目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文 3
2.6.4.1 まとめ 3
2.6.4.2 分析法 4
2.6.4.3 吸収 4
2.6.4.4 分布 8
2.6.4.5 代謝 10
2.6.4.6 排泄 10
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 10
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 10
2.6.4.9 考察及び結論 11
2.6.4.10 図表 12
2.6.4.11 参考文献 12
2.6.5 薬物動態試験概要表 1

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	area under the concentration-time curve（濃度－時間曲線下面積）
AUC_{24h}	area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours（0 時間から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積）
AUC_{last}	area under the 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濃度－時間曲線下面積）
C	concentration（濃度）
CL	systemic clearance（全身クリアランス）
CL_2	clearance for the linear elimination pathway（線形消失経路のクリアランス）
C_{max}	maximum concentration（最高濃度）
ECLIA	electrochemiluminescent immunoassay（電気化学発光免疫測定）
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素結合免疫吸着測定）
GD	gestation day（妊娠日数）
ICH	International Council for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
IV	intravenous（静脈内）
K_m	Michaelis-Menten constant（ミカエリス・メンテン定数）
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）］
SC	subcutaneous（皮下）
$T_{1/2}$	elimination half-life（消失半減期）
T_{max}	time to maximum concentration（最高濃度到達時間）
V	volume of distribution（分布容積）
V_{max}	maximal velocity（最大速度）
V_{ss}	volume of distribution at steady-state（定常状態における分布容積）

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

ダラツムマブ（遺伝子組換え）（以下，ダラツムマブ）は，分子量が約 148 kDa のヒト免疫グロブリン G1κ（IgG1κ）モノクローナル抗体であり，形質細胞及びその腫瘍細胞である多発性骨髄腫細胞の表面に発現する CD38 に特異的に結合する。ダラツムマブは，ヒト及びチンパンジーの CD38 に結合するが，マウス，ラット，ウサギ，ブタ，カニクイザル及びアカゲザルなどの毒性試験に汎用される動物種の CD38 には結合しないため，ダラツムマブ点滴静注製剤（Dara-IV 製剤）に関する初回の製造販売承認申請では，チンパンジーを用いた静脈内投与薬物動態試験を提出した。しかし，チンパンジーは絶滅危惧種であることから，今回のダラツムマブ皮下注製剤（Dara-SC 製剤）の製造販売承認申請では，新たな非臨床薬物動態試験を実施しなかった。なお，Dara-SC 製剤投与時のダラツムマブの薬物動態プロファイルはヒトで得られている【2.7.2】。

一方，Dara-SC 製剤には，ボルヒアルロニダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（以下，rHuPH20）も含まれている。rHuPH20 は，分子量が 60～65 kDa のヒトヒアルロニダーゼの可溶型グリコシル化一本鎖タンパク質であり，細胞外マトリックスであるヒアルロン酸を脱重合することにより皮下投与された併用薬の拡散を促進させる。ヒアルロン酸の構造は動物種間で共通していることから[1)]，rHuPH20 が薬理学的活性を示すと考えられるマウス及びカニクイザルを用いて，rHuPH20 の非臨床薬物動態試験を実施した。rHuPH20 の非臨床薬物動態試験の概要を【2.6.5.1】に示す。なお，試験間で比較ができるように，rHuPH20 の全身曝露量［最高濃度（C_{max}）及び濃度－時間曲線下面積（AUC）］は，それぞれ U/mL 及び U·h/mL で表し，報告書で他の単位が使用されていた場合はこれらの単位に変換した。また，非標識 rHuPH20 の用量（mg/kg）は，平均比活性（110,000 U/mg）を用いて U/kg に変換した。

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 3～30 mg/kg（330,000～3,300,000 U/kg）の用量範囲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 3～18 mg/kg（330,000～1,980,000 U/kg）の用量で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 2 及び 5 mg/kg（それぞれ 220,000 及び 550,000 U/kg）の用量で反復皮下投与したとき，皮下投与された rHuPH20 の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，抗 rHuPH20 中和抗体（中和 ADA）の産生による可能性が考えられる。

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，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 で標識した rHuPH20（^{125}I-rHuPH20）を 0.00133 及び 0.00173 mg/匹（それぞれ 400 及び 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。さらに，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。いずれにおいても，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。

2.6.4.2 分析法

2.6.4.2.1 rHuPH20

【評価資料 4.2.2.1.1，4.2.2.1.2，4.2.2.1.3，4.2.2.1.4，4.2.2.1.5，4.2.2.1.6，4.2.2.3.2-1】

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。

2.6.4.2.2 抗 rHuPH20 抗体

【評価資料 4.2.2.1.8，4.2.2.1.9，4.2.2.1.10，4.2.2.1.11，4.2.2.1.12，4.2.2.1.13，4.2.2.1.14】

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 に関する試験結果は，【2.6.6】にも記載する。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 単回投与薬物動態試験

2.6.4.3.1.1 マウスを用いた単回静脈内投与試験

【評価資料 4.2.2.2.1】

雄 CD-1 マウス（n=6/時点）に rHuPH20 を 0.4 mg/kg（44,000 U/kg）の用量で単回静脈内投与し，投与前，並びに投与 1，5，10，30，60 分，2 及び 3 時間後に採血した。このときの薬物動態パラメータを【2.6.5.3A】に示す。

血漿中 rHuPH20 濃度は静脈内投与後速やかに減少し，投与後 30 分までに定量下限（0.625 U/mL）未満となった。$T_{1/2}$ は 2.3 分（0.038 時間）と推定され，rHuPH20 はマウスの全身循環から速やかに消失することが示された。

2.6.4.3.1.2 サルを用いた単回静脈内及び皮下投与試験

【評価資料 4.2.2.2.2】

雌カニクイザル（n=3/群）に rHuPH20 を 0.3，3，15 及び 30 mg/kg（それぞれ 33,000，330,000，1,650,000 及び 3,300,000 U/kg）の用量で単回静脈内投与，又は 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，静脈内投与では

投与前，並びに投与 1，2.5，5，10，15，30 及び 60 分後，皮下投与では投与前，並びに投与 0.25，0.5，1，4，8，24 及び 48 時間後に採血した。本試験では，ノンコンパートメント及びコンパートメントモデルの両方を用いて rHuPH20 の薬物動態パラメータを解析した。ノンコンパートメント解析により得られた薬物動態パラメータを【2.6.5.3B】に示す。

