPH20 の忍容性は、いずれも良好であった。したがって、本試験における NOAEL は両投与経路とも 5 mg/kg/dose と判断した。

2.6.6.3.2.2　サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-4（R09050）

カニクイザル（雌雄各 6 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.0）、0.02、0.2 及び 2 mg/kg/dose（2200、22000 及び 220000 U/kg/dose）の用量で週 1 回、39 週間にわたり反復皮下投与した（2.6.7.7.C）。すべての群に雌雄各 2 例/群の回復群を設定し、投与終了後 4 週間休薬して回復性の有無を評価した。評価項目は、死亡、一般状態、体重、摂餌量、心電図検査、血圧、心拍数、呼吸数、眼科学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。さらに、雄では精巣サイズ、精子検査（精子の濃度、運動性及び形態）、テストステロン値及び黄体形成ホルモン値、並びに雌では月経周期を評価した。

TK 測定用（投与前、Day 1、21、85、183 及び 267 の投与後 0.25、1、2、4、6、12 及び 16 時間）並びに抗 rHuPH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性の測定用（Day 7、14、42、70、95、123、140、154、182、210、238、266、274、295 及び 302）の血液を採取した。追加解析として、カニクイザルの精巣、結腸の腸管神経叢及び精子塗抹標本並びにヒト精子塗抹標本における抗 rHuPH20 抗体に対する組織交差反応性について免疫組織化学的手法を用いて評価を行った。

いずれの rHuPH20 投与群でも死亡例はみられず、投与部位に認められた病理組織学的変化を除いて、rHuPH20投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。投与期間終了時検査例の投与部位では、rHuPH20投与に関連すると考えられる変化として、皮下の血管周囲に軽微なリンパ形質細胞浸潤が、2 mg/kg/dose 群では雌雄でそれぞれ 4/4 例に、0.2 mg/kg/dose群では雌雄でそれぞれ1/4例に認められたが、4週間の回復期間終了後には、2 mg/kg/dose 群の雄 1 例にみられたのみであったことから、回復性が示された。さらに、所見の重症度は軽微であったことから、有害ではないと考えられた。

0.02 及び 0.2 mg/kg/dose 群の動物の TK 解析では、ヒアルロニダーゼ活性値が定量下限未満であった。2 mg/kg/dose 群の動物の血漿では、Day 1～85 にヒアルロニダーゼ活性値が増加し、その後 Day 183 及び 267 に減少した。rHuPH20 投与群の雌雄で最高 C_{max} は Day 85 に観察された。2 mg/kg/dose 群の雄では、Day 1 及び 183 の平均 C_{max} はそれぞれ 12.5 及び 12.0 U/mL、Day 1 及び 183 の平均 AUC はそれぞれ 20.5 及び 89.6 U·h/mL であった。Day 267 の雄ではヒアルロニダーゼ活性は定量下限未満で、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性から説明可能であった。雌では Day 267 までヒアルロニダーゼ活性が測定可能であった。2 mg/kg/dose群の雌では、Day 1及び267の平均C_{max}はそれぞれ20.8及び10.0 U/mL、Day 1 及び 267 の平均 AUC はそれぞれ 47.8 及び 56.2 U·h/mL であった。

週 1 回の反復皮下投与後にみられた rHuPH20 曝露量の減少は、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性と関連していた。抗 rHuPH20 抗体の発現率及び力価は、2 mg/kg/dose 群で最も高く、概ね経時的に増加した。しかしながら、4 週間の回復期間終了時では、ヒアルロニダーゼ中和活性値はピーク値から約 50%減少した。抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性は有害作用と相関しなかった。

カニクイザルの組織及び精子に対する組織交差反応性について、免疫組織化学（IHC）法を用いて抗 rHuPH20 抗体の特性について評価した。IHC 解析の結果、週 1 回の頻度で rHuPH20 を皮下投与した後に発現したカニクイザル抗 PH20 抗体はサル精巣と反応するが、結腸の腸管神経叢とは反応しないことが明らかになった。カニクイザル及びヒトの精子の両方に局在する PH20 に対するカニクイザル抗 PH20 抗体の特異的結合を IHC 法で確認した。ビオチン標識ヤギ抗サル IgG 試薬を用いて結腸の腸管神経叢、精巣、及び精巣上体における潜在的 IgG 沈着を評価したところ、サル IgG の分布はこれらの組織における血液組織関門によって制限されていることが確認され、公表された報告と一致した。

以上のように、カニクイザルに rHuPH20 を 0.02、0.2 及び 2 mg/kg/dose の用量で週 1 回、39 週間にわたり皮下投与した結果、rHuPH20 投与に関連して、投与部位の皮下の血管周囲に軽微なリンパ形質細胞浸潤が認められたが、有害ではないと考えられた。TK 解析では、高用量の 2 mg/kg/dose 群でのみ rHuPH20 の全身曝露が認められ、雄では少なくとも 6 ヵ月間、雌では 9 ヵ月間血漿中ヒアルロニダーゼ活性が認められた。有害な変化は認められなかったが、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性と関連した rHuPH20 の曝露量の減少が認められた。本試験における NOAEL は 2 mg/kg/dose であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 エフガルチギモド

実施せず。

2.6.6.4.2　rHuPH20

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

2.6.6.5　がん原性試験

2.6.6.5.1　エフガルチギモド

実施せず。

2.6.6.5.2　rHuPH20

rHuPH20 のがん原性試験は実施しなかった

「医薬品のがん原性試験に関するガイダンスの改正に係る前向き評価への参加協力依頼の改訂について（協力依頼）」（平成 28 年 2 月 17 日付　事務連絡）の付録 1「がん原性評価文書で検討する証拠の重み付（WOE）の要素」を参考に考察した結果、rHuPH20 にはがん原性に関して懸念されるリスクはないと考えている。すなわち、幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験（15028）を含む反復投与毒性試験では、細胞肥大、びまん性又は限局性の細胞過形成、持続性組織傷害又は慢性炎症、前腫瘍性病変並びに腫瘍は認められなかった。さらに、非臨床試験及び臨床試験において、内因性ホルモンの攪乱や免疫抑制に関連すると考えられる明らかな影響も認められなかった。したがって、非臨床試験成績、ヒトに臨床予定用量で皮下投与した時の血中 rHuPH20 は LLOQ 未満であること（2.5.3）、並びに rHuPH20 及びヒアルロニダーゼの広範な臨床使用経験での安全性プロファイルに基づき、rHuPH20 の皮下投与によるがん原性リスクは低いと考えられる。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1　エフガルチギモド

新たな試験は実施していない。

2.6.6.6.2　rHuPH20

2.6.6.6.2.1　受胎能及び初期胚発生に関する試験

rHuPH20 の受胎能及び初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

雌雄の幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験（15028）で、rHuPH20 を 1 mg/kg の用量で皮下投与し、雌雄の受胎能及び胎児発生に対する影響の有無について評価した結果、雌雄の交配及び受胎能、精子検査パラメータ（精子の運動性、濃度及び形態）、卵巣及び子宮のパラメータ、胎児関連パラメータ、剖検、臓器重量並びに病理組織学的検査所見に rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。さらに、サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験（R09050）では、rHuPH20 の最大 2 mg/kg/dose（220000 U/kg/dose）の用量を、週 1 回の投与頻度で 39 週間にわたり皮下投与したが、雄の精巣サイズ、精子検査（精子の濃度、運動性及び形態）及び黄体形成ホルモン値、雌の月経

周期並びに雌雄生殖器の病理組織学的検査に rHuPH20 投与によると考えられる影響は認められなかった。

2.6.6.6.2.2　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.2.1　マウスを用いた EFD に関する用量設定試験

添付資料番号: 4.2.3.5.2-1（R07046）

妊娠中の雌 Crl:CD1(ICR)マウス（雌 8 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）、1、3、10 及び 30 mg/kg/dose（110000、330000、1100000 及び 3300000 U/kg/dose）の用量で妊娠 6～15 日（DG 6～15）に連日皮下投与した。DG 17 に母動物の子宮内観察を実施し、胎児を観察した（2.6.7.11）。評価項目は、母動物の生存率、一般状態、体重、体重増加量、剖検及び生殖パラメータ並びに胎児の体重、性比及び外表検査とした。

妊娠成立例は 0、1、3、10 及び 30 mg/kg/dose 群でそれぞれ 8、6、6、7 及び 8 例であった。いずれの rHuPH20 投与群でも母動物に死亡例はみられず、胎児にも肉眼的変化は認められなかった。1 及び 3 mg/kg/dose では、母動物又はその同腹児にも rHuPH20 投与に関連する影響は認められなかった。

rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は、母動物体重及び体重増加量、吸収胚、胎児体重、剖検所見において認められた。30 mg/kg/dose 群で DG 18 に体重減少（溶媒対照群の 88.7%）がみられ、DG 6～18 に体重増加抑制が認められた。30 mg/kg/dose の 8 例中 4 例の母動物で全胚吸収が認められ、10 mg/kg/dose 群の 7 例中 1 例の母動物で胚吸収率が高かった（68.8%）。30 mg/kg/dose 群で胎児体重の減少が認められたが、いずれの群においても胎児の性比及び外表検査では rHuPH20 投与によると考えられる影響は認められなかった。剖検では、10 mg/kg/dose 群の母動物 1 例及び 30 mg/kg/dose 群の母動物 3 例で脾臓の肥大が認められ、rHuPH20 に関連したものと判断された。

以上のように、妊娠マウスに rHuPH20 を 1、3、10 及び 30 mg/kg/dose の用量で DG 6～15 にわたり皮下投与した結果、30 mg/kg/dose 群で母動物の体重減少、体重増加抑制、同腹児数の減少及び胎児体重の減少、吸収胚数の増加及び脾臓の腫大が認められたことから、マウスを用いた EFD 試験の用量は 0、3、9 及び 18 mg/kg/dose とした。

2.6.6.6.2.2.2　マウスを用いた EFD に関する試験

添付資料番号: 4.2.3.5.2-2（R08176）

本試験では、妊娠中の雌 Crl:CD1(ICR)マウスに着床から硬口蓋の閉鎖までの期間 rHuPH20 を皮下投与したときの妊娠動物に対する rHuPH20 の潜在的な有害作用及び EFD に対する影響を評価した（2.6.7.13.1）。本試験では、ICH S5（R2）ガイドラインのステージ C 及び D を評価した。妊娠マウス（雌 25 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）、3、9 及び 18 mg/kg/dose（330000、990000 及び 1980000 U/kg/dose）の用量で DG 6～15 に連日皮下投与した。本試験では、生存率、一般状態、母動物の体重及び体重変化、摂餌量、交配成績、帝王切開による観察、胎児パラメータを評価した。生存したすべての主試験群のマウスを DG 18 に帝王切開し、黄体数、着床部

位、生存及び死亡胎児、並びに早期及び後期吸収胚数を調べた。胎児を子宮から摘出し、性別、体重、肉眼的外表変化、内臓及び骨格の変化について検査した。別途、TK 群（雌 36 例/群）を設け、DG 6 及び DG 15 の rHuPH20 投与前、投与後約 30 分、2、4、8、24 時間に血液サンプルを採取した。TK 群マウスでは妊娠状態のみを確認し、その他の評価は実施しなかった。

母動物では、rHuPH20 投与に関連すると考えられる死亡は認められなかった。9 mg/kg/dose 群では主試験群の 25 例中 2 例、18 mg/kg/dose 群では主試験群及び TK 群のそれぞれ 25 例中 1 例及び 36 例中 1 例が計画剖検前に死亡したが、有害な臨床徴候、体重増加抑制又は体重減少などの毒性徴候は認められず、死亡例数（各群 2 例）に用量依存性も認められなかったことから、これらの死亡は rHuPH20 投与に関連しないものと考えられた。そのほかには、母動物に明らかな毒性は認められなかった。さらに、いずれの用量でも明らかな母動物毒性は発現せず、母動物の体重及び体重増加量に HuPH20 投与によると考えられる影響はみられなかった。

各主試験群では 23 例及び 24 例に妊娠が確認された。すべての群で rHuPH20 投与に関連すると考えられる胎児の外表、内臓及び骨格の奇形又は異常は認められなかった。溶媒対照群と比較して、9 及び 18 mg/kg/dose 群で rHuPH20 に関連した胎児体重の減少が認められた（$p \leqq 0.05$）。後期吸収胚数の増加が 9 及び 18 mg/kg/dose で認められたが、統計学的な有意差はみられなかった。

rHuPH20 を妊娠マウスに皮下投与したときの TK を評価した。3、9 及び 18 mg/kg/dose 群の DG 6 での C_{max} はそれぞれ 3.4、30.5 及び 49.6 U/mL であり、$AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 5.5、45.3 及び 120 U·h/mL であった。また、DG 15 での C_{max} はそれぞれ 20.9、17.1 及び 99.2 U/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 55.1、79.0 及び 363 U·h/mL であった。DG 6 及び DG 15 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、おおむね用量に応じて増加した。

DG 6 及び DG 15 の血漿 TK 試料を用いて、抗 rHuPH20 抗体の産生の有無について評価した。マウス血漿中の抗 rHuPH20 抗体の安定性評価は実施しなかった。抗 rHuPH20 抗体は、測定したすべてのマウスにおいて同程度の抗体価で確認された。抗 rHuPH20 抗体は主に IgG であった。IgG は胎盤を通過するため、胎児が胎盤を通じて抗 rHuPH20 抗体に曝露された可能性が考えられる。抗 rHuPH20 抗体価は、3、9 及び 18 mg/kg/dose 群間で同程度であり、9 及び 18 mg/kg/dose 群でみられた用量依存的な胚吸収の増加と相関しなかったことから、抗 rHuPH20 抗体は EFD に有害な影響を及ぼさなかったことが示唆された。

以上のように、いずれの rHuPH20 投与群においても母動物毒性は認められなかった。DG 6 及び DG 15 に実施した TK 解析では、皮下投与によって rHuPH20 の曝露が確認された。9 及び 18 mg/kg/dose 群で胎児体重の減少及び後期吸収胚数の増加がみられたが、rHuPH20 投与に関連すると考えられる胎児の外表、内臓及び骨格異常は認められなかった。したがって、rHuPH20 は 9 及び 18 mg/kg/dose の用量で胚・胎児毒性を示したが、催奇形性は示さなかった。母動物に対する NOAEL は 18 mg/kg/dose、胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg/dose であると判断した。

2.6.6.6.2.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.2.3.1　マウスを用いた PPND に関する試験

添付資料番号: 4.2.3.5.3-1（R09058）

本試験では、Crl:CD1(ICR)雌マウスに着床から離乳まで rHuPH20 を投与し、妊娠、分娩、授乳及び哺育行動並びに出生児の発達に及ぼす影響の有無について評価した（2.6.7.14.1）。本試験は、ICH S5（R2）ガイドラインのステージ C から F を評価するためにデザインされたが、ステージ C 及び D に関してはマウスを用いた EFD 試験（R08176）で評価したため、帝王切開による胎児の評価は実施しなかった。本試験期間中に誘発される影響は遅れて発現する可能性があるので、観察は F1 児が性成熟期に達するまで継続した。妊娠 CD-1 マウス（雌 25 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）、3、6 及び 9 mg/kg/dose（330000、660000 及び 990000 U/kg）の用量で DG 6～DG 22（自然分娩に供しなかったマウス）又は DG 6～授乳 20 日（DL 20）（自然分娩マウス）に連日皮下投与した。

F0 母動物では一般状態観察、流産、早産、死亡、同腹仔数、出生児の生存率を調べた。DL 21 に生存母動物を安楽死させ、剖検による肉眼的観察を行った。F1 出生児は DL 20 に離乳させた後、約 90 日齢で交配させて生殖能を評価した。

rHuPH20 に関連した早期死亡は認められず、一般状態、剖検、体重及び体重増加量、自然分娩並びに F1 児に rHuPH20 に関連した変化は認められなかった。F0 母動物では、6 及び 9 mg/kg/dose でそれぞれ 1/25 及び 2/25 例の死亡が認められたが、低頻度であり、rHuPH20 との関連性はないと判断された。

F1 出生児では、一般状態観察、体重、性成熟、受動回避試験（学習能検査、短期及び長期保持）、運動活動性試験、交尾成績、剖検における肉眼的観察所見について、いずれの用量においても rHuPH20 に関連した影響は認められなかった。F1 母動物は DG 18 で帝王切開を行い、F2 胎児を観察したところ、F1 妊娠雌の黄体数、着床数、同腹児数、生存胎児数、早期及び後期吸収胚数、胎児体重、吸収胚率及び生存雄胎児数の平均値は、4 用量群間で同程度であり、有意差は認められなかった。F2 胎児に rHuPH20 投与に関連すると考えられる肉眼的変化は認められなかった。

以上のように、rHuPH20 のいずれの用量でも有害作用は認められなかった。したがって、母動物に対する rHuPH20 の NOAEL は 9 mg/kg/dose であった。母動物の生殖能、F1 出生児の生存率及び成長（性成熟、学習能、記憶能及び生殖能を含む）に対する NOAEL も 9 mg/kg/dose であった。

2.6.6.6.2.4　幼若動物を用いた試験

2.6.6.6.2.4.1　幼若マウスを用いた用量設定試験

添付資料番号: 4.2.3.5.4-1（13123）

本用量設定試験では、PND 7～42 の幼若マウスに rHuPH20 を 1 日 1 回又は週 1 回の頻度で皮下投与したときの忍容性を検討した（2.6.7.11）。マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）、1、3 及び 9 mg/kg/dose（110000、330000 及び 990000 U/kg/dose）の用量で連日又は週 1 回皮下投与した。血漿サンプルを採取し、rHuPH20 の TK 及び抗 rHuPH20 抗体反応を評価した。抗 rHuPH20 抗体解析

では抗体価、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性、並びに抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性を評価した。

主試験の連日投与群（各群雌雄各 8 例）のマウスに、PND 7～42 に rHuPH20 又は溶媒対照を 1 日 1 回投与した。主試験の週 1 回投与群（雌雄各 8 例/群）のマウスには PND 7、14、21、28、35 及び 42 に rHuPH20 を投与した。抗体サブセット（各群雌雄各 8 例）のマウスに PND 7～28 まで rHuPH20 を連日又は週 1 回投与し、その後 PND 30 に安楽死させて抗 rHuPH20 抗体測定用試料を採取した。TK サブセットのマウスに PND 7 から PND 42 まで rHuPH20 を投与し（連日投与：雌雄各 39 例/群、週 1 回週投与：雌雄各 24/群）、投与前、投与後 1、2、4 及び 8 時間に安楽死させて TK 試料を採取した。

本試験では、以下を評価した：一般状態、体重、体重変化、臨床病理学的パラメータ（血液学的検査及び血液生化学的検査）、TK、抗 rHuPH20 抗体（力価、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性）、剖検所見及び臓器重量。

rHuPH20 の連日投与群及び週 1 回投与群のいずれにおいても、rHuPH20 投与に関連したと考えられる一般状態の変化及び剖検所見は認められなかった。主試験群の連日又は週 1 回投与群では、全例が最終剖検日まで生存した。抗 rHuPH20 抗体測定群（連日投与群の 3 mg/kg/dose 群及び週 1 回投与群の 3 mg/kg/dose 群の各 1/110 例）及び TK 群（週 1 回投与群の 3 mg/kg/dose 群及び 9 mg/kg/dose 群の各 1/80 例）で死亡が認められたが、発現頻度は低く、試験実施施設の背景データと同程度であり、用量依存性も認められなかったため、rHuPH20 投与に関連したものではないと考えられた。

3 及び 9 mg/kg/dose の連日投与群の雌で、体重及び体重増加量の用量依存的な増加が認められたが、対照群の体重と比較して概して 10%以内の増加であり、有害ではないと考えられた。

rHuPH20 の連日又は週 1 回投与群の雌雄マウスでは、対照群と比較して、rHuPH20 に関連した平均好酸球数の増加が観察されたが、雌では統計学的に有意ではなかった。また、9 mg/kg/dose の週 1 回投与群の雌雄で、対照群と比較して平均網状赤血球数の増加が認められた。これらの増加は有害ではないと考えられた。

各群のいずれの測定時点においても、ヒアルロニダーゼ活性値が定量できたサンプル数が 3 未満であったため、TK パラメータは算出できなかった。PND 28 及び 42 では、各時点の定量できた血漿サンプル数は雌雄同じであった。定量できた血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の割合は、用量に応じて増加した。血漿中ヒアルロニダーゼ活性値は 3 及び 9 mg/kg/dose 群では連日及び週 1 回投与群間で類似していた。しかし、血漿中ヒアルロニダーゼ活性値は週 1 回投与群よりも連日投与群でばらつきが大きかった。平均血漿中ヒアルロニダーゼ活性値の要約を表 2.6.6-10 に示す。

表 2.6.6-10　PND 7、28 及び 42 の幼若マウスに rHuPH20 を連日又は週 1 回皮下投与したときの平均血漿中ヒアルロニダーゼ活性値

Day (PND)	Timepoint (hr)	Mean Plasma rHuPH20 Concentration (U/mL)±SD Daily dose (mg/kg/dose)						Weekly dose (mg/kg/dose)			
		1		3		9		3		9	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
7	0	–	–	–	–	–	–	NA	NA	NA	NA
	1	–	1.9 (ID)	0.3 ±0.5	–	36.8 (ID)	20.4 ±9.1	NA	NA	NA	NA
	2	–	–	–	–	6.8 (ID)	2.2 ±2.4	NA	NA	NA	NA
	4	–	–	–	–	–	–	NA	NA	NA	NA
	8	–	–	–	–	–	–	NA	NA	NA	NA
28	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	1	–	–	–	–	8.2 ±10.8	4.4 ±6.0	1.8 ±0.5	3.4 ±0.4	11.6 ±2.3	18.4 ±1.2
	2	–	–	–	–	4.5 ±1.5	3.7 ±2.5	–	0.2 ±0.4	8.8 ±2.7	10.3 ±10.0
	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
42	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	1	–	–	–	–	0.7 ±1.3	–	0.4 ±0.6	–	5.0 ±4.4	1.8 ±3.1
	2	–	–	–	–	0.8 ±0.8	1.3 ±2.3	–	–	2.8 ±4.8	0.6 ±1.0
	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

–= <lower limit of quantification (<0.625 U/mL); F= female; ID= insufficient data; M = male; NA= not applicable; PND= postnatal day; rHuPH20= recombinant humat1 hyaluronidase PH20, TK= toxicokinetics
Note: Data was rounded to one decimal place from the values in the TK report for Report 13123.

PND 30 及び 44 の血漿サンプルを用いて、抗 rHuPH20 抗体価の測定、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性、並びに抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性を測定した。抗 rHuPH20 抗体が、PND 30 では 3 mg/kg/dose の週 1 回投与群の 4 例を除いた rHuPH20 投与群の全例で、PND 44 では rHuPH20 投与群の全例で検出された。抗 rHuPH20 抗体価の中央値は、同じ測定時点では、連日投与群の方が週 1 回投与群よりも一貫して高かった（4～100 倍超）。全 rHuPH20 投与群において、抗体価の中央値は PND 30～44 間で増加した。rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する抗 rHuPH20 抗体の交差反応性は、PND 30 及び 44 では連日投与群の大部分で観察された。週 1 回投与群でも rMuPH20 及び rMuHyal5 に対して抗 rHuPH20 抗体の交差反応性が認められ、発現率はそれぞれ 44～88%及び 73～100%であった。さらに、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性は、週 1 回投与群と比較して連日投与群でより高い発現率を示した。PND 44 では、連日投与群の 85%超のマウスで中和活性がみられたが、週 1 回投与群で中和活性がみられた割合は、3 及び 9 mg/kg/dose でそれぞれ 44%及び 65%のみであった。

以上のように、幼若マウスに rHuPH20 を連日又は週 1 回の頻度で皮下投与したときの忍容性は 9 mg/kg の用量まで良好であり、有害な影響は認められなかった。抗 rHuPH20 抗体は

PND 30 までにすべての rHuPH20 群で検出され、rMuPH20 及び rMuHyal5 の両方に対して交差反応性を示した。

2.6.6.6.2.4.2　幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.5.4-2（15028）

本試験では、rHuPH20 及び de novo で産生された抗 rHuPH20 抗体の潜在的な毒性学的影響の有無について、幼若動物を用いて動物の成熟期を通じて評価した。幼若マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）及び 1 mg/kg/dose の用量で、PND 7～30 に連日皮下投与した。その後、幼若動物評価サブセットでは PND 129 まで、慢性毒性評価サブセットでは PND 241 まで週 1 回の頻度で皮下投与した。神経行動学的評価、生殖能及び胎児評価、並びに成熟期までの慢性毒性評価を実施した。

雌雄幼若 Crl:CD1(ICR)マウス（雌雄各 220 例）を、PND 6 又はそれ以前に幼若動物評価サブセット、慢性毒性評価サブセットに振り分け、各サブセットの rHuPH20 投与群には rHuPH20 を PND 7 から 30 まで 1 日 1 回皮下投与し、その後は週 1 回投与し、計画安楽死前日まで抗体価を維持させた。投与容量は 5 mL/kg とした。幼若動物評価終了時（PND 129 又は GD 18；各群雌雄 30 例/性/群）又は慢性毒性評価終了時（PND 241；25 例/性/群）終了時にマウスを安楽死させた。幼若動物評価サブセット（22 例/性/群）の動物は、PND 87～90 に交配させ、交配に供した雌全例を DG 18 に安楽死させ、生殖評価を実施した。抗 rHuPH20 抗体反応の特性評価のために血漿サンプルを採取した（2.6.7.15.1）。

両サブセットの動物について、生存率、一般状態、体重、体重変化及び臓器重量を検査し、肉眼的及び病理組織学的検査を実施した。幼若動物評価サブセットで実施した追加評価項目は、離乳後の性成熟（亀頭包皮分離又は膣開口）、神経行動学的検査（受動的回避評価、運動活動性、聴覚性驚愕反射、及び Morris 水迷路）、交尾、受胎能、精子パラメータ（運動性、濃度、形態)、卵巣及び子宮のパラメータ並びに胎児検査（体重、性別、外表、内臓、及び骨格の異常）であった。血液サンプルは PND 30、60、90、180（慢性毒性評価サブセットのみ）、又は抗 rHuPH20 抗体評価のための計画剖検時に、全動物から採取した。

<u>幼若動物評価サブセット</u>

雌では rHuPH20 の投与に関連すると考えられる死亡又は早産は認められず、雄では投与期間終了日である PND 129 まで全例が生存した。予定外の剖検が 5 例で実施された。内訳は対照群で 2 例、1 mg/kg/dose 群で 3 例であった。1 mg/kg/dose 群の 3 例については、偶発的なものと判断され、発現頻度も対照群と同程度であったことから、いずれも rHuPH20 投与との関連性はないものと考えられた。他のすべての雌マウスは、計画剖検日まで生存した。

1 mg/kg/dose 群の雌雄では、一般状態、体重及び体重増加量に rHuPH20 投与に関連した変化は認められず、また、妊娠期間中の母動物の体重及び体重増加量に rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

雌雄の性成熟及び神経行動学的検査、交配及び受胎能、精子検査、卵巣及び子宮のパラメータ、胎児関連パラメータ、剖検、臓器重量並びに病理組織学的検査に rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

