目次

2.4.1 非臨床試験計画概略.....3
2.4.1.1 ダラツムマブ.....3
2.4.1.2 ヒアルロニダーゼ.....4
2.4.1.3 ダラツムマブと rHuPH20 の併用（Dara-rHuPH20）.....4
2.4.2 薬理試験.....5
2.4.2.1 rHuPH20.....5
2.4.2.1.1 効力を裏付ける試験.....5
2.4.2.1.2 副次的薬理試験.....6
2.4.2.1.3 安全性薬理試験.....6
2.4.3 薬物動態試験.....6
2.4.3.1 rHuPH20.....6
2.4.3.1.1 分析法.....8
2.4.3.1.2 吸収.....8
2.4.3.1.3 分布.....9
2.4.3.1.4 代謝.....9
2.4.3.1.5 排泄.....9
2.4.3.1.6 薬物動態学的薬物相互作用.....9
2.4.4 毒性試験.....10
2.4.4.1 rHuPH20.....10
2.4.4.1.1 単回投与毒性試験.....12
2.4.4.1.2 反復投与毒性試験.....12
2.4.4.1.3 遺伝毒性試験.....13
2.4.4.1.4 がん原性試験.....13
2.4.4.1.5 生殖発生毒性試験.....13
2.4.4.1.6 局所刺激性試験.....14
2.4.4.1.7 その他の毒性試験.....15
2.4.4.1.8 安全域.....16
2.4.4.2 Dara-rHuPH20.....16
2.4.4.2.1 局所刺激性試験.....17
2.4.5 総合評価及び結論.....17
2.4.5.1 rHuPH20.....17
2.4.5.2 Dara-rHuPH20.....19
2.4.6 参考文献.....19

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
ADA	anti-drug antibody（抗薬物抗体）
AUC_{24h}	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours（0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積）
AUC_{last}	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint（0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積）
CL	systemic clearance（全身クリアランス）
C_{max}	maximum plasma concentration（最高血漿中濃度）
ECLIA	electrochemiluminescent immunoassay（電気化学発光免疫測定）
EFD	embryo-fetal development（胚・胎児発生）
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素結合免疫吸着測定）
GD	gestation day（妊娠日数）
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／ヒアルロナン）
HED	human equivalent dose（ヒト等価用量）
ICH	International Council for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
IgG	immunoglobulin G（免疫グロブリン G）
K_m	Michaelis-Menten constant（ミカエリス・メンテン定数）
LD	lactation day（授乳日数）
LLOQ	lower limit of quantitation（定量下限）
NOAEL	no-observed-adverse-effect-level（無毒性量）
NZW	New Zealand White（ニュージーランドホワイト）
PND	postnatal day（生後日数）
PPND	pre/postnatal development（出生前及び出生後の発生）
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase PH20［ボルヒアルロニダーゼアルファ（遺伝子組換え）］
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（ディープ RNA シークエンシング）
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction（定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）
SPAM1	sperm adhesion molecule 1（精子接着分子 1）
$T_{1/2}$	elimination half-life（消失半減期）
T_{max}	time to maximum plasma concentration（最高血漿中濃度到達時間）
V_{ss}	volume of distribution at steady-state（定常状態における分布容積）

2.4.1　非臨床試験計画概略

ダラツムマブ（遺伝子組換え）（以下，ダラツムマブ）は，腫瘍細胞上に発現する膜貫通糖タンパク質である CD38 に対して高い結合親和性を示すヒト免疫グロブリン（Ig）G1κ抗体製剤で，複数の作用機序を介して抗腫瘍効果を示す。ダラツムマブ点滴静注製剤（Dara-IV 製剤）は，多発性骨髄腫（MM）の治療薬として既に世界各国で承認されており，本邦でも「再発又は難治性の多発性骨髄腫」を効能・効果として 2017 年に新有効成分含有医薬品として初回承認されている。

新たな皮下投与製剤であるダラツムマブ皮下注製剤（Dara-SC 製剤，本剤）は，ダラツムマブとボルヒアルロニダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（以下，rHuPH20）を含有する新医療用配合剤である。rHuPH20 は，rHuPH20 と同時に皮下投与した治療薬の拡散及び吸収を促進する目的で配合されるエンドグリコシダーゼである。rHuPH20 は他剤の吸収及び拡散促進剤として 2005 年に米国で承認され，また，リツキシマブ又はハーセプチンとの配合剤が皮下投与製剤として欧米で承認されている。本邦では rHuPH20 及び rHuPH20 を配合する製剤は承認されていない。本申請は，ダラツムマブの新投与経路及び新用量を追加するための医薬品製造販売承認事項一部変更承認申請，並びに rHuPH20 の新有効成分含有医薬品及び「多発性骨髄腫」を効能・効果としたダラツムマブと rHuPH20 の新医療用配合剤としての医薬品製造販売承認申請である。

ダラツムマブの非臨床試験結果は，「再発又は難治性の多発性骨髄腫」を効能・効果とした Dara-IV 製剤の初回申請時に評価済みである。今回の申請にあたって，新たに rHuPH20 の非臨床試験，並びにダラツムマブ及び rHuPH20 を併用皮下投与（Dara-rHuPH20）した局所刺激性試験の結果を提出する。

rHuPH20 及び Dara-rHuPH20 の毒性試験は，医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)，S9 及び M3(R2)ガイドラインに従って実施した。重要な毒性試験は，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。

2.4.1.1　ダラツムマブ

ダラツムマブの作用機序は，補体依存性細胞傷害作用，抗体依存性細胞傷害作用，抗体依存性細胞貪食作用及び Fcγ 受容体を介した腫瘍細胞と抗体間架橋形成によるアポトーシス誘導での直接的な細胞傷害作用である。また，ダラツムマブは免疫抑制性のサブセットである CD38 陽性の制御性 T 細胞，骨髄由来免疫抑制細胞及び制御性 B 細胞を速やかかつ持続的に除去することに加え，CD38 酵素活性の調節や悪性骨髄腫細胞に対する傷害作用により，CD8 及び CD4 陽性 T 細胞のクローナルな増殖を誘導すると考えられる[1),2)]。このようなダラツムマブの集合的な作用機序が，患者で認められている深い奏効を相乗的にもたらすと推定されている。