静脈内投与後，血漿中 rHuPH20 濃度推移に非線形性が認められたのに対し，皮下投与後，1 mg/kg の用量では血漿中濃度が低く，評価できなかったものの，3～30 mg/kg の用量では全身曝露量は用量にほぼ比例して増加した。また，$T_{1/2}$ は，0.3 mg/kg の静脈内投与では約 5 分，3，10 及び 30 mg/kg の皮下投与では 10.3～15.7 時間であり，皮下投与後の緩やかな吸収が示された。

静脈内投与後の血漿中 rHuPH20 濃度を線形及び非線形のクリアランス（$CL = [V_{max}/(K_m + C)] + CL_2$；CL は全身クリアランス，$V_{max}$ は非線形クリアランスの最大速度，K_m はミカエリス・メンテン定数，C は血漿中 rHuPH20 濃度，CL_2 は線形クリアランス）を有する 1-コンパートメントモデルを用いて解析したところ［表 2.6.4-1（V は分布容積）及び図 2.6.4-1］，K_m は 1,118 U/mL と推定された。一方，皮下投与後の血漿中 rHuPH20 濃度は K_m より低く，一次吸収及び消失過程を有する 1-コンパートメントモデルで表すことができた（図 2.6.4-2）。コンパートメントモデル解析により得られた AUC に基づく 3，10 及び 30 mg/kg の用量で皮下投与したときのバイオアベイラビリティは低く，それぞれ 3.9，1.8 及び 1.5%と推定された。

表 2.6.4-1 1-コンパートメントモデル解析により得られたサルにおける薬物動態パラメータ

Parameter	Mean ± Standard Deviation
CL_2 (mL/h/kg)	9.3±1.3
V_{max} (U/h/kg)	2.7±0.1
K_m (U/mL)	1,118±146
V (mL/kg)	25.7±0.1

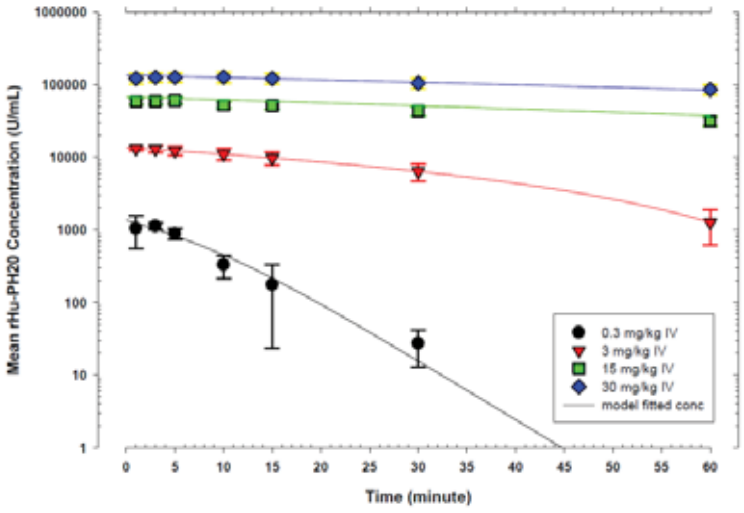


図 2.6.4-1 サルに静脈内投与したときの血漿中 rHuPH20 濃度推移

Symbol represents mean rHuPH20 concentration, error bar represents standard deviation and line represents model-fitted profile.

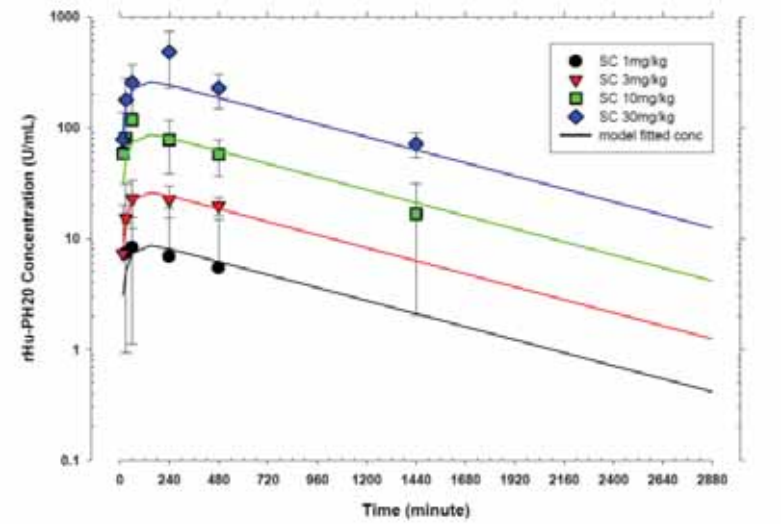


図 2.6.4-2 サルに皮下投与したときの血漿中 rHuPH20 濃度推移

Symbol represents mean rHuPH20 concentration, error bar represents standard deviation and line represents model-fitted profile.

2.6.4.3.2 反復投与トキシコキネティクス試験

2.6.4.3.2.1 マウスを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験

【評価資料 4.2.3.5.2.2】

妊娠 CD-1 マウス（n=3/時点）に 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，GD 6 及び 15 の投与前，並びに投与 0.5，2，4，8 及び 24 時間後に母動物から採血した。また，一部の血漿（GD 6 及び 15 の投与前，並びに GD 15 の投与 8 及び 24 時間後）を用いて，ADA を測定した。このときのトキシコキネティクスパラメータを【2.6.5.4A】に，ADA 抗体価を【2.6.5.4B】に示す。

rHuPH20 の血漿中における最高濃度到達時間（T_{max}）は 0.5～2 時間であった。また，全身曝露量はおおむね用量の増加に伴い増加し，3，9 及び 18 mg/kg 投与群の血漿中における C_{max} は GD 6 ではそれぞれ 3.4，30.5 及び 49.6 U/mL，GD 15 ではそれぞれ 20.9，17.1 及び 99.2 U/mL であり，血漿中における 0 時間から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{24h}）は GD 6 ではそれぞれ 5.5，45.3 及び 120 U·h/mL，GD 15 ではそれぞれ 55.1，79.0 及び 363 U·h/mL であった。また，ADA は，GD 6 では全ての動物で陰性（抗体価 50 未満）であったのに対して，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。