慢性毒性評価サブセット

慢性毒性評価サブセットの雌雄では、rHuPH20の投与に関連すると考えられる死亡は認められなかった。予定外の剖検が 5 例で実施された。内訳は対照群の雌 3 例、1 mg/kg/dose 群の雄 2 例であった。1 mg/kg/dose 群では、四肢の異常による安楽死、及び悪性リンパ腫に伴う瀕死であり、偶発的なものと判断され、発現頻度も対照群と同程度であったことから、いずれも rHuPH20 投与との関連性はないものと考えられた。慢性毒性評価サブセットの他の雌雄はすべて、PND 241 の計画剖検日まで生存した。

1 mg/kg/dose 群の雌雄には、一般状態観察、体重及び体重増加量、眼科学的検査所見及び血液学及び血液生化学的検査のいずれにも rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

1 mg/kg/dose 群の雌では脾臓の絶対重量（22.6%；p≦0.01）、比体重値（18.1%；p≦0.01）及び比脳重量値（21.0%；p≦0.01）の増加が認められ、病理組織学的検査では、関連すると考えられる所見として、脾臓に髄外造血亢進の頻度の上昇が認められた。脾臓重量の増加及び脾臓の髄外造血の亢進については、rHuPH20投与部位の炎症に対する二次的／反応性変化である可能性が高く、骨髄で異常所見がみられず、PND 160 の血液学的変化も認められなかったこと、及び／又は慢性毒性評価サブセットの雄において同様の所見が認められなかったことから、rHuPH20投与による影響ではないと考えられた。その他に、rHuPH20投与に関連すると考えられる臓器重量の変化は認められなかった。

剖検では雌雄ともに rHuPH20 に関連した肉眼的所見は認められなかった。

rHuPH20に起因する軽微から中等度の病理組織学的検査所見が慢性毒性評価サブセットの雌雄で認められ、皮下組織の混合細胞性炎症を伴うこともある皮下組織内の混合細胞浸潤が主に認められた。この変化は、病理組織学的に静止状態の組織像を呈しており、炎症の発現頻度が低く、表皮に異常が認められないことから、マウスに対して掻爬や自咬などの自傷行動を誘発しなかったことが示唆され、有害な変化でないと考えられた。

抗体評価

rHuPH20 投与群の全例で抗 rHuPH20 抗体の産生が認められた。遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）に対する交差反応性が認められた。rMuPH20 に交差反応性を示す IgG の発現率は、幼若動物評価サブセットで 76～100%、慢性毒性評価サブセットで60～100%であった。rMuHyal5 に交差反応性を示すIgGについては、rMuPH20 よりも発現率が高く、幼若動物評価サブセットでは 90～100%、慢性毒性評価サブセットでは100%であった。

また、抗 rHuPH20 抗体による中和活性は PND 90 で 92～100%のサンプルで認められ、幼若動物評価サブセット（PND 129）及び慢性毒性評価サブセット（PND 241）でも多くのサンプルで期間を通して中和活性が認められた。

結論

以上のように、幼若マウスに rHuPH20 を 1 mg/kg の用量で最長 8 ヵ月間にわたり皮下投与したときの忍容性は良好であり、成長、機能発達、雌雄の受胎能及び胎児発生に rHuPH20 投与による有害な影響は認められなかった。

2.6.6.7　局所刺激性試験

2.6.6.7.1　エフガルチギモド

カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.2）で、反復投与時の局所刺激性を評価した。

さらに、ウサギに rHuPH20 と混合したエフガルチギモド SC 又はエフガルチギモド SC 単独を単回投与して局所刺激性の有無を検討した。

2.6.6.7.1.1　ウサギを用いたエフガルチギモドの局所刺激試験

添付資料番号: 4.2.3.6-1（[redacted]37107）

エフガルチギモド SC の局所刺激性試験（GLP 遵守）では、ニュージーランドホワイトウサギ（雌 6 例）にエフガルチギモド SC を rHuPH20 と混合して、皮下又は筋肉内投与し、投与後 48 及び 96 時間並びに投与後 14 日に剖検を実施し、投与部位に対する肉眼的観察及び病理組織学的に評価した。

すべての動物に、2000 U/mL の rHuPH20 と混合したエフガルチギモド（ロット [redacted]）を 180 mg/mL の濃度で、皮下投与では 1 mL、筋肉内投与では 0.25 mL を単回投与した（表 2.6.6-11）。筋肉内投与は投与過誤の可能性のある投与経路として選択した。

個体内比較のため、各例には溶媒対照として 2000 U/mL の rHuPH20 を含む調製用緩衝液を皮下投与では 1 mL、筋肉内投与では 0.25 mL の容量でそれぞれ投与した。

調製用緩衝液（pH6.0）の組成は、ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩一水和物（20 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）及びポリソルベート 20［0.03%（w/v)］であり、これは、申請製剤（pH6.0）［L-ヒスチジン/L-ヒスチジン塩酸塩（20 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、ポリソルベート 20（0.04% w/v)］+ rHuPH20（2000 U/mL）と同様であった。

表 2.6.6-11　ウサギを用いたエフガルチギモドの局所刺激試験の試験デザイン

Species	Method of administration	Efgartigimod dose (mg/animal)	Number and sex of animals per follow-up period		
			48 hours	96 hours	14 days
			F	F	F
Rabbit/ New Zealand White	SC and IM routes **Left-right comparison:** left side (control solution): vehicle [a] versus right side: efgartigimod + 2000 U/mL rHuPH20, administered in an equal volume for each route of administration	SC: 180 mg per animal in 1 mL volume + 2000 U/mL rHuPH20 IM: 45 mg per animal in 0.25 mL volume + 2000 U/mL rHuPH20	2	2	2

Source: [redacted]37107
F=female; h=hour; IM=intramuscular; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous
Note: General clinical observations were made at least once a day and the health condition of the animals was recorded. On the day of treatment, animals were observed before and after dosing to detect any clinical signs or reaction to treatment. The body weight of the animals was documented on Day 1 before the first dosing and on the day of sacrifice. Local reactions were inspected macroscopically 1 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h 96 h and 14 days after administration. The reactions were scored based on DRAIZE. Dissection occurred of two animals at 48 h, 96 h, 14 days with subsequent histopathology of the injection sites.
a Vehicle (formulation buffer solution + 2000 U/mL rHuPH20).

ウサギにおいてエフガルチギモド SC（180 mg/mL）+ rHuPH20（2000U/mL）は、皮下又は筋肉内投与後に良好な忍容性を示し、一般状態や体重への影響は認められなかった。皮下又は筋肉内投与後の各観察時点で、被験物質投与部位及び溶媒対照（調製用緩衝液）投与部位の肉眼的変化（Draize スコアリングにより評価した紅斑、痂皮、浮腫）は認められなかった。

エフガルチギモド SC（180 mg/mL）+ rHuPH20（2000U/mL）を皮下投与又は筋肉内投与した部位の病理組織学的検査では、被験物質に関連した形態学的変化は認められなかったことから、エフガルチギモド SC（180 mg/mL）+ rHuPH20（2000 U/mL）を皮下投与又は筋肉内投与した場合の忍容性は、溶媒対照である調製用緩衝液 + rHuPH20（2000 U/mL）を等容量で投与した場合と比較して差は認められなかった。

2.6.6.7.2　rHuPH20

rHuPH20 では、独立した局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性の評価は、サルを用いた反復投与毒性試験及びマウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験で実施した。全体として、供試動物への rHuPH20 の静脈内及び皮下投与は忍容性が良好であり、いずれの毒性試験においても局所刺激性を示唆する有害所見は認められなかった。局所刺激性を評価した 6 試験のうち 2 試験で、投与部位への軽微な影響が認められたものの、有害とみなされなかった。

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では、一般状態観察及び投与部位及び流入リンパ節の病理組織学的検査により局所刺激性が検討された。7 日間試験（4.2.3.2-3）において、5 mg/kg/dose の rHuPH20 を連日静脈内又は皮下投与した結果、投与部位に異常所見は認められなかった。39 週の皮下回投与試験（週 1 回投与）では、投与部位の病理組織学的検査にお

いて、可逆的で rHuPH20 に関連するが、有害ではない軽微な皮下の血管周囲におけるリンパ形質細胞浸潤が認められた（4.2.3.2-4）。投与期間終了時に剖検した動物では、この病理組織学的検査所見は 0.2 mg/kg/dose で雄 1/4 例、雌 1/4 例に、2 mg/kg/dose で雄 4/4 例、雌 4/4 例に認められた。回復器官終了時の剖検例では、2 mg/kg/dose 群の雄 1/2 例及び雌 0/2 例で軽微な皮下の血管周囲におけるリンパ形質細胞浸潤が認められたことから、これらの影響は 4 週間の回復復期間終了後に概ね回復した。さらに、所見の重症度は軽微であったため、この変化は有害ではないと考えられた。

カニクイザルを用いた 7 日間反復投与毒性試験（R08056）及び 39 週間反復投与毒性試験（R09050）で、それぞれ Day 7 及び Week 39 に投与部位及び近傍リンパ節の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。7 日間静脈内又は皮下投与毒性試験の 5 mg/kg/dose 群［投与濃度：10.6 mg/mL（1166000 U/mL）、投与容量：0.47 mL/kg］では、局所刺激性を示唆する変化は認められなかった。また、39 週間皮下投与毒性試験の 2 mg/kg/dose 群［投与濃度：1.0 mg/mL（110000 U/mL）、投与容量：2 mL/kg]では、投与部位の皮下の血管周囲にリンパ形質細胞浸潤が認められたが、可逆的かつ軽微であることから有害ではないと考えられた。

マウスを用いた皮下投与による生殖発生毒性試験（R07046、R08176、R09058）で投与部位に対する一般状態観察及び剖検時の肉眼的観察により、局所刺激性を評価した。妊娠マウスに rHuPH20 を 3～30 mg/kg/dose の用量で、妊娠期間中の 10 日間又は 17 日間及び授乳期間中の 20 日間にわたり連日皮下投与したところ、局所刺激性の徴候は認められなかった。

ウサギでは、抗 rHuPH20 抗体が雌雄の受胎能、EFD 及び出生後の発達に及ぼす影響を評価するために実施された 2 試験（12208、12195）で投与部位に対する一般状態観察及び皮膚スコアリングによって局所刺激性を評価した。両試験において、rHuPH20 を 0.76 mg/kg/dose の用量を週 1 回皮下投与したところ、雌受胎能及び EFD 試験では、皮膚スコアリング所見及び皮膚反応は認められなかった。しかし、雄の受胎能試験では 5 週間にわたる rHuPH20 投与によって、rHuPH20 投与群の投与部位にグレード 1、2 及び 3 の紅斑がそれぞれ雄 22 例中 12 例、4 例及び 1 例に認められた。紅斑は各投与後 4 日以内に消失したことから、有害とは判断されなかった。本試験で認められた紅斑は rHuPH20 投与による影響と判断されたが、その他のマウス、ウサギ及びサルを用いた毒性試験並びにマウスを用いた薬理試験では紅斑は認められなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　エフガルチギモド

2.6.6.8.1.1　不純物の毒性評価

エフガルチギモド原薬中又は製剤中に存在する可能性のある不純物（3.2.S.3.2 及び 3.2.P.5.5）について以下に考察する。

毒性試験で使用された原薬ロットの不純物プロファイルは、臨床試験で使用されたロットの不純物プロファイルと同程度であり、また、市販を意図して生産したロットの不純物プロファイルとも類似していると考えられる。表 2.6.6-12 に概略を示した正当性に従って、12 週間の反復投与毒性試験における 3 種類の製造プロセス関連不純物の摂取量を、ヒトにおける推定最大摂取量と比較した（表 2.6.6-13）。

表 2.6.6-12　不純物評価の対象とした 12 週間反復皮下投与毒性試験

Study number	Type of study	DS	Batch number	Justification of choice of toxicity study
[redacted]36930	12 week + 12 weeks post-treatment observation in monkey. SC repeated-dose study	Efgartigimod SC	[redacted]	Use of relevant SC formulation of efgartigimod. Pivotal for local tolerance.
		Efgartigimod SC comixed with rHuPH20	[redacted]	Use of relevant SC formulation of efgartigimod and rHuPH20. Pivotal for local tolerance

Source: [redacted]36930
DS=drug substance; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous

12 週間毒性試験のエフガルチギモド投与群では、使用した原薬ロットでは十分に管理された不純物のみに低濃度曝露された。不純物の安全域は、理論上の最高濃度（定量上限）を用いて算出した。ヒトにおける不純物摂取量は、原薬の不純物の規格及び試験方法から算出され、推奨基準値を十分下回っていた。残留 HCP 及び[redacted] のレベルについては規制上の限界が存在しないため、リスクに基づくアプローチを用いてこれらのレベルについて考察する。

算出には以下の値を用いた：

- 原薬ロット[redacted] のエフガルチギモド濃度: 180 mg/mL。
- ヒトの摂取量評価：エフガルチギモド SC の臨床用量＝ 1000 mg q7d（1 サイクル＝4 週間）。
- カニクイザルの摂取評価：エフガルチギモド SC の最高用量＝ 100 mg/kg q7d。
  投与開始時の最高体重:3.9 kg。

表 2.6.6-13 の不純物に伴う潜在的リスクについて、以下のように考察した。

- 残留 HCP：
  残留 HCP への曝露に伴う潜在的な安全性上の懸念として、免疫原性、生物活性、製品相互作用が挙げられる。Bracewell らは、Risk Based Approach を用いて考察すべき判定基準として目標値 100 ng/mL（治療用蛋白質 100 ng/mg）を提案している（Bracewell, 2015）。このため、データを統合した評価が実施され、臨床での免疫原性データからは、検出された抗エフガルチギモド抗体の臨床的意義はなく、免疫原性及びこれに関連する可能性のある影響のリスクは低いと考えられると結論付けられた（5.3.5.3: ARGX-113-9023-ISI- Integrated summary of immunogenicity）。ヒトにおける投与 1 回当たりの残留 HCP 摂取量は、提案された判定基準より約 14 倍低いと推定された。したがって、エフガルチギモド SC 製剤中に含まれる HCP が患者に対する安全性上の懸念となる可能性は低いと考えられる。

- 残留 DNA：
  宿主細胞由来の残留 DNA への曝露に伴う潜在的な安全性リスクは、発がん性のリスクとゲノムへの組込みのリスクである。世界保健機構及び米国食品医薬品局は、最終産物中の残留 DNA（残留断片を含む）の基準値として 10 ng/dose、200 塩基対（機能性遺伝子のサイズ）と設定している。このレベル以下では、宿主細胞由来の残留 DNA の安全性リスクは無視できるものと考えられている（Yang, 2013; WHO, 2013; FDA, 2010）。ヒトにおけるエフガルチギモド曝露後の残留 DNA の推定摂取量は投与 1 回当たり [redacted] ng 未満であるため、公表されている許容限度の約 100 倍低い。したがって、エフガルチギモド SC 製剤中に含まれる残留 DNA が患者に対する安全性上の懸念となる可能性は低いと考えられる。

- 残留[redacted]：残留す[redacted]への曝露に関連する潜在的な安全性リスクは、[redacted]及び免疫学的反応である（[redacted]）。規制当局からは、最終製品中に残留する[redacted]の許容限度に関する勧告は公表されていない。残留[redacted]の一般的な許容限界値は[redacted]～[redacted] ng/mg の範囲である（[redacted]）。エフガルチギモド SC の基準値は≦[redacted] ng/mg A280 蛋白質である。ヒトにおけるエフガルチギモド曝露後の残留[redacted]の推定摂取量は投与 1 回当たり [redacted] µg 未満であり、これは提案された判定基準の約 10 倍低い。したがって、エフガルチギモド SC 製剤中に残留する[redacted]が患者に対する安全性上の懸念となる可能性は低いと考えられる。

表 2.6.6-13　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験における不純物の濃度とヒトにおける推定最大摂取量の比較

Test	Human exposure			Animal exposure			Comparisons	
	Proposed Acceptance Criteria	**[redacted] (reference standard HC) Results**	**Impurity Intake in Humans [a]**	**DS Batch [redacted] Target specification**	**DS Batch [redacted] Results**	**Impurity Intake in Monkey per Dose [b] Toxicology studies SC toxicity Study [redacted]36930**	**Impurity Intake per Dose (Animal / Human) [c]**	**Human Intake /Dose to Recommended Acceptable Limits or Acceptance Criteria [d]**
Residual host cell protein	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] µg/dose	<100[redacted] [redacted] protein	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] µg/dose	[redacted]	Margin: 14 [d]
Residual host cell DNA	[redacted] pg/mg A_{280} protein	[redacted] pg/mg A_{280} protein	[redacted] ng/dose	[redacted] pg/mg A_{280} protein	[redacted] pg/mg A_{280} protein	[redacted] ng/dose	[redacted]	Published limit: 10 ng/dose Margin: 100
Residual [redacted]	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] µg/dose	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] ng/mg A_{280} protein	[redacted] µg/dose	[redacted]	Margin: 10 [d]

Source: Specifications from: CTD module 3.2.S.4.1 Specifications and 3.2.S.4.4 Batch Analyses
DS=drug substance; NA=not applicable
Note: mg A280 protein refers to mg of efgartigimod

a A human dose corresponds to 1000 mg/dose and specifications are expressed in ng/mg where mg A280 protein = mg of efgartigimod, hence impurity intake is expressed in unit of impurities/dose of efgartigimod.

b Intake calculation in a 3.9 kg cynomolgus monkey: The highest dose corresponds to 100 mg/kg*3.9 kg= 390 mg of efgartigimod/dose and specifications are expressed in ng/mg where mg A280 protein = mg of efgartigimod, hence impurity intake is expressed in unit of impurities/dose of efgartigimod.

c The safety margin is calculated taking the theoretical highest possible impurity intake in monkey into account (when the results were below the limit of quantification (LOQ), the LOQ was considered as the highest theoretical possible impurity intake. Values are rounded.

d When recommendation by regulatory bodies were absent, safety margins were calculated based on acceptance criteria.

2.6.6.8.2　rHuPH20

抗 rHuPH20 抗体は内在性 PH20 と反応する可能性があるため、抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響を包括的に特徴づける試験を実施した。PH20 は精子先体に関連して成熟した雄性生殖器官で発現している（Martin-DeLeon, 2006）。したがって、抗 rHuPH20 抗体が内在性 PH20 と反応する可能性があることから、生殖能及び次世代の成長に対する抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響を評価した。マウスを用いた PPND 試験（R09058）の補足試験として実施した試験（12096）では、妊娠及び授乳中のマウス及びその出生児の循環血中抗 rHuPH20 抗体を測定した。ウサギでは雌雄の受胎能（EFD 及び出生後の評価を含む）を評価する試験を実施した（12208、12195）。これらの試験では、抗 rHuPH20 抗体産生させる目的で rHuPH20 を投与したため、rHuPH20 の曝露の確認は実施しなかった。

抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響をさらに検討するために、組織交差反応性試験を実施し、抗 rHuPH20 抗体がヒト組織に結合する可能性を評価した。また、SPAM1/PH20 遺伝子発現について RT-qPCR 法及び RNA-Seq 法により、様々な発達・成長段階のマウス、ウサギ及びヒト組織を用いて評価した。

2.6.6.8.2.1　生殖発生毒性試験における抗 rHuPH20 抗体の検討

2.6.6.8.2.1.1　マウス出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する抗 rHuPH20 抗体の影響

添付資料番号: 4.2.3.7.7-2（12096）

本試験は別途実施した PPND 試験（12195）の補足試験として実施した。rHuPH20 を投与した妊娠及び授乳期間のマウス F0 母動物並びに F1 胎児及び出生児への抗 rHuPH20 抗体の曝露を確認し、F1 児の発生及び発育に及ぼす影響の有無について評価した（2.6.7.17.2）。

妊娠 CD-1 マウス（対照群：雌 21 例/群、rHuPH20 投与群：雌 42 例/群）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）、3、6 及び 9 mg/kg/dose（330000、660000 及び 990000 U/kg/dose）の用量で連日皮下投与した。各群に 4 つのサブセットを設定した（表 2.6.6-14）。各サブセットの投与期間を表 2.6.6-15 に示した。血中 rHuPH20 が抗 rHuPH20 抗体の測定を妨害することを避けるために、最終投与後約 48 時間に F0 母動物及び F1 胎児/出生児から末梢血を採取した。また、血漿中ヒアルロニダーゼ活性測定用サブセットのマウスの血液サンプルは最終投与後約 2 時間に採取した。

抗 rHuPH20 抗体の有無はサブセット 1、2 及び 3 の血漿サンプルを用いて検討した。抗 rHuPH20 抗体が検出された F0 母動物及び F1 出生児から採取した血漿サンプルを用いて、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性を評価した。F0 母動物及び F1 児について、F0 母動物及び F1 児の生存率、一般状態、体重、分娩観察（F0 母動物のみ）、血漿中ヒアルロニダーゼ活性、抗 rHuPH20 抗体並びに剖検所見の評価を実施した。

表 2.6.6-14 抗 rHuPH20 抗体評価のための試験デザイン

Group	Test material	rHuPH20 (mg/kg/day)	rHuPH20 concentration (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Number of mice			
					Subset 1	Subset 2 [a]	Subset 3	rHuPH20
1	Control	0	0	5	6	9	3	3
2	rHuPH20	3	0.6	5	12	18	6	6
3	rHuPH20	6	1.2	5	12	18	6	6
4	rHuPH20	9	1.8	5	12	18	6	6

rHuPH20= recombinant human hyaluronidase PH20.
a Mice assigned to subset 2 were equally divided into three subgroups.

表 2.6.6-15 rHuPH20 の投与スケジュール

Subset	Subgroup	Days of Dose Administration
1	NA	DG 6 to DG 16
2	A	DG 6 to DL 4
	B	DG 6 to DL 13
	C	DG 6 to DL 21
3	NA	DG 6 to DL 21
rHuPH20	NA	DG 6 to DG18

DG= day of presumed gestation; DL= day of lactation; NA= not applicable; rHuPH20= recombinant human hyaluronidase PH20.

rHuPH20 投与に関連した死亡は認められなかった。6 及び 9 mg/kg/dose 群の母動物各 42 例中それぞれ 3 及び 5 例と低頻度の死亡が認められたが、rHuPH20 投与に関連した死亡は認められなかった。6 mg/kg/dose の 2 例及び 9 mg/kg/dose の 3 例が DG 17 又は DG 17 以降に死亡した。これらの死亡例は 1 例を除き、いずれも投与後 2 時間以内に死亡した。これらの早期死亡は、PPND 試験（GLP 適合、R09058）で認められた発現頻度と同程度であり、rHuPH20 との直接的な関連性はないと判断された。その他の 3 例の死亡は、6 mg/kg/dose の 1 例が出産後に出生児を喰殺したと推定されたため（体重の変化に基づく）、DG 19 に安楽死させ、9 mg/kg/dose の 2 例は妊娠時期算定を誤ったため安楽死させたことから、rHuPH20 との関連性はないと判断された。

抗 rHuPH20 抗体の測定では、rHuPH20 を投与した F0 母動物の全例で DG 18（母動物での初回サンプリング）までに抗 rHuPH20 抗体が検出され、DL 23（母動物での最終サンプリング）まで持続的に増加した。F1 胎児では、DG 18 のプール血漿で抗 rHuPH20 抗体が検出された。F1 出生児における力価の中央値は雌雄（雌雄毎に分けてプールした）ともに、DL 6 より DL 15 で高く、離乳時の DL 23 まで増加し、PND 60（最終の採取時点）まで検出された。

交差反応性に関する検討では、DG 18 に 65%以上の母動物で rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性が認められ、DL 6～23 には全例にみられた。F1 児では、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性がすべての時点（DG 18～PND 60）で確認され、PND 6～30 の間で最も高頻度に認められた。

以上のように、F0 母動物に rHuPH20 を投与したとき、抗 rHuPH20 抗体が F1 児に移行し、F1 児では妊娠後期から成熟までの発生段階を通して、抗 rHuPH20 抗体の曝露が認められた。この PPND 補足試験における抗 rHuPH20 抗体の血漿サンプル分析のスケジュールと、PPND 試験（GLP 適合）における神経系及び生殖器系の発達に関する評価を合わせると、母体の

妊娠後期から F1 出生児の成熟に至るすべての発達段階にわたって抗 rHuPH20 抗体に曝露しても、rHuPH20 を投与された母動物から生まれた出生児の発育、神経学的発達、性成熟、生殖機能又は生殖能に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.6.8.2.1.2　ウサギを用いた 3 種類の免疫感作条件による抗 rHuPH20 抗体産生の検討

添付資料番号: 4.2.3.7.7-3（12124）

本試験ではウサギに rHuPH20 を皮下又は筋肉内投与し、抗 rHuPH20 抗体価、抗体の発現率及び経時的変化を評価した（2.6.7.17.3）。ウサギを用いた EFD 及び出生後の発達に関する試験の実施に向けて、血漿採取時期を選択した（表 2.6.6-16）。

非妊娠雌及び雄 NZW ウサギに rHuPH20 を以下の 3 種類の初回感作条件で投与した。感作条件 1 では、雌 4 例に rHuPH20 を 0.05 mg/回の用量で、Day 1 にアジュバントとともに皮下投与し、Day 8、22 及び 36 にアジュバントとともに筋肉内投与した（表 2.6.6-16）。感作条件 2 では、雌 5 例にアジュバントを含まない rHuPH20 を 0.76 mg/kg/dose（83600 U/kg/dose）の用量で 28 日間連日皮下投与した（表 2.6.6-17）。感作条件 3 では、雄 2 例及び雌 5 例にアジュバントを含まない rHuPH20 を 0.76 mg/kg/dose（83600 U/kg/dose）の用量で週 1 回 5 週間にわたり皮下投与した（表 2.6.6-18）。対照群（雌 2 例）には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム、pH6.5）を 28 日間連日皮下投与した。抗 rHuPH20 抗体の力価を維持するため、すべての条件で、感作期間終了の約 2 週間後に追加感作を実施した。マウスを用いた EFD 試験（R08176）のマウス胎児の発生に対する NOAEL である 3 mg/kg に基づき、体表面積で換算した 0.76 mg/kg を設定した。

表 2.6.6-17 及び表 2.6.6-18 のとおりに雌雄のウサギから血液を採取したが、血漿中抗 rHuPH20 抗体価は雌のみで測定した。

表 2.6.6-16　免疫感作条件 1 のデザイン

Group	No. of animals	rHuPH20 (mg/day)	Dose volume (mL) [a]		Route [b]	Immunization (Study Day)	Blood collection timepoints (Study Day)
			rHuPH20	Adjuvant [c]			
1	4 females	0.2/0.1	0.1	0.1	SC/IM	1, 8, 22, 36, 57 [d]	Predose, 33, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 126

IM= intramuscular; rHuPH20= recombinant human hyaluronidase PH20; SC= subcutaneous.
a Immunization volumes on Day 1 were doubled for a total injection volume of 400 µL.
b Immunizations on Day 1 were delivered SC. All others were delivered IM.
c Adjuvant on Day 1 was Complete Freund's Adjuvant (CFA). All other immunizations used Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) as the adjuvant.
d The final injection on Day 57 was a booster injection delivered 2 weeks after the completion of the primary immunization period.

表 2.6.6-17　免疫感作条件 2 のデザイン

Group	No. of Animals	rHuPH20 (mg/day)	Dose volume (mL/kg)	Route	Dose administration (Study Day)	Blood collection timepoints (Study Day) [a]
2	2 females	0	0.5	SC	1-14 [a], 16-28, 43 [b]	Predose, 16, 30, 43, 57, 71, 85, 99, 112
3	5 females	0.76	0.5	SC	1-14 [a], 16-28, 43 [b]	Predose, 16, 30, 43, 57, 71, 85, 99, 112

rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC= subcutaneous.

a　Dose was not administered on Study Day 15 to allow for a drug washout period prior to blood collection on Day 16, which allowed for a 48-hour washout period.
b　The final injection on Study Day 43 was a booster injection delivered 2 weeks after the completion of the initial dose period.