ダラツムマブの非臨床試験結果は，「再発又は難治性の多発性骨髄腫」を効能・効果とした Dara-IV 製剤の初回申請時に提出した資料に基づいて既に評価されている。

2.4.1.2　ヒアルロニダーゼ

rHuPH20 は，ヒトヒアルロニダーゼ（PH20）の可溶性フラグメントをコードする DNA プラスミドを導入したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞から，分子量 60～65 kDa のグリコシル化一本鎖タンパク質として産生される[3)]。

rHuPH20 の基質であるヒアルロン酸（HA）は非分岐直鎖グリコサミノグリカンであり，眼の硝子体，臍帯，滑液，心臓弁，皮膚，骨格組織などの多くの組織の細胞外／細胞周囲マトリックスに遍在する構造成分として，結合するタンパク質との相互作用により形態発生や創傷治癒等の様々な細胞機能に関与する[4),5)]。局所で分解された HA はリンパ管からリンパ節に運ばれ，ヒアルロニダーゼによって分解される[6)]。PH20 ヒアルロニダーゼは，N-アセチルグルコサミンの C1 位とグルクロン酸の C4 位の間の β-1,4 結合の加水分解によって HA を脱重合し，四糖及び六糖の最終生成物を産生する[7)]。PH20 ヒアルロニダーゼによる HA の脱重合により細胞外マトリックスのゲル状相の粘性が一過性に低下し，拡散作用が促進される[8),9),10)]。他の薬剤と併用皮下投与することにより治療薬の拡散及び吸収が促進されるが，その程度は PH20 ヒアルロニダーゼの用量及び併用投与する薬剤の容量と相関する[7),9)]。

rHuPH20 の効力を裏付ける試験は，マウス，ラット及びミニブタで検討した。マウスに rHuPH20 を皮内投与し，一過性及び局所性の拡散促進作用を評価した。ラットに皮内投与し，投与液の皮膚反応性を評価した。また，ミニブタに皮下投与し，硬結及び投与部位局所への影響を評価した。安全性薬理パラメータは，カニクイザル 39 週間反復皮下投与毒性試験の中で評価した。

rHuPH20 の薬物動態試験は，マウス及びカニクイザルで検討した。すなわち，マウス及びカニクイザルに rHuPH20 を単回及び反復皮下又は静脈内投与したときの吸収［抗 rHuPH20 抗体（ADA）産生を含む］，並びにマウスに rHuPH20 又は ^{125}I で標識した rHuPH20（^{125}I-rHuPH20）を単回皮下，皮内又は静脈内投与したときの分布及び排泄を評価した。

rHuPH20 の重要な毒性試験は，カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験，マウスを用いた胚・胎児発生に関する（EFD）試験，マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する（PPND）試験，並びに幼若マウスを用いた 8 カ月間反復投与毒性試験（胚・胎児発生に関する評価を含む）で検討した。受胎能は，カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験の成績を基に評価した。局所刺激性は，カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験，並びにマウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験の成績を基に評価した。PH20 は，精子先体を含む成体雄の生殖器官に認められ[11)]，受精時に卵母細胞への精子の侵入を促進することが報告されている[12)]。そのため，ADA が内因性 PH20 と反応する可能性があることから，マウス及びウサギを用いて ADA が受胎能及び F_1 児の発生・発育に及ぼす影響を評価した。さらに，ADA の潜在的な影響及び PH20 の組織発現プロファイルを明らかにするため，それぞれ組織交差反応性試験及び遺伝子発現解析試験を実施した。

2.4.1.3　ダラツムマブと rHuPH20 の併用（Dara-rHuPH20）

ダラツムマブと rHuPH20 の併用（Dara-rHuPH20）投与による局所刺激性は，ウサギ及びミニブタを用いて評価した。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　rHuPH20

2.4.2.1.1　効力を裏付ける試験

NCr nu/nu マウス及び Sprague-Dawley ラットを用いた検討では，ヒトの皮下スペースと類似し色素拡散を可視化しやすいことから，投与経路として皮内投与を選択した。また，トレーサ色素（[redacted]）の拡散を用いた手法は，ヌードマウスの皮膚におけるヒアルロニダーゼの薬理活性を評価する方法として確立されている[7)]。さらに，ユカタン系ミニブタはヒトの皮膚と解剖学的に類似し，臨床相当用量の治療用タンパク質を注入できる十分な体重とサイズを持つことから皮下投与試験の動物種として用いた[13)]。rHuPH20 の薬理試験の概要を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1 rHuPH20 の薬理試験の概要

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics				
Dye dispersion/dermal reconstitution	Mouse/NCr nu/nu	ID	No	R08103/ 【4.2.1.1.1】
Dye dispersion	Mouse/NCr nu/nu	ID	No	R09022/ 【4.2.1.1.2】
Dye dispersion	Mouse/NCr nu/nu	ID	No	R09109/ 【4.2.1.1.3】
Local skin reaction assessment	Rat/Sprague Dawley	ID	No	R09090/ 【4.2.1.1.4】
Induration assessment	Pig/Yucatan Mini	SC	No	11018/ 【4.2.1.1.5】
Induration assessment	Pig/Yucatan Mini	SC	No	11028/ 【4.2.1.1.6】
Local infusion (25 min) site evaluation	Pig/Yucatan Mini	SC	No	11125/ 【4.2.1.1.7】
Secondary Pharmacodynamics				
Secondary pharmacodynamics studies were not conducted.				
Safety Pharmacology				
39-week Repeat-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	0，0.02，0.2，2.0 mg/kg SC once weekly	Yes	R09050/ 【4.2.3.2.2】

ID = intradermal; min = minute; SC = subcutaneous.

各種試験で[redacted]色素の拡散面積を比較した結果，皮内投与した rHuPH20 が一過性かつ局所性拡散促進作用を示すことが明らかになった。rHuPH20 の皮内又は皮下投与後，投与部位における病理組織学的な変化は観察されなかった。

マウスにおいて，皮内投与した rHuPH20 は溶媒投与群と比較して色素拡散を一過性に促進した。その作用は rHuPH20 の投与 6 時間後まで観察され，投与 18 時間後には消失し，拡散を阻害する皮下組織が再構築されると考えられた【2.6.2.2.2.1】。また，rHuPH20（0.04～1,200 U/匹）の皮内投与は，対側に投与した色素の拡散には影響を及ぼさなかった。さらに，皮内投与した rHuPH20（80 U/匹）の色素拡散作用は，静脈内投与した抗 rHuPH20 中和抗体により抑制されなかったことからも，rHuPH20 は局所性に作用することが示された【2.6.2.2.2.2】。

ラットに rHuPH20 を皮内投与後，投与部位皮膚の病理組織学的検査の結果，rHuPH20 の皮内投与に関連した局所皮膚反応性を示す所見は認められなかった【2.6.2.2.2.3】。

ユカタン系ミニブタでヒト免疫グロブリン G（IgG）（50～300 mL）の皮下投与に対する rHuPH20（2,240～100,000 U/匹）の影響を検討したところ，rHuPH20 を皮下投与することにより，大量の IgG の皮下投与に伴う投与部位の腫脹，注入圧の上昇及び皮膚表面温度の低下を軽減し，皮膚の柔軟性及び血流量を維持した。その結果，大量の IgG の皮下投与に伴う硬結の発現を抑制し，IgG の拡散を促進した【2.6.2.2.2.4，2.6.2.2.2.5 及び 2.6.2.2.2.6】。

以上をまとめると，マウス，ラット及びミニブタを用いた薬理試験から，rHuPH20 は一過性かつ局所性に拡散促進作用を示し，併用皮下投与する治療薬の拡散を促進させることが明らかになった。