2.6.4.3.2.2 サルを用いた 7 日間反復投与毒性試験

【参考資料 4.2.3.2.1】

雌雄カニクイザル（n=2/性/群）に 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，静脈内投与では，Day 1 及び 7 の投与 1，5，10，30，60 分，2 及び 4 時間後，並びに Day 7 の投与 24 時間後，皮下投与では，Day 1 及び 7 の投与 0.5，1，2，4，8，12 及び 24 時間後に採血した。このときのトキシコキネティクスパラメータを【2.6.5.4C】に示す。

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%であった。

2.6.4.3.2.3　サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.2】

雌雄カニクイザル（n=6/性/群）に溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L NaCl，pH 6.0），並びに 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，Day 1 の投与前及び投与 0.25，0.5，1，2，4，6，12 時間後，並びに Day 21（溶媒，0.02 及び 0.2 mg/kg 投与群のみ），85，183 及び 267 に採血した。また，ADA の測定のために，Day 7，14，42，70，95，123，140，154，182，210，238，266，274，296 及び 302 に採血した。このときのトキシコキネティクスパラメータを【2.6.5.4D】に，ADA 抗体価を【2.6.5.4E】及び【2.6.5.4F】に示す。

Day 1 の投与前の血漿中にヒアルロニダーゼ活性（約 10～25 U/mL）が認められたため，各動物における投与前値を，その後の全ての時点における値から差し引いた。補正後，血漿中 rHuPH20 濃度は，溶媒対照群，並びに 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。一方，2 mg/kg 投与群では雌雄とも Day 1～85 まで増加し，その後，雄では Day 183 以降，雌では Day 267 に減少した。ADA は投与開始 6 週間後（Day 42）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（Day 95）から検出された（図 2.6.4-3 及び図 2.6.4-4）。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。これらのことから，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。

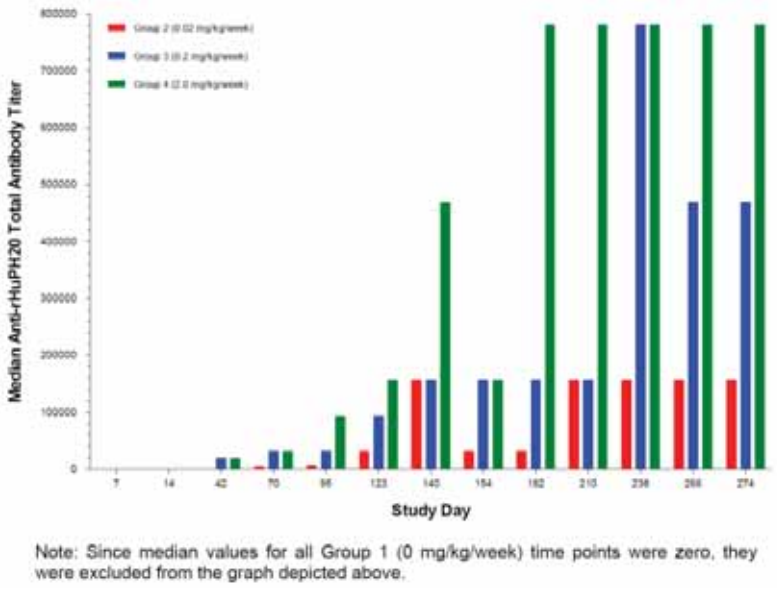
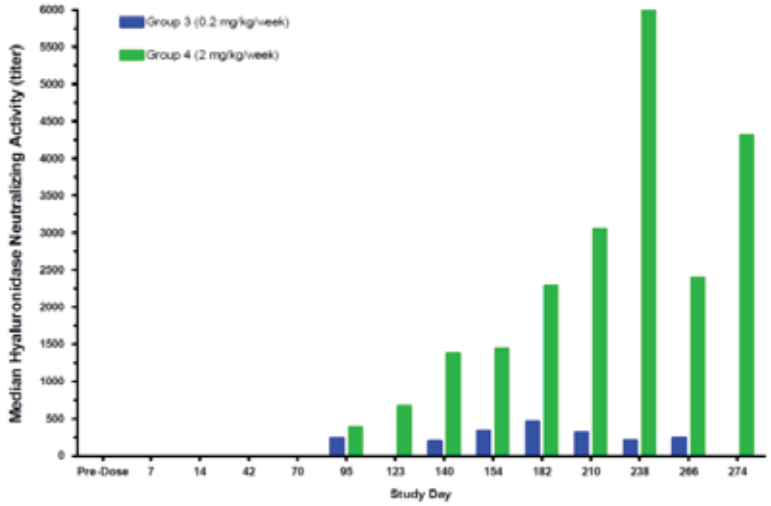


図 2.6.4-3 サルに反復皮下投与したときの血漿中抗 rHuPH20 抗体価（中央値）



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

図 2.6.4-4 サルに反復皮下投与したときの血漿中抗 rHuPH20 中和抗体価（中央値）

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 マウスに rHuPH20 を単回皮内投与したときの組織分布

【評価資料 4.2.2.3.1】

雌胸腺欠損 NCr nu/nu マウス（n=5/時点）の左内側面に rHuPH20 を 0.00073 mg/匹（80 U/匹）の用量で単回皮内投与し，投与 0.0167，0.25，0.5，1，4，8 及び 24 時間後に血漿，投与側の頸部，腋窩，上腕及び鼠径リンパ節を含むリンパ節，並びに投与部位の皮膚を採取した。このときの薬物動態パラメータを【2.6.5.5A】に示す。

投与部位の皮膚内 C_{max} は最高 23.0 U/mL であり，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，プールしたリンパ節内 C_{max} は最高 3.3 U/mL と非常に低く，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，投与部位の皮膚における rHuPH20 活性は一時的なものであり，全身曝露はわずかであることが示された。

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

【評価資料 4.2.2.3.2-2】

雌雄 CD-1 マウス（n=1/性/時点）に ^{125}I-rHuPH20 を 0.00133 mg/匹（400 U/匹）の用量で左尾部に単回皮内投与し，投与 5，15，30 分，1，2，4，8，12，24 及び 48 時間後に組織を採取して，液体シンチレーションカウンタで放射能を測定した。測定した組織は，血液，血漿，甲状腺／副甲状腺，心臓，肺，肝臓，胆のう／胆汁，脾臓，腎臓，膀胱，小腸，大腸，リンパ節（腸間膜，鼠径及び腋窩），皮膚（投与部位），子宮及び卵巣（雌）並びに精巣（雄）であった。このときの薬物動態パラメータを【2.6.5.5B】に示す。