表 2.6.6-18　免疫感作条件 3 のデザイン

Group	No. of Animals	rHuPH20 (mg/day)	Dose volume (mL/kg)	Route	Dose administration (Study Day)	Blood collection timepoints (Study Day)
4	5 females	0.76	0.5	SC	1, 8, 15, 22, 29, 50 [a]	Predose, 19, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 119
5	2 males	0.76	0.5	SC	1, 8, 15, 22, 29, 50 [a]	Predose, 19, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 119

rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC= subcutaneous.
a　The final injection on Study Day 50 was a booster injection delivered 2 weeks after the completion of the initial dose period.

rHuPH20 を投与した雌では、Day 33 から抗 rHuPH20 抗体価が上昇したが、溶媒対照では上昇しなかった。rHuPH20 を連日投与した動物（条件 2）では Day 30 で最大力価を示し、Day 57 まで定常状態を維持した。rHuPH20 を週 1 回投与した動物（条件 3）では同様の力価プロファイルを示し、最大力価は Day 50～64 に観察された。また、rRbPH20 に対する交差反応性が 80%超の動物で認められた。さらに、免疫蛍光標識及び IHC アッセイにおいて、これらの抗体が精子及び精巣組織における内在性ウサギ PH20 に対して結合することが示された。

アジュバントで感作した動物（条件 1）における抗 rHuPH20 抗体産生の経時変化は、条件 2 及び 3 と比較して遅く、Day 33～57 で抗体反応を示したが、最大力価は Day 71 で他の群と同程度であった。これらの結果は、雌ウサギにおける連日又は週 1 回の皮下投与による rHuPH20 感作条件によって持続的な高い力価を有する抗 rHuPH20 抗体を産生したことを示している。抗 rHuPH20 抗体は rRbPH20 に交差反応性を示したため、受胎能、EFD 及び PPND に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響を評価するための動物種として、ウサギは適切であると考えられた。

2.6.6.8.2.1.3　雄ウサギの授胎能及び生殖能に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響

添付資料番号: 4.2.3.7.7-4（12208）

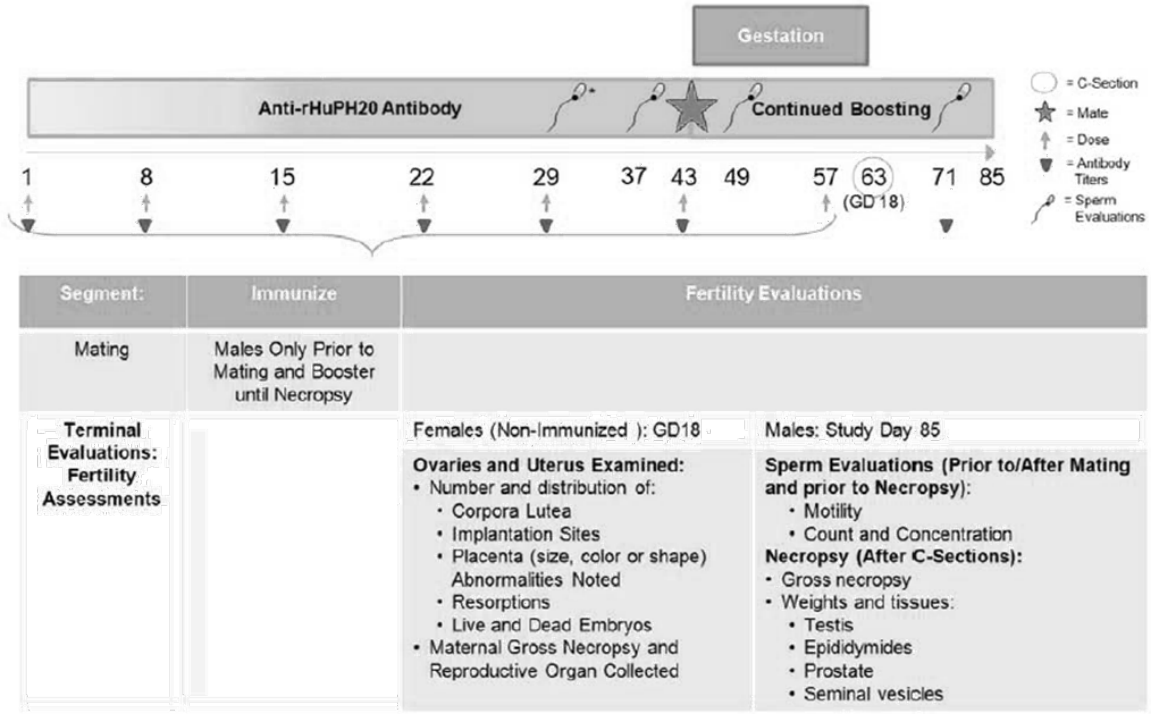
本試験では、反復皮下投与により抗 rHuPH20 抗体産生が確認された雄 NZW ウサギにおける生殖毒性を評価した。抗 rHuPH20 抗体の影響を、交配前は精子検査により評価し、着床までの期間は抗 rHuPH20 抗体陽性の雄動物と交配した無処置雌動物を帝王切開して評価した。本試験は、ICH S5（R2）ガイドラインで示されている生殖発生過程のステージ A（成熟雄動物の生殖機能、交尾行動、授胎能）及び B（雄親動物による影響）を評価するためにデザインされた（2.6.7.17.4）。

雄ウサギを 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L NaCl、pH6.5）及び rHuPH20 0.76 mg/kg/dose（rHuPH20 83600 U/kg に相当）の 2 群（22 例/群）に無作為に割り付けた。授胎能を評価するため、無処置雌動物 44 例を Day 44 の交配に用いた。雄動物に rHuPH20 を 0.76 mg/kg/dose の用量で交配前週 1 回（Day 1、8、15、22、29 及び 43）皮下投与して抗

rHuPH20 抗体を産生させ、精子検査、授胎能の評価及び Day 85 の試験終了までの期間を通じて抗体価を維持するため、Day 57 に再度投与した（図 2.6.6-1）。

一般状態、皮膚スコア、体重及び体重増加量、摂餌量、交尾行動、生殖能評価、卵巣及び子宮を評価した。抗 rHuPH20 抗体測定のため、雄動物の血漿サンプルを、投与前、Day 1、8、15、22、29、43、57 及び 85（剖検日）に採取した。抗 rHuPH20 抗体の抗体価を測定し、rRbPH20 に対する交差反応性を評価し、rHuPH20 及び rRbPH20 に対する中和活性について免疫比濁法を用いて評価をした。精液サンプルは、交配前の Day 37、交配後の Day 49 及び Day 71 に採取し、精子の運動性、数及び形態を検査した。雄の生殖能力を評価するため、DG 18 に交配した無処置雌動物を剖検し、卵巣及び子宮について、黄体数、着床数、胎盤、生存胎児及び死亡胚の数と分布を調べた。

図 2.6.6-1　雄ウサギの授胎能及び生殖能に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響評価に関する試験の概要



GD = Gestation Day

抗 rHuPH20 抗体は、rHuPH20 投与群の雄全例で Day 8 までに確認され、最終剖検日（Day 85）まで維持された。抗体価の中央値は Day 8 の 1600 から Day 29 の 2457600 に増加し、Day 29（2457600）から Day 85（6553600）の抗体価の中央値は 819200 以上で維持された。rRbPH20 に対する交差反応は、Day 15 で認められた後、発現率は Day 29 までに 100%に増加し、Day 29～Day 85 では 90%を超えていた。rHuPH20 に対する中和活性は、交配前日には rHuPH20 投与群の雄の大部分（82%）で検出された。rRbPH20 に対する中和活性も、評価した各時点の雄血漿サンプルの大部分（60%）で検出された。

雄では rHuPH20 又は抗 rHuPH20 抗体に起因する死亡は認められなかった。rHuPH20 投与群の雄と交配した無処置雌 1 例の死亡が DG 8 に認められた。

対照群と比較して、rHuPH20 に関連した体重、体重増加量及び摂餌量の変化は認められなかった。精子検査では抗 rHuPH20 抗体の影響は認められなかった。また、無処置雌動物では、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数、着床前/後胚損失率などの受胎能又は胚の評価に統計学的有意差は認められなかった。rHuPH20 投与群の雄で認められた rHuPH20 に関連した一般状態の変化は、投与後の投与部位の紅斑（グレード 1～3）のみであった。5 回目の投与後ではグレード 1、2 及び 3 の紅斑が rHuPH20 投与群 22 例中のそれぞれ 12、4 及び 1 例で認められた。紅斑は投与後 4 日以内に消失したことから、有害ではないと考えられた。。

以上、rHuPH20 投与群雄全例で交配前及び交配中に抗 rHuPH20 抗体産生が持続的に認められ、抗体価は精子検査及び授胎能の評価期間を通して維持された。ウサギの抗 rHuPH20 抗体は rRbPH20 に対する交差反応性及び中和活性を示したことから、雄の生殖能に対する抗 rHuPH20 抗体の影響を NZW ウサギで評価したことは適切であったと考えられる。精子検査及び交配した無処置雌の帝王切開による評価では、抗 rHuPH20 抗体に起因する有害な影響は認められなかったことから、交配前の抗 rHuPH20 抗体の持続的曝露は雄の生殖能、交尾行動又は授胎能に影響を及ぼさないと考えられた。

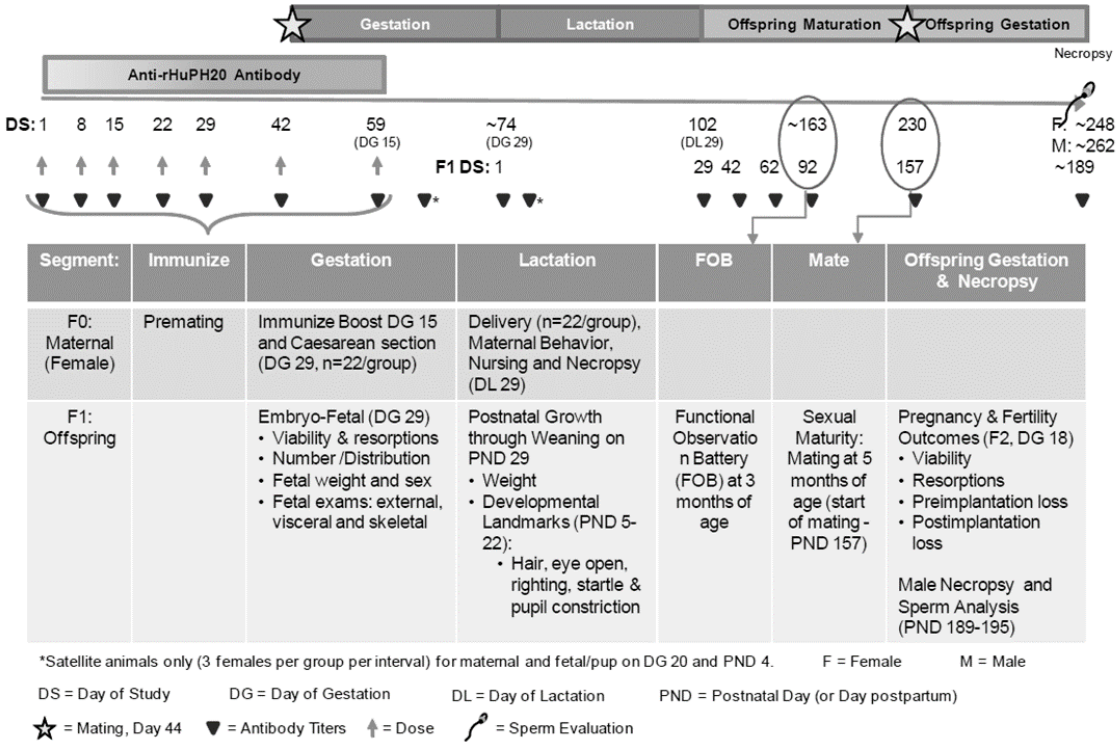
2.6.6.8.2.1.4　雌ウサギの受胎能、胚・胎児発生及び出生後の発達に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響の評価

添付資料番号: 4.2.3.7.7-5（12195）

本試験では、rHuPH20 の反復皮下投与により抗 rHuPH20 抗体産生が確認された雌 NZW ウサギにおける受胎能及び EFD を評価した。抗 rHuPH20 抗体を交配前及び交配期間中を通して産生させ、雌の交尾行動及び受胎能並びに着床から硬口蓋の閉鎖までの出生児の発生への影響を検討した。また、生後発達の進行度への影響を検討するため、出生児の発達、行動、活動及び生殖能を評価した。本試験は、ICH S5（R2）ガイドラインで示されている生殖発生過程のステージ A～F を評価するためにデザインされた。抗 rHuPH20 抗体測定のための血液サンプルを、雌親動物では交配前、妊娠期間中及び授乳期間中に採取し、また、F1 世代では胎児及び出生児の成熟までの期間中に採取した（2.6.7.17.5）。

雌ウサギを 0（溶媒：10 mmol ヒスチジン、130 mmol NaCl、pH6.0）及び rHuPH20 0.76 mg/kg/dose（rHuPH20 83600 U/kg に相当）の 2 群（44 例/群）に無作為に割り付けた。DS44 に交配し、妊娠 0 日（DG 0）とした。rHuPH20 を 0.76 mg/kg/dose の用量で Day 1、8、15、22、29 及び 42 に皮下投与して抗 rHuPH20 抗体を産生させ、抗体価を分娩まで維持するため、DG 15 に再度投与した。雌動物の半数を帝王切開し、残りの半数は自然分娩させた。また、母動物及び胎児／出生児の抗 rHuPH20 抗体測定用に、サテライト群（3 例/群/測定時点）を設定した（図 2.6.6-2）。

図 2.6.6-2　受胎能、EFD 及び出生後の発達に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響評価に関する試験の概要



母動物毒性は、交配前、妊娠及び授乳期間中を通して、一般状態、体重、摂餌量、皮膚スコアを基に評価した。雌動物は Day 44 に無処置雄動物と交配させた後、DG 29 に帝王切開を実施し、受胎能（黄体数、着床数、生存／死亡胎児数、早期／後期吸収胚数及び着床前／着床後胚損失率）及び胚・胎児毒性（胎児の生存、体重、性比、外表、内臓及び骨格）を評価した。自然分娩させた動物では、分娩、哺育行動、一般状態及び体重増加量を評価し、授乳期間終了後に安楽死させた。離乳前の出生児では、生存、一般状態、体重、摂餌量、発達パラメータ（毛生、眼瞼開裂、空中落下正向反射、聴覚驚愕反射及び瞳孔反射）を評価した。離乳児に各腹から同数の雌雄出生児（可能な限り雌雄各 1 例/腹）を無作為に選択し、成熟期間を通じて、体重、摂餌量、性成熟、神経行動学的検査、受胎能及び生殖パラメータを評価した。

抗 rHuPH20 抗体の特異的な結合及び抗体価を測定し、rRbPH20 に対する交差反応性を評価し、rHuPH20 と rRbPH20 の両方に対する中和活性を評価した。抗 rHuPH20 抗体測定のための血液サンプルを以下の時点で採取した：F0 母動物では投与前～Day 29 まで週 1 回、Day 42（交配前）、DG 15、DG 29、PND 4 及び PND 29。F0 母動物のサテライト群及び胎児／出生児で DG20 及び PND 4。F1 児で PND 29、42、62 及び 92、交配日（PND 152～167）並びに試験終了時（雌は DG 18、雄は PND 189～195）。rRbPH20 に対する交差反応性を同じ時点で評価した。rHuPH20 に対する中和活性は、F0 母動物で Day 42、DG 15 及び DG 29 に評価した。また、rRbPH20 に対する中和活性を、一部の F0 母動物で Day 42、DG 5 及び DG 29 に、サテライト群の F1 胎児（同腹胎児をプール）で DG 20 に並びに一部の F1 出生児

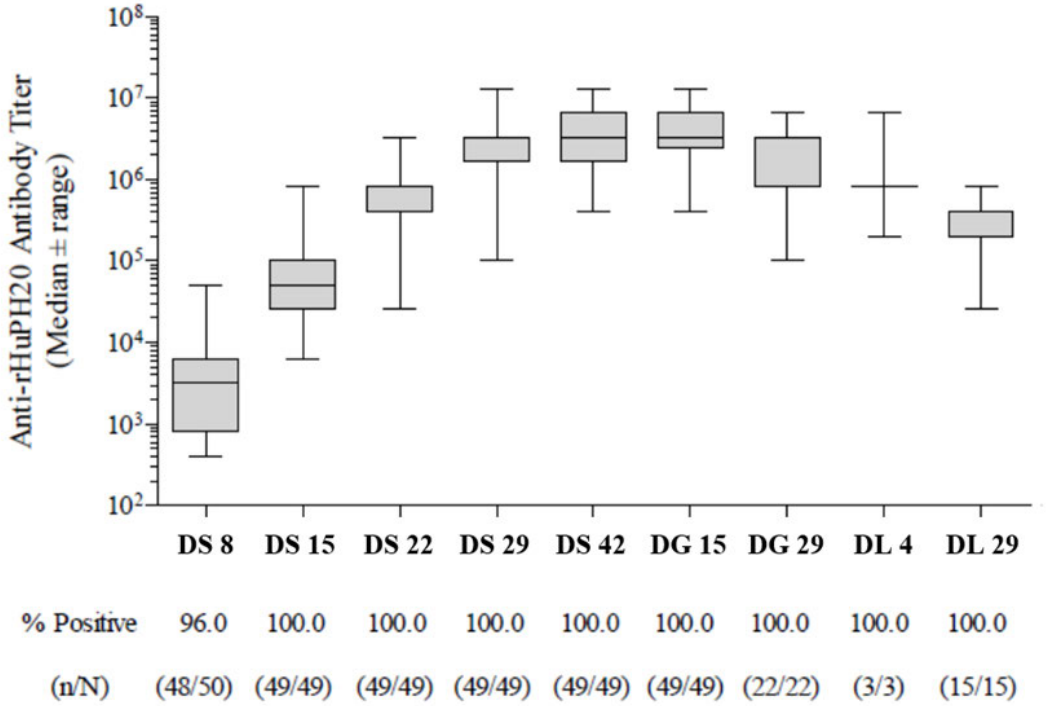
で PND 4 に評価した。溶媒対照群では、抗 rHuPH20 抗体への結合を Day 1 の投与前及び DG 29 に評価した。

F0 母動物では、溶媒対照群及び rHuPH20 群で 44 例中それぞれ 2 例及び 1 例の死亡が認められたが、死亡率は低く、rHuPH20 及び抗 rHuPH20 抗体との関連性はないものと考えられた。rHuPH20 群の 1 例の死亡は Day 9 にみられ、ヒトタンパク質投与による脱水及び過敏症に関連している可能性が高いと考えられたが、投与前後の一般状態の変化からは死因を特定することはできなかった。この動物では Day 8 の投与前に軽度の脱水、呼吸数減少及び重度の摂餌量減少が認められ、投与後に活動性低下と皮温低下がみられ、翌日に死亡が認められた。rHuPH20 投与群では他に死亡例が認められなかったことから、この死亡は rHuPH20 投与と直接関連するものではないと考えられた。溶媒対照群における早期死亡例及び流産例では、一般状態の変化が便の変化のみであったことから、原因を特定できなかった。rHuPH20 投与群の F1 出生児雌 22 例中 1 例の死亡が PND 69 に認められたが、1 例のみの死亡であったことから、抗 rHuPH20 抗体との関連はないと考えられた。

生存例では、一般状態、皮膚スコア、体重変化、摂餌量に rHuPH20 に関連した変化は認められなかった。

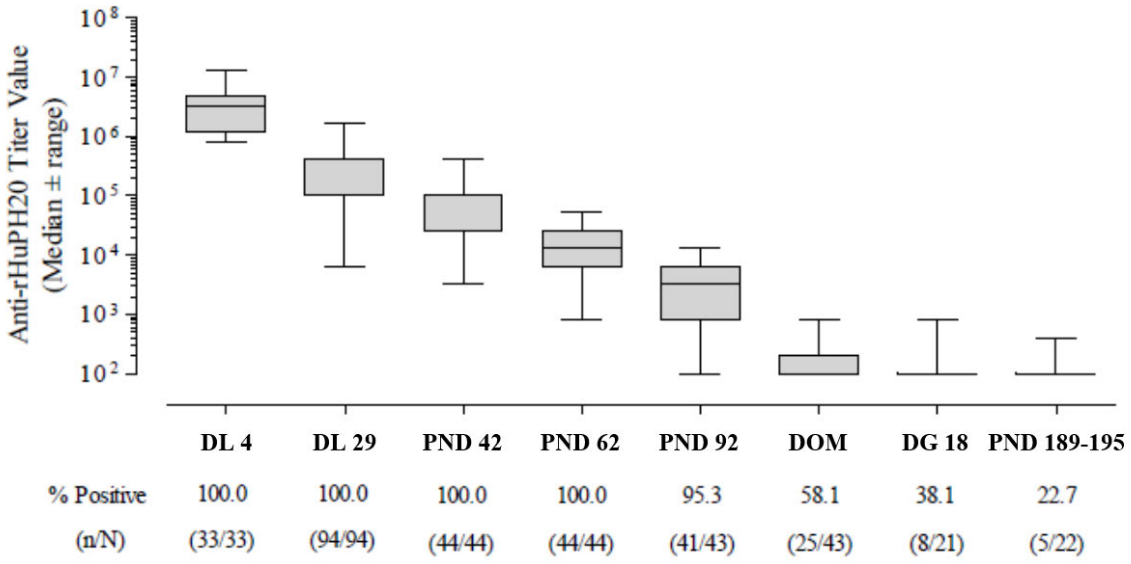
rHuPH20 投与群の母動物では交配前及び妊娠期間中の血漿中に抗 rHuPH20 抗体が検出された（図 2.6.6-3）。DG 20 の胎児では母動物から移行した抗 rHuPH20 抗体が検出された。rHuPH20 及び rRbPH20 に対する中和活性は、Day 42（交配前）、DG 15 及び DG 29 の母動物の血漿サンプルの大部分（>60%）で認められた。F0 母動物の受胎能（黄体数、着床数、生存及び死亡胎児、早期及び後期吸収並びに着床前及び着床後胚損失率）、EFD（胎児生存率、体重、性比並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査）に抗 rHuPH20 抗体による影響は認められなかった。

図 2.6.6-3　F0 母動物の抗 rHuPH20 抗体価（中央値 ± 範囲）



rHuPH20 投与群の自然分娩に供した母動物では、授乳期間を通して抗 rHuPH20 抗体が検出され、出生児では抗体価の中央値が DL 4 で最も高かった。rRbPH20 に対する中和活性は、Day 42 の母動物の血漿サンプルの 80%及び DL 4 の出生児の血漿サンプルの 30%で認められた。その後、出生児の抗体価は、母動物からの抗体の移行の減少に伴って徐々に減少した。出生児の交配時（最も遅くて PND 152）に出生児の 50%で抗 rHuPH20 抗体が認められ、抗 rHuPH20 抗体の維持が示された（図 2.6.6-4）。これらのデータから、抗 rHuPH20 抗体の子宮内曝露は、母動物の一般状態、出生児の一般状態、成長並びに出生後の発達（身体発達指標、行動、活動及び受胎能）に影響を及ぼさないことが示された。

図 2.6.6-4　F1 児の抗 rHuPH20 抗体価（中央値 ± 範囲）



DOM = day of mating

以上、雌ウサギの抗 rHuPH20 抗体は、rRbPH20 に対する交差反応性及び中和活性を示したことから、ウサギは抗 rHuPH20 抗体の安全性評価に適切な動物種であったと考えられる。母動物では交配前及び妊娠期間中に高い抗 rHuPH20 抗体価が認められたが、母動物の交尾行動及び受胎能に影響はみられなかった。母動物から胎児への抗 rHuPH20 抗体の移行が DG 20 にみられ、抗体価は出生児では出生直後（DL 4）に最も高く、離乳期間を通じて低下した。抗 rHuPH20 抗体は離乳後も持続して認められ、受胎能及び生殖能評価のために交配させた約 5 ヵ月齢の出生児の 50%以上に認められたが、出生児の離乳前及び離乳後の成長、成熟及び生殖能に影響を及ぼさなかった。

2.6.6.8.2.2　組織交差反応性試験

2.6.6.8.2.2.1　3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体のウサギ正常組織に対する交差反応性：免疫蛍光標識法及び免疫組織化学的（IHC）染色法の比較

添付資料番号: 4.2.3.7.7-6（12124-SR）

本試験では 3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体（Rb anti-rHuPH20 pAbs）のウサギ組織（精子、精巣及び結腸の腸管神経叢）に対する交差反応性を免疫蛍光標識法及び IHC 染色法により評価した（2.6.7.17.6）。異なる免疫感作条件（アジュバントを含む又は含まない rHuPH20 の連日又は週 1 回投与）で産生された 3 種類の Rb anti-rHuPH20 pAbs をアフィニティー精製し、ビオチン標識した。免疫蛍光標識法では、ビオチン化 Rb anti-rHuPH20 pAbs を精巣と結腸の腸管神経叢に添加し、次いで蛍光色素で標識したストレプトアビジンで検出した。ビオチン標識 Rb anti-rHuPH20 pAbs を用いて免疫蛍光標識法及び IHC 染色法により、精子、精巣及び腸管神経叢に対する交差反応性を評価した。IHC 染色については、検出システム及び測定条件の異なる 2 種の手法（IHC 染色法 1：

二次抗体にストレプトアビジンー西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を用いた染色法、IHC 染色法 2：感度を高めるため、高濃度のビオチン標識 Rb anti-rHuPH20 pAbs を IHC 染色法 1 よりも長時間反応させ、二次抗体にアビジン/ビオチン複合体を用いた染色法）で比較した。

免疫蛍光標識法では、3 種類の免疫感作条件で得られたビオチン標識 Rb anti-rHuPH20 pAbs は、精巣に強く結合したが、腸管神経叢に対する結合は弱かった。精子に存在する PH20 に対する結合性についても併せて検討した結果、Rb anti-rHuPH20 pAbs はいずれも精子に対し強い結合を示した。

IHC 染色法 1 及び 2 ともに、精巣、特に生殖細胞及び精細管内の精子に限局して Rb anti-rHuPH20 pAbs の交差反応性を示し、ウサギ精巣に対する抗 rHuPH20 抗体の反応性が確認された。腸管神経叢では IHC 染色法により結果が異なっていた。IHC 染色法 1 では、アジュバントを用いず rHuPH20 を感作した 2 種類の条件で得られた Rb anti-rHuPH20 pAbs でウサギの腸管神経叢に陽性シグナルは認められなかったが、アジュバントを用いて rHuPH20 を感作した Rb anti-rHuPH20 pAbs では腸管神経叢に弱い陽性シグナルが認められた。一方、IHC 染色法 2 では、3 種類のビオチン化 Rb anti-rHuPH20 pAbs で腸管神経叢に弱い陽性シグナルが認められた。腸管神経叢でみられた弱い陽性シグナルは、染色強度、色調及び細胞の局在性が精巣でみられた陽性シグナルと質的に異なっており、灰色、境界不明瞭かつ細胞質にびまん性にみられ、rHuPH20 又はウサギ IgG により 2 次抗体を前吸収処理することによって部分的な染色を示したことから、腸管神経叢でみられた陽性シグナルは非特異的な陽性シグナルであることが示された。