2.4.2.1.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.1.3 安全性薬理試験

rHuPH20 の独立した安全性薬理試験は実施しなかったが，心血管系，呼吸系及び中枢神経系に及ぼす rHuPH20 の影響は，カニクイザル 39 週間反復皮下投与毒性試験の中で評価した【2.6.2.4】。rHuPH20 は 2 mg/kg/回（220,000 U/回）まで，安全性薬理パラメータ（一般状態，心電図，心拍数，血圧及び呼吸数）に対する有害な影響を及ぼさなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 rHuPH20

rHuPH20 の単回投与後の薬物動態，並びに反復投与後のトキシコキネティクス及び ADA 産生は，マウス及びカニクイザルを用いて検討した。また，rHuPH20 又は ^{125}I-rHuPH20 の単回投与後の組織分布及び排泄は，マウスを用いて検討した。rHuPH20 の非臨床薬物動態試験の概要を表 2.4-2 に示す。

表 2.4-2 rHuPH20 の非臨床薬物動態試験の概要

Type of Study	Test System	Method of Administration: Doses Tested	GLP	Report No./ Location in CTD
Absorption				
Single-Dose PK				
Evaluation of the Pharmacokinetics of Two Halozyme Test Articles Following a Single IV Dose	Mouse/ CD-1	IV: 0.4 mg/kg (44,000 U/kg)	No	R09023/ 【4.2.2.2.1】
A Multi-Dose Pharmacokinetics Study of rHuPH20 Administered by IV and SC Injection	Monkey/ Cynomolgus	IV: 0.3, 3, 15, 30 mg/kg (33,000, 330,000, 1,650,000, 3,300,000 U/kg) SC: 1, 3, 10, 30 mg/kg (110,000, 330,000, 1,100,000, 3,300,000 U/kg)	No	R07060/ 【4.2.2.2.2】
Repeat-Dose TK				
SC Developmental Toxicity Study of rHuPH20	Mouse/ CD-1	SC: 3, 9, 18 mg/kg (330,000, 990,000, 1,980,000 U/kg)	Yes	R08176/ 【4.2.3.5.2.2】
A 7-Day Repeat Dose IV and SC Toxicity Study of rHuPH20	Monkey/ Cynomolgus	IV, SC: 5 mg/kg (550,000 U/kg)	Yes	R08056/ 【4.2.3.2.1】
A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered SC with a Recovery Phase	Monkey/ Cynomolgus	SC: 0.02, 0.2, 2 mg/kg (2,200, 22,000, 220,000 U/kg)	Yes	R09050/ 【4.2.3.2.2】
Distribution				
Biodistribution of rHuPH20 in the Skin, Lymphatics and Plasma after ID Administration	Mouse/ NCr nu/nu athymic	ID: 0.00073 mg/animal (80 U/animal)	No	R08127/ 【4.2.2.3.1】
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity Following Single ID Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse/ CD-1	ID: 0.00133 mg/animal (400 U/animal)	No	12214-B/ 【4.2.2.3.2-2】
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity Following Single ID or SC Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse/ CD-1	ID, SC: 0.00173 mg/animal (100 U/animal)	No	13184/ 【4.2.2.3.3】
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity Following Single IV Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse/ CD-1	IV: 0.004 mg/animal (200 U/animal)	No	13128/ 【4.2.2.3.4】
Metabolism In accordance with ICH S6 (R1), studies on the metabolism of rHuPH20 were not conducted as it is a biotechnology-derived pharmaceutical.				
Excretion				
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity Following Single ID Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse/ CD-1	ID: 0.00133 mg/animal (400 U/animal)	No	12214-B/ 【4.2.2.3.2-2】
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity Following Single ID or SC Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse/ CD-1	ID, SC: 0.00173 mg/animal (100 U/animal)	No	13184/ 【4.2.2.3.3】
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity Following Single IV Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse/ CD-1	IV: 0.004 mg/animal (200 U/animal)	No	13128/ 【4.2.2.3.4】

ID=intradermal; IV=intravenous; SC=subcutaneous.

2.4.3.1.1 分析法

マウスの血漿中 rHuPH20 濃度は，バリデーションした酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を用いて測定した。定量下限は 0.625 U/mL であった。カニクイザルの血漿中 rHuPH20 濃度は，バリデーションした比濁法を用いて測定した。定量下限は 10 U/mL であった。また，比濁法を用い，^{125}I-rHuPH20 が活性を有することも確認した。

マウス及びウサギの血漿中 ADA は，バリデーションした電気化学発光免疫測定（ECLIA）法を用いて測定した。カニクイザルの血漿中 ADA は，バリデーションした ELISA 法を用いて測定した。また，比濁法を用い，マウス，ウサギ及びカニクイザルの血漿中中和 ADA も測定した。ADA に関する一部の試験結果は，2.4.4.1.7 に記載する。

2.4.3.1.2 吸収

2.4.3.1.2.1 単回投与薬物動態試験

CD-1 マウス及びカニクイザルに rHuPH20 をそれぞれ 0.4 及び 0.3 mg/kg（それぞれ 44,000 及び 33,000 U/kg）の用量で単回静脈内投与したとき，rHuPH20 の全身クリアランス（CL）は非常に速やかであり，血漿中濃度の消失半減期（$T_{1/2}$）は，マウスでは約 2 分，カニクイザルでは約 5 分であった。また，カニクイザルに高用量（3，15 及び 30 mg/kg；それぞれ 330,000，1,650,000 及び 3,300,000 U/kg）で単回静脈内投与したとき，クリアランスの飽和が認められ，ミカエリス・メンテン定数（K_m）は 1,118 U/mL と推定された。

rHuPH20 の皮下吸収は，カニクイザルに 1，3，10 及び 30 mg/kg（それぞれ 110,000，330,000，1,100,000 及び 3,300,000 U/kg）の用量で単回皮下投与して検討した。1 mg/kg では血漿中濃度が低く，評価できなかったものの，全身曝露量は 3～30 mg/kg で用量にほぼ比例して増加し，コンパートメントモデル解析によるバイオアベイラビリティは 1.5～3.9%と推定された。検討した最も高い皮下投与量における血漿中濃度は，K_m より低かった。

2.4.3.1.2.2 反復投与トキシコキネティクス試験

CD-1 マウスを用いた EFD 試験において，rHuPH20 を 3，9 及び 18 mg/kg（それぞれ 330,000，990,000 及び 1,980,000 U/kg）の用量で 1 日 1 回，妊娠 6～15 日（GD 6～15）に反復皮下投与したとき，rHuPH20 の全身曝露量は，おおむね用量の増加に伴い増加した。また，ADA は，GD 6 では全ての動物で陰性（抗体価 50 未満），GD 15 では陽性（抗体価 200～3,200,000 以上）であり，抗体価に明らかな用量依存性は認められなかった。