放射能濃度は投与部位で最も高く（T_{max} = 5～15 分），次いで甲状腺／副甲状腺で高かった（T_{max} = 8～24 時間）。甲状腺／副甲状腺の T_{max} は投与後遅い時点であったことから，遊離した

^{125}I の蓄積によるものと考えられる。また，投与後初期における鼠径及び腋窩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。

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

【評価資料 4.2.2.3.3】

雌雄 CD-1 マウス（n=1/性/時点）に ^{125}I-rHuPH20 を 0.00173 mg/匹（100 U/匹）の用量で左尾部に単回皮内又は皮下投与し，投与 2，5，10，15，20，30，45 分，1，2，4 及び 24 時間後に組織を採取して，液体シンチレーションカウンタで放射能を測定した。測定した組織は，血液，血漿，脳，眼，甲状腺／副甲状腺，肺，心臓，肝臓，胆のう／胆汁，脾臓，腎臓，膀胱，小腸，大腸，リンパ節（腸間膜，鼠径及び腋窩），皮膚（投与部位），筋肉（投与部位及び非投与部位），子宮及び卵巣（雌）並びに精巣（雄）であった。このときの薬物動態パラメータを【2.6.5.5C】に示す。

放射能濃度は，両投与経路とも投与部位で高く（T_{max} = 2～30 分），甲状腺／副甲状腺でも高かった（T_{max} = 4～24 時間）。甲状腺／副甲状腺の T_{max} は投与後遅い時点であったことから，遊離した ^{125}I の蓄積によるものと考えられる。また，投与後初期における鼠径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。

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

【評価資料 4.2.2.3.4】

雌雄 CD-1 マウス（n=1/性/時点）に ^{125}I-rHuPH20 を 0.004 mg/匹（200 U/匹）の用量で単回静脈内投与し，投与 2，5，10，15，30 分，1，2，8，24 及び 48 時間後に組織を採取して，液体シンチレーションカウンタで放射能を測定した。測定した組織は，血液，血漿，脳，眼，甲状腺／副甲状腺，肺，心臓，肝臓，胆のう／胆汁，脾臓，腎臓，膀胱，小腸，大腸，リンパ節（腸間膜及び鼠径），筋肉，皮膚，子宮及び卵巣（雌）並びに精巣（雄）であった。また，^{125}I-rHuPH20 を同じ用量で投与した別の群（n=1/性）において，投与 5 分後の組織内放射能濃度を定量的全身オートラジオグラフィーで測定した。測定した組織は，脳，眼，甲状腺／副甲状腺，肺，心臓，肝臓，胆のう／胆汁，脾臓，腎臓，膀胱（壁及び尿），小腸，大腸，リンパ節（腸間膜及び鼠径），筋肉，皮膚，子宮及び卵巣（雌）並びに精巣（雄）であった。このときの放射能濃度を【2.6.5.5D】に示す。

放射能濃度は甲状腺／副甲状腺で最も高く（T_{max} = 8 時間），次いで肺及び肝臓で高かった（T_{max} = 5～30 分）。甲状腺／副甲状腺の T_{max} は投与後遅い時点であったことから，遊離した ^{125}I の蓄積によるものと考えられる。また，定量的全身オートラジオグラフィーによって得られた投与 5 分後の放射能濃度は，液体シンチレーションカウンタによって得られた濃度と同程度であった。

2.6.4.5 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。

2.6.4.6 排泄

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

【評価資料 4.2.2.3.2-2】

雌雄 CD-1 マウス（n=1/性）に ^{125}I-rHuPH20 を 0.00133 mg/匹（400 U/匹）の用量で単回皮内投与し，投与後 0～6，6～12，12～24，24～36 及び 36～48 時間に尿及び糞を採取した。また，ケージ洗浄液も測定した。得られた結果を【2.6.5.13A】に示す。

投与放射能の大部分（約 70～80%）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 13～16%）が糞中に回収された。

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

【評価資料 4.2.2.3.3】

雌雄 CD-1 マウス（n=1/性）に ^{125}I-rHuPH20 を 0.00173 mg/匹（100 U/匹）の用量で単回皮内又は皮下投与し，投与後 0～2，2～6，6～12 及び 12～24 時間に尿及び糞を採取した。また，ケージ洗浄液及び屍体も測定した。得られた結果を【2.6.5.13B】に示す。

両投与経路ともに，投与放射能の大部分（90%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 5～12%）が糞中に回収された。

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

【評価資料 4.2.2.3.4】

雌雄 CD-1 マウス（n=1/性）に ^{125}I-rHuPH20 を 0.004 mg/匹（200 U/匹）の用量で単回静脈内投与し，投与後 0～6，6～12，12～24，24～36 及び 36～48 時間に尿及び糞を採取した。また，ケージ洗浄液及び屍体も測定した。得られた結果を【2.6.5.13C】に示す。

投与放射能の大部分（約 70～80%）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 15～17%）が糞中に回収された。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

rHuPH20 の薬物動態学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

rHuPH20 のその他の薬物動態試験は実施しなかった。

2.6.4.9 考察及び結論

マウス及びカニクイザルに rHuPH20 又は ^{125}I-rHuPH20 を静脈内，皮下又は皮内投与したときの薬物動態について検討した。

単回投与後の血漿中濃度

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 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，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。

反復投与後の血漿中濃度

rHuPH20 を反復投与したときの全身曝露量は，トキシコキネティクス試験で評価した。

CD-1 マウスを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験において，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，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 V_{ss} は小さく，皮下投与後の 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（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。

分布及び排泄

胸腺欠損 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。いずれにおいても，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。