以上のように、免疫感作条件に関わらず、3 種類の Rb anti-rHuPH20 pAbs がウサギの精子及び精巣組織内のウサギ PH20 に交差反応性を示した。ウサギ結腸の腸管神経叢でみられた陽性シグナルは、非特異的と考えられた。

2.6.6.8.2.2.2　正常ヒト組織を用いたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体の組織交差反応性試験

添付資料番号: 4.2.3.7.7-7（12058）

本試験ではアフィニティー精製 Rb anti-rHuPH20 pAbs を用いて、ヒト組織における PH20 発現について評価した。Rb anti-rHuPH20 pAbs が 42 のヒト組織（各組織につき男女ドナー各 3 名）の内因性 PH20 に結合する可能性の有無について IHC 染色法を用いて評価した。さらに、Rb anti-rHuPH20 pAbs を rHuPH20 で前処置して、抗体結合を遮断することにより、Rb anti-rHuPH20 pAbs 染色の特異性を検討した（2.6.7.17.7）。この特異性解析では、PH20 を発現することが知られている組織（精巣）に加え、PH20 を発現することが知られていない組織（扁桃及び尿管）であった。

精巣の精細管にのみ、Rb anti-rHuPH20 pAbs の特異的で強い陽性シグナルが認められた。その染色性は、精子形成後期の精上皮細胞の細胞質に特異的にみられ、細胞膜でより強かった。この特異的結合は、Rb anti-rHuPH20 pAbs を rHuPH20 で前処置することによって阻害され、対照のウサギ IgG 又は一次抗体を含まない陰性対照では特異的な染色は観察されなかった。また、結腸（男性 3 名中 2 名及び女性 3 名中 1 名）及び食道（女性 3 名中 1 名及び男性 3 名中 0 名）の筋層内神経叢に特異的で弱い陽性シグナルが認められた。これらの組織では、細胞質のみ染色され、細胞膜は染色されなかった。この細胞質における陽性シグナルは

rHuPH20で前処置することによって阻害された。雌性生殖器官、滑膜及び軟骨などを含む他の大部分の組織では特異的な染色は認められなかった。

以上のように、Rb anti-rHuPH20 pAbsはヒト精巣では精細管の内腔近傍に位置する精上皮細胞（精子形成後期）にのみ染色を示し、ヒト結腸及び食道に局在する腸管神経叢の細胞質に弱い染色を示した。

2.6.6.8.2.2.3　正常ヒト組織を用いたヒト抗PH20抗体及びヒト抗rHuPH20抗体の組織交差反応性試験

添付資料番号: 4.2.3.7.7-8（13086）

本試験ではヒト組織に対するヒト抗PH20抗体及びヒト抗rHuPH20抗体の交差反応性を検討した結果、2試験から得られた患者サンプルに、抗PH20又は抗rHuPH20抗体価が認められた。rHuPH20ナイーブ患者の血漿試料には既存のヒトIgG、IgA、IgM（IgGAM）抗PH20抗体が含まれていたが、800~6400 Uのを3～4週間毎に皮下投与した患者の2つの試料では、IgGAM抗rHuPH20抗体が発現していた。

ヒト抗PH20抗体及び抗rHuPH20抗体を患者血漿サンプルからアフィニティー精製したヒト抗PH20抗体又はヒト抗rHuPH20抗体をビオチン標識（ビオチン標識ヒト抗体）し、精巣、結腸及び心臓のクリオスタットで薄切した正常ヒト組織切片（精巣：男性ドナー3名、結腸及び心臓：男女ドナー各3名）に対する結合性を評価した（2.6.7.17.8）。

すべての血漿サンプルから得たビオチンで標識したヒト抗体は、ヒト精巣内の精祖細胞に陽性シグナルを示した。心臓及び結腸でも、すべてのビオチン標識ヒト抗体による陽性シグナルがみられたが、その染色性はびまん性であり、不鮮明であり、色素顆粒も同時に染色されたことから、非特異的であると判断された。

以上のように、ヒト抗PH20抗体及び抗rHuPH20抗体はヒト組織の精巣に特異的に結合し、心臓及び結腸への結合は非特異的であった。

2.6.6.8.2.3　遺伝子発現解析試験

2.6.6.8.2.3.1　マウスにおけるSPAM1/PH20及びHYAL5遺伝子発現の定量的PCR解析

添付資料番号: 4.2.3.7.7-9（12196）

本試験ではマウスにおけるマウスSPAM1及びHYAL5（C57 Bl/6、CD-1、及びICR Balb/c）のRNA発現量及び組織局在性についてqPCRを用いて測定した。マウスSPAM1/PH20及びHYAL5は、ヒアルロニダーゼをコードする染色体6A2上に存在する遺伝子であり、主に、精巣及び精巣上体でmRNAが発現している。マウスSPAM1及びHYAL5遺伝子を発現する組織の特定のために、マウスSPAM1及びHYAL5に対する特異的qPCRプライマー／プローブセットを市販のcDNAの包括的なスクリーニングのために利用した。胎児、及び幼若（PND 1～21）並びに成熟マウスの組織を用いて、マウスSPAM1/PH20及びHYAL5の発現を定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析により評価した（2.6.7.17.9）。

SPAM1/PH20及びHYAL5の発現は、胎児全身（DG 7～DG 18）由来のcDNAで評価した。胎児の全身では、いずれの発生段階でもSPAM1/PH20の発現はみられなかった。一方、HYAL5の発現は、DG 16から検出され始めDG 18までに定常状態レベルまで増加した。

幼若マウスの精巣では、PND 7 に SPAM1/PH20 及び HYAL5 の発現はみられなかったが、PND 14 では 2 試料のうちの 1 試料で依然として低レベルであった。PND 21 までに成熟過程にある精巣において SPAM1/PH20 及び HYAL5 ともに高い発現が認められた。しかし、出生後のいずれの時点でも脳梁に SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

雌雄成熟マウスの生殖器官、骨格筋、皮膚、脳梁を含む広範囲の組織から RNA が分離された。qPCR 解析では、成熟雄マウスの精巣及び精巣上体、並びに雌の卵巣に SPAM1/PH20 の発現が認められたが、子宮頸部、子宮、又は膣では発現はみられなかった。SPAM1 mRNA は雌雄成熟マウスの骨格筋や脳梁では検出されなかった。HYAL5 は精巣と精巣上体で発現が認められた。

これらのデータから、マウス SPAM1/PH20 及び HYAL5 は主に精巣で発現しており、およそ PND 14～21 に発現し始めることが示唆された。さらに、両遺伝子は精巣上体でも低レベル（精巣と比較して約 1/250~1/350）で発現している。卵巣でも SPAM1/PH20 の発現は低い（精巣と比較して約 1/2000）。雌の生殖器官（すなわち、子宮頸部、子宮、膣）又は脳梁ではマウス SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

2.6.6.8.2.3.2　マウス脳梁における SPAM1/PH20 の発現

添付資料番号: 4.2.3.7.7-10（12210）

本試験はマウスの脳梁、脳皮質及び精巣における SPAM1/PH20 遺伝子の発現状態を明らかにするために実施した（2.6.7.17.10）。

遺伝的背景が異なる 3 系統（C57BL/6、Nu/Nu 及び SCID）の成熟雄マウス（17~19 週齢）の脳梁、脳皮質及び精巣を摘出した。脳梁は PH20 を発現することが報告されていないため、陰性対照とした。一方、成熟雄マウスの精巣を陽性対照とした。全 RNA を各組織（1 系統につき 3 例）から単離し、逆転写して、124、440、および 588 塩基対の増幅産物に対応するポリメラーゼ連鎖反応用の cDNA を生成した。3 系統のマウスから抽出した精巣由来の RNA 試料では 3 つの SPAM1/PH20 プライマーセットで PCR 増幅産物が検出された。3 系統のマウスの SPAM1/PH20 転写産物の増幅産物は脳梁又は脳皮質では検出されなかった。この結果から、いずれの系統のマウスでも、精巣に SPAM1/PH20 の発現が認められたが、脳梁及び脳皮質には SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

2.6.6.8.2.3.3　精巣及び結腸の腸管神経叢を含むウサギの特定組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の RT-qPCR 解析

添付資料番号: 4.2.3.7.7-11（13091）

本試験では成熟ウサギの特定組織における SPAM1/PH20 mRNA の発現について検討した。

雌雄の成熟 NZW ウサギ（5 ヵ月齢）の脳梁、脳皮質、精巣及び結腸の腸管神経叢（それぞれ雌雄各 3 例の組織）を用いて、RT-qPCR 解析により SPAM1/PH20 の発現を評価した（2.6.7.17.11）。

すべての精巣に SPAM1/PH20 の高い発現が認められたが、脳皮質、脳梁及び腸管神経叢には SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

2.6.6.8.2.3.4　ウサギの胎児、胎児及び成体組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

添付資料番号: 4.2.3.7.7-12（13116）

本試験では成熟ウサギ（5 ヵ月齢）及びウサギ胎児組織、並びに幼若ウサギ（1～4 ヵ月齢齢）の生殖組織及び神経組織における SPAM1 mRNA の器官毎の経時的な発現について検討した（2.6.7.17.12）。成熟ウサギでは軟骨、結腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、骨格筋、精巣、子宮頸部、子宮、膣から RNA を抽出した（2.6.7.17.12）。

DG 11、14 及び 17 の胎児では、全身の組織から RNA を抽出し、DG 20、23、26 及び 29 の胎児では、結腸、心臓、卵巣、膵臓、胎盤、小腸、胃及び精巣から RNA を抽出した。RNA は幼若雄ウサギの脳梁、皮質、精巣上体、精巣からも分離され、これらの RNA 試料から cDNA を作製し、ウサギ SPAM1、β-アクチン、ネスチンに特異的なプライマーを用いた定量的 PCR 法の鋳型として用いた。検討したすべての試料では β-アクチンが高レベルで発現していた。神経幹細胞のマーカーであるネスチンの発現は、脳皮質と脳梁で認められた。本試験では成熟雄の精巣を陽性対照とした。

検討した成熟ウサギの 13 組織では、SPAM1/PH20 発現は精巣でのみ検出された。

DG 14~23 の胎盤では、SPAM1/PH20 の低い発現が認められたが、DG 26 には検出されなかった。DG 11、14 及び 17 の胎児では、SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。幼若ウサギでは脳梁及び脳皮質に SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。3 ヵ月齢の精巣に SPAM1/PH20 の低い発現が認められ、4 ヵ月齢では発現は著しく増加した。また、4 ヵ月齢の精巣上体に SPAM1/PH20 の低い発現が認められた。

以上のように、ウサギの胎生期では胎盤にのみ SPAM1/PH20 の一過性で低い発現が認められた。成熟ウサギでは、主に精巣及び精巣上体に SPAM1/PH20 の発現がみられた。胎児、幼若及び成熟ウサギの検討した他の組織における SPAM1 は、全て、定量的 PCR 解析では定量下限未満であった。

2.6.6.8.2.3.5　ヒト結腸の腸管神経叢における SPAM1/PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

添付資料番号: 4.2.3.7.7-13（12147）

本試験ではヒト腸管神経叢における SPAM1/PH20 発現の有無について明らかにするために組織交差反応性成績との直交法を用いて検証した（2.6.7.17.13）。ヒト腸管神経叢由来の cDNA 試料について、定量的 PCR 解析を用いて SPAM1 mRNA 転写産物の有無を評価した。ヒト精巣由来の cDNA 試料を陽性対照として用いた。

腸管神経叢を豊富に含むヒト結腸（7 サンプル）から抽出した RNA を cDNA に逆転写し、ヒト SPAM1/PH20 に特異的なプライマー／プローブセットを用いた qPCR により解析した。すべてのヒト結腸の腸管神経叢において SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

以上のように、ヒト精巣で SPAM1 mRNA の発現を確認できたが、ヒト結腸の腸管神経叢では SPAM1 mRNA の発現は認められなかった。

2.6.6.8.2.3.6　ヒト成人及び胎児組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の RT-qPCR 解析

添付資料番号: 4.2.3.7.7-14（12197）

本試験ではヒト成人及び胎児組織における SPAM1/PH20 の発現量及び組織局在性について RT-qPCR を用いて検討した（2.6.7.17.14）。ヒト成人及び胎児の神経組織、消化管、生殖器官、その他の内臓及び支持組織を用いて SPAM1 mRNA の発現の有無を確認した。

SPAM1 の cDNA 発現スクリーニングで同定された 14 の成熟組織から全 RNA を抽出し、さらに RT-qPCR により解析した。これら 14 組織のうち、SPAM1/PH20 発現は雄性生殖器で最も高かったが、骨／軟骨、精巣上体、腎臓、胎盤、骨格筋、滑膜細胞を含む他の組織でも検出限界（LOD）に近似した低いレベルで検出された。同様に、SPAM1 の cDNA 発現スクリーニングで同定された 9 種類の胎児組織から全 RNA を抽出し、さらに RT-qPCR により解析した。9 種類の胎児組織のうち、6 種類の組織は SPAM1 遺伝子発現陽性で、結腸、卵巣、膵臓、小腸、胃、及び精巣で低レベルの SPAM1/PH20 発現が認められた。ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養細胞では、SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

以上のように、RT-qPCR 解析の結果、主に成人の精巣に SPAM1/PH20 の発現が認められ、成人の骨/軟骨、精巣上体、腎臓、胎盤、骨格筋及び滑膜細胞、並びに胎児の結腸、卵巣、膵臓、小腸、胃及び精巣に低い発現がみられた。一方、いずれの神経組織及び神経細胞には SPAM1/PH20 の発現はみられなかった。

2.6.6.8.2.3.7　ヒト、マウス及びウサギ由来の成人/成体及び胎児組織における SPAM1/PH20 及び他のヒアルロニダーゼ遺伝子発現の RNA-Seq 解析

添付資料番号: 4.2.3.7.7-15（14077）

本試験ではヒト、マウス及びウサギ組織における SPAM1/PH20 及びヒアルロニダーゼをコードする他の遺伝子（HYALl、HYAL2、HYAL3 及び HYAL4）の発現プロファイルを検討した（2.6.7.17.15）。

ヒト、マウス（CD-1、C57Bl/6、ICR 及び Webster）の成人／成体組織（骨／軟骨、脳、脳梁、腎臓、胎盤、骨格筋、前立腺、皮膚、滑膜、精巣、精巣上体、腸管神経叢）、胎児組織（結腸、腎臓、前立腺、小腸、胃、卵巣、精巣、膵臓）、初代培養細胞（ヒト神経細胞、並びにヒト及びラットのアストロサイト及びオリゴデンドロサイト前駆細胞）並びに 1、2、3 及び 4 ヵ月齢のウサギ（NZW）の成体組織（皮質、脳梁、精巣上体、精巣）及び DG 23 の胎児組織（結腸、胎盤、小腸、胃）を用いて、RNA-Seq 法により SPAM1/PH20、HYALl、HYAL2、HYAL3 及び HYAL4 の発現量を評価した。

ヒト及びマウスの SPAM1 mRNA が定常的に発現していた組織は、成人／成体の精巣のみであった。ウサギでは、生後 4 ヵ月齢から定常的に SPAM1 mRNA の発現がみられる組織は、雄性生殖器（精巣及び精巣上体）のみであった。以上の RNA-Seq 解析の結果から、SPAM1/PH20 の発現が高度に特異的であり、マウス、ウサギ、ヒトの成人／成体の雄性生殖器官に限定されることが示された。脳、脳梁、腸神経叢を含む神経組織から単離した RNA サンプルでは SPAM1/PH20 の発現は検出されなかった。これは、mRNA レベルで広範な組織で発現する他のヒアルロニダーゼ遺伝子と対照的であった。

HYALl、2 及び 3 の発現が、ヒト、マウス及びウサギの成人/成体及び胎児において脳、脳梁及び腸管神経叢などの神経由来組織を含む様々な組織並びに初代培養細胞に認められた。HYAL4 の低い発現が、ヒトの成人及び胎児組織並びにウサギ成体組織の一部にみられた。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 エフガルチギモド

エフガルチギモドの静脈内投与による毒性学的並びに TK プロファイルはエフガルチギモド点滴静注製剤の初回製造販売承認申請時に評価されている。静脈内投与は、化合物の全身曝露に関して最も過酷な投与経路であるため、エフガルチギモドの静脈内投与で実施した試験成績に基づいて、エフガルチギモドを単独で皮下投与した場合や rHuPH20 とともにエフガルチギモドを皮下投与した場合の潜在的な全身毒性を評価することは可能であると考えている。したがって、これらのデータを皮下投与経路の評価に適用するため、カニクイザルを用いた 12 週間反復投与毒性試験及びニュージーランドホワイトウサギを用いた局所刺激性試験を実施した。さらに、KLH 免疫後のカニクイザルにおける体液性及び T 細胞応答に対するエフガルチギモド投与による影響の有無について検討するためエフガルチギモドの 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験を実施した。

反復投与毒性試験

12 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.2）において、カニクイザルにエフガルチギモドを単独又は rHuPH20 と混合して反復皮下投与したときの全身毒性を検討した。

エフガルチギモド SC の忍容性は良好であり、試験した最高用量まで毒性学的に意義があると考えられる全身毒性所見は認められなかったことから、2000 U/mL の rHuPH20（0.01 mg/kg）を混合した場合及び混合しない場合の NOAEL はいずれも最高投与量である 100 mg/kg と判断された。

100 mg/kg のエフガルチギモドを単独で、又は 30 若しくは 100 mg/kg のエフガルチギモドを rHuPH20 と混合して週 1 回投与の頻度で皮下投与したところ、リンパ節腫大及び脾臓の腫大が散見されたが、エフガルチギモドの用量との間に明らかな関連性は認められなかった。回復期間終了時にも限定的であったが散発的に認められた。脾臓の病理組織学的検査では、リンパ組織及び赤脾髄の過形成が対照群及び回復群を含む全用量群で散発的に認められ、リンパ節の所見（組織球症、リンパ球過形成、散発的及び軽度の細胞浸潤）は、対照群及び回復群を含む全用量群に散在して認められた。これらの所見は、ヒト以外の霊長類におけるヒト由来 IgG-Fc に対する免疫応答による二次的影響である可能性も考えられるが、脾臓重量の変化、脾臓の組織病理学的変化、リンパ節の大きさの変化及びリンパ節の組織病理組織学的変化（特に腸間膜リンパ節）は、カニクイザルにおける自然発生性の変化である可能性が高いと考えられる（Everds, 2019; Chamanza, 2010）。

Day 15 以降、抗エフガルチギモド抗体の陽性反応が観察されたが、用量と抗エフガルチギモド抗体の産生に明らかな相関性は認められなかった。したがって、抗エフガルチギモド抗体とリンパ節及び脾臓の腫大所見と関連する可能性は低いと考えられた。血清中エフガルチギモド濃度推移に抗エフガルチギモド抗体の明らかな影響は認められなかったことから、TK 評価から抗エフガルチギモド抗体陽性例を除外しなかった。

非臨床の供試動物種での抗エフガルチギモド抗体産生が、ヒトにおける抗エフガルチギモド抗体産生の可能性を予測するものではないと考えられている［ICH ガイドライン S6（R1）］。臨床試験でも抗エフガルチギモド抗体の陽性反応が観察されたが、PK、PD 及び安全性への明らかな影響は認められなかった（ARGX-113-1907）。

トキシコキネティクス

TK 評価は反復投与で実施した毒性試験で実施し、曝露量を確認した。採血による過度の出血を避けるために、採血時点は可能な限り制限した。エフガルチギモドを静脈内投与したときと同様に、皮下投与したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}144h}$ は用量に応じて増加し、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(表 2.6.6-5、表 2.6.6-9)。

局所刺激性

エフガルチギモドの単回皮下投与後の局所刺激性は、ウサギを用いた局所刺激性試験（GLP 遵守）で評価した、すべての動物に、2000 U/mL の rHuPH20 と混合したエフガルチギモド（ロット [redacted]）を 180 mg/mL の濃度で、皮下投与では 1 mL、筋肉内投与では 0.25 mL を単回投与した。筋肉内投与は投与過誤の可能性のある投与経路として選択した。被験物質投与部位と対照投与部位との間で、Draize スコアや病理組織学的観察所見に差はなかった（2.6.6.7.1.1）。

反復投与後の局所刺激性を検討する上で最も重要なデータは、カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.2）から得られた。rHuPH20 と混合しなかったエフガルチギモド SC 単独の 100 mg/kg 投与群では rHuPH20 による拡散促進効果（Connor, 2020; Frost, 2007）が認められず、投与後に薬液が迅速に拡散しなかったため、投与部に浮腫が時折認められた。浮腫（又は腫脹）は断続的に認められたのみであり、発赤は認められなかった。浮腫又は腫脹の程度は反復投与により悪化しなかった。回復期間中では投与部位の外表所見は認められなかった。浮腫及び腫脹は投与手技によるものであり、被験物質による影響である可能性は低いと考えられた。さらに、投与終了時の剖検では、皮下出血又は肥厚が対照群を含む全群で認められ、投与手技による影響と考えられた。

投与部位の病理組織学的所見として、rHuPH20 と混合又は混合しないエフガルチギモド SC を投与した用量群で、皮下組織における軽微から軽度のリンパ球、好中球性及び好酸球性の炎症性細胞浸潤、並びに真皮におけるリンパ球性の細胞浸潤が認められ、用量の増加に伴って発現頻度が増加した。エフガルチギモド SC の 100 mg/kg と rHuPH20 と混合投与しても、エフガルチギモド SC の 100 mg/kg 単独投与群と比較して炎症反応が亢進することを示す徴候は認められなかった。エフガルチギモド SC の 100 mg/kg と rHuPH20 混合投与群又はエフガルチギモド SC の 100 mg/kg 単独投与群の投与部位に、軽微から軽度の好酸性のタンパク様無細胞性物質が認められたが、これは投与後に沈着した被験物質の遺残物と解釈された。投与部位局所の病理組織学的変化は、回復期間終了時には完全に回復することが示された。

以上のように、非臨床試験において、エフガルチギモド SC［ヒスチジン/ヒスチジン塩酸塩一水和物（20 mmol/L）、L-メチオニン（10 mmol/L）、塩化ナトリウム（100 mmol/L）、ショ糖（60 mmol/L）及びポリソルベート 20（0.03% w/v）、pH6.0 を含有する製剤］単独投与又は rHuPH20 と混合投与による局所刺激性の徴候は認められなかったと結論された。非臨床製剤と臨床製剤の違いはポリソルベート 20 の濃度（非臨床製剤 0.03%に対し臨床製剤 0.04%）のみであることから、臨床製剤とほぼ同等と考えられる。ポリソルベート 20 は、静脈内、筋肉内及び皮下の投与経路を含む非経口適用を意図した良く知られた不活性成分である（Le Basle, 2020）。

したがって、臨床使用に際して、エフガルチギモド皮下投与製剤による局所刺激性のリスクは低いと考えられる。

免疫毒性

カニクイザルを用いた 11 週間反復静脈内投与による TDAR 試験において、エフガルチギモド（用量：100 mg/kg、投与頻度：週 1 回）を静脈内投与した際のモデル抗原に対する反応への影響の有無について検討した（2.6.6.3.1.3）。最悪の場合を想定して、カニクイザルでは、最大の薬力学的効果（最大の IgG 減少）に達した後に KLH を投与した。初回 KLH 免疫後の液性免疫（IgM、IgG）及び細胞性免疫応答にはエフガルチギモド投与群と対照群では差は認められなかった。最大の薬力学的効果に達していた Day 56 に、2 回目の KLH を接種したところ、エフガルチギモド投与群では KLH 特異的 IgG レベルが、予想した通り、対照群よりわずかに低かった。IgM と T 細胞応答はエフガルチギモド投与によって低下しなかった。回復期間の Day 29 の KLH 追加接種後でも、エフガルチギモド投与群と溶媒対照群で IgG を含むすべての免疫応答は同様であったことから、エフガルチギモド投与が免疫学的機能を損なわないことが確認され、IgG の一過性の減少が唯一の影響であることが示された。

不純物

毒性試験に用いられた原薬ロットの不純物プロファイルは、臨床試験に用いられたロット及び市販用製剤に使用する予定のロットの不純物プロファイルと同等であった（2.6.6.8.1.1）。

12 週間の反復投与毒性試験における 3 種類の製造プロセス関連不純物の摂取量を、ヒトにおける推定最大摂取量と比較した（2.6.6.8.1.1）。毒性試験では、製造プロセス関連不純物（HCP、残留 DNA、残留[redacted]）の濃度は、規格値／適否の判定基準で許容されている濃度と同程度かそれを下回っていた。文献情報に基づいて検討した結果、ヒトへの使用に対する明らかな懸念は認められなかった（2.6.6.8.1.1）。

2.6.6.9.2　rHuPH20

rHuPH20 の皮下投与による非臨床毒性試験として、カニクイザルを用いた 7 日間連日及び 39 週間週 1 回反復投与毒性試験、マウスを用いた EFD 試験、マウスを用いた PPND 試験及び幼若マウスを用いた生涯投与毒性試験を GLP に準拠して実施した。HA はいずれの動物種においても発現しており、構造に差はないことから（Hascall, 2017）、マウス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。また、ウサギでは母体 IgG の胎盤移行時期がヒトと類似していることから（DeSesso, 2012）、抗 rHuPH20 抗体が受胎能、EFD 及び出生児の成熟に及ぼす影響をウサギを用いて評価した。

カニクイザルに rHuPH20 を 1 日 1 回又は週 1 回皮下投与したところ、検討した最高用量まで投与部位及び全身に対する忍容性は良好であり、7 日間又は 39 週間反復投与毒性試験のいずれにおいても死亡及び rHuPH20 の有害作用は認められなかった。カニクイザルを用いた 7 日間連日反復投与毒性試験では、静脈内投与に比べて皮下投与時の血漿中ヒアルロニダーゼ活性は低かった。本試験では抗 rHuPH20 抗体産生の評価を実施しなかったが、7 日間連日静脈内又は皮下投与後に AUC の約 25%の減少が認められた。本試験では、試験期間を通して rHuPH20 の全身曝露が認められたため、rHuPH20 の静脈内及び皮下投与に関連する潜在的なリスクを適切に評価できたと考えている。

カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験では、投与部位皮下の血管周囲に有害作用ではない可逆的で軽微なリンパ形質細胞浸潤が認められた以外に、いずれの評価パラメータにおいても rHuPH20 投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。週 1 回反復皮下投与による rHuPH20 の全身曝露は 2 mg/kg/dose 群では限定的に認められた。血漿中ヒアルロニダーゼ活性値は 0.02 及び 0.2 mg/kg/dose 群ではほとんどのサンプルで定量下限未満であったが、2 mg/kg/dose 群では少なくとも雄で 6 ヵ月間、雌では 9 ヵ月間認められた。反復投与したときに認められた rHuPH20 の曝露量の減少は抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性と関連していると考えられた。抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性に関連した有害な影響は認められなかった。