カニクイザルを用いた 7 日間反復投与毒性試験において，rHuPH20 を 5 mg/kg（550,000 U/kg）の用量で 1 日 1 回，7 日間反復静脈内又は皮下投与したとき，静脈内投与後の定常状態における分布容積（V_{ss}）は小さく，皮下投与後の血漿中における最高濃度到達時間（T_{max}）の中央値は 1 時間であった。皮下投与後の全身曝露量は，静脈内投与後より著しく低く［血漿中における 0 時間から最終定量可能時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）を用いて算出した 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%］，皮下投与後の全身曝露は限定的であることが示された。

カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験において，rHuPH20 を 0.02，0.2 及び 2 mg/kg（それぞれ 2,200，22,000 及び 220,000 U/kg）の用量で週 1 回，39 週間反復皮下投与したとき，投与前値で補正後の血漿中濃度は，2 mg/kg 投与群では定量可能であったものの，0.02 及び 0.2 mg/kg 投与群ではほとんどの時点で定量下限（10 U/mL）未満となった。このことからも，皮下投与された rHuPH20 のバイオアベイラビリティは低いことが示唆された。ADA は投与開始 6 週間後からほとんど全ての rHuPH20 投与動物で検出され，中和 ADA は概して投与開始 13 週間後から検出された。また，ADA 抗体価及び中和 ADA 抗体価ともに，概して用量及び反復投与回数の増加に伴い増加した。2 mg/kg 投与群で認められた反復投与後の全身曝露量の減少は，中和 ADA の産生による可能性が考えられる。

2.4.3.1.3 分布

NCr nu/nu マウスに rHuPH20 を 0.00073 mg/匹（80 U/匹）の用量で単回皮内投与したとき，投与部位の皮膚内濃度は 12.9 分の $T_{1/2}$ で速やかに減少し，投与 4 時間後に定量下限（約 0.7 U/mL）未満となった。また，リンパ節内濃度は非常に低く，ほとんどの血漿中（40 検体中 39 検体）に rHuPH20 は認められなかった。これらのことから，投与部位における rHuPH20 活性は一時的なものであり，全身曝露はごくわずかであることが確認された。

CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を 0.00133 mg/匹（400 U/匹）の用量で単回皮内投与，若しくは 0.00173 mg/匹（100 U/匹）の用量で単回皮内又は皮下投与したとき，放射能濃度は投与部位で高く，投与後初期におけるリンパ節内放射能濃度は，右側と比較して投与側である左側の方が高かったことから，リンパ節を介した分布が示唆された。また，CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を 0.004 mg/匹（200 U/匹）の用量で単回静脈内投与したとき，放射能濃度は肺及び肝臓で高かった。

2.4.3.1.4 代謝

rHuPH20 はバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6（R1）に従い，rHuPH20 の代謝試験は実施しなかった。

2.4.3.1.5 排泄

CD-1 マウスに ^{125}I-rHuPH20 を 0.00133 mg/匹（400 U/匹）の用量で単回皮内投与，0.00173 mg/匹（100 U/匹）の用量で単回皮内又は皮下投与，若しくは 0.004 mg/匹（200 U/匹）の用量で単回静脈内投与したとき，投与放射能の大部分（70%以上）が尿及びケージ洗浄液（ケージに付着した乾燥尿）中に回収され，少量（約 5～17%）が糞中に回収された。

2.4.3.1.6 薬物動態学的薬物相互作用

rHuPH20 の薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 rHuPH20

rHuPH20 の毒性試験の概要を表 2.4-3 に示す。

HA の構造は動物種間で共通しており[14)]，rHuPH20 はマウス及びカニクイザルで薬理学的活性を示すと考えられるため，rHuPH20 の影響を評価する動物種としてこれらの動物を選択した。PH20 はヒトとカニクイザルで高い相同性を示し，マウスと比較して免疫原性が低いと考えられたことから，長期投与による毒性評価に適切な動物種としてカニクイザルを選択した。一方，生殖発生毒性試験に汎用されていることから，EFD 試験，PPND 試験及び幼若動物を用いた毒性試験の動物種としてマウスを選択した。母体 IgG が胎盤を通過する時期がヒトと類似していることから[15)]，受胎能，EFD 及び出生児の発達に及ぼす ADA の影響を評価する適切な動物種としてウサギを選択した。

表 2.4-3 rHuPH20 の毒性試験の概要

Study Type	Species/Strain	Doses Tested (mg/kg/dose), Method, Frequency of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
Single-Dose Toxicity Dedicated studies were not deemed necessary, but single ascending doses were evaluated in R07060【4.2.2.2.2】.				
Repeat-Dose Toxicity				
7-day Repeat-Dose Toxicity & Toxicokinetics	Monkey/ Cynomolgus	0, 5 (0, 550,000 U/kg) IV or SC, once daily	Yes	R08056/ 【4.2.3.2.1】
39-week Repeat-Dose Toxicity & Toxicokinetics with 4-week Recovery[a]	Monkey/ Cynomolgus	0, 0.02, 0.2, 2.0 (0, 2,200, 22,000, 220,000 U/kg) SC, once weekly	Yes	R09050/ 【4.2.3.2.2】
Genotoxicity In accordance with ICH S6 (R1) guideline, no studies were conducted due to the nature of the product.				
Carcinogenicity As per ICH S6 (R1) and S9 guidelines, no carcinogenicity studies with rHuPh20 were conducted.				
Reproductive and Developmental Toxicity				
EFD Dose Range-Finding	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	0, 1, 3, 10, 30 (0, 110,000, 330,000, 1,100,000, 3,300,000 U/kg) SC, once daily, GD 6 to 15	No	R07046/ 【4.2.3.5.2.1】
EFD Pivotal	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	0, 3, 9, 18 (0, 330,000, 990,000, 1,980,000 U/kg) SC, once daily, GD 6 to 15	Yes	R08176/ 【4.2.3.5.2.2】
PPND Pivotal	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	0, 3, 6, 9 (0, 330,000, 660,000, 990,000 U/kg) SC, once daily, GD 6 to 22 or GD 6 to LD 20	Yes	R09058/ 【4.2.3.5.3.1】
Juvenile Animal 6-week Repeat-Dose Toxicity & Toxicokinetics Dose range-finding	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	0 (daily), 1, 3, 9 (0, 110,000, 330,000, 990,000 U/kg) SC, once daily or weekly, PND 7 to 42	No	13123/ 【4.2.3.5.4.1】