2.6.4.10 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.4.11 参考文献

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

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Test System	Type of Assay	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Analytical Methods and Validation Reports				
Determination of Hyaluronidase Activity of rHuPH20				
Microtiter Plate-Based Enzyme Assay				
Quantitative Determination of Hyaluronidase Activity in Mouse Plasma Using a Microplate-Based Method with a Biotinylated Hyaluronic Acid Substrate	Mouse, Swiss Webster/ Plasma	Microplate-based method	[redacted], USA	R09017/ 4.2.2.1.1
Evaluation of the Stability of rHuPH20 in Diluted Mouse Plasma Using a Microplate-Based Method with a Biotinylated Hyaluronic Acid Substrate	Mouse (strain nonspecified)/ Plasma	Microplate-based method	[redacted], USA	R09148/ 4.2.2.1.2
Turbidimetric Method with Spectrophotometric Detection				
Partial Validation of a Method for the Determination of Hyaluronidase Activity in Cynomolgus Monkey Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	R05094/ 4.2.2.1.3
Partial Validation of a Method for the Determination of Hyaluronidase Activity in Cynomolgus Monkey K2EDTA Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	R09147/ 4.2.2.1.4
Evaluation of the Extended Stability of rHuPH20 in Cynomolgus Monkey Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	10213/ 4.2.2.1.5
Evaluation of the Extended Frozen Stability and the Freeze/Thaw Stability of rHuPH20 in Cynomolgus Monkey Plasma Using Spectrophotometric Detection	Monkey, Cynomolgus/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	R06037/ 4.2.2.1.6

(Continued)

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Test System	Type of Assay	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Determination of Hyaluronidase Activity of ^{125}I-Labelled rHuPH20				
Method Development, Validation and Analysis of Enzyme Activity of ^{125}I-labelled Hyaluronidase	Buffer	Turbidimetric method	[redacted], Canada	12214-A/ 4.2.2.3.2-1
Determination of Anti-rHuPH20 Antibodies				
An Electrochemiluminescent Immunoassay for the Detection of Anti-rHuPH20 Antibodies in Mouse Plasma	Mouse (strain nonspecified)/ Plasma	ECL immunoassay	[redacted], USA	18072/ 4.2.2.1.8
Validation of an Electrochemiluminescent Immunoassay to Detect Antibodies to rHuPH20 in Rabbit EDTA Plasma	Rabbit, NZW/ Plasma	ECL immunoassay	[redacted], USA	13072/ 4.2.2.1.9
Qualitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K-2 EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Monkey, Cynomolgus/ Plasma	ELISA	[redacted], USA	R09059/ 4.2.2.1.10
Determination of Neutralizing Antibodies				
Qualification of a Turbidimetric Method for rHuPH20-Neutralizing Activity in Mouse Plasma	Mouse (strain nonspecified)/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	13162/ 4.2.2.1.11
Qualification of a Method for the Qualitative Detection of rHuPH20 nAbs in Rabbit Plasma Using Spectrophotometric Detection	Rabbit (strain nonspecified)/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	13083/ 4.2.2.1.12
Qualification of a Turbidimetric Method for rRbPH20-Neutralizing Activity in Rabbit Plasma	Rabbit, NZW/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	13163/ 4.2.2.1.13
Method for the Determination of Neutralizing Activity Titer Against Hyaluronidase in Cynomolgus Monkey Plasma	Monkey, Cynomolgus/ Plasma	Turbidimetric method	[redacted], USA	R09061/ 4.2.2.1.14

(Continued)

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Absorption				
Single Dose				
Evaluation of the Pharmacokinetics of Two Halozyme Test Articles Following a Single Intravenous Dose in CD-1 Mice	Mouse, CD-1	Intravenous	[redacted], USA	R09023/ 4.2.2.2.1
A Multi-Dose Pharmacokinetics Study of rHuPH20 Administered by Intravenous and Subcutaneous Injection in Female Cynomolgus Monkeys	Monkey, Cynomolgus	Intravenous Subcutaneous	[redacted], USA	R07060/ 4.2.2.2.2
Repeat Dose				
Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice	Mouse, CD-1	Subcutaneous	[redacted], USA	R08176/ 4.2.3.5.2.2
A 7-Day Repeat Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys	Monkey, Cynomolgus	Intravenous Subcutaneous	[redacted], USA	R08056/ 4.2.3.2.1
A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous	[redacted], USA	R09050/ 4.2.3.2.2

(Continued)

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: rHuPH20

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Distribution				
Biodistribution of rHuPH20 in the Skin, Lymphatics and Plasma after Intradermal Administration in the Mouse	Mouse, NCr nu/nu athymic	Intradermal	Halozyme Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	R08127/ 4.2.2.3.1
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse, CD-1	Intradermal	[redacted], Canada	12214-B/ 4.2.2.3.2-2
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse, CD-1	Intradermal Subcutaneous	[redacted], Canada	13184/ 4.2.2.3.3
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I- rHuPH20	Mouse, CD-1	Intravenous	[redacted], Canada	13128/ 4.2.2.3.4
Metabolism	No studies were conducted.			
Excretion				
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse, CD-1	Intradermal	[redacted], Canada	12214-B/ 4.2.2.3.2-2
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-rHuPH20	Mouse, CD-1	Intradermal Subcutaneous	[redacted], Canada	13184/ 4.2.2.3.3
Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I- rHuPH20	Mouse, CD-1	Intravenous	[redacted], Canada	13128/ 4.2.2.3.4
Pharmacokinetic Drug Interactions	No studies were conducted.			
Other	No studies were conducted.			

ECL = electrochemiluminescent; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; NZW = New Zealand White.

2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験

Test Article: rHuPH20

Analytical methods are described in 2.6.4.2.

2.6.5.3 A 薬物動態試験：単回投与後の吸収（静脈内） - Pharmacokinetic Parameters of rHuPH20 Following Single Intravenous Administration in the Mouse

Report Title: Evaluation of the Pharmacokinetics of Two Halozyme Test Articles Following a Single Intravenous Dose in CD-1 Mice

Test Article: rHuPH20
Report No. R09023
Location in CTD: 4.2.2.2.1

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 6/timepoint
Vehicle/Formulation: NA
Method of Administration: Intravenous
Dose: 0.4 mg/kg (44,000 U/kg)
Sample: Plasma
Analyte: rHuPH20
Assay: Microplate-based assay
Sampling Time: Pre-dose, 1, 5, 10, 30 minutes and 1, 2 and 3 h post-dose

	Mean PK Parameters for rHuPH20 ([redacted][a]) Following IV administration
C_0 (U/mL)	217.2
AUC_{inf} (U·h/mL)	8.8
CL (mL/h/kg)	5,440
V_{ss} (mL/kg)	160
$T_{1/2}$ (h)	0.038

[a] Two lots, [redacted] and [redacted], were tested with comparable results.