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

rHuPH20 の生殖発生毒性試験として、マウスを用いた EFD 用量設定試験、EFD 試験及び PPND 試験を実施した。EFD 試験では、妊娠マウスに DG 6～15 に 1 日 1 回皮下投与したところ、9 mg/kg/dose 以上の用量で胚・胎児毒性を示し、吸収胚の増加、同腹児数の減少、胎児重量の減少が認められた。その他に EFD に対する影響は認められなかった。の影響は認められなかった。PPND 試験では、妊娠マウスに DG 6～DG 22 又は DL 20 に 1 日 1 回皮下投与したところ、9 mg/kg/dose（最高用量）まで母動物の生殖能並びに F1 出生児の生存率、性成熟、学習・記憶能及び生殖能に有害な影響は認められなかった。

反復投与毒性試験、EFD 試験及び PPND 試験における無毒性量、ヒト等価用量（HED）及び安全域を 2.6.4.3.2.3 に示す。

幼若マウスに rHuPH20 を 1、3 及び 9 mg/kg/dose の用量で 1 日 1 回又は週 1 回皮下投与したところ、忍容性は良好であり、いずれの用量においても有害作用は認められなかった。

幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験では、幼若マウスに rHuPH20 を 1 mg/kg/dose の用量で PND 7～30 に連日皮下投与し、その後、PND 129 又は PND 241 まで週 1 回皮下投与した。慢性毒性評価サブセットの雌雄で投与部位の皮下組織に軽微から中等度の有害作用ではない病理組織学的変化（主として、皮下組織の混合細胞性炎症を伴うこともある皮下組織内の混合細胞浸潤）が rHuPH20 投与に関連して認められたが、その他に rHuPH20 投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。rHuPH20 投与群の全例で抗 rHuPH20 抗体の産生が認められ、抗 rHuPH20 抗体によるヒアルロニダーゼ中和活性及び遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）に対する交差反応性が高頻度に認められた。神経行動学的評価、生殖能、胎児評価及び成熟までの期間に評価したその他の毒性エンドポイントに、rHuPH20 の 1 mg/kg/dose 又は抗 rHuPH20 抗体による有害作用は認められなかった。

局所刺激性の評価は、サルを用いた反復投与毒性試験及びマウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験で実施した。一部の試験で投与部位に軽微な変化が認められたが、有害作用ではないと考えられた。全体として、供試動物への rHuPH20 の静脈内及び皮下投与は忍容性が良好であり、いずれの毒性試験においても局所刺激性を示唆する変化は認められなかった。

PH20 は精子先体に局在しており（Martin-DeLeon, 2006）、受精時の卵母細胞の精子侵入を促進することが報告されている（Lin, 1994）。抗 rHuPH20 抗体は内在性 PH20 と反応する可能性があることから、抗 rHuPH20 抗体が受胎能及び出生児の成長・発達に及ぼす影響の有無について検討する目的で、一連の補足的な生殖発生毒性試験を実施した。CD-1 マウスを用いた PPND 試験（GLP 不適合）では、妊娠中及び授乳中の母動物並びに F1 児（胎児及び出生児）の血中抗 rHuPH20 抗体を測定したところ、妊娠後期から F1 児が成熟に至る発達・成長過程を通じて、F1 児で抗 rHuPH20 抗体の曝露が確認された。抗 rHuPH20 抗体は rMuPH20 及び rMuHyal5 に対して交差反応性であることも示された。ウサギでは、雌雄の受胎能（EFD 及び出生後の評価を含む）に対する影響を評価するために 2 試験を実施した。これらの試験では、雌雄の受胎能、EFD 並びに出生児の発達及び生殖能に対する抗 rHuPH20 抗体の影響は認められなかった。これらの試験における抗 rHuPH20 抗体は、rRbPH20 に対して交差反応性及び中和活性を示したことから、抗 rHuPH20 抗体の安全性を NZW ウサギで評価したことは適切であったと考えられる。

抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響をさらに検討するために、組織交差反応性試験を実施し、抗 rHuPH20 抗体がヒト組織に結合する可能性を評価した。先に実施したヒト組織交差反応性試験（GLP 不適合）では、Rb anti-rHuPH20 pAbs による強い特異的染色が精巣の精細管でのみ認められ、ヒト食道及び結腸に局在する腸管神経叢に弱い染色がみられた。しかし、その後に実施したヒト抗 rHuPH20 抗体及びヒト抗 PH20 抗体を用いたヒト組織交差反応性試験（GLP 適合）では腸管神経叢に染色はみられなかったことから、ヒト抗 rHuPH20 抗体及びヒト抗 PH20 抗体は精巣にのみ特異的に結合すると考えられた。

PH20 の発現に関する文献報告の結果を確認するため、SPAM1/PH20 遺伝子の発現を RT-qPCR 法及び RNA-Seq 法を用いて評価した。RT-qPCR 法では、SPAM1/PH20 遺伝子の発現がヒト、マウス及びウサギの成人男性/成熟雄の生殖器で高く、その他の組織では定量下限に近い値であった。しかしながら、RNA-Seq 法では、SPAM1/PH20 遺伝子の発現がヒト、マウス及びウサギの成人男性/成熟雄の生殖器のみで認められ、その他の組織では検出されなかった（Martin-DeLeon, 2006）。

2.6.6.9.3 全体の結論

100 mg/kg までの用量のエフガルチギモドを皮下又は静脈内に反復投与した結果、カニクイザルにおいて良好な忍容性を示した。ヒト臨床使用に際し、懸念すべき安全性に関する影響は認められなかった。

KLH に対する一次及び二次免疫応答は、エフガルチギモドの 100 mg/kg の用量では阻害されず、投与期間中の抗原特異的 IgG の低レベルが唯一の関連する変化であり、回復期間の KLH 追加接種に対する免疫応答への影響は観察されなかった。

ウサギ及びカニクイザルにおいて、エフガルチギモド SC 製剤単独又は rHuPH20 と混合したエフガルチギモド SC 製剤の皮下投与時の局所刺激性は、100 mg/kg までの用量で忍容性が確認された。得られた成績から、ヒト臨床使用に際し、エフガルチギモド皮下投与製剤による局所刺激性のリスクは低いと考えられる。

エフガルチギモドのカニクイザルを用いた週 1 回の皮下投与による反復投与毒性試験の NOAEL は、2000 U/mL の rHuPH20（0.01 mg/kg）混合の有無にかかわらず、最高用量である 100 mg/kg であった。

rHuPH20 の臨床使用を支持するための一連の毒性試験を実施した。反復投与試験では rHuPH20 の忍容性は良好であり、rHuPH20 投与に関連すると考えられる変化は、可逆的で軽微な有害作用と判断されない変化が認められたのみであった。rHuPH20 の皮下投与時の全身曝露は高用量のみで確認された。EFD 試験では、9 mg/kg/dose 以上の用量で胚・胎児毒性が認められたが、催奇形性はみられなかった。補足的な生殖発生毒性試験において、抗 rHuPH20 抗体は、雌雄の受胎能、EFD、出生児の成長に対して有害な影響を示さなかった。組織交差反応性試験及び遺伝子発現解析試験では、PH20 が主に成人男性及び成熟雄の生殖器で検出された。以上の毒性試験成績より、rHuPH20 の皮下投与での臨床使用を支持すると考えられた。

2.6.6.10　参考文献

[redacted]

Bracewell DG, Francis R, Smales CM. The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control. Biotechnol Bioeng. 2015;112(9):1727-37.

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

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

DeSesso JM, et al. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. Crit Rev Toxicol. 2012; 42:185-210.

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

[redacted]

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

[redacted]

Hascall V., Esko J.D. Hyaluronan. In: Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. editors. Essentials of Glycobiology. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 16.

ICH guideline S6 (R1) – Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. MHLW/PFSB/ELD Notification No.0323-1; March 23. 2012.

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.

Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: A review. J Pharm Sci. 2020 Jan;109(1):169-90.

Lin Y, et al. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. J Cell Biol. 1994; 125:1157-63

Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. Mol Cell Endocrinol. 2006; 250:114-21.

US FDA, Guidance for Industry: Guidance for industry on estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Pharmacology and Toxicology, July 2005. Available at: https://www.fda.gov/media/72309/download, accessed 27 Feb 2023.

US FDA, Guidance for Industry: Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications, February 2010. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production, accessed 02 July 2021.

WHO, Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2010 Annex 3 in: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report. Geneva, World Health Organization, 2013 (WHO Technical Report Series, No. 987) Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs_978_annex_3.pdf?sfvrsn=fe61af77_3&download=true , accessed 02 July 2021.

Yang H. Establishing acceptable limits of residual DNA. PDA J Pharm Sci Technol. 2013;67(2):155-63.

[redacted]

目次

2.6.7　毒性試験概要表....3
2.6.7.1　毒性試験：一覧表....3
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表....8
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧....10
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧....14
2.6.7.5　単回投与毒性試験....16
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験....17
2.6.7.6.1　サルを用いた 7 日間反復皮下又は静脈内投与毒性試験....17
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験....18
2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験....36
2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験....36
2.6.7.10　がん原性試験....37
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験....38
2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験....39
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験....40
2.6.7.13.1　マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験....40
2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験....42
2.6.7.14.1　マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験....42
2.6.7.15　新生児を用いた試験....44
2.6.7.15.1　幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験....44
2.6.7.16　局所刺激性試験....48
2.6.7.17　その他の毒性試験....49
2.6.7.17.1　資料保管施設....49
2.6.7.17.2　マウス出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する抗 rHuPH20 抗体の影響....50
2.6.7.17.3　ウサギを用いた 3 種類の免疫感作条件による抗 rHuPH20 抗体反応の検討....53
2.6.7.17.4　雄ウサギ授胎能及び生殖能に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響....55
2.6.7.17.5　雌ウサギの受胎能、胚・胎児発生及び出生後の発達に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響の評価....57
2.6.7.17.6　3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体のウサギ正常組織に対する交差反応性：免疫蛍光標識法及び免疫組織化学的（IHC）染色法の比較....60
2.6.7.17.7　正常ヒト組織を用いたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体の組織交差反応性試験....60
2.6.7.17.8　正常ヒト組織を用いたビオチン標識ヒト抗 PH20 抗体及びヒト抗 rHuPH20 抗体の組織交差反応性試験....61
2.6.7.17.9　マウスにおける SPAM1/PH20 及び HYAL5 遺伝子発現の定量的 PCR 解析....61
2.6.7.17.10 マウス脳梁における SPAM1/PH20 の発現....62
2.6.7.17.11 精巣及び結腸腸神経叢を含むウサギの特定組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の RT-qPCR 解析....62

2.6.7.17.12 ウサギの胎児、幼若及び成体組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析 63
2.6.7.17.13 ヒト結腸腸神経叢における SPAM1/PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析 63
2.6.7.17.14 ヒト成人及び胎児組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の RT-qPCR 解析 64
2.6.7.17.15 ヒト、マウス及びウサギ由来の成人/成体及び胎児組織における SPAM1/PH20 及び他のヒアルロニダーゼ遺伝子発現の RNA-Seq 解析 65

2.6.7　毒性試験概要表

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses [a] (mg/kg)	GLP compliance	Test article: efgartigimod		
						Testing facility	Study number	Location
Single-dose toxicity								
This section was not updated								
Repeat-dose toxicity								
12 weeks + 12 weeks post-treatment observation	Monkey/ cynomolgus	SC	12 weeks	0 (vehicle with 0.01 mg/kg rHuPH20), 30 and 100 with 0.01 mg/kg rHuPH20 q7d 100 q7d	Yes	[redacted], Germany	[redacted]36930	Module 4.2.3.2-1
11 weeks + 9 weeks post-treatment observation (TDAR)	Monkey/ cynomolgus	IV	11 weeks	0 (vehicle), 100 q7d [b]	Yes	[redacted], UK	[redacted]8459761	Module 4.2.3.2-2
Genotoxicity								
Not performed	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Carcinogenicity								
Not performed	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reproductive and developmental toxicity								
This section was not updated								

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses [a] (mg/kg)	GLP compliance	Test article: efgartigimod		
						Testing facility	Study number	Location
Local tolerance								
Local tolerance study with 48 and 96 hours, as well as 14 days post-treatment observation	Rabbit/New Zealand White	SC and IM	Single dose	1 mL/animal (180 mg) + 2000 U/mL rHuPH20 SC 0.25 mL/animal (45 mg) + 2000 U/mL rHuPH20 IM	Yes	[redacted], Germany	[redacted]37107	Module 4.2.3.6-1
Other toxicity studies								
Amendment to Final Reports to clarify details concerning archiving.	various	various	various	various	Yes	[redacted], Germany	ARGX-PTBA-0223 Linked to main study reports [redacted]36930, 37107	Module 4.2.3.7.7-1

AUC=area under the curve; GLP=Good Laboratory Practice; IM=intramuscular; IV=intravenous; NA=not applicable; q7d=once weekly; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous; TDAR=T-cell dependent antibody response; TK=toxicokinetics

Notes:

The test facility [redacted], Germany changed their name to [redacted] effective as of [redacted] 202[redacted] and subsequently informed argenx that the facility will 'close' and go into liquidation procedures (Module 4.2.3.7.7-1, Amendment to report ARGX-PTBA-0223).

Study materials of studies conducted at [redacted] were transferred to sponsor appointed archiving facilities. Because of this, update of the TK assessment for the re-estimation of AUCs using the linear-up, logarithmic down trapezoidal method, could not be amended to reports of studies conducted and were reported separately (Module 4.2.2.7-2, [redacted]22046).

a　Unless otherwise specified. For repeat-dose toxicity, the highest no observed adverse effect level (NOAEL) is underlined.

b　Based on in-life examinations; no necropsy (actual dose: 102.4 mg/kg).

Overview							Test Article: rHuPH20	
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses,[a] mg/kg/dose**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Halozyme Report**	**Location**
Single-Dose Toxicity		Dedicated studies were not deemed necessary, but single ascending doses were evaluated in Pharmacokinetics Report No. R07060.						
Repeat-Dose Toxicity								
Nonpivotal	Monkey/ Cynomolgus	IV and SC, once daily	7 days	5 (550000 U/kg)	Yes	[redacted][b]	R08056	4.2.3.2-3
Pivotal	Monkey/ Cynomolgus	SC, once weekly	39 weeks	0.02; 0.2; 2.0 (2200; 22000; 220000 U/kg)	Yes	[redacted]	R09050	4.2.3.2-4
Genotoxicity		No studies were deemed necessary.						
Carcinogenicity		No studies were deemed necessary.						
Reproductive and Developmental Toxicity								
Embryo-fetal Development Dose range-finding	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-15	1; 3; 10; 30 (110000; 330000; 1100000; 3300000 U/kg)	No	[redacted][c]	R07046	4.2.3.5.2-1
Embryo-fetal Development Pivotal	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-15	3; 9; 18[d] (330000; 990000; 1980000 U/kg)	Yes	[redacted]	R08176	4.2.3.5.2-2
Pre/postnatal Development Pivotal	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-DL 20 or DG 22	3; 6; 9 (330000; 660000; 990000 U/kg)	Yes	[redacted]	R09058	4.2.3.5.3-1
Juvenile Toxicity Dose range-finding	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily or weekly	PND 7-42	1; 3; 9 (110000; 330000; 990000 U/kg)	No	[redacted]	13123	4.2.3.5.4-1
Life-time Toxicity	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily or weekly	PND 7-30 once daily, then weekly until PND 129 or PND 241	1 (110000 U/kg)	Yes	[redacted]	15028	4.2.3.5.4-2
Local Tolerance		Local tolerance was assessed as part of the repeat-dose toxicity and developmental and reproductive toxicity studies.						
Other Toxicity Studies								
Antigenicity		No studies were deemed necessary.						
Impurities		No studies were deemed necessary.						
Mechanistic		No studies were deemed necessary.						
Other								
Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies in Developmental and Reproduction Toxicity Studies								

Overview							**Test Article: rHuPH20**	
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses,[a] mg/kg/dose**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Halozyme Report**	**Location**
Satellite Pre/postnatal Development	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily	DG 6-DL 20 or DG 22	3; 6; 9 (330000; 660000; 990000 U/kg)	No	[redacted]	12096	4.2.3.7.7-2
Immunization Procedures	Rabbit/ NZW	SC / IM SC SC	Days 1,8, 22, 36, 57 Days 1-14, 16-28, 43 Days 1, 8, 15, 22, 29, 50	0.1 mL rHuPH20 + 0.1 mL adjuvant 0.76 0.76	No	Halozyme[e]	12124	4.2.3.7.7-3
Effects of ADA on Female Fertility and Embryo-fetal development and PPND Assessments	Rabbit/ NZW	SC	Days 1, 8, 15, 22, 29, 42 and 59 (DG 15)	0.76	Yes	[redacted]	12195	4.2.3.7.7-5
Effects of ADA on Male Fertility	Rabbit/ NZW	SC	Days 1, 8, 15, 22, 29, 43, 57	0.76	Yes	[redacted]	12208	4.2.3.7.7-4
Tissue Cross-Reactivity Studies								
ADA Characterization/Tissue Cross Reactivity	Rabbit/ NZW	NA – in vitro study Rabbit anti-rHuPH20 antibody/Rabbit Tissues			No	Halozyme	12124-SR	4.2.3.7.7-6
Tissue Cross Reactivity	Human	NA – in vitro study Rabbit anti-rHuPH20 antibody/ Human tissues			No	[redacted][f]	12058	4.2.3.7.7-7
Tissue Cross Reactivity	Human	NA – in vitro study Human anti-rHuPH20 antibody / Human tissues			Yes	[redacted]	13086	4.2.3.7.7-8
Gene Expression Studies								
Gene Expression	Mouse/ C57 Bl6, CD-1, ICR Balb/c	NA – in vitro study RT-qPCR/fetal, juvenile, adult tissues			No	Halozyme	12196	4.2.3.7.7-9
Gene Expression	Mouse/ C57 Bl/6, Nu/Nu, SCID	NA – in vitro study RT-qPCR/ corpus callosum			No	Halozyme	12210	4.2.3.7.7-10
Gene Expression	Rabbit/ NZW	NA – in vitro study RT-qPCR/ several tissues			No	Halozyme	13091	4.2.3.7.7-11
Gene Expression	Rabbit/ NZW	NA – in vitro study RT-qPCR/fetal, juvenile, adult tissues			No	Halozyme	13116	4.2.3.7.7-12

Overview							Test Article: rHuPH20	
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses, [a] mg/kg/dose**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Halozyme Report**	**Location**
Gene Expression	Human	NA – in vitro study RT-qPCR/ human tissues			No	Halozyme	12147	4.2.3.7.7-13
Gene Expression	Human	NA – in vitro study RT-qPCR/ human tissues			No	Halozyme	12197	4.2.3.7.7-14
Gene Expression	Human, Mouse/CD-1, C57Bl/6, ICR, Webster, Rabbit/ NZW	NA – in vitro study Deep RNA sequencing			No	Halozyme	14077	4.2.3.7.7-15

IV = intravenous; SC = subcutaneous; IM = intra-muscular; DG = day of (presumed) gestation; DL = day of lactation; PPND = pre/postnatal development; PND = postnatal day; ADA = anti-drug antibody; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; U = units of hyaluronidase activity; NZW = New Zealand White.

a For repeat-dose toxicity and pivotal reproductive and developmentalstudies, the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) is underlined

b [redacted]

c [redacted]

d Developmental NOAEL is 3 mg/kg/dose, while maternal NOAEL is 18 mg/kg/dose.

e Halozyme Therapeutics, Inc., 11388 Sorrento Valley Road, San Diego, CA 92121.

f [redacted], UK.

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

		Overview of toxicokinetics studies		Test article: efgartigimod		
Type of study	**Test system**	**Method of administration**	**Doses (mg/kg)** [a]	**GLP compliance**	**Study number**	**Location**
Repeat-dose toxicity						
12 weeks	Monkey/ cynomolgus	SC	0 (vehicle with 0.01 mg/kg rHuPH20), 30 and <u>100</u> with 0.01 mg/kg rHuPH20 q7d <u>100</u> q7d	Yes	[redacted]36930	Module 4.2.3.2-1
11 weeks	Monkey/ cynomolgus	IV	0 (vehicle), <u>100</u> q7d	Yes	[redacted] 8459761	Module 4.2.3.2-2

IV=intravenous; q7d=once weekly; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous
a　Unless otherwise specified. For repeat-dose toxicity, the highest no observed adverse effect level (NOAEL) is underlined.

Overview of Toxicokinetics Studies				**Test Article: rHuPH20**		
Type of Study	**Species/Strain**	**Method of Administration**	**Dose (mg/kg/dose)**	**GLP Compliance**	**Halozyme Report**	**Location**
7-day repeat-dose toxicity study	Monkey/ Cynomolgus	IV and SC	5 (550000 U/kg) Once daily	Yes	R08056	4.2.3.2-3
39-week repeat-dose toxicity study with a 4-week recovery period	Monkey/ Cynomolgus	SC	0.02; 0.2; 2.0 (2200; 22000; 220000 U/kg) Once weekly	Yes	R09050	4.2.3.2-4
Embryo-fetal development	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC	3; 9; 18 (330000; 990000; 1980000 U/kg) Once daily	Yes	R08176	4.2.3.5.2-2
Juvenile dose range-finding	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC	1; 3; 9 (110000; 330000; 990000 U/kg) Once daily or weekly	No	13123	4.2.3.5.4-1

SC = subcutaneous; IV = intravenous; U = units.

2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Dose (mg/kg)	Sex	Study Number C_{max} (µg/mL)	Study Number AUC (µg·h/mL)	Test Article: efgartigimod Study Number	Test Article: efgartigimod Location
Monkey					
12 weeks + 12 weeks post-treatment observation [a]					
Day 1 to day 7			$AUC_{0\text{-}144h}$		Module 4.2.3.2-1 Module 4.2.2.7-2
30 [b] q7d	M	215 [c]	**8551±1761**	[redacted] 36930 22046	
30 [b] q7d	F	201 [c]	**8328±1061**	[redacted] 36930 22046	
100 [b] q7d	M	435 [c]	**22357±2995**	[redacted] 36930 22046	
100 [b] q7d	F	461 [c]	**21741±2898**	[redacted] 36930 22046	
100 q7d	M	259 [c]	**19270±3396**	[redacted] 36930 22046	
100 q7d	F	234 [c]	**17498±4825**	[redacted] 36930 22046	
Day 85 to day 91			$AUC_{0\text{-}144h}$		
30 [b] q7d	M	534 [c]	**12011**	[redacted] 36930 22046	
30 [b] q7d	F	208 [c]	**6488**	[redacted] 36930 22046	
100 [b] q7d	M	585 [c]	**34030**	[redacted] 36930 22046	
100 [b] q7d	F	402 [c]	**22182**	[redacted] 36930 22046	
100 q7d	M	377 [c]	**25143**	[redacted] 36930 22046	

Dose (mg/kg)	Sex	Study Number C_{max} (µg/mL)	 AUC (µg·h/mL)	Test Article: efgartigimod Study Number	 Location
100 q7d	F	378 [c]	**19973**	[redacted] 36930 22046	Module 4.2.3.2-1 Module 4.2.2.7-2
11 weeks + 9 weeks post-treatment observation					
Week 3			AUC_{0-168h}		Module 4.2.3.2-2
100 q7d	M	3260±311	32400±4490	[redacted] 8459761	
100 q7d	F	3330±190	30900±2550	[redacted] 8459761	
Week 3 (pooled data M+F)			AUC_{0-168h}		
100 q7d	M+F	3290±233	31700±3370	[redacted] 8459761	

AUC=area under the curve; $AUC_{x\ yh}$=area under the concentration-time curve from time x to the last quantifiable serum concentration >LLOQ and where y h was the last sampling time point that was considered for this evaluation; C_{max}= maximum observed concentration; F=female; h=hour; LLOQ=lower limit of quantification; M=male; PK=pharmacokinetics; q7d=once weekly; TK=toxicokinetics

Notes:

Note that individual animals were excluded from PK assessment (see Module 2.6.6). AUC values were re-calculated in study [redacted] 22046 for study [redacted] 36930.

Standard deviation (±SD) is only presented if given in the original report.

a　Re-calculated data are in bold. For a depiction of the marginal differences, refer to Table 2.6.7.7.A.

b　Co-administered with 0.01 mg/kg rHuPH20.

c　Values obtained from serum analysis; all other values calculated by TK analysis.

Overview of Toxicokinetics Data					Test Article: rHuPH20		
Dose /Route	**Parameter**	**Monkey/Cynomolgus**		**Study Duration**	**GLP Compliance**	**Halozyme Report**	**Location**
		Day 1 [a]	**Day 7** [a]				
5 mg/kg/dose IV	Mean AUC_{0-T} (U·h/mL) Mean $AUC_{0-\infty}$ (U·h/mL) Mean C_{max} (U/mL) Median T_{max} (min) Mean V_{ss} (mL/kg)	11800 11883 NC NC 17.0	8733 8800 NC NC 16.7	7 days	Yes	R08056	4.2.3.2-3
5 mg/kg/dose SC	Mean AUC_{0-T} (U·h/mL) Mean $AUC_{0-\infty}$ (U·h/mL) Mean C_{max} (U/mL) Median T_{max} (min) Mean V_{ss} (mL/kg)	641.7 NC 200 60 NC	501.7 NC 115 60 NC				
Dose /Route	**Parameter**	**Monkey/Cynomolgus**		**Study Duration**	**GLP Compliance**	**Halozyme Report**	**Location**
		Male	**Female**				
0.02 mg/kg/dose SC	Below baseline plasma levels	-	-	39 weeks	Yes	R09050	4.2.3.2-4
0.2 mg/kg/dose SC	Below baseline plasma levels	-	-				
2 mg/kg/dose SC	Day 1: $AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL) C_{max} (U/mL) T_{max} (h) Day 85: $AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL) C_{max} (U/mL) T_{max} (h) Day 183: $AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL) C_{max} (U/mL) T_{max} (h) Day 267: $AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL) C_{max} (U/mL) T_{max} (h)	20.5 12.5 2.0 177 28.8 6.0 89.6 12.0 4.0 NC NC NC	47.8 20.8 2.0 395 64.7 4.0 467 64.2 4.0 56.2 10.0 4.0	39 weeks	Yes	R09050	4.2.3.2-4

Overview of Toxicokinetics Data				**Test Article: rHuPH20**		
Dose / Route	**Parameter**	**Mouse/Crl:CD1(ICR)**	**Study Duration**	**GLP Compliance**	**Halozyme Report**	**Location**
3 mg/kg/dose SC	DG 6: Mean C_{max} (U/mL) $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL) DG 15: Mean C_{max} (U/mL) $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL)	3.44 5.45 20.9 55.1	DG 6-15	Yes	R08176	4.2.3.5.2-2
9 mg/kg/dose SC	DG 6: Mean C_{max} (U/mL) $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL) DG 15: Mean C_{max} (U/mL) $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL)	30.5 45.3 17.1 79.0				
18 mg/kg/dose SC	DG 6: Mean C_{max} (U/mL) $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL) DG 15: Mean C_{max} (U/mL) $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL)	49.6 120 99.2 363				
Dose/Route	**Parameter**	**Mice, Crl:CD1(ICR)**	**Study Duration**	**GLP Compliance**	**Halozyme Report**	**Location**
		Male / **Female**				
1 mg/kg/dose SC 3 mg/kg/dose SC 9 mg/kg/dose SC	Below baseline plasma levels Below baseline plasma levels Below baseline plasma levels	- - -	PND 7-42	No	13123	4.2.3.5.4-1

- = below detection limit; NC= Not calculable due to below baseline plasma levels; IV= intravenous; SC= subcutaneous; M= male; F= female; $AUC_{0\text{-}last}$= area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; $AUC_{0\text{-}\infty}$= area under the plasma activity-time curve from time 0 to infinity; C_{max}= maximum observed plasma concentration; T_{max}= time to maximum observed plasma concentration; NC= not calculated; V_{ss}= volume of distribution at steady-state.
[a] Combined genders (2M and 2F).