表 2.4-3 rHuPH20 の毒性試験の概要（続き）

Study Type	Species/Strain	Doses Tested (mg/kg/dose), Method, Frequency of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity (Continued)				
Juvenile animal Life-time toxicity Pivotal	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	0, 1 (0, 110,000 U/kg) SC, Juvenile Subset: once daily, PND 7 to 30; once weekly, PND 30 to 129, Chronic Subset: once daily, PND 7 to 30; once weekly, PND 30 to 241	Yes	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 **Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies in Developmental and Reproductive Toxicity Studies**				
Exposure to circulating ADA in a satellite PPND	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	0, 3, 6, 9 (0, 330,000, 660,000, 990,000 U/kg) SC, once daily, GD 6 to 16, GD 18, LD 4, 13 or 21	No	12096/ 【4.2.3.7.7.1】
ADA response in immunization procedures	Rabbit/ NZW	See footnote[a] SC/IM, Days 1, 8, 22, 36, 57 0.76 (83,600 U/kg) SC, once daily, Days 1 to 14, 16 to 28, 43 0.76 (83,600 U/kg) SC, once weekly, Days 1, 8, 15, 22, 29, 50	No	12124/ 【4.2.3.7.7.2】
Effects of ADA on male fertility and reproduction	Rabbit/ NZW	0, 0.76 (0, 83,600 U/kg) SC, Days 1, 8, 15, 22, 29, 43, 57	Yes	12208/ 【4.2.3.7.7.3】
Effects of ADA on female fertility and EFD and PPND assessments	Rabbit/ NZW	0, 0.76 (0, 83,600 U/kg) SC, Days 1, 8, 15, 22, 29, 42, 59 (GD 15)	Yes	12195/ 【4.2.3.7.7.4】
Tissue Cross-Reactivity Studies				
ADA characterization/ tissue cross-reactivity	Rabbit/ NZW	In vitro study Rabbit anti-rHuPH20 antibody, rabbit tissues	No	12124-SR/ 【4.2.3.7.7.5】
Tissue cross-reactivity	Human	In vitro study Rabbit anti-rHuPH20 antibody, human tissues	No	12058/ 【4.2.3.7.7.6】
Tissue cross-reactivity	Human	In vitro study Human anti-rHuPH20/-HuPH20 antibody, human tissues	Yes	13086/ 【4.2.3.7.7.7】

表 2.4-3 rHuPH20 の毒性試験の概要（続き）

Study Type	Species/Strain	Doses Tested (mg/kg/dose), Method, Frequency of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
Gene Expression Studies				
Gene expression	Mouse/C57Bl/6, CD-1, ICR Balb/c	In vitro study RT-qPCR, fetal, juvenile and adult tissues	No	12196/ 【4.2.3.7.7.8】
Gene expression	Mouse/C57Bl/6, Nu/Nu, SCID	In vitro study RT-qPCR, several tissues	No	12210/ 【4.2.3.7.7.9】
Gene expression	Rabbit/NZW	In vitro study RT-qPCR, several tissues	No	13091/ 【4.2.3.7.7.10】
Gene expression	Rabbit/NZW	In vitro study RT-qPCR, fetal, juvenile and adult tissues	No	13116/ 【4.2.3.7.7.11】
Gene expression	Human	In vitro study RT-qPCR, colon containing enteric neural plexus	No	12147/ 【4.2.3.7.7.12】
Gene expression	Human	In vitro study RT-qPCR, adult and fetal tissues, primary cells	No	12197/ 【4.2.3.7.7.13】
Gene expression	Human, Mouse/CD-1, ICR, C57Bl/6, Webster, Rabbit/NZW	In vitro study RNA-Seq, fetal and adult tissues, primary cells (human and mouse)	No	14077/ 【4.2.3.7.7.14】

[a] On Day 1, animals received 4 SC injections of 100 µL of a 1:1 emulsion of rHuPH20 (1 mg/mL) and Complete Freund's Adjuvant (CFA). On subsequent days, animals received 4 IM injections of 50 µL of a 1:1 emulsion of rHuPH20 and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) into the hind limbs.

EFD = embryo-fetal development; GD = gestation day; IM = intramuscular; IV = intravenous; LD = lactation day; NZW = New Zealand White; PND = postnatal day; PPND = pre and postnatal development; RNA = ribonucleic acid; RNA-Seq = deep RNA sequencing; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SC = subcutaneous.
Note: See【2.6.7.1】for additional information on studies conducted with rHuPH20.

2.4.4.1.1 単回投与毒性試験

rHuPH20 の単回投与毒性は，雌のカニクイザルを用いた薬物動態試験の結果に基づいて評価した。rHuPH20 を最大 30 mg/kg（3,300,000 U/kg）まで皮下又は静脈内投与したときの忍容性は良好であり，一般状態，体重，血液凝固検査及び血液生化学的検査への影響はみられなかった【2.6.6.2.1.1】。

2.4.4.1.2 反復投与毒性試験

7 日間反復投与毒性試験では，雌雄のカニクイザルに rHuPH20 を 0（溶媒対照）及び 5 mg/kg/日（550,000 U/kg/日）の用量で皮下又は静脈内投与した【2.6.6.3.1.1】。rHuPH20 を 5 mg/kg/日の用量で投与したときの忍容性は良好であり，rHuPH20 投与に関連した有害な所見はみられなかった。皮下投与における血漿中 rHuPH20 濃度は静脈内投与に比べて低かった。両投与経路のいずれも，試験を通して rHuPH20 の全身曝露が認められたため，rHuPH20 の皮下及び静脈内投与に関連する潜在的なリスクを適切に評価できたものと考えられた。本試験の無毒性量（NOAEL）は両投与経路とも 5 mg/kg/日と判断した。

39 週間反復投与毒性試験では，雌雄のカニクイザルに rHuPH20 を 0（溶媒対照），0.02，0.2 及び 2 mg/kg/週（2,200，22,000 及び 220,000 U/kg/週）の用量で皮下投与した【2.6.6.3.1.2】。最高用量の 2 mg/kg/週まで投与局所及び全身に対する忍容性は良好であり，rHuPH20 投与に関連した有害な所見はみられなかった。0.02 及び 0.2 mg/kg/週群の血漿中 rHuPH20 濃度はほとんどの測定時点で，定量下限（LLOQ）未満であった。一方，2 mg/kg/週群における全身曝露量は低かったが，少なくとも雄で 6 カ月間及び雌で 9 カ月間，血漿中に rHuPH20 が検出された。ADA 及び中和抗体の陽性率及び抗体価の中央値はともに 2 mg/kg/週群で最も高く，投与期間を通して，おおむね増加した。しかし，反復投与後に中和抗体の産生と関連した rHuPH20 の曝露量の減少が認められた。ADA 及び中和抗体の産生と関連した毒性はみられなかった。本試験の NOAEL は 2 mg/kg/週と判断した。

2.4.4.1.3 遺伝毒性試験

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

2.4.4.1.4 がん原性試験

rHuPH20 は天然アミノ酸から構成されるタンパク質であり，進行がんである多発性骨髄腫の治療を目的としたダラツムマブとの併用投与のみで使用されることから，ICH S6（R1）及び ICH S9 ガイドラインに基づき，rHuPH20 のがん原性試験は実施しなかった。

2.4.4.1.5 生殖発生毒性試験

rHuPH20 の受胎能に及ぼす影響は，カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験の成績に基づいて評価した。rHuPH20 を 2 mg/kg/週（220,000 U/kg/週）までの用量で週 1 回，39 週間皮下投与したが，雌の月経周期，雄の精巣サイズ，精子検査（精子の濃度，運動性及び形態），黄体形成ホルモン値及び雌雄生殖器の病理組織学的検査に影響はみられなかった。したがって，受胎能への影響は低いと判断された。