AUC_{inf} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; CL = systemic clearance; C_0 = plasma concentration back-extrapolated to time 0; F = female; IV = intravenous; M = male; NA = not available; PK = pharmacokinetics; $T_{1/2}$ = elimination half-life; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

Note: Standard deviations were not calculated.

2.6.5.3 B 薬物動態試験：単回投与後の吸収（静脈内及び皮下） - Pharmacokinetic Parameters of rHuPH20 Following Single Intravenous or Subcutaneous Administration in the Monkey

Report Title: A Multi-Dose Pharmacokinetics Study of rHuPH20 Administered by Intravenous and Subcutaneous Injection in Female Cynomolgus Monkeys

Test Article: rHuPH20
Report No. R07060
Location in CTD: 4.2.2.2.2

Species: Cynomolgus monkey
Gender (M/F): Number of Animals: F: 3/group
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0
Method of Administration: Intravenous and subcutaneous
Dose: 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)
Sample: Plasma
Analyte: rHuPH20
Assay: USP turbidimetric assay for hyaluronidase activity
Sampling Time: IV: pre-dose, 1, 2.5, 5, 10, 15, 30 and 60 minutes post-dose
SC: pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 4, 8, 24 and 48 h post-dose

	Mean (± SD) PK Parameters for rHuPH20 from Noncompartmental Analysis Following IV Administration			
Dose (mg/kg)	**0.3**	**3**	**15**	**30**
Gender (M/F): Number of Animals	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
AUC_{last} (U·h/mL)	174.5 ± 47.4	6,724.0 ± 1,249.2	43,997.3 ± 5,722.4	106,166.7 ± 17,492.9
AUC_{inf} (U·h/mL)	177.9 ± 49.5	7,201.3 ± 1,139.4	93,194.9 ± 15,961.0	290,481.3 ± 59,342.6
CL (mL/h/kg)	207.7 ± 65.6	49.1 ± 7.3	19.0 ± 3.0	12.3 ± 2.5
V_{ss} (mL/kg)	23.4 ± 2.4	19.4 ± 5.6	29.3 ± 3.8	26.5 ± 4.9

AUC_{inf} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_{last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint (30 minutes for 0.3 mg/kg and 60 minutes for 3, 15, and 30 mg/kg doses); CL = systemic clearance; F = female; IV = intravenous; M = male; PK = pharmacokinetics; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

(Continued)

2.6.5.3 B 薬物動態試験：単回投与後の吸収（静脈内及び皮下） - Pharmacokinetic Parameters of rHuPH20 Following Single Intravenous or Subcutaneous Administration in the Monkey（続き）

Report Title: A Multi-Dose Pharmacokinetics Study of rHuPH20 Administered by Intravenous and Subcutaneous Injection in Female Cynomolgus Monkeys

Test Article: rHuPH20
Report No. R07060
Location in CTD: 4.2.2.2.2

	Mean (± SD) PK Parameters for rHuPH20 Following SC Administration			
Dose (mg/kg)	**1**	**3**	**10**	**30**
Gender (M/F): Number of Animals	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
C_{max} (U/mL)	11.0 ± 10.4	26.4 ± 5.8	140.5 ± 118.7	480.2 ± 252.9
T_{max} (h)	2.5 ± 2.1	3.3 ± 4.0	4.3 ± 3.5	4.0 ± 0.0
AUC_{inf} (U·h/mL)	NC	561.6 ± 139.9	1,584.8 ± 276.5	6,101.8 ± 1,980.6
CL/F (mL/h/kg)	NC	639.5 ± 159.3	748.8 ± 145.0	615.1 ± 210.4
V_z/F (mL/kg)	NC	13,171.0 ± 6,835.5	11,826.8 ± 9,179.3	9,613.7 ± 5,866.4

AUC_{inf} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; CL/F = apparent clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NC = not calculated; PK = pharmacokinetics; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum plasma concentration; V_z/F = apparent volume of distribution.

2.6.5.4 A 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下） - Mouse: Embryo-Fetal Developmental Subcutaneous Toxicity Study

Report Title: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice

Test Article: rHuPH20
Report No. R08176
Location in CTD: 4.2.3.5.2.2

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: F: 36/group
Vehicle/Formulation: NA
Method of Administration: Subcutaneous once daily on Days 6 through 15 of gestation
Dose: 3, 9, 18 mg/kg/day (330,000, 990,000, 1,980,000 U/kg/day)
Sample: Plasma
Analyte: rHuPH20
Assay: Microplate-based assay
Sampling Time: Pre-dose, 30 minutes and 2, 4, 8 and 24 h post-dose

Mean (± SD) TK Parameters for rHuPH20 Following SC Administration on Days 6 Through 15 of Gestation

Dose (mg/kg)	**3**		**9**		**18**	
	Day 6	**Day 15**	**Day 6**	**Day 15**	**Day 6**	**Day 15**
C_{max} (U/mL)	3.44±2.18	20.9±35.1	30.5±23.7	17.1±16.5	49.6±10.6	99.2±64.1
AUC_{24h} (U·h/mL)	5.5	55.1	45.3	79.0	120	363
T_{max} (h)	0.5	0.5	0.5	2.0	0.5	2.0

AUC_{24h} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 h (the last collection timepoint); C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NA = not available; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

Note: Mean standard deviations were not calculated for AUC_{24h}.

2.6.5.4 B 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Electrochemiluminescent (ECL) Bridging Immunoassay

Report Title: Non-GLP Characterization of Anti-rHuPH20 Binding Antibodies from Mouse Embryo Fetal Developmental Toxicity Study

Test Article: rHuPH20
Report No. R08176 (Amendment 3)
Location in CTD: 4.2.3.5.2.2

Study System:	Retrospective determination of anti-drug antibodies in mouse plasma samples		
Dose (mg/kg)	**3**	**9**	**18**
Gestation Day 6 (Incidences)			
Pre-dose			
Confirmatory assay pos.	0/3	0/3	0/3
Endpoint Titer	-[a]	-	-
Gestation Day 15 (Incidences)			
Pre-dose			
Confirmatory assay pos.	3/3	3/3	3/3
Endpoint Titer	12,500; 62,500; 1,600,000	12,500; 12,500; 12,500	12,500; 62,500; ≥3,200,000[b]
8 h			
Confirmatory assay pos.	3/3	3/3	2/2
Endpoint Titer	200; ≥1,600[c]; 62,500	2,500; 2,500; 2,500	2,500; ≥3,200,000[d]
24 h			
Confirmatory assay pos.	3/3	3/3	3/3
Endpoint Titer	200; 2,500; 12,500	2,500; 12,500; 1,600,000	62,500; 62,500; 400,000