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Batch no.	Drug substance specification							Test article: efgartigimod	
	Purity (%)		Specified impurities						
PROPOSED SPECIFICATION:	[redacted] %, reducing CE-SDS	[redacted] %, GP HPLC	Aggregates: [redacted] %	CHO DNA: [redacted] pg/mg A_{280} protein	[redacted]: [redacted] ng/mg A_{280} protein	CHO host cell protein: [redacted] ng/mg A_{280} protein	Endotoxin [a]: [redacted] EU/mg A_{280} protein	Location Study number	Type of study
Batch: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Module 4.2.3.2-1 [redacted]36930	12 weeks + 12 weeks post-treatment observation in monkeys (SC)
Batch: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Module 4.2.3.2-2 [redacted] 8459761	Evaluation of TDAR response 11Week + 9 Week Recovery Period (IV)

CE-SDS=capillary electrophoresis; CHO=Chinese hamster ovary; DNA=deoxyribonucleic acid; Fc=fragment crystallizable; GP HPLC=gel permeation high-performance liquid chromatography; IV=intravenous; SC=subcutaneous; TDAR=T-cell-dependent antibody response

Notes:

Section 3.2.S.2.6 describes these batches in more detail.

a　In the commercial presentation the proposed specification is [redacted] EU/mL which corresponds to [redacted] EU/mg protein, taking into account the lowest end of the protein concentration range of [redacted] mg/mL and a safety margin of [redacted] EU/mL

Toxicology: Drug Substance				Test Article: rHuPH20		
Batch No.	Purity (%) [a]	Specified Impurities (%) 類縁物質A＊ 不純物B＊	不純物A＊	Halozyme Report	Location	Type of Study
[redacted] [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	R08056	4.2.3.2-3	Repeat-dose toxicity (GLP)
[redacted] [c]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	R09050	4.2.3.2-4	Repeat-dose toxicity (GLP)
[redacted] [d]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	R07046	4.2.3.5.2-1	Reproductive and developmental toxicity (non-GLP)
[redacted] [e]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	R08176	4.2.3.5.2-2	Reproductive and developmental toxicity (GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	R09058	4.2.3.5.3-1	Pre/postnatal development (GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	13123	4.2.3.5.4-1	Other toxicity studies (non-GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	12096	4.2.3.7.7-2	Other toxicity studies (non-GLP)
[redacted] (females) [redacted] (males)	- -	- -	- -	12124	4.2.3.7.7-3	Other toxicity studies (non-GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	12195	4.2.3.7.7-5	Other toxicity studies (GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	12208	4.2.3.7.7-4	Other toxicity studies (GLP)
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	15028	4.2.3.5.4-2	Other toxicity studies (GLP)

- = information not available.

a Source for drug substance purity is the certificate of analysis appended to the final study report unless otherwise noted.

b Source: [redacted] Certificate of Analysis.

c Source: [redacted] Certificate of Analysis.

d Source: [redacted] Statement of Testing.

e Source: [redacted] Certificate of Analysis.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

Test Article: rHuPH20

Dedicated single-dose toxicity studies with rHuPH20 were not conducted. Single ascending doses were evaluated in Pharmacokinetics Report No. R07060 / 4.2.2.2-3

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No additional materials related to this application.

2.6.7.6.1 サルを用いた 7 日間反復皮下又は静脈内投与毒性試験

Report Title: A 7-Day Repeat Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys		**Test Article: rHuPH20**
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing:** 7 days	**Halozyme Report** R08056
Initial Age: Approximately 3 years	**Duration of Postdose:** None	**Location in CTD:** 4.2.3.2-3
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV or SC, once daily	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle/Formulation: 10 mM histidine, 130 mM NaCl, pH6.0 in Sterile Water for Injection, USP		**Lot Number:** [redacted]
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg (IV, SC)		

Dose (mg/kg)	**0 (IV and SC)**		**5 (IV)**		**5 (SC)**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics:						
$AUC_{(0\text{-}T)}$ (U·h/mL) [a]						
Day 1	NA		11800		641.7	
Day 7	NA		8733		501.7	
C_{max} (U/mL)						
Day 1	NA		NA		200	
Day 7	NA		NA		115	

$AUC_{(0\text{-}T)}$ = Area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measurable time point; C_{max} = Maximum (peak) observed plasma activity; M = Male; F = Female; IV = intravenous; SC = subcutaneous.

a The following exploratory (non-GLP) evaluations of the anti-rHuPH20 antibodies (anti-drug antibodies, ADA) and tissues from this study were performed: ADA detection assays; ADA neutralization assays; IHC analysis of ADA to cynomolgus monkey colon enteric neural plexus (ENP), testis, and sperm, and to human sperm; evaluation of potential IgG deposition in the ENP, testis and epididymis. The additional evaluations had no impact on the interpretation of the study.

2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.A　カニクイザルを用いた 12 週間反復皮下投与毒性試験

Report Title: 12-Week Bridging Study With Weekly Subcutaneous Administration of ARGX-113 With rHuPH20 and ARGX-113 in Cynomolgus Monkeys With a 12-Week Recovery Period		**Test Article:** efgartigimod SC ±0.01 mg/kg rHuPH20
Species/Strain: monkey/cynomolgus	**Duration of Dosing:** 12 weeks	**Study No. (1)** [redacted]36930 **(2)** updated TK: [redacted]22046
Initial Age: 3.4-4.3 years	**Duration of Postdose:** 12 weeks	**Location in CTD:** **(1)** Module 4.2.3.2-1 **(2)** TK: Module 4.2.2.7-2
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** SC q7d, ie, in total 13 injections/animal Administration volume: 0.56 mL/kg	GLP Compliance: Yes
	Vehicle/Formulation: 20 mmol/L histidine/histidine hydrochloride monohydrate, 10 mmol/L L-methionine, 100 mmol/L sodium chloride, 60 mmol/L sucrose, 0.03% (w/v) polysorbate 20, pH6.0	

Special Features:
Determination of ADA in serum from all efgartigimod-treated animals (n=5/sex/group) during the main study period; blood sampling prior to each SC injection; Initially, 4 selected timepoints per animal were analyzed, more samples were analyzed for animals that were ADA negative in initial testing. All samples were analyzed for animals No.13, 23, and 31.
Blood sampling for TK at the following time point:
During treatment period: on days 1-7 prior to dosing and at 8, 24, 48, 72, 144 hours after dosing, on days 8/9, 15/16, 22/23, 29/30, 36/37, 43/44, 50/51, 57/58, 64/65, 71/72, 78/79, and 85/86 before and 24 hours after each dosing (n=5/sex/group), and
During recovery period: on days 85-91 at 8, 48, 72, and 144 hours after the last test article administration (n=2/sex/group).
Bone marrow examinations (myeloid:erythroid ratios) determined by cell differentiation (counting of 200 nuclei-containing cells) for all groups
Determination of endotoxin levels in the formulation buffer sample: determined at 0.110 EU/mL and, hence, it met the specifications (GMP-compliant analysis according to Ph. Eur. 2.6.14).
rHuPH20 activity analysis in formulation samples (non-GLP): no abnormalities; all values were within the expected range.
Note: presented TK parameters are taken from Module 4.2.3.2-1, [redacted]36930 and for AUC-related parameters are taken from Module 4.2.2.7-2, [redacted]22046 (in bold).

No Observed Adverse Effect Level:	100 mg/kg with 0.01 mg/kg rHuPH20 q7d 100 mg/kg q7d

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Efgartigimod Dose (mg/kg) q7d	**0** [a]		**30** [a]		**100** [a]		**100**	
Total number of animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Main group	**M: 5 (3+2)**	**F: 5 (3+2)**	**M: 5 (3+2)**	**F: 5 (3+2)**	**M: 5 (3+2)**	**F: 5 (3+2)**	**M: 5 (3+2)**	**F: 5 (3+2)**
Recovery group	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Toxicokinetics: from Module 4.2.3.2-1, [redacted]**36930 and Module** 4.2.2.7-2 [redacted]**22046 (in bold).**								
Main study	**Day 1 to day 7** (n=5/sex/group)							
C_{max} (µg/mL) [b]	NA	NA	215	201	435	461	259	234
t_{max} (h) [b]	NA	NA	8.0	8.0	11.2	11.2	38.4	43.2
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	31.0	32.5	28.3	29.0	43.7	36.5
$AUC_{0\text{-}144h}$ (µg·h/mL)	**NA**	**NA**	**8551±1761**	**8328±1061**	**22357±2995**	**21741±2898**	**19270±3396**	**17498±4825**
$AUC_{0\text{-}\infty}$ (µg·h/mL)	**NA**	**NA**	**8935±1946**	**8750±1198**	**23215±2851**	**22658±2635**	**22563±4965**	**19238±4649**
$AUC_{0\text{-}tlast}$/dose (µg·h·kg/mL/mg)	**NA**	**NA**	**285±58.7**	**278±35.4**	**224±30.0**	**217±29.0**	**193±34.0**	**175±48.3**
CL (mL/h/kg)	**NA**	**NA**	**3.47±0.64**	**3.48±0.49**	**4.36±0.57**	**4.47±0.59**	**4.60±1.00**	**5.45±1.30**
DPF	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**0.78**	**0.78**	**0.68**	**0.63**
Recovery period	**Day 85 to day 91** (n=2/sex/group)							
C_{max} (µg/mL) [b]	NA	NA	534	208	585	402	377	378
t_{max} (h) [b]	NA	NA	24.0	16.0	16.0	8.0	8.0	16.0
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	17.1	38.4	120.0	35.8	132.2	44.6
$AUC_{0\text{-}144h}$ (µg·h/mL)	**NA**	**NA**	**12011**	**6488**	**34030**	**22182**	**25143**	**19973**
$AUC_{0\text{-}\infty}$ (µg·h/mL)	**NA**	**NA**	**12037**	**6942**	**56495**	**23918**	**45501**	**22008**
$AUC_{0\text{-}tlast}$/dose (µg·h·kg/mL/mg)	**NA**	**NA**	**400**	**216**	**340**	**222**	**251**	**200**
CL (mL/h/kg)	**NA**	**NA**	**4.50**	**9.07**	**1.89**	**4.27**	**2.20**	**4.71**
DPF	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**0.85**	**1.03**	**0.63**	**0.92**
R	**NA**	**NA**	**1.40**	**0.78**	**1.52**	**1.02**	**1.30**	**1.14**
Noteworthy findings:								
Main study								
Died or sacrificed moribund	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Body weight (% [c])	3.74 kg	3.26 kg	+1.6	-7.4	+1.6	-2.5	-4.3	-4.9
Food consumption	-	-	-	-	-	-	-	-

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Water consumption (by visual appraisal)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Local tolerance								
Swelling								
Day 23	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
Day 86	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	3/5
Hematoma [d]								
Day 9	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Day 10	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Day 11	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Day 12	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5 [e]
Edema according to Draize scale								
Very slight edema								
Day 15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Day 22	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
Day 71	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	1/5
Slight edema								
Day 64	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5
Moderate edema								
Day 15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5
Day 71	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Behavior, external appearance, and feces								
ADA response [f]								
Incidence of ADA								
Day 1 (predose)	NA	NA	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
Day 8	NA	NA	0/1	0/0	0/3	0/3	0/1	0/3

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Day 15	NA	NA	1/1	0/0	2/3 [g]	2/3	1/1	2/3
Day 22	NA	NA	1/1	0/0	2/3 [g]	0/3	1/1	1/3
Day 29	NA	NA	4/5 [g]	5/5	3/5	2/5	4/5	3/5 [g]
Day 36	NA	NA	0/1	0/0	0/3	0/3	1/1	0/3
Day 43	NA	NA	0/1	0/0	0/3	0/3	1/1	0/3
Day 50	NA	NA	0/1	0/0	0/3	0/3	1/1	0/3
Day 57	NA	NA	3/5 [g]	5/5	2/5	2/5	2/5	2/5
Day 64	NA	NA	0/1	0/0	0/3	0/3	0/1	0/3
Day 71	NA	NA	1/1	0/0	0/3	0/3	0/1	0/3
Day 78	NA	NA	1/1	0/0	0/3	0/3	0/1	0/3
Day 85	NA	NA	4/5 [g]	2/5	1/5	2/5	2/5	1/5
Terminal sacrifice: number evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Gross pathology								
Injection site								
Hemorrhagic (subcutaneous)	3	1	1	2	2	2	0	2
Indurated	0	0	0	0	0	0	0	1
Thickened	0	0	0	0	2	2	2	1
Thickened (subcutaneous)	0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen								
Enlarged	0	0	2	0	0	1	0	0
Lungs								
Emphysematous	1	1	0	0	0	0	0	0
Right lobes adhered to chest wall	0	0	0	0	1	0	0	0
Left lobes adhered to chest wall	0	0	0	0	0	0	1	0
Thyroid								
Reduced in size	0	0	0	0	1	0	0	0
Thymus								

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Reduced in size	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph nodes (axillar)								
Enlarged	0	0	1	0	1	0	0	0
Lymph nodes (bronchial)								
Gray discolored	0	0	1	0	0	0	0	0
Enlarged	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph nodes (cervical)								
Enlarged	0	0	1	0	1	0	0	0
Lymph nodes (inguinal)								
Enlarged	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph nodes (mandibular)								
Enlarged	0	0	1	0	1	0	0	0
Lymph nodes (mesenteric)								
Partly dark-brown discolored	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph nodes (iliac)								
Enlarged	0	0	0	0	0	0	1	0
Bone marrow (myeloid:erythroid ratios)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Injection site								
Infiltration, lymphocytic; subcutaneous; perivascular; focal								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Infiltration, lymphocytic; subcutaneous; perivascular; multifocal								
Minimal	0	0	1	1	1	0	1	0
Mild	0	0	1	0	2	2	2	3

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Infiltration, lymphocytic; dermis; perivascular; multifocal								
Minimal	0	0	0	1	3	0	2	0
Mild	0	0	1	1	0	2	1	3
Infiltration, neutrophilic; subcutaneous								
Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Mild	0	0	0	0	1	2	0	3
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Eosinophilic, proteinaceous, acellular material; subcutaneous								
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	3	2	1	3
Infiltration, eosinophilic; subcutaneous								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph node, axillary								
Hyperplasia; lymphoid								
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Marked	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node, cervical								
Hyperplasia; lymphoid								
Minimal	1	1	0	0	1	0	0	0
Mild	2	1	2	3	1	2	1	3
Moderate	0	0	1	0	1	1	0	0
Lymph node, iliac								
Hyperplasia; lymphoid								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Lymph node, inguinal								
Hyperplasia; lymphoid								
Marked	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node, mesenteric								
Hyperplasia; lymphoid								
Minimal	1	0	0	0	0	0	0	0
Mild	2	3	2	3	3	3	3	3
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node, bronchial								
Hyperplasia; lymphoid								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymph node, mandibular								
Hyperplasia; lymphoid								
Moderate	0	0	1	0	1	0	0	0
Spleen								
Hyperplasia; lymphoid								
Minimal	0	2	0	1	0	1	3	0
Mild	2	0	0	2	3	2	0	2
Marked	0	0	1	0	0	0	0	0
Postdose evaluation [h]								
Number evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Body weight (%[c]**)**	3.60 kg	3.65 kg	+8.3	-16	+21	-12	+6.9	-9.6
Terminal sacrifice: number evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Gross pathology								
Ileocecal valve								
Reddened mucosa	1	1	1	1	0	1	0	0
Spleen								
Enlarged	0	0	0	0	1	0	0	0
Lungs								
Left lobes adhered to thoracic wall and diaphragm	0	0	0	1	0	0	0	1
Lymph node (cervical)								
Right, enlarged	0	0	1	0	0	0	0	0
Enlarged	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph nodes (pancreatic)								
Enlarged	0	0	0	0	0	1	0	0
Histopathology								
Number of animals examined	2	2	2	2	2	2	2	2
Injection site								
Infiltration; lymphohistiocytic; subcutaneous; focal								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltration; lymphohistiocytic; dermis; focal								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Infiltration; lymphohistiocytic; dermis; multifocal								
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	0
Infiltration, lymphocytic; subcutaneous; perivascular; multifocal								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltration, lymphocytic; dermis; focal								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0

Test Article: efgartigimod ±0.01 mg/kg rHuPH20					**Study No.** [redacted]36930			
Lymph node, cervical								
Hyperplasia; lymphoid								
Minimal	0	1	0	0	0	0	0	1
Mild	2	0	1	1	1	2	2	1
Moderate	0	0	1	0	1	0	0	0
Lymph node, mesenteric								
Hyperplasia; lymphoid								
Mild	0	2	0	2	0	2	1	1
Moderate	2	0	2	0	2	0	1	1
Spleen								
Hyperplasia; lymphoid								
Minimal	0	1	0	0	0	0	0	0
Mild	2	1	2	2	1	2	1	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	1	0

ADA=anti-drug antibodies; ARGX-113=efgartigimod; AUC=area under the curve; $AUC_{0-\infty}$=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; AUC_{0-144h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 144 hours; $AUC_{0-tlast}$=area under the concentration-time curve from time zero to the last quantifiable concentration >LLOQ; CL=total clearance; C_{max}= maximum observed concentration; DPF=dose proportion factor; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; GMP=Good Manufacturing Practice; h=hour(s); LLOQ=lower limit of quantification; M=male; n=number of animals, subjects or samples; NA=not applicable; no=number; Ph. Eur.=European Pharmacopoeia; q7d=once weekly; R=accumulation factor; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous; $t_{1/2}$=elimination half-life; TK=toxicokinetics; t_{max}=time of C_{max}; w/v=weight per volume

a Co-administered with 0.01 mg/kg rHuPH20.
b Values obtained from serum analysis; all other values calculated by TK analysis.
c At the end of dosing or recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
d The findings were either caused by the technical procedure, rather than representing an adverse effect of the formulation tested, or were regarded as incidental and within the normal background pathology
e See [redacted]36930 page 101, Table 1-1
f Additional samples from animals (No. 13, 23, 31) were analyzed on days 8, 15, 22, 36, 43, 50, 64, 71, and 78. Control animals were not tested for ADA development.
g A positive screening result was obtained but there was insufficient sample volume left to confirm this result.
h Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under “Postdose Evaluation,” were fully reversible.

2.6.7.7.B　エフガルチギモドの 11 週間反復静脈内投与による T 細胞依存性抗体反応（TDAR）試験

Report Title: Evaluation of TDAR Response Upon 11-Week Intravenous (Bolus) Administration in the Monkey Followed by a 9-Week Recovery Period	**Test Article:** efgartigimod	
Species/Strain: Monkey/cynomolgus	**Duration of Dosing:** 11 weeks	**Study No.** [redacted] 8459761
Initial Age: 100-119 weeks	**Duration of Postdose:** 9 weeks	**Location in CTD:** Module 4.2.3.2-2
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** IV (slow bolus) q7d, ie, in total 12 injections/animal Administration volume: 0.55 mL/kg	
	Vehicle/Formulation: 20 mmol/L histidine/histidine hydrochloride monohydrate, 10 mmol/L L-methionine, 100 mmol/L sodium chloride, 60 mmol/L sucrose, 0.04% (w/v) polysorbate 80, pH6.0	**GLP Compliance:** Yes

Special Features:

- **Tolerability assessment of efgartigimod (in life):** health monitoring, clinical observations, veterinary observations, body weights, and food consumption (by visual appraisal). Data from efgartigimod-treated animals were compared with control data. No necropsy: all animals were transferred to a stock colony on Day 64 of the recovery phase.
- **Blood sampling for TK of efgartigimod in serum (n=3/sex/group) at the following time points:**
  During treatment period: prior to dosing and at the end of bolus administration during Weeks 1, 4, 8, and 11; blood samples were additionally taken prior to dosing, at the end of bolus administration, and 24, 96, and 168 (equivalent to the Week 4 predose sample collection) hours postdose during Week 3.
  During recovery period: during Weeks 3, 5, 7, and 9 of the recovery phase; samples were collected at a time point comparable to the end of bolus collection time point during the dosing phase.
- **For TDAR response to KLH immunization:** 3 subcutaneous injections of 10 mg KLH formulation/dose (1 mL of 10 mg/mL) on Days 28 and 56 of the dosing phase and on Day 29 of the recovery phase.
- **Immunology and immunotoxicology (n=3/sex/group):**
  TDAR analysis: anti-KLH IgM and anti-KLH IgG in serum (n=3/sex/group):
  During treatment period: prior to KLH administration on Days 28 and 56; samples were also collected on Days 36, 43, 50, 64, 71, and 77.
  During recovery period: prior to KLH administration on Day 29 as well as Days 37, 44, and 64 of the recovery phase.
  ELISpot analysis: IFN-γ spot forming units (± immunizing antigen) in peripheral blood mononuclear cells.
  During treatment period: prior to dosing on Day 1 and prior to KLH administration on Days 28 and 56; samples were also collected on Days 36, 43, 50, 64, 71, and 77.
  During recovery period: prior to KLH administration on Day 29 as well as Days 37, 44, and 64 of the recovery phase.
  Determination of total IgG in serum (n=3/sex/group): twice during the predose phase and once weekly during the dosing and recovery phases.
- **Blood sampling for possible determination of ADA in serum (n=3/sex/group)**: prior to dosing on Day 1 of the dosing phase and during Week 8 of the dosing phase as well as during Weeks 1, 5, 7, and 9 of the recovery phase. Because the serum ARGX-113 concentration-time profiles and the total IgG concentrations did not seem to indicate a meaningful impact of potential ADA interactions, ADA analysis was not conducted.
- Note: Difference to control and x-fold change were self-calculated.

No Observed Adverse Effect Level: 100 mg/kg q7d based on in-life examinations; no necropsy (actual dose: 102.4 mg/kg)

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics (mean):				
During Treatment	Week 3:			
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	3260±311	3330±190
			M+F: 3290±233	
t_{max} (h) [a]	NA	NA	0.0166±0.00	0.0166±0.00
			M+F: 0.0166±0.00	
$t_{1/2}$ (h)	NA	NA	27.0±2.48	32.7±1.45
			M+F: 29.8±3.63	
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·h/mL)	NA	NA	32400±4490	30900±2550
			M+F: 31700±3370	
Noteworthy Findings:				
Died or Sacrificed Moribund	0/3	0/3	0/3	0/3
Body Weight (% [b])	2.93 kg	2.85 kg	0	-8.1
Food Consumption	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-
Veterinary Observations	-	-	-	-
Laceration on the tail	0	1 [c, Days 8-13]	0	0
TDAR assessment				
anti-KLH IgM Titers				

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 28 (prior to KLH)	100	1479	903	367
x-fold change to control	NA	NA	9.0-fold ↑	4.0-fold ↓
Day 28	1st KLH administration			
Day 36	7078	9660	4077	2014
x-fold change to control	NA	NA	1.7-fold ↓	4.8-fold ↓
Day 43	4560	19859	23381	8418
x-fold change to control	NA	NA	5.1-fold ↑	2.4-fold ↓
Day 50	3967	6746	2977	2187
x-fold change to control	NA	NA	1.3-fold ↓	3.1-fold ↓
Day 56 (prior to KLH)	2923	6368	1841	1346
x-fold change to control	NA	NA	1.6-fold ↓	4.7-fold ↓
Day 56	2nd KLH administration			
Day 64	12760	10339	18366	13101
x-fold change to control	NA	NA	1.4-fold ↑	1.3-fold ↑
Day 71	9842	32586	6128	4999
x-fold change to control	NA	NA	1.6-fold ↓	6.5-fold ↓
Day 77	4005	5772	1564	1412
x-fold change to control	NA	NA	2.6-fold ↓	4.1-fold ↓

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
anti-KLH IgG Titers				
Day 28 (prior to KLH)	100	100	100	100
x-fold change to control	NA	NA	No change	No change
Day 28	1st KLH administration			
Day 36	12136	21178	8318	7462
x-fold change to control	NA	NA	1.5-fold ↓	2.8-fold ↓
Day 43	25572	58197	56895	31772
x-fold change to control	NA	NA	2.2-fold ↑	1.8-fold ↓
Day 50	19907	21634	9307	16023
x-fold change to control	NA	NA	2.1-fold ↓	1.4-fold ↓
Day 56 (prior to KLH)	42490	44036	11518	9227
x-fold change to control	NA	NA	3.7-fold ↓	4.8-fold ↓
Day 56	2nd KLH administration			
Day 64	120036	154188	94160	86501
x-fold change to control	NA	NA	1.3-fold ↓	1.8-fold ↓
Day 71	104689	186811	58490	42079
x-fold change to control	NA	NA	1.8-fold ↓	4.4-fold ↓
Day 77	108039	115219	12118	14982
x-fold change to control	NA	NA	8.9-fold ↓	7.7-fold ↓
ELISpot analysis data				

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
%Cell viability, PBMCs	-	-	-	-
Response to PHA	-	-	-	-
IFN-γ spot forming units	-	-	-	-
Immunoglobulin G				
IgG Levels, Total (g/L)				
Day 1	9.16	9.75	8.65	10.22
Day 8	8.98	9.81	<3.96	<4.51
Day 15	9.17	9.59	<3.61	<4.00
Day 22	9.34	9.82	<3.77	<3.95
Day 29	9.13	9.44	<3.36	<3.98
Day 36	9.94	9.76	<3.85	<4.05
Day 43	9.99	10.05	<3.84	<4.09
Day 50	10.44	10.64	4.15	<4.29
Day 57	9.28	10.06	3.98	<4.18
Day 64	10.52	11.74	4.58	4.44
Day 71	10.20	11.06	4.27	<4.24
% difference to control				
Day 1	NA	NA	-5.6	+4.8
Day 8	NA	NA	> -56	> -54
Day 15	NA	NA	> -61	> -58

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Day 22	NA	NA	> -60	> -60
Day 29	NA	NA	> -63	> -58
Day 36	NA	NA	> -61	> -59
Day 43	NA	NA	> -62	> -59
Day 50	NA	NA	-60	> -60
Day 57	NA	NA	-57	> -58
Day 64	NA	NA	-56	-62
Day 71	NA	NA	-58	> -62
Terminal Sacrifice: Number Evaluated	0	0	0	0
Organ Weights	No data	No data	No data	No data
Gross Pathology	No data	No data	No data	No data
Histopathology	No data	No data	No data	No data
Postdose Evaluation [d]: Number Evaluated	3	3	3	3
TDAR assessment				
anti-KLH IgM Titers				
Recovery Day 29 (prior to KLH)	2152	3692	1293	1025
x-fold change to control	NA	NA	1.7-fold ↓	3.6-fold ↓
Recovery Day 29	3rd KLH administration			
Recovery Day 37	8622	27387	10382	8296

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
x-fold change to control	NA	NA	1.2-fold ↑	3.3-fold ↓
Recovery Day 44	12955	43025	38053	18902
x-fold change to control	NA	NA	2.9-fold ↑	2.3-fold ↓
Recovery Day 64	5037	9553	7528	6100
x-fold change to control	NA	NA	1.5-fold ↑	1.6-fold ↓
anti-KLH IgG Titers	-	-	-	-
ELISpot analysis data				
%Cell viability, PBMCs	-	-	-	-
Response to PHA	-	-	-	-
IFN-γ spot forming units	-	-	-	-
Immunoglobulin G				
IgG Levels, Total (g/L)				
Recovery Day 1	9.82	10.50	3.98	<4.32
Recovery Day 10	9.48	10.52	6.76	7.34
Recovery Day 15	9.13	10.87	7.86	8.40
Recovery Day 22	9.12	11.36	9.00	9.32
Recovery Day 29	9.29	10.95	9.47	10.34
Recovery Day 38	9.52	10.41	9.68	10.85
Recovery Day 44	9.58	10.47	9.50	10.23
Recovery Day 50	9.28	10.46	9.68	10.13

Test Article: efgartigimod			**Study No.** [redacted] 8459761	
Dose (mg/kg) q7d	**0 (Control)**		**100 (nominal dose)** 102.4 (actual dose)	
Total Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Dosing and Recovery Phase	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery Day 57	8.87	10.73	9.28	10.03
% difference to control				
Recovery Day 1	NA	NA	-59	> -59
Recovery Day 10	NA	NA	-29	-30
Recovery Day 15	NA	NA	-14	-23
Recovery Day 22	NA	NA	-1.3	-18
Recovery Day 29	NA	NA	+1.9	-5.6
Recovery Day 38	NA	NA	+1.7	+4.2
Recovery Day 44	NA	NA	-0.8	-2.3
Recovery Day 50	NA	NA	+4.3	-3.2
Recovery Day 57	NA	NA	+4.6	-6.5

ADA=anti-drug antibodies; ARGX-113=efgartigimod; AUC=area under the curve; $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; C_{max}=maximum observed concentration; ELISpot= enzyme-linked immunospot; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; h=hour(s); IFN-γ=interferon gamma; Ig=immunoglobulin; IV=intravenous; KLH=keyhole limpet hemocyanin; M=male; n=number of animals, subjects or samples; NA=not applicable; no=number; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; PHA=phytohaemagglutinin; q7d=once weekly; R=accumulation factor; $t_{1/2}$=elimination half-life; TDAR=T-cell-dependent antibody response; TK=toxicokinetics; t_{max}=time of C_{max}
- No noteworthy findings.

a Median values are presented for t_{max}.

b At end of dosing period (Day 71). For controls, group means are shown. For the treated group, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

c Female no. P0202 (Group 1) received Meloxidyl (oral administration of non-steroidal anti-inflammatory drug) and Vetasept (topical chlorhexidine) once daily on Days 8 through 13 of the dosing phase due to a laceration on the tail.

d Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation', were fully reversible.