EFD 用量設定試験では，妊娠雌 CD-1 マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照），1，3，10 及び 30 mg/kg/日（110,000，330,000，1,100,000 及び 3,300,000 U/kg/日）の用量で GD 6～15 に連日皮下投与した。その結果，30 mg/kg/日群で母動物の体重及び体重増加量の減少，吸収胚数の増加，同腹児数の減少，並びに胎児体重の減少，10 mg/kg/日以上の群で脾臓の腫大が認められた【2.6.6.6.2.1(1)】。

重要な EFD 試験では，CD-1 マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照），3，9 及び 18 mg/kg/日（330,000，990,000 及び 1,980,000 U/kg/日）の用量で，GD 6～15 に連日皮下投与した。その結果，胎児では，9 mg/kg/日以上の群で後期吸収胚数の増加及び体重の減少が認められた【2.6.6.6.2.1(2)】。母動物における rHuPH20 の曝露量は，GD 6 では，3，9 及び 18 mg/kg/日群の平均最高濃度（C_{max}）値はそれぞれ 3.4，30.5 及び 49.6 U/mL であり，平均 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{24h}）値はそれぞれ 5.5，45.3 及び 120 U·h/mL であった。GD 15 では，3，9 及び 18 mg/kg/日群の平均 C_{max} 値はそれぞれ 20.9，17.1 及び 99.2 U/mL であ

り，平均 AUC_{24h} 値はそれぞれ 55.1，79.0 及び 363 U·h/mL であった。C_{max} 及び AUC_{24h} は，GD 6 及び 15 で概して用量依存性に増加した。したがって，母動物に対する NOAEL は 18 mg/kg/日，胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg/日と判断した。マウスの胚・胎児に対する NOAEL における rHuPH20 のヒト等価用量（HED）換算値は，臨床推奨用量の 30,000 U と比較して 45 倍高かった（表 2.4-4）。また，臨床推奨用量では，rHuPH20 が測定可能な全身曝露に至る可能性は低いと考えられることから【2.7.2.3.1.1】，ヒトに rHuPH20 を皮下投与したときの EFD に影響を及ぼすリスクは低いと考えられた。

PPND 試験では，妊娠雌 CD-1 マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照），3，6 及び 9 mg/kg/日（330,000，660,000 及び 990,000 U/kg/日）の用量で，GD 6～授乳 20 日（LD 20）に連日皮下投与したが，母動物の生殖能，並びに出生児の生殖能，成長及び機能発達に及ぼす rHuPH20 の影響は認められなかった【2.6.6.6.3.1(1)】。

幼若マウスを用いた反復投与用量設定試験では，生後 7 日（PND 7）～42 の幼若 CD-1 マウスに，rHuPH20 を 0（溶媒対照），1，3 及び 9 mg/kg/日（110,000，330,000 及び 990,000 U/kg/日）の用量で連日，若しくは 3 及び 9 mg/kg/日（330,000 及び 990,000 U/kg/週）の用量で週 1 回，5 週間皮下投与したが，いずれの用量でも忍容性は良好であり，毒性は認められなかった【2.6.6.6.4.1(1)】。

幼若マウスを用いた 8 カ月間反復投与毒性試験（胚・胎児発生に関する評価を含む）では，幼若 CD-1 マウスに rHuPH20 を 0（溶媒対照）及び 1 mg/kg の用量で，PND 7～30 に連日皮下投与し，PND 129（生殖発生毒性評価）又は PND 241（慢性毒性評価）まで週 1 回皮下投与した【2.6.6.6.4.1(2)】。生殖発生毒性評価サブセット及び慢性毒性評価サブセットではいずれも，成長，機能発達，雌雄の受胎能，生殖能及び／又は胎児発生に rHuPH20 投与による有害な影響は認められなかった。rHuPH20 を投与した全ての動物で ADA の産生がみられ，中和抗体及び遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ［遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ PH20（rMuPH20）及び遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ 5（rMuHyal5）］に対する ADA の交差反応性が高頻度に認められた。

rHuPH20 と併用投与されるダラツムマブでは，生殖発生毒性試験は実施しておらず，妊娠中の投与に関する安全性は確立していない。そのため，rHuPH20 の生殖発生毒性に関する更なる検討は実施していない。

2.4.4.1.6　局所刺激性試験

カニクイザルを用いた 7 日間及び 39 週間反復投与毒性試験，マウスを用いた EFD 試験，ウサギを用いた生殖発生に及ぼす ADA の影響を評価した試験で局所刺激性を評価した【2.6.6.7.1】。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，投与部位の血管周囲にリンパ形質細胞の浸潤がみられたが，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。CD-1 マウスを用いた皮下投与による EFD 用量設定試験では，剖検時に皮膚の肉眼的観察を実施したが，局所刺激性は認められなかった。雄のニュージーランドホワイト（NZW）ウサギを用いた皮下投与による受胎能試験では，投与部位に紅斑が認められたが，一過性であったことから有害ではないと考えられた。

以上のとおり，カニクイザル，マウス及びウサギにおいて rHuPH20 の皮下又は静脈内投与による有害な局所刺激性は認められなかった。

2.4.4.1.7 その他の毒性試験

2.4.4.1.7.1 生殖発生毒性試験における ADA 評価

CD-1 マウスを用いた PPND 補足試験では，妊娠及び授乳中の F_0 母動物，並びにそれらの F_1 児（胎児及び出生児）の血漿中 ADA を測定した【2.6.6.8.1.1(1)】。重要な PPND 試験と同じく，F_0 母動物に rHuPH20 を 0（溶媒対照），3，6 及び 9 mg/kg/日（330,000，660,000 及び 990,000 U/kg/日）の用量で GD 6 から連日皮下投与した。遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）と交差反応性を示す ADA が，rHuPH20 を投与した F_0 母動物の全例及び GD 18～PND 60 の F_1 児で認められたが，F_1 児の生死，一般状態，体重，性成熟，交配，受胎能，剖検及び機能検査に有害な影響はみられなかった。

NZW ウサギを用いた 2 つの試験で，雌雄の受胎能，EFD，並びに出生後評価に及ぼす ADA の影響を評価した。両試験では，確実に ADA を産生するために，rHuPH20 を 0.76 mg/kg/週（83,600 U/kg/週）の用量で週 1 回皮下投与した。雄の受胎能試験では，rHuPH20 群の全例で，交配前及び交配中に持続的な ADA 力価が認められ，最終剖検時まで維持された。ADA の産生がみられたが，精子及び生殖パラメータに異常は認められず，ADA の曝露は雄の生殖能，交配及び受胎能に影響を及ぼさないと考えられた【2.6.6.8.1.1(3)】。雌の受胎能，EFD 及び出生後の発達に関する試験では，母動物で交配前，妊娠及び授乳期間中に持続的な ADA の抗体価が認められた。母動物から胎児への ADA 移行が GD 20 にみられ，ADA の抗体価は PND 4 にピークに達した後に離乳まで低下したが，離乳後も出生児の ADA は持続し，受胎能及び生殖能評価のために交配させた約 3 カ月齢の出生児においても認められた。しかし，ADA は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【2.6.6.8.1.1(4)】。