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

2.6.5.4 C 薬物動態試験：反復投与後の吸収（静脈内及び皮下） - Monkey: 7-Day Repeat-Dose Intravenous or Subcutaneous Toxicity Study

Report Title: A 7-Day Repeat-Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys

Test Article: rHuPH20
Report No. R08056
Location in CTD: 4.2.3.2.1

Species: Cynomolgus monkey
Gender (M/F): Number of Animals: M: 2/group, F: 2/group
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0
Method of Administration: Intravenous and subcutaneous once daily
Dose: 5 mg/kg/day (550,000 U/kg/day)
Sample: Plasma
Analyte: rHuPH20
Assay: USP turbidimetric assay for hyaluronidase activity
Sampling Time: IV: 1, 5, 10, 30, 60, 120 and 240 minutes post-dose on Days 1 and 7, and 24 h after last dose on Day 7
SC: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h post-dose on Days 1 and 7

	Mean (SD) TK Parameters for rHuPH20 Following IV or SC Administration			
Dose / Route of Administration	**5 mg/kg/day IV**		**5 mg/kg/day SC**	
Gender (M/F): Number of Animals	**M: 2 / F: 2**	**M: 2 / F: 2**	**M: 2 / F: 2**	**M: 2 / F: 2**
	Day 1	**Day 7**	**Day 1**	**Day 7**
C_{max} (U/mL)	NC	NC	200.0 (45.4)	115.0 (46.1)
AUC_{last} (U·h/mL)	11,800.0 (2,466.7)	8,733.3 (820.0)	641.7 (149.8)	501.7 (164.8)
AUC_{inf} (U·h/mL)	11,883.3 (2,350.0)	8,800.0 (885.0)	NC	NC
T_{max} (min)[a]	NC	NC	60.0 (30-61)	60.0 (30-239)
V_{ss} (mL/kg)	17.0 (1.75)	16.7 (0.996)	NC	NC

[a] Median value.

AUC_{inf} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_{last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; IV = intravenous; M = male; NC = not calculated; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to maximum plasma concentration; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

2.6.5.4 D 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下） - Monkey: 39-Week Repeat-Dose Subcutaneous Toxicity Study

Report Title: A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase

Test Article: rHuPH20
Report No. R09050
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Species: Cynomolgus monkey
Gender (M/F): Number of Animals: M: 6/group, F: 6/group
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0
Method of Administration: Subcutaneous once weekly
Dose: 0.02, 0.2, 2 mg/kg/week (2,200, 22,000, 220,000 U/kg/week)
Sample: Plasma
Analyte: rHuPH20
Assay: USP turbidimetric assay for hyaluronidase activity
Sampling Time: Blood samples: pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, and 12 h post-dose on Days 1, 21 (Group 1-3), 85, 183, and 267
ADA and hyaluronidase neutralizing activity blood samples: Days 7, 14, 42, 70, 95, 123, 140, 154, 182, 210, 238, 266, 274, 296, and 302

Mean (SD) TK Parameters for rHuPH20 Following Once Weekly SC Administration of 2.0 mg/kg[b] rHuPH20

	Male				Female			
	Day 1	**Day 85**	**Day 183**	**Day 267**	**Day 1**	**Day 85**	**Day 183**	**Day 267**
C_{max} (U/mL)	12.5 (5.21)	28.8 (48.4)	12.0 (22.4)	NC	20.8 (9.54)	64.7 (61.1)	64.2 (110)	10.0 (11.2)
AUC_{last} (U·h/mL)	20.5 (22.8)	177 (274)	89.6 (176)	NC	47.8 (34.2)	395 (433)	467 (795)	56.2 (68.3)
T_{max} (h)[a]	2.0 (2-2)	6.0 (4-6)	4.0 (4-6)	NC	2.0 (0.25-2)	4.0 (2-4)	4.0 (4-4)	4.0 (4-6)

[a] Median value.
[b] No TK analysis were performed for Group 1 (0 mg/kg/week rHuPH20), Group 2 (0.02 mg/kg/week rHuPH20) and Group 3 (0.2 mg/kg/week rHuPH20) as the majority of monkey plasma samples had hyaluronidase activity levels which were either low or below the quantifiable assay limit (i.e. < 10 U/mL).

ADA = anti-drug antibody; AUC_{last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NC = not calculated; SC = subcutaneous; SD = standard deviation; TK = toxicokinetics; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

2.6.5.4 E 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Neutralizing Activity

Report Title: Qualitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K-2 EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Determination of the Titer of Hyaluronidase Neutralizing Activity in Plasma Specimens from "A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase"

Test Article: rHuPH20

Report No. R09050
(Appendix 12 and Appendix 9)
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Study System:	Determination of anti-drug antibodies and hyaluronidase-neutralizing activity in monkey plasma samples			
Test System and Method:	Anti-rHuPH20 antibodies: ELISA (R09050, Appendix 12) Determination of hyaluronidase-neutralizing activity to rHuPH20: Turbidimetric assay (R09050, Appendix 9)			
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**	**0.02**	**0.2**	**2**
Gender/ Number of animals:	**M: 6 / F: 6**	**M: 6 / F: 6**	**M: 6 / F: 6**	**M: 6 / F: 6**
Day 7 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/10	0/12	0/12	2/12
Endpoint Titer	<10	<10	<10	10
Neutralizing Ab	0/10	0/12	0/12	0/12
Dilution Titer Results	-	-	-	-
Day 14 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	1/12	3/12	3/12	8/12
Endpoint Titer	10	10 - 50	10 - 50	10 - 250 (50 - 1,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	0/12	0/12	0/12
Dilution Titer Results	-	-	-	-
Day 42 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	11/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	10 - 6,250	250 - 156,250 (6,250 - 156,250)[§]	6,250 - 31,250 (250 - 156,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	0/12	0/12	0/12
Dilution Titer Results	-	-	-	-
Day 70 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	10 - 156,250	1,250 - 156,250 (31,250 - 781,250)[§]	31,250 (6,250 - 781,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	0/12	1/12	0/12
Dilution Titer Results	-	-	1,156	-

(Continued)