2.6.7.7.C　サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験

Report Title: A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase			**Test Article: rHuPH20**
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing**: 39 weeks		**Halozyme Report** R09050
Initial Age: Approx. 4 to 7 years	**Duration of Post Dose**: 4 weeks	**GLP Compliance**: Yes	**Location in CTD:** 4.2.3.2-4
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**: SC, once weekly	**Lot Number**: [redacted], [redacted]	
Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH6.0 in Sterile Water for Injection, USP			
Special Features: Exploratory (non-GLP) additional ADA cross-reactivity of tissues using immunohistochemistry (IHC) was conducted[a]			
No Observed Adverse Effect Level: 2 mg/kg/dose			

Dose (mg/kg)		**0 (Control)**		**0.02**		**0.2**		**2**	
Sex		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: Main		4	4	4	4	4	4	4	4
Number of Animals: Recovery		2	2	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics:									
Day 1	$AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL)	NA [a]	NA	NA	NA	NA	NA	20.5	47.8
	C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12.5	20.8
Day 85	$AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	177.0	395.0
	C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	28.8	64.7
Day 183	$AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	89.6	467.0
	C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12.0	64.2
Day 267	$AUC_{0\text{-last}}$ (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	56.2
	C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10.0
Histopathology (animal incidence/sex/group): Injection site, minimal perivascular lymphoplasmacytic infiltration		0/4 (main) 0/2 (recovery)	0/4 (main) 0/2 (recovery)	0/4 (main) 0/2 (recovery)	0/4 (main) 0/2 (recovery)	1/4 (main) 0/2 (recovery)	1/4 (main) 0/2 (recovery)	4/4 (main) 1/2 (recovery)	4/4 (main) 0/2 (recovery)
Note: There were no rHuPH20-related responses identified in the following: clinical observations, menstrual monitoring, food consumption, body weights, electrocardiography, blood pressure, respiratory rate, ophthalmology, testicular volume, semen analysis (sperm concentration, motility and morphology), urinalysis, hematology, coagulation, serum chemistry, testosterone, luteinizing hormone, gross pathology and organ weights.									

ADA= anti-drug antibodies; $AUC_{0\text{-last}}$ = area under the plasma activity-time curve from time 0 to the last measurable sampling time; C_{max}= maximum observed plasma activity; NA= not available.

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

Test Article: rHuPH20

Since rHuPH20 is a naturally occurring protein with all natural amino acids, genotoxicity studies were not conducted (ICH S6 (R1) guideline)

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

Test Article: rHuPH20

Since rHuPH20 is a naturally occurring protein with all natural amino acids, genotoxicity studies were not conducted (ICH S6 (R1) guideline)

2.6.7.10　がん原性試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

Test Article: rHuPH20

Guideline S1 “Weight-of-evidence factors for consideration in a carcinogenicity assessment document” (ICH Guideline S1 29 February 2016), it is concluded that rHuPH20 has no specific risk for carcinogenicity. Histopathologic analyses of tissues from repeat dose nonclinical toxicology studies, including a life-time study in mice, indicate no evidence of cellular hypertrophy, diffuse and/or focal cellular hyperplasia, persistent tissue injury and/or chronic inflammation, preneoplastic changes, nor tumor observations. Furthermore, in nonclinical and clinical studies there has been no evidence of hormonal perturbation nor immune suppression. Based on the nonclinical dataset, the limited systemic exposure for rHuPH20 when injected subcutaneously at the intended doses in humans, and the extensive clinical safety profile of rHuPH20 and hyaluronidases as a class, it is concluded that there is low risk for carcinogenicity with rHuPH20.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

Nonpivotal Studies					**Test Article: rHuPH20**			
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dose Period**	**Doses (mg/kg/dose)**	**Number of Animals per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP**	**Halozyme Report**	**Location**
Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily (10 mM Histidine, 130 mM NaCl, and sterile water for injection) Lot No. [redacted]	DG 6-15	1; 3; 10; 30 (110000; 330000; 1100000; 3300000 U/kg)	8	**≥10 mg/kg/dose**: ↑ resorptions (1/7 dams with 68.8% resorption to 4/8 dams with 100% resorption), enlarged spleens (1/8 to 3/8 dams, at 0.234-0.379 g) **30 mg/kg/dose**: ↓ maternal body weights on DG 18 (88.7% of controls), ↓ maternal body weight gains from DG 6-18 (73.2% of controls), ↓ fetal body weights (92% of controls)	No	R07046	4.2.3.5.2-1
Mouse/ Crl:CD1(ICR)	SC, once daily or weekly (10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH6.5) Lot [redacted]	PND 7-42	1; 3; 9 (110000; 330000; 990000 U/kg)	8 (main study); 4 or 8 (antibody subset); 9, 24, or 39 (TK subset)	**≥1 mg/kg/dose** (daily): ↑ Mean body weights (109.9%, 108.3%,111.6%), ↑ Body weight gains, ↑ Eosinophils **9 mg/kg/dose** (weekly): ↑ Reticulocytes	No	13123	4.2.3.5.4-1

DG = day of (presumed) gestation; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic.

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

Test Article: rHuPH20

No dedicated fertility and early embryonic development study was conducted. Male and female fertility and fetal development were evaluated in the pivotal life-time study in juvenile mice (Halozyme Report 15028). There were no rHuPH20-related effects on mating and fertility, sperm parameters (motility, concentration, and morphology), organ weight, ovarian or uterine parameters, litter parameters, macroscopic or microscopic observations. In addition, the effect on fertility was evaluated based on the results of a 39-week subcutaneous repeated dose toxicity study in monkeys (Halozyme Report R09050). No rHuPH20 treatment-related effects on testicular size, sperm examination (sperm concentration, motility, and morphology), menstrual cycle in females, luteinizing hormone levels, or histopathology of the male and female reproductive organs were observed after subcutaneous administration of rHuPH20 at the highest doses of 2 mg/kg/q7d (220000 U/kg/q7d) for 39 weeks.

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

2.6.7.13.1　マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験

Report Title: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice		**Test Article: rHuPH20**
Dosing Period: Once daily on DGs 6-15 (10 doses)	**Day of Mating**: DG 0	**Halozyme Report** R08176
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Day of C-Section**: DG 18	**Location in CTD**: 4.2.3.5.2-2
Initial Age: 63 days	**Method of Administration:** SC	**Lot Number:** [redacted]
Special Features: Retrospective ADA analyses [a]	**GLP Compliance**: Yes	**Date of First Dose**: [redacted] 20[redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH6.5 in Sterile Water for Injection		
No Observed Adverse Effect Level: Maternal: 18 mg/kg/dose, Developmental: 3 mg/kg/dose		

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**9**	**18**
Females				
Number of Females, Main Study	25	25	25	25
Number of Females, TK Study	0	36	36	36
Number Pregnant, Main Study	24	24	23	23
Number Died/Euthanized Moribund (Main and TK Study) [b]	0	0	2 [c]	2 [d]
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
TK DG 6: $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL)	NA	5.45	45.3	120
C_{max} (U/mL)	NA	3.44	30.5	49.6
DG 15: $AUC_{0\text{-}24h}$ (U·h/mL)	NA	55.1	79.0	363
C_{max} (U/mL)	NA	20.9	17.1	99.2
Fetuses				
Number of Fetuses Evaluated	298	285	232	256
Mean No. Late Resorptions	0.1	0.2	1.0	1.2 [e]
Mean Fetal Body Weight (g)	1.36	1.36	1.30 [f]	1.30 [f]
Note: Maternal toxicity did not occur at any dosage of rHuPH20. There were no test article-related fetal gross external, soft tissue or skeletal fetal alterations (malformations or variations) at any dosage.				

ADA = anti-drug antibodies; $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma activity-time curve from 0 to 24 hours; C_{max} = maximum observed plasma concentration; DG = day of (presumed) gestation; NA = not applicable; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic.

a Retrospective analysis of a subset of DG6 and DG15 plasma TK samples was performed to determine the presence of ADA, titer, and isotype. ADA titer ranges were similar in mice administered 3, 9, and 18 mg/kg/dose rHuPH20 and were predominantly isotype IgG.
b A low incidence of mortality was considered not related to rHuPH20 treatment. Unscheduled deaths occurred in 2/25 main study mice at 9 mg/kg/dose, and 1/25 main study mice and 1/36 TK study mice at 18 mg/kg/dose.
c Two main study mice were found dead on DG 9 and DG11. The cause of death could not be determined, there were no adverse clinical signs or effects on body weight gains. All tissues appeared normal at necropsy.
d One main study and one TK study mouse were found dead on DG 14 and DG 15. The cause of death could not be determined, there were no adverse clinical signs or effects on body weight gains. All tissues appeared normal at necropsy.
e A non-statistically significant increase in the number of late resorptions was seen at 9 and 18 mg/kg/dose, but was considered test article related.
f Significantly different from vehicle controls, ($p \leq 0.05$).

2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

2.6.7.14.1　マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Report Title: Subcutaneous Developmental and Perinatal/ Postnatal Reproduction Toxicity Study of rHuPH20 in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation			**Test Article: rHuPH20**
Design similar to ICH 4.1.2? Yes	**Dosing Period:** DG 6 through DL 20 or DG 22[a]		**Halozyme Report** R09058
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Day of Mating**: DG 0	**Day of C-Section**: DG 18	**Location in CTD**: 4.2.3.5.3-1
Initial Age: 63 days	**Method of Administration:** SC		**Lot Number:** [redacted]
Special Features: None	**GLP Compliance**: Yes		**Date of First Dose**: [redacted] 20[redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl, pH6.5 in Sterile Water for Injection			
No Observed Adverse Effect Level: F_0 females: 9 mg/kg/dose, F_1 generation: 9 mg/kg/dose			

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle)**	**3**	**6**	**9**
F_0 females				
Number of Females	25	25	25	25
Number Pregnant	22	20	21	20
Number Died or Euthanized Moribund[a]	0	0	1[b]	2[c]
F_1 litters (preweaning)				
Number of Litters Evaluated	22	19	19	17
F_1 Males (postweaning)				
Number Evaluated	25	25	25	24
Number Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0
Number of Males Mated	23	25	25	24
Number of Fertile Males	18	23	24	21
F_1 Females (postweaning)				
Number Evaluated	23	25	25	25
Number Died or Euthanized Moribund	1[d]	0	0	0
Number of Females Mated	23	25	25	25
Number of Pregnant Females	18	23	24	22

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle)**	**3**	**6**	**9**
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Note: Toxicity did not occur at any dosage of rHuPH20, as there were no rHuPH20-related premature deaths, clinical or necropsy observations, body weight or body weight gain changes, natural delivery or litter observations. There were no rHuPH20-related effects noted in the F1 generation pups and mice for clinical observations, body weights, age of sexual maturation, passive avoidance test (for learning, short-term and long-term retention), motor activity test, mating performance, and gross pathologic findings.				

DG = day of gestation; DL = day of lactation; SC = subcutaneous; PND = postnatal day.

a A low incidence of mortality was considered not related to rHuPH20 treatment.

b One mouse at 6 mg/kg/dose was found dead on DL4, clinical observation of purple discoloration on the back DG16, unremarkable body weights, and all tissues normal at necropsy.

c One mouse at 9 mg/kg/dose was found dead on DG17, clinical observations of cold to touch and purple tail on DG 15, unremarkable body weights, and all tissues appeared normal at necropsy. Another mouse at 9 mg/kg/dose was euthanized early due to adverse clinical observations of decreased motor activity, prostrate, pale ears, pale extremities, cold to touch, blue discolored extremities, mild dehydration and bradypnea on DG19, unremarkable body weights, and all tissues normal at necropsy.

d One mouse in the vehicle control group was found dead on PND 31, with no adverse clinical observations, unremarkable body weights, and all tissues normal at necropsy.

2.6.7.15　新生児を用いた試験

Test Article: efgartigimod SC ± 2000 U/mL rHuPH20

No new information is being provided in this submission.

2.6.7.15.1　幼若マウスを用いた生涯反復投与毒性試験

Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse		**Test Article: rHuPH20**
Design similar to ICH 4.1.1	**Duration of Dosing:** PND 7- PND 241	**Halozyme Report** 15028
Species/Strain: Mouse/ Crl:CD (ICR)	**Day of Mating: PND 90**	**Location in CTD:** 4.2.3.5.4-2
Initial Age: PND 7	**Day of C-Section: DG 18 (PND 108-129) or Necropsy ~PND 129**	**Lot Number**: [redacted]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** SC, once daily from PND 7 to 30 and then once weekly	**GLP Compliance: Yes**
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** 10 mM histidine, 130 mM NaCl, pH6.5 in Sterile Water for Injection, USP	
No Observed Adverse Effect Level: 1 mg/kg		

Juvenile Subset

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**rHuPH20 (1 mg/kg)**
Males- F0		
Toxicokinetics: AUC	-	-
No. Evaluated	30	30
No. Died or Sacrificed Moribund [a]	0	0
Clinical Observations	No significant rHuPH20-related clinical signs [a, c]	
Necropsy Observations	No significant rHuPH20-related necropsy observations [a, c]	
Body Weight (PND 129- Mean ± S.D.)	41.4 ± 3.8	42.7 ± 4.2
Food Consumption (%) [d]	-	-
Mean No. Days Prior to Mating	2.3 ± 1.2	1.9 ± 1.2
No. of Males that Mated	22 [f]	22 [f]
No. of Fertile Males	21/ 22	22/ 22
Females - F0		
Toxicokinetics: AUC	-	-
No. Evaluated	30	30
No. Died or Sacrificed Moribund [a]	2 [b]	2 [b]

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**rHuPH20 (1 mg/kg)**
Clinical Observations	No significant rHuPH20-related clinical signs [a, c]	
Necropsy Observations	No significant rHuPH20-related necropsy observations [a, c]	
Premating Body Weight (PND 86- Mean ± S.D.)	29.4 ± 2.1	29.3 ± 2.1 [e]
Gestation Body Weight (DG 18- Mean ± S.D.)	61.7 ± 4.8	61.0 ± 9.9
Premating Food Consumption (%) [d]	-	-
Gestation Food Consumption (%) [d]	-	-
Mean No. Estrous Cycles/14 days		
Mean No. Days Prior to Mating	2.3 ± 1.2	1.9 ± 1.2
No. of Females Sperm Positive	21/22	22/22
No. of Pregnant Females	21/22	22/22
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1.7 ± 1.2	2.0 ± 2.5
Mean No. Corpora Lutea	14.5 ± 1.5	14.0 ± 3.9
Mean No. Implantations	14.0 ± 1.7	13.5 ± 4.0
Mean % Preimplantation Loss [g]	3.4 ± 5.3	5.7 ± 10.0
Mean No. Live Conceptuses	11.8 ± 3.4	10.8 ± 5.3
Mean No. Resorptions	1.7 ± 1.2	2.0 ± 2.5
No. Dead Conceptuses	36	43
Mean % Postimplantation Loss [h]	12.6 ± 9.6	15.0 ± 20.5
Litters:		
No. Litters Evaluated	21	21
No. Live Fetuses	259	240
Mean No. Resorptions	1.7 ± 1.2	2.0 ± 2.5
No. of Litters with Dead Fetuses	1	0
Mean % Postimplantation Loss [h]	12.6 ± 9.6	15.0 ± 20.5
Mean Fetal Body Weight (g)	1.33	1.36
Fetal Sex Ratios	0.87	1.21
Fetal Anomalies:		
Gross External (Lid open, cleft palate, fore/hind limb)	2 (1)	2 (1)
Visceral Anomalies (eyes)	1 (1)	0 (0)
Skeletal Anomalies (Skull, vertebrae, ribs)	76 (30)	58 (33)
Total Affected Fetuses (Litters)	79 (33)	56 (34)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	rHuPH20 (1 mg/kg)
Note: Toxicity did not occur at 1 mg/kg of rHuPH20, as there were no rHuPH20-related premature deaths, clinical or necropsy observations, body weight or body weight gain changes, natural delivery or litter observations. There were no rHuPH20-related effects noted in the F1 generation pups and mice for clinical observations, body weights, age of sexual maturation, passive avoidance test (for learning, short-term and long-term retention), motor activity test, mating performance, and gross pathologic findings.		

Chronic Subset

Daily Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	rHuPH20 (1 mg/kg)
Males		
Toxicokinetics: AUC	-	-
No. Evaluated	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund [a]	0	2 [a, c]
Clinical Observations	No significant rHuPH20-related clinical signs [a, c]	
Necropsy Observations	No significant rHuPH20-related necropsy observations [a, c]	
Body Weight (PND 241- Mean ± S.D.) [a, b]	46.2 ± 5.2 [e]	46.1 ± 5.5
Food Consumption (%) [d]	-	-
Ophthalmic Examination	No significant rHuPH20-related ophthalmic observations [a]	
Clinical Pathology (Hematology and Clinical Chemistry)	No significant rHuPH20-related differences in the hematology parameters [a]	
Pathology	No significant rHuPH20-related macroscopic findings [a]	
Females		
Toxicokinetics: AUC	-	-
No. Evaluated	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund [a]	3 [a, b]	0
Clinical Observations	No rHuPH20-related clinical signs [a, b]	
Necropsy Observations	No significant rHuPH20-related necropsy observations [a, c]	
Body Weight (PND 241- Mean ± S.D.) [a, b]	34.5 ± 3.3	35.6 ± 3.4
Food Consumption (%) [e]	-	-
Ophthalmic Examination	No significant rHuPH20-related ophthalmic observations [a]	
Clinical Pathology (Hematology and Clinical Chemistry)	No significant rHuPH20-related differences in the hematology parameters [a]	
Pathology (Gross Pathology, Terminal Body and Organ Weights	No significant rHuPH20-related macroscopic findings [a]	
Note: Toxicity did not occur at 1 mg/kg of rHuPH20, as there were no rHuPH20-related premature deaths, clinical or necropsy observations, body weight or body weight gain changes.		

N/A = not applicable; DG = day of gestation; PND = postnatal day; SC = subcutaneous.

a A low incidence of mortality was considered not related to rHuPH20 treatment

b Found dead or unscheduled euthanasia due to adverse clinical observations

c No rHuPH20-related clinical signs/ necropsy observations in male and female mice assigned to the 1 mg/kg/dose rHuPH20 group

d Food consumption data not measured

e　28 and 24 animals in the Juvenile and Chronic Subsets, respectively, were used to average (excludes the value for mice found dead or euthanized due to adverse clinical observations)
f　Excludes values for mice that were inadvertently placed into cohabitation and removed prior to mating
g　% Preimplantation loss = [(number of corpora lutea - number of implantations) / number of corpora lutea]
h　Postimplantation loss = [(number of implantations - number of live fetuses) / number of implantations] x 100

2.6.7.16　局所刺激性試験

2.6.7.16-1　ウサギを用いたエフガルチギモドの局所刺激試験

Report Title: Study of Local Tolerance of ARGX-113 With rHuPH20 Following Single Intramuscular and Subcutaneous Administration in Rabbits				**Test Article:** efgartigimod + 2000 U/mL rHuPH20	
Species/Strain	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Location Study Number**
Rabbit/New Zealand White	SC and IM routes left-right comparison: left side: vehicle (formulation buffer solution + 2000 U/mL rHuPH20 as reference control) right side: efgartigimod + 2000 U/mL rHuPH20	SC: 180 mg per animal in 1 mL volume + 2000 U/mL rHuPH20 IM: 45 mg per animal in 0.25 mL volume + 2000 U/mL rHuPH20	6F	Single injections of ARGX-113 + 2000 U/mL rHuPH20 at administration volumes per animal of 0.25 mL (intramuscular) and 1 mL (subcutaneous) did not cause any erythema, eschar, edema, or test item-related histopathological changes at the injection sites. ARGX-113 + 2000 U/mL rHuPH20 showed compatibility after intramuscular and subcutaneous administration. Additional information: Clinical signs at 1, 2, 6, 24, 48, 72, and 96 hours, and 14 days after administration. Necropsy with macroscopic and microscopic examinations at 48 hours (n=2) and 96 hours (n=2) and 14 days (n=2) postdose.	4.2.3.6-1 [redacted]37107

F=female; IM=intramuscular (gastrocnemius muscle); n=number of animals, subjects or samples; no.=number; rHuPH20=recombinant human hyaluronidase PH20 enzyme; SC=subcutaneous (under the dorsal skin of the flank)

Test Article: rHuPH20

Dedicated local tolerance studies were not conducted with rHuPH20. However, local tolerance assessments were conducted as part of the repeat-dose toxicity studies in monkeys and developmental and reproductive toxicity studies in mice and rabbits.

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　資料保管施設

Amendment to Final Reports to clarify details concerning archiving.				**Test article:** efgartigimod	
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Location Study number**
NA	NA	NA	NA	This amendment clarifies details concerning archiving of argenx study records and specimen before these study related materials are transferred from [redacted] or the 'new company' to GLP certified archiving facilities that are appointed by the sponsor argenx.	4.2.3.7.7-1 ARGX-PTBA-0223

GLP=Good Laboratory Practice; NA=not applicable; no=number

2.6.7.17.2　マウス出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する抗 rHuPH20 抗体の影響

Report Title: Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies Following Administration of rHuPH20 by Subcutaneous Injection in Mice (Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study Design)		**Halozyme Report** 12096 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-2
Method of Administration: SC	**Duration of Dosing**: Daily DG 6 through DG 16, DG 18, DL 4, DL 13 or DL 21	**Test Article:** rHuPH20
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Day of Mating**: DG 0	**Lot Number:** [redacted]
Initial Age:~63 days at receipt	**Vehicle**:　10mM Histidine, 130 mM NaCl (pH6.5), Sterile Water for Injection, USP	**GLP Compliance**: No
Special Features: Satellite study to evaluate ADA in pregnant and postpartum lactating mice and their offspring (fetuses and pups) in support of a previous GLP perinatal/postnatal development study (R09058), including ADA titers, cross reactivity to rMuPH20 and rMuHyal5		**Date of First Dose**: [redacted] 20[redacted]

Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3**	**6**	**9**
Number of Animals				
Subset 1	3	3	12	12
Subset 2	6	6	18	18
Subset 3	6	6	6	6
rHuPH20	6	6	6	6
Number Died or Euthanized Moribund [a]				
DG 18 (Subset 1)	0	0	0	0
DL 6 (Subset 2A)	0	0	1	1
DL 15 (Subset 2B)	0	0	1	1
DL 23 (Subset 2C)	0	0	1	1
PND 30 and PND 60 (Subset 3)	0	0	0	1
rHuPH20 Plasma Concentrations Subset	0	0	0	1
Maternal Median ADA Titers [b]				
DG 18 (Subset 1)	-	51200		
DL 6 (Subset 2A)	-	819200		
DL 15 (Subset 2B)	-	1638400		
DL 23 (Subset 2C)	-	3276800		

Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	3	6	9
Fetal/Pup Median ADA Titers [c]				
DG 18 (Subset 1)	-		19200	
DL 6 (Subset 2A)	-		307200	
DL 15 (Subset 2B)	-		1638400	
DL 23 (Subset 2C)	-		409600	
PND 30 (Subset 3)	-		153600	
PND 60 (Subset 3)	-		51200	
Median ADA Titers from Individuals [d]				
PND 30 (Subset 3, Male)	-	102400	153600	128000
PND 30 (Subset 3, Female)	-	204800	102400	128000
PND 60 (Subset 3, Male)	-	25600	51200	51200
PND 60 (Subset 3, Female)	-	38400	51200	19200
Incidence of Cross-Reactivity to rMuPH20 and rMuHyal5 in Maternal Plasma Samples [e]			rMuPH20 / rMuHyal5	
DG 18 (Subset 1)	NA		67% / 78%	
DL 6 (Subset 2A)	NA		100% / 100%	
DL 15 (Subset 2B)	NA		100% / 100%	
DL 23 (Subset 2C)	NA		100% / 100%	
Incidence of Cross-Reactivity to rMuPH20 and MuHyal5 in Fetal/Pup Plasma Samples [e]			rMuPH20 / rMuHyal5	
DG 18 (Subset 1)	NA		10% / 50%	
DL 6 (Subset 2A)	NA		87% / 100%	
DL 15 (Subset 2B)	NA		93% / 100%	
DL 23 (Subset 2C)	NA		100% / 100%	
PND 30 (Subset 3)	NA		55% / 100%	
PND 60 (Subset 3)	NA		48% / 74%	

ADA= anti-drug antibody; DG = day of (presumed) gestation; DL = day of lactation (postpartum day); DS = day of study; GLP=Good Laboratory Practice; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; rMuHyal5= recombinant murine hyaluronidase 5; rMuPH20= recombinant murine hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; - = no noteworthy findings .

a Two mice in the 6 mg/kg/day dose group and three mice in the 9 mg/kg/day dose group were found dead on or after DG 17. These early deaths were not considered directly related to the test article. The other three deaths (one in the 6 mg/kg/day dose group and two in the 9 mg/kg/day dose group) were unscheduled euthanizations of mice that had mistimed pregnancies (two mice) or that had presumably delivered and cannibalized its litter (one mouse).

b Median anti-rHuPH20 antibody titers are reported by subset for all maternal mice dosed with rHuPH20 (3, 6, and 9 mg/kg dose groups). There was no significant correlation (non-parametric Spearman's correlation, p = 0.3313) between the maternal anti-rHuPH20 titer values and rHuPH20 dose group, suggesting that within the range of rHuPH20 doses administered in this study, the antibody levels in the F0 maternal animals were comparable.

c Median anti-rHuPH20 antibody titers are reported by subset for individual litters/mice across all three maternal rHuPH20 dose levels (3, 6, and 9 mg/kg). The maternal animal was dosed and maternal antibody titers were presented as a median. Therefore, rHuPH20 and/or anti-rHuPH20 antibodies in the fetus/pup were maternally transferred to the fetus/pup and the titer values for the litter were also presented as a median.

d　No notable differences in anti-rHuPH20 antibody titers in the pups by sex were observed.
e　A qualitative assessment of the cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to the murine homologues of PH20 (SPAM1) and Hyal5 was performed on all maternal and offspring plasma samples that were positive for anti-rHuPH20 antibodies. Incidence for maternal mice and fetuses/pups is reported for all three rHuPH20 dose levels (3, 6, and 9 mg/kg) combined. While the incidence of measured cross-reactivity declined in pup samples between PND 23 and PND 60, there was a corresponding decline in overall anti-rHuPH20 antibody titer over the same time frame.