2.4.4.1.7.2 組織交差反応性試験

アフィニティー精製ウサギ ADA を用いたヒト組織交差反応性試験では，ヒト精巣の精細管に強い染色が認められ，ヒト食道及び結腸の筋層内腸神経叢の細胞質に弱い染色がみられた【2.6.6.8.1.2(2)】。しかし，ヒト抗 PH20 抗体及びヒト ADA を用いたヒト組織交差反応性試験では，精巣のみに特異的な結合がみられた【2.6.6.8.1.2(3)】。

2.4.4.1.7.3 遺伝子発現解析試験

様々な発達段階のマウス（3 系統），NZW ウサギ及びヒト組織を用いて，精子接着分子 1（SPAM1）／PH20 遺伝子発現を定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）法及びディープ RNA シークエンシング（RNA-Seq）法により体系的に評価した【2.6.6.8.1.3】。RT-qPCR 法では，成人男性，並びにマウス及びウサギの成体雄の生殖器のみに SPAM1／PH20 の高い発現が認められたが，その他の多くの組織では LLOQ 付近の低い発現がみられた。RNA-Seq 法では，成人男性，並びにマウス及びウサギの成体雄の生殖器のみに SPAM1／PH20 の発現が認められ，そ

の他の組織では認められなかった。これらの結果は，PH20 の組織発現に関する公表論文の報告と同様であった[11]。

2.4.4.1.8 安全域

rHuPH20 の安全マージンの推定には，曝露パラメータの代わりに mg/kg（U/kg）を使用し，HED と比較して算出した。rHuPH20 の反復投与毒性試験，EFD 試験及び PPND 試験での NOAEL，HED 及び安全域を表 2.4-4 に示す。NOAEL の HED は，ヒトに rHuPH20 を 30,000 U（臨床推奨用量）の用量で投与した場合の約 45～296 倍であった。

表 2.4-4 rHuPH20 の毒性試験で求めた NOAEL に基づく安全域

Species/ Strain	Study Type/ Route/ Frequency	NOAEL mg/kg, (U/kg)	HED mg/kg[a] (U/kg)	Safety Margin[b]
Monkey/ Cynomolgus	7-day repeat-dose toxicity[c]/ IV or SC/once daily	5 (IV and SC) (550,000)	1.61 (177,419)	296
	39-week repeat-dose toxicity[d]/ SC/once weekly	2 (220,000)	0.65 (70,968)	118
Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	EFD/ SC/once daily[e]	3 (embryo-fetal)[e] (330,000)	0.24 (26,829)	45
		18 (maternal)[e] (1,980,000)	1.46 (160,976)	268
	PPND[f]/ SC/once daily	9 (maternal, F_1 and F_2)[f] (990,000)	0.73 (80,488)	134

[a] A HED based on allometric scaling was determined by dividing the NOAEL by a scaling factor of 3.1 for cynomolgus monkeys or 12.3 for mice.[16)]

[b] The HED (U/kg) was divided by the human dose of 600 U/kg rHuPH20 (clinical flat dose of 30,000 U rHuPH20 estimating a body weight of 50 kg) to determine the safety margin.

[c] There were no adverse effects, and the NOAEL was the highest dose tested【4.2.3.2.1】.

[d] There were no adverse effects, and the NOAEL was the highest dose tested【4.2.3.2.2】.

[e] rHuPH20 was embryo-fetotoxic at ≥ 9 mg/kg/dose (NOAEL = 3 mg/kg/day) as demonstrated by increased resorptions, decreased litter size, and decreased fetal weight. There were no maternal adverse effects at the highest dose tested, 18 mg/kg/dose【4.2.3.5.2.2】.

[f] There were no adverse effects for maternal, or F_1 mice or the ability to produce a F_2 generation, and the NOAEL was the highest dose tested (9 mg/kg/day)【4.2.3.5.3.1】.

EFD = embryo-fetal development; HED = human equivalent dose; IV= intravenous; NOAEL = no-adverse-effect level; PPND = pre- and post-natal development; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.4.4.2 Dara-rHuPH20

Dara-rHuPH20 の毒性試験を表 2.4-5 に示す。

薬理学的に適切な動物種であるチンパンジーは絶滅危惧種であり，米国[17)]及び欧州連合[18)]ではチンパンジーを用いた試験は禁止されていることから，皮下投与により新たな毒性試験を実施することはできない。したがって，ダラツムマブの臨床投与経路である皮下投与に対する影響は，局所刺激性のみ Dara-rHuPH20 投与によりウサギ及びミニブタを用いて評価した。

表 2.4-5 Dara-rHuPH20 の非臨床試験の概要

Study Type	Species/Strain	Concentration Tested, Method, Frequency of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
Local tolerance	Rabbit/NZW	Formulation buffer + rHuPH20 (200, 1,000 U/mL), daratumumab (20 mg/mL) + rHuPH20 (200, 1,000 U/mL) SC, 14 mL of mixture, 5 mL/min, syringe pump, single dose	Yes	T-2014-031/ 【4.2.3.6.1】
Assessment of different rHuPH20 concentrations and infusion rates	Mini-pig/ Yucatan	IgG (20 mg/mL) + rHuPH20 (200, 500, 800 U/mL) SC, 100 mL of mixture, 2 or 4 mL/min, syringe pump, single dose	No	15036/ 【4.2.3.6.2】
Assessment of different rHuPH20 concentrations with high concentration daratumumab	Mini-pig/ Yucatan	Daratumumab (100 mg/mL) + rHuPH20 (50, 500, 2,000, 5,000 U/mL), human IgG1κ + rHuPH20 (50, 5,000 U/mL) SC, 16 mL of mixture, 3 mL/min, syringe pump, single dose	No	16020/ 【4.2.3.6.3】
Assessment of needle size on SC infusion sets and manual injection [a]	Mini-pig/ Yucatan	Daratumumab (120 mg/mL) + rHuPH20 (2,000 U/mL) SC, 15 mL of mixture, 3 mL/min, syringe pump or 5 min, manual push, single dose	No	16093/ 【4.2.3.6.4】

[a] Assessment of needle size (23-, 25- or 27-gauge) on SC administration in sedated mini-pigs

GLP = Good Laboratory Practice; IgG1κ = immunoglobulin G1 kappa; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase; SC = subcutaneous.
Note: See【2.6.7.1】for additional information on studies conducted with dara-rHuPH20.