2.6.7.17.3　ウサギを用いた 3 種類の免疫感作条件による抗 rHuPH20 抗体反応の検討

Report Title: Antibody Response Against rHuPH20 in New Zealand White Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures		**Halozyme Report** 12124 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-3
Duration of Dosing: Group 1 (Days of Study 1, 8, 22, 36, 57); Groups 2 & 3 (Days of Study 1-14, 16-28, 43); Group 4 (Days of Study 1, 8, 15, 22, 29, 50)[a]		**Test Article:** rHuPH20
Species/Strain: Rabbit/ NZW	**Method of Administration:** SC/IM (Group 1); SC (Groups 2, 3, 4)	**GLP Compliance**: No
Initial Age: ~4 months at receipt	**Vehicle**: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl (pH6.5) and Sterile Water for Injection, USP	**Date of First Dose**: [redacted] 20[redacted]
Special Features: Evaluation of the incidence, time course and magnitude of circulating ADA in non-pregnant female rabbits after SC or IM administration of rHuPH20 in support of GLP studies 12208 and 12195.		

Group No.	**Group 1**	**Group 2**	**Group 3**	**Group 4**
Number Animals Evaluated	4	2	5	5
Median Anti-rHuPH20 Titer Values	Day of study (Titer) Predose (negative) 33 (76800) 43 (307200) 57 (307200) 71 (3276800) 85 (1228800) 99 (819200) 113 (614400) 126 (1228800)	Day of study (Titer) Predose (negative) 16 (negative) 30 (negative) 43 (negative) 57 (negative) 71 (negative) 85 (negative) 99 (negative) 112 (negative)	Day of study (Titer) Predose (negative) 16 (102400) 30 (1638400) 43 (1638400) 57 (1638400) 71 (819200) 85 (409600) 99 (204800) 112 (409600)	Day of study (Titer) Predose (negative) 19 (128000) 36 (614400) 50 (819200) 64 (819200) 78 (409600) 92 (409600) 106 (204,00) 119 (204800)
Incidence of Cross-Reactivity to rRbPH20 at Each Time Point (Group 4 only)				
Day 19	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 36	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 50	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 64	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 78	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 92	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 106	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 119	ND	NA	ND	80% (4/5)

GLP=Good Laboratory Practice; IM = intramuscular; NA = not applicable; ND = not determined; No. = number; rRbPH20= recombinant rabbit hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous;

a Female NZW rabbits were administered rHuPH20 using one of three different dosing regimens: (regimen 1) intermittently with adjuvant (Group 1); (regimen 2) SC without adjuvant at a dose of 0.76 mg/kg once daily for 28 days and DS 43 (Group 3); or (regimen 3) SC once weekly without adjuvant for five weeks and DS 50 (Group 4). Group 2 animals received once daily SC administration of the rHuPH20 vehicle for 28 days.

2.6.7.17.4　雄ウサギ授胎能及び生殖能に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Male Fertility and General Reproduction in the New Zealand White Rabbit		**Halozyme Report** 12208 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-4
Lot Number: [redacted]	**Duration of Dosing**: 7 doses total on DS 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57	**Test Article:** rHuPH20
Species/Strain: Rabbit/NZW	**Day of Mating:** DG 0	**Day of C-Section**: DG 18
Initial Age: Males: ~ 4 months at receipt Females: ~ 6 months at receipt	**Method of Administration**: SC	**Date of First Dose**: [redacted] 20[redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl (pH6.5) in Sterile Water for Injection		**GLP Compliance**: Yes
Special Features: Evaluation of ADA titers, cross-reactivity to recombinant rabbit PH20 (rRbPH20), and neutralizing activity in treated males. Evaluation of semen parameters in treated males and mating outcome through implantation by conducting C-section of non-treated females that had been mated to ADA positive males.		

Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.76** [a]
Number of Males	22	22
Number Died or Euthanized Moribund	0	0
Number of Males Mated	20	21
Dermal Scoring		
Erythema: Grade 1 (No.obs./No. animals w/ obs.)	0/0	24/12 [b, c]
Erythema: Grade 2 (No.obs./No. animals w/ obs.)	2/1	10/4 [c]
Erythema: Grade 3 (No.obs./No. animals w/ obs.)	0/0	2/1 [c]
Additional Examinations [d]		
ADA Median Titer Value		
Day 8	Negative	1,600
Day 29	Negative	2457600
Day 85	Negative	6553600
Incidence (%) Cross Reactivity of ADA to rRbPH20		
Day 29	NA	>90%
Day 85	NA	>90%
Incidence (%) ADA Neutralizing Activity		
Day 43	NA	82%
Females (Untreated and Mated with Treated Males)		
Number Died or Sacrificed Moribund	0	1 [e]
Number Pregnant	17	21

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76 [a]
Note: There were no effects attributed to ADA on sperm parameters or Caesarean-section evaluations in the mated and non-drug treated females (mating outcomes), demonstrating that persistent exposure to ADA prior to mating had no effect on male reproductive functions, mating behavior or fertility.		

ADA= anti-drug antibody; DG = day of (presumed) gestation; DS = day of study; GLP=Good Laboratory Practice; NA = not applicable; No. = number; rRbPH20= recombinant rabbit hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

a All rHuPH20-dosed animals had anti-rHuPH20 antibodies prior to mating and through termination.

b Significantly different from the control group value ($p \leq 0.01$).

c These reactions were noted after the 5th dose and resolved within 4 days of each dose and were therefore not considered adverse.

d For all male rabbits, blood samples for plasma analysis of ADA were collected on DS 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57, and on the day of necropsy (DS 85). Plasma samples from rHuPH20-treated rabbits at all time points and from vehicle control-treated rabbits on DS 1 and DS 43 were assayed for the presence of anti-rHuPH20 binding antibody titers. Antibody analyses also included cross-reactivity of antibodies from rHuPH20-dosed males to rRbPH2) at each interval and anti-rHuPH20 neutralizing activity of plasma samples from rHuPH20-dosed males on DS 43.

e A single untreated female that was mated by a rHuPH20-treated male was found dead on DG 8. The cause of death was not determined. Because the female was not treated with rHuPH20 and an occasional death occurs in the control population, the death was not considered related to rHuPH20 treatment.

2.6.7.17.5　雌ウサギの受胎能、胚・胎児発生及び出生後の発達に及ぼす抗 rHuPH20 抗体の影響の評価

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments in the New Zealand White Rabbit		**Halozyme Report** 12195 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-5
Lot No: [redacted]	**Duration of Dosing**: DS 1, 8, 15, 22, 29, 42 and 59 (DG 15)	**Test Article:** rHuPH20
Species/Strain: Rabbit/NZW	**Vehicle/Formulation**: 10 mM Histidine, 130 mM NaCl (pH6.5) in Sterile Water for Injection	**Day of Mating**: DG 0 **Day of C-Section**: DG 29 (Subgroup A only)
Initial Age: ~ 6 months at receipt	**Method of Administration:** SC	**Date of First Dose**: [redacted] 20[redacted]
Special Features: Evaluation of ADA, including satellite groups for assessment in fetuses and pups.[a] Postnatal observations of F1 generation were conducted preweaning through adulthood to include sexual maturation, neurobehavioral testing and assessment of fertility and mating outcome.		**GLP Compliance**: Yes

Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0.76**
F_0 Females		
Number of Animals	44	44
Number Died or Euthanized Moribund[b]	2[c]	1[d]
Number Mated	43	41
Number Pregnant	40	37
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0
Maternal ADA: Median Titer Values /% Incidence Cross Reactivity to rRbPH20	Titer / rRbPH20	Titer / rRbPH20
Day 8	NA	1,600
Day 15	NA	51,200
Day 22	NA	409600 / >80%
Day 29	NA	3276800 / 100%
Day 42	NA	3276800 / 100%
DG 15	NA	3276800 / >90%
DG 29	NA	3276800 / >80%
DL 4	NA	819200 / >60%
DL 29	NA	409600 / >50%
Maternal ADA: % Incidence rHuPH20 Neutralizing Activity/ % Incidence rRbPH20 Neutralizing Activity	rHuPH20 / rRbPH20	rHuPH20 / rRbPH20
Day 42	NA	>75% / ≥60%
DG 15	NA	>75% / ≥60%
DG 29	NA	>75% / ≥60%

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76
F_1 Litters (Preweaning)		
Number of Litters Evaluated	16	15
F1 Generation ADA: Median Titer Value / % Incidence Cross Reactivity to rRbPH20	Titer / rRbPH20	Titer / rRbPH20
DG 20	NA	204800 / >20%
DL 4	NA	3276800 / 100%
DL 29	NA	409600 / >40%
F_1 Males (Postweaning)		
Number Evaluated	22	22
Number Died or Euthanized Moribund	0	0
Number of Males that Mated	19	19
Number of Fertile Males	19	15
F1 Generation ADA Median Titer Value		
Day 42	NA	76800
Day 62	NA	12800
Day 92	NA	3200
Day of Mating (~ Day 152)	NA	200
DG 18 (female)	NA	Negative
Day 189-195 (male)	NA	Negative
F_1 Females (Postweaning)		
Number Evaluated	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	1 [e]
Number of Females that Mated	20	21
Number of Females Pregnant	19	17
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.76
F1 Generation ADA Median Titer Value		
Day 42	NA	76800
Day 62	NA	12800
Day 92	NA	3200
Day of Mating (~ Day 152)	NA	200
DG 18 (female)	NA	Negative
Day 189-195 (male)	NA	Negative
Note: The presence of circulating ADA did not show an effect on F0 female fertility (number of corpora lutea, implantations, live and dead fetuses, early and late resorptions and pre- and post-implantation loss) or on embryo-fetal development (fetal viability, weights, sex ratio, and fetal external, visceral and skeletal examinations). The natural delivery following in utero exposure to ADA did not show an effect on maternal health or offspring health, growth and postnatal development including developmental milestones, behavior, activity and fertility of the offspring. ADA did not show effects on the offspring preweaning or postweaning through maturity and mating.		

ADA= anti-drug antibodies; DG= day of (presumed) gestation; DL= day of lactation; DS= day of study; GLP=Good Laboratory Practice; NA= not applicable; No.= number; PND= postnatal day; SC= subcutaneous; rRbPH20= recombinant rabbit PH20

a Anti-rHuPH20 antibody titers were measured in female rabbit plasma samples at weekly intervals from baseline through DS 29, on DS 42, and in maternal plasma on DG 15 and DG 29. A satellite group of 3 additional rabbits per group per interval was included to assess maternal and fetal/pup levels of anti-rHuPH20 antibodies on DG 20 and PND 4. In addition, cross reactivity of plasma IgG to rRbPH20 was evaluated at the same intervals and in vitro neutralization of rHuPH20 was evaluated on DS 42, DG 15 and DG 29, while in vitro neutralization of rRbPH20 was evaluated on DS 42, DG 15, DG 29 and DL4. In the buffer control-treated animals, antibody testing was performed at baseline on DS 1 and again at DG 29.

b Mortalities were not directly attributed to rHuPH20 treatment or ADA.

c One rabbit was found dead on DG 31, and one aborted and was euthanized on DG 22.

d One rabbit was found dead on DS 9 (during the treatment phase, prior to mating). Prior to dosing on DS 8, this rabbit exhibited signs of mild dehydration, slow breathing and severely reduced food consumption. After dosing this rabbit became hypoactive and cold to touch and was found dead the following day.

e Rabbit was found dead on postpartum day 69. No clear cause of death could be determined but since this was a single event, it was not considered related to the presence of ADA.

2.6.7.17.6　3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体のウサギ正常組織に対する交差反応性：免疫蛍光標識法及び免疫組織化学的（IHC）染色法の比較

Report Title: Antibody Response Against rHuPH20 in New Zealand White Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures: Immunofluorescence Labeling and Comparison of Immunohistochemical Methods and Conditions for Evaluating Potential Cross-Reactivity of Rabbit Anti-rHuPH20 Polyclonal Antibodies in Select Normal Rabbit Tissues		**Halozyme Report** 12124-SR **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-6
Study Type: ADA Characterization and Tissue Cross-Reactivity	**Special Features:** Evaluation of rabbit anti-rHuPH20 polyclonal antibodies (Rb anti-PH20 pAbs) developed by different immunization methods to bind to rabbit PH20 in sperm and testis. Subreport for Halozyme Study 12124.	
Antibody reagents: Rabbit anti-rHuPH20 pAbs generated from three different immunization methods	**Methods**: Immunofluoresence and IHC staining	**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Rabbit - NZW/ sperm, testis, enteric neural plexus (ENP)		
Noteworthy findings: The three Rb anti-rHuPH20 pAbs generated by different immunization methods all bound to rabbit PH20 in sperm and testis tissue. The staining by Rb anti-rHuPH20 pAbs observed in ganglion (neural) cells of rabbit colon containing ENP was determined to be nonspecific.		

ADA= anti-drug antibodies; ENP= enteric neural plexus; GLP=Good Laboratory Practice; IHC= immunohistochemistry; pAbs= polyclonal antibody; Rb= rabbit

2.6.7.17.7　正常ヒト組織を用いたウサギ抗 rHuPH20 ポリクローナル抗体の組織交差反応性試験

Report Title: Immunohistochemical Analysis of the Human Tissue Cross-Reactivity of an Antibody to Recombinant Human Hyaluronidase PH20 (rHuPH20)		**Halozyme Report** 12058 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-7
Study Type: Tissue Cross-Reactivity	**Antibody reagent**: Affinity purified rabbit anti-rHuPH20 pAb	**GLP Compliance**: No
Methods: IHC staining	**Special Features**: Assess PH20 expression in human tissues using an affinity purified rabbit anti-rHuPH20 pAb reagent, then confirm specificity by blocking with rHuPH20	
Species/Tissues Evaluated : Human/adrenal gland, bladder, bone marrow, brain-cerebellum, brain-cortex, breast, colon, eye-retina, fallopian tube, heart, ileum, kidney-cortex, liver, lung-parenchyma, lung-bronchus, lymph node, ovary, pancreas, parathyroid, parotid, peripheral nerve, pituitary, placenta, prostate, skeletal muscle, skin, spinal cord, spleen, stomach, testis, thymus, thyroid, tonsil, ureter, uterus-cervix, uterus-endometrium, appendix, duodenum, nasopharynx, esophagus, cartilage, synovium		
Noteworthy findings: Immunoreactivity of the Rb anti-rHuPH20 pAb is limited to germinal epithelium in the central portion of the seminiferous tubules (late stages of spermatogenesis) and weak staining in the cytoplasm of the ENP located in the esophagus and colon.		

ENP= enteric neural plexus; GLP=Good Laboratory Practice; IHC= immunohistochemistry; pAbs= polyclonal antibody; Rb= rabbit

2.6.7.17.8　正常ヒト組織を用いたビオチン標識ヒト抗 PH20 抗体及びヒト抗 rHuPH20 抗体の組織交差反応性試験

Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of Biotinylated Baxter BioLife Study GP64PR12018 Plasma Sample PBN12DTXD5953 and Baxter Studies 160603/160902 Samples TE 010003 and TE 040005 in Selected Normal Human Tissues		**Halozyme Report** 13086 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-8
Study Type: Tissue Cross-Reactivity	**Antibody reagent:** Biotinylated affinity purified human anti-rHuPH20 antibody from three patients	**GLP Compliance:** Yes
Methods: IHC staining	**Special Features:** Determine cross-reactivity of human anti-rHuPH20 to human tissues.	
Species/Tissues Evaluated: Human/colon, heart, testis		
Noteworthy findings: All three human anti-rHuPH20/anti-PH20 antibody reagents positively stained spermatogenic cells within the testis. The staining observed in the heart and colon tissues was interpreted as non-specific based on the minor smudgy and diffuse character along with the rapid titration or coincident staining with pigment granules. In conclusion, the human anti-rHuPH20/anti-PH20 antibodies demonstrated specific binding to the testis, but not heart or colon human tissues.		

GLP=Good Laboratory Practice; IHC= immunohistochemistry; pAbs= polyclonal antibody

2.6.7.17.9　マウスにおける SPAM1/PH20 及び HYAL5 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 and HYAL5 Gene Expression in the Mouse		**Halozyme Report** 12196 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-9
Study Type: Gene Expression	**Methods:** RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from murine tissues	**GLP Compliance:** No
qPCR probe specificity: Murine SPAM1 and HYAL5	**Special Features:** Determine the expression levels and localization of murine SPAM1 and HYAL5 in murine tissues at the RNA level using quantitative polymerase chain reaction (qPCR).	
Species/Tissues Evaluated: Mouse (C57 Bl/6, CD-1, and ICR Balb/c)/ adult brain, cerebellum, colon, kidney, liver, lung, ovary, cervix, uterus, vagina, pancreas, prostate, skeletal muscle, skin, stomach, testis, thymus, uterus, eye, heart, lymph, placenta, spleen, cartilage, epididymis, esophagus, small intestine; juvenile postnatal day (PND) 1-21 testis, heart, corpus callosum; fetal day of gestation (DG) 7-18 whole embryos		
Noteworthy findings: Expression of murine SPAM1 and HYAL5 occurs predominantly in the testis and begins approximately between PND 14 and PND 21. In addition, both genes are also expressed in the epididymis at low levels (approximately 250-350 fold lower levels as compared to testis). There is also low expression of SPAM1 in the ovary (approximately 2,000 fold lower compared to testis).		

cDNA= complementary DNA; DG= day of gestation; GLP=Good Laboratory Practice; HYAL= hyaluronidase; PND= postnatal day; qPCR= quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR= reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1= sperm adhesion molecule 1

2.6.7.17.10　マウス脳梁における SPAM1/PH20 の発現

Report Title: Examining the Expression of PH20/SPAM1 in the Corpus Callosum of Murine Brain – A Preliminary Study		**Halozyme Report 12210** **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-10
Study Type: Gene Expression	**Methods:** RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from murine tissues	GLP Compliance: No
qPCR probe specificity: murine SPAM1	**Special Features:** Determine the expression levels of murine SPAM1 in murine corpus callosum at the RNA level using reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).	
Species/Tissues Evaluated: mouse (C57Bl/6, Nu/Nu, SCID)/ adult corpus callosum, cortex, testis		
Noteworthy findings: PH20 is not expressed in the murine corpus callosum using RT-qPCR conditions that readily detected expression in the testis.		

cDNA= complementary DNA; RT-qPCR= reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1= sperm adhesion molecule 1

2.6.7.17.11　精巣及び結腸腸神経叢を含むウサギの特定組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の RT-qPCR 解析

Report Title: Reverse Transcriptase (RT) – Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Analysis of SPAM1 Gene Expression in Specific Rabbit Tissues Including Testis and Enteric Neural Plexus of the Colon		**Halozyme Report** 13091 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-11
Study Type: Gene Expression	**Methods:** RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from rabbit tissues	**GLP Compliance:** No
qPCR probe specificity: European brown rabbit SPAM1	**Special Features:** Determine whether SPAM1/PH20 mRNA is expressed in a select panel tissues isolated from adult (5 months of age) rabbit	
Species/Tissues Evaluated: Rabbit – NZW/ testis, corpus callosum, cortex, enteric neural plexus (ENP) of colon		
Noteworthy findings: SPAM1/PH20 expression level was high in testis samples, however, no SPAM1/PH20 was observed in the brain cortex, brain corpus callosum, or colon ENP samples.		

cDNA= complementary DNA; ENP= enteric neural plexus; qPCR= quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR= reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1= sperm adhesion molecule 1

2.6.7.17.12　ウサギの胎児、幼若及び成体組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 Gene Expression in Fetal and Adult Tissues of the New Zealand White Rabbit		**Halozyme Report** 13116 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-12
Study Type: Gene Expression	**Methods:** RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from rabbit tissues	**GLP Compliance:** No
qPCR probe specificity: European brown rabbit SPAM1	**Special Features:** Analysis of the spatial and temporal expression of SPAM1 mRNA in adult and fetal tissues of the NZW rabbit, as well as reproductive and neuronal tissues from juvenile animals	
Species/Tissues Evaluated: Rabbit - NZW/ Adult: cartilage, colon, heart, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, skeletal muscle, testis, cervix, uterus, and vagina (5 months old) Fetuses: whole fetuses and placentas at days of gestation (DG) 11, 14, and 17 and from fetal colon, heart, ovary, pancreas, placenta, small intestine, stomach, testis at DG 20, 23, 26, and 29 Juvenile: corpus callosum, cortex, epididymis, and testis (one to four months old)		
Noteworthy findings: During fetal development there was transient, low level expression of SPAM1 only in the placenta, while in the adult expression is primarily in the testis and epididymis. The temporal expression pattern of SPAM1 expression in the testis from juvenile animals coincides with the reported development of the blood-testis barrier. All other fetal, juvenile, and adult tissues tested were below the lower limit of quantitation (LLOQ) for the SPAM1 RT-qPCR assay.		

cDNA= complementary DNA; DG= day of gestation; LLOQ= lower limit of quantitation; RT-qPCR= reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1= sperm adhesion molecule 1

2.6.7.17.13　ヒト結腸腸神経叢における SPAM1/PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 Gene Expression in the Enteric Neural Plexus of Human Colon		**Halozyme Report** 12147 **Location in CTD:** 4.2.3.7.7-13
Study Type: Gene Expression	**Methods:** RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from human tissues	**GLP Compliance:** No
qPCR probe specificity: human SPAM1	**Special Features:** Human ENP cDNA samples were evaluated for the presence SPAM mRNA transcripts RT-qPCR. Human testis cDNA samples were also evaluated using RT-qPCR to serve as a positive control.	
Species/Tissues Evaluated: human/ ENP, testis		
Noteworthy findings: There was no expression of SPAM1 mRNA in human colon ENP, however, expression of SPAM1 mRNA in human testis was confirmed.		

cDNA= complementary DNA; ENP= enteric neural plexus; RT-qPCR= reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1= sperm adhesion molecule 1

2.6.7.17.14　ヒト成人及び胎児組織における SPAM1/PH20 遺伝子発現の RT-qPCR 解析

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 Gene Expression in Human Adult and Fetal Tissues</td><td>Halozyme Report 12197
Location in CTD: 4.2.3.7.7-14</td></tr>
<tr><td>Study Type: Gene Expression</td><td>Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from human tissues</td><td>GLP Compliance: No</td></tr>
<tr><td>qPCR probe specificity: human SPAM1</td><td colspan="2">Special Features: Determine the expression levels and tissue localization of SPAM1 in both adult and fetal human tissues, using RT-qPCR.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Species/Tissues Evaluated: human/
Adult: brain, breast, cartilage, cecum, cerebellum, colon, colon (ascending), colon (descending), colon (transverse), corpus callosum, cortex, duodenum, esophagus, fallopian tube, heart, ileocecum, ileum, jejunum, kidney, leukocytes, liver, lung, ovary, pancreas, placenta, prostate, rectum, skeletal muscle, skin, small intestine, spleen, stomach, synovium, testis, thymus, uterus, uterus (cervix)
Fetal: brain, cerebellum, colon, cortex, esophagus, heart, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, prostate, skeletal muscle, skin, small intestine, spleen, stomach, testis, thymus, uterus
Primary human cell culture: neurons, astrocytes, oligodendrocyte precursor cells</td></tr>
<tr><td colspan="3">Noteworthy findings:
The distribution profile for SPAM1 transcripts in vivo is primarily found in adult testis. Low levels of expression were also observed in adult cartilage, epididymis, kidney, placenta, skeletal muscle, and synoviocytes, and fetal colon, ovary, pancreas, small intestine, stomach and testis. SPAM1 mRNA was not detected in any of the neuronal tissues and/or neuronal cells tested.</td></tr>
</table>

cDNA= complementary DNA; RT-qPCR= reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1= sperm adhesion molecule 1

2.6.7.17.15 ヒト、マウス及びウサギ由来の成人/成体及び胎児組織における SPAM1/PH20 及び他のヒアルロニダーゼ遺伝子発現の RNA-Seq 解析

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: Expression of SPAM1/PH20 and Other Hyaluronidases in Various Adult and Fetal Tissues from Human, Mouse, and Rabbit as Assessed by High-Throughput Deep RNA Sequencing (Non-GLP): An Interim Study</td><td>Halozyme Report 14077
Location in CTD: 4.2.3.7.7-15</td></tr>
<tr><td>Study Type: Gene Expression</td><td>Methods: deep RNA sequencing (RNA-Seq)</td><td>GLP Compliance: No</td></tr>
<tr><td>RNA Transcripts Profiled:
SPAM1, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4</td><td colspan="2">Special Features: Determine the transcriptional profile of SPAM1 and other hyaluronidases in human, murine, and rabbit tissues using RNA-Seq</td></tr>
<tr><td colspan="3">Species/ Tissues Evaluated:
Human/
adult: bone (cartilage), brain, corpus callosum, enteric neural plexus (ENP), epididymis, kidney, placenta, prostate, skeletal muscle, skin, synovium, testis primary cell cultures: oligodendrocyte precursors, neurons, astrocytes
fetal: colon, kidney, ovary, pancreas, prostate, small intestine, stomach, testis
Mouse (CD-1, C57Bl/6, ICR, Webster)/
adult: corpus callosum, brain, cervix, colon, cortex, epididymis without sperm, epididymis, kidney, ovary, skeletal muscle, testis, uterus, vagina
primary cell cultures: oligodendrocyte precursors, astrocytes
fetal: whole embryos day of gestation (DG) 15, 16, 17, and 18, brain (DG18), embryo (DG18), intestines (DG18), placenta (DG18)
Rabbit (NZW)/
adult: corpus callosum, cortex, epididymis, testis each at 1, 2, 3, and 4 months
fetal: colon, placenta, small intestine, stomach each at DG 23</td></tr>
<tr><td colspan="3">Noteworthy findings:
The RNA-Seq results demonstrate that expression of SPAM1/PH20 is highly specific and restricted to the adult male reproductive tract in human, mouse, and rabbit. There was no SPAM1 expression detected in any RNA samples obtained from tissues of neuronal origin, including brain, corpus callosum, and ENP. This contrasts with expression of other specific hyaluronidase genes which were expressed (at the mRNA level) in a broad range of tissues.</td></tr>
</table>

cDNA= complementary DNA; DG= day of gestation; HYAL= hyaluronidase; RNA-Seq = RNA sequencing, SPAM1= sperm adhesion molecule 1,