2.4.4.2.1 局所刺激性試験

NZW ウサギに 20 mg/mL のダラツムマブと 200 又は 1,000 U/mL の rHuPH20 を単回併用皮下投与した結果，rHuPH20 の単独投与と比較して有害な局所刺激性は認められなかった。その後，ユカタン系ミニブタに 100 mg/mL のダラツムマブと 50，500，2,000 又は 5,000 U/mL の rHuPH20 を単回皮下投与し，rHuPH20 の至適濃度を検討した結果，全ての濃度で投与部位に紅斑及び／又は腫脹が認められたが，500 U/mL 以上の濃度では，腫脹は小さくて柔らかく，紅斑は軽度～なしであった。さらに，ユカタン系ミニブタに 120 mg/mL のダラツムマブと 2,000 U/mL の rHuPH20 を 23，25 又は 27 ゲージの注射針を用いて単回皮下投与し，投与局所に及ぼす注射針径の影響を検討した。その結果，全ての投与群で投与部位に腫脹がみられたが，いずれの腫脹も投与 24 時間後には消失した。腫脹の大きさは 27 ゲージで最も大きく，注入圧及びシリンジを押す力は注射針の太さに伴い低下した。

以上のとおり，ウサギ及びミニブタにおいて，Dara-rHuPH20 の皮下投与による有害な局所刺激性は認められなかった。

2.4.5 総合評価及び結論

2.4.5.1 rHuPH20

効力を裏付ける試験から，rHuPH20 が皮下投与する併用薬の拡散及び吸収を容易にする一過性かつ局所性の拡散促進作用を示す酵素であることが示された。マウスを用いて実施した一連の色素拡散試験から，皮内投与した rHuPH20 が投与部位の皮膚で一過性かつ局所性の作用を示し，

色素拡散を促進することが明らかになった。ラットに rHuPH20 を皮内投与後，投与部位の皮膚組織の病理組織学的評価の結果，rHuPH20 の皮内投与に関連した局所皮膚反応性は認められなかった。マイクロ・ピッグを用いて実施した皮下投与試験から，rHuPH20 は大量の IgG 皮下投与に伴う投与部位の腫脹，注入圧の上昇及び皮膚表面温度の低下を軽減させ，皮膚の柔軟性及び血流量を維持した。その結果，大量の IgG の皮下投与に関連する硬結の発現を抑制することが明らかになった。

マウス及びカニクイザルに rHuPH20 を単回静脈内投与したとき，rHuPH20 の CL は非常に速やかであり，血漿中濃度の $T_{1/2}$ は，マウスでは約 2 分，カニクイザルでは約 5 分であった。また，カニクイザルに単回静脈内投与したとき，用量の増加に伴うクリアランスの飽和が認められたが，同用量範囲で単回皮下投与したとき，バイオアベイラビリティは 1.5～3.9%と低く，全身曝露量は用量にほぼ比例して増加した。マウスに rHuPH20 を反復皮下投与したとき，全身曝露量はおおむね用量の増加に伴い増加した。また，カニクイザルに反復皮下投与したとき，全身曝露は限定的であることが示唆された。反復投与後に認められた全身曝露量の減少は，中和 ADA の産生による可能性が考えられる。

マウスに rHuPH20 を単回皮内投与したとき，投与部位の皮膚内濃度は 12.9 分の $T_{1/2}$ で速やかに減少し，リンパ節内濃度は非常に低く，ほとんどの血漿中に rHuPH20 は認められなかった。このことから，投与部位における rHuPH20 活性は一時的なものであり，全身曝露はごくわずかであることが確認された。また，マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回皮内又は皮下投与したとき，放射能濃度は投与部位で高く，リンパ節を介した分布が示唆された。さらに，マウスに ^{125}I-rHuPH20 を単回静脈内投与したとき，放射能濃度は肺及び肝臓で高かった。いずれにおいても，投与放射能の大部分が尿及びケージ洗浄液（ケージに付着した乾燥尿）中に回収され，少量が糞中に回収された。

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

rHuPH20 の受胎能に及ぼす影響は，カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験で評価したが，最高用量の 2 mg/kg/週まで受胎能に及ぼす影響はみられなかった。

マウスを用いた rHuPH20 の EFD 試験では催奇形性はみられなかったが，9 mg/kg/日以上の用量で胚・胎児毒性が認められた。マウスを用いた PPND 試験では，最高用量の 9 mg/kg/日まで，母動物の生殖能，並びに出生児の生殖能，成長及び機能発達に及ぼす有害な影響は認められなかった。

幼若マウスを用いた 8 カ月間反復投与毒性試験（胚・胎児発生に関する評価を含む）では，1 mg/kg を最高 8 カ月間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，生殖能及び胎児発生に rHuPH20 投与及び ADA による有害な影響はみられなかった。

ADA の影響についてウサギを用いた生殖発生毒性試験で評価したが，雌雄の受胎能，EFD 及び出生児の発達に有害な影響は認められなかった。組織交差反応性試験，RT-qPCR 及び RNA-Seq 法による一連の遺伝子発現解析試験では，主に男性，並びにマウス及びウサギの成体雄の生殖器に SPAM1／PH20 の発現が認められた。

非臨床試験の結果から，rHuPH20 の皮下投与では，バイオアベイラビリティは限定的であり，安全性プロファイルが良好であることが明らかになった。また，ADA の長期曝露による生殖発生パラメータに及ぼす有害な影響は認められなかった。毒性試験から得られた安全域は，皮下投与による rHuPH20 のヒトへの安全性が高いことを支持する。

2.4.5.2 Dara-rHuPH20

ウサギ及びミニブタにおいて，Dara-rHuPH20 の皮下投与による局所刺激性は認められなかった。

2.4.6 参考文献

1） Chiu C, et al. Daratumumab in combination with lenalidomide plus dexamethasone induces clonality increase and T-cell expansion: results from a phase 3 randomized study (POLLUX). 58th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology; December 3-6, 2016; San Diego, CA. Abstract 4531.

2） van de Donk NWCJ, et al. Daratumumab in combination with lenalidomide plus dexamethasone results in persistent natural killer (NK) cells with a distinct phenotype and expansion of effector memory T-cells in Pollux, a phase 3 randomized study. Blood. 2017;130 (Supplement):3124.

3） Bookbinder LH, et al. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Control Release. 2006;114:230-41.

4） Fraser JR, et al. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med. 1997;242:27-33.

5） Dicker KT, et al. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. Acta Biomater. 2014;10:1558-70.

6） Laurent UBG, et al. Turnover of hyaluronan in the tissues. Adv Drug Deliv Rev. 1991;7:237-56.

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

8） Bywaters EG, et al. Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after hyaluronidase injection. Br Med J. 1951;2:1178-83.

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

10） Holborow EJ, et al. Hyaluronidase skin spreading effect; an analysis of repeated measurements. Br Med J. 1951;2:1173-8.

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

12） 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.

13） Kang DW, et al. Porcine model to evaluate local tissue tolerability associated with subcutaneous delivery of protein. J Pharmacol Toxicol Methods. 2013;67:140-7.

14） Grandoch M, et al. Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation. Circ Res. 2018;122:1341-3.

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

16） U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Pharmacology and Toxicology. 2005.

17） National Institutes of Health. The Use of Chimpanzees in NIH-Supported Research. 2016; Federal Register 81:6873-4.

18） Vermij P. Europe's last research chimps to retire. Nat Med. 2003;9:981.