2.6.5.4 E 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Neutralizing Activity（続き）

Report Title: Qualitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K-2 EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Determination of the Titer of Hyaluronidase Neutralizing Activity in Plasma Specimens from "A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase"

Test Article: rHuPH20

Report No. R09050
(Appendix 12 and Appendix 9)
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Dose (mg/kg/week) **Gender/ Number of animals:**	**0 (Control)** **M: 6 / F: 6**	**0.02** **M: 6 / F: 6**	**0.2** **M: 6 / F: 6**	**2** **M: 6 / F: 6**
Day 95 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	50 - 31,250	1,250 - 156,250 (6,250 - 156,250)[§]	156,250 (6,250 - 781,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	2/12	8/12	8/12
Dilution Titer Results	-	96 - 121	145 - 1,724	241 - 1,288
Day 123 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	1,250 - 156,250	1,250 - 156,250 (31,250 - 781,250)[§]	781,250 (6,250 - 3,906,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	4/12	4/12[b]	9/12
Dilution Titer Results	-	123 - 162	218 - 2,044	367 - 9,950
Day 140 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6,250 - 781,250	31,250 - 156,250 (31,250 - 781,250)[§]	156,250 - 781,250 (31,250 - 19,531,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	1/12	6/12	10/12
Dilution Titer Results	-	166	389 - 3,824	751 - 11,050
Day 154 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6,250 - 156,250	6,250 - 3,906,250 (31,250 - 781,250)[§]	156,250 - 781,250 (31,250 - 3,906,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	3/12[c]	8/12	8/12
Dilution Titer Results	-	263 - 308	109 - 6,340	822 - 11,800
Day 182 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6,250 - 156,250	6,250 - 781,250 (156,250 - 19,531,250)[§]	156,250 - 781,250 (31,250 - 19,531,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	4/12	7/12	9/12
Dilution Titer Results	-	141 - 456	331 - 9,815	976 - 15,420

(Continued)

2.6.5.4 E 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Neutralizing Activity（続き）

Report Title: Qualitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K-2 EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Determination of the Titer of Hyaluronidase Neutralizing Activity in Plasma Specimens from "A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase"

Test Article: rHuPH20

Report No. R09050
(Appendix 12 and Appendix 9)
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Dose (mg/kg/week) **Gender/ Number of animals:**	**0 (Control)** **M: 6 / F: 6**	**0.02** **M: 6 / F: 6**	**0.2** **M: 6 / F: 6**	**2** **M: 6 / F: 6**
Day 210 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6,250 - 3,906,250	6,250 - 3,906,250 (31,250 - 781,250)[§]	156,250 - 781,250 (31,250 - 3,906,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	4/12	7/12	10/12
Dilution Titer Results	-	174 - 730	277 - 12,100	1,529 - 26,630
Day 238 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	11/11
Endpoint Titer	<10	31,250 - 781,250	6,250 - 3,906,250 781,250[§]	31,250 - 781,250 (156,250 - 19,531,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	2/12	7/12[d]	11/11[e]
Dilution Titer Results	-	221 - 320	411 - 14,760	1,982 - 50,950
Day 266 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/12	12/12	12/12	12/12
Endpoint Titer	<10	6,250 - 19,531,250	31,250 - 19,531,250 (156,250 - 781,250)[§]	156,250 - 781,250 (31,250 - 19,531,250)[§]
Neutralizing Ab	0/12	6/12[f]	7/12	7/12
Dilution Titer Results	-	270 - 1,218	146 - 13,370	2,106 - 27,660
Day 274 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/8	8/8	8/8	7/7
Endpoint Titer	<10	31,250 - 3,906,250	31,250 - 3,906,250 (156,250 - 3,906,250)[§]	156,250 - 781,250 (156,250 - 3,902,650)[§]
Neutralizing Ab	0/8	2/8[g]	3/8	5/7[h]
Dilution Titer Results	-	323	177 - 1,149	3,380 - 22,960

(Continued)

2.6.5.4 E 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Neutralizing Activity（続き）

Report Title: Qualitative Determination of Antibodies to Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) in Cynomolgus Monkey K-2 EDTA Plasma Using a Bridging Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Determination of the Titer of Hyaluronidase Neutralizing Activity in Plasma Specimens from "A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase"

Test Article: rHuPH20

Report No. R09050
(Appendix 12 and Appendix 9)
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Dose (mg/kg/week) **Gender/ Number of animals:**	**0 (Control)** **M: 6 / F: 6**	**0.02** **M: 6 / F: 6**	**0.2** **M: 6 / F: 6**	**2** **M: 6 / F: 6**
Day 296 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/4	4/4	4/4	4/4
Endpoint Titer	<10	6,250 - 781,250	156,250 -3,906,250	3,906,250 (6,250 - 19,531,250)[§]
Neutralizing Ab	0/4	1/4	2/4	1/4
Dilution Titer Results	-	102	2,631 - 5,784	23,850
Day 302 (Incidences)				
Screening assay pos.[a]	0/4	4/4	4/4	4/4
Endpoint Titer	<10	6,250 - 156,250	156,250 - 3,906,250	3,906,250 (6,250 - 3,906,250)[§]
Neutralizing Ab	0/4	1/4	3/4	2/4
Dilution Titer Results	-	70	228 - 7,328	5,137 - 26,380

[a] An initial screen was performed using a ten-fold sample dilution; the specimens that exceeded the cut-point threshold were deemed reactive (positive if ≥10). Since most optical density values observed during the screening process far exceeded the cut point, it was decided that confirmatory testing was unneeded, and analysis of reactive samples was performed directly using a titer format.
[b] Sample #34 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.
[c] Sample #21 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.
[d] Sample #26 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.
[e] At Day 238 a neutralizing titer value for sample #42 (25210) was detected but there is no titer value for the initial screen for this sample on Day 238 available; sample #37 had an initial screen value of 156250 but no neutralizing titer determination was performed for #37.
[f] Sample #24 yielded an optical density equal to that of the cut-off optical density determined during initial screen for neutralizing antibody; no neutralizing titer determination was performed.
[g] Sample #13 was originally deemed negative with an OD value equal to the cut-off OD; no neutralizing titer determination was performed. The cut-off OD was later re-calculated for correct number of significant figures, resulting in an OD decrease by 0.001. The sample is therefore considered positive for hyaluronidase neutralizing activity, with its OD value exceeding the re-calculated cut-off by 0.001.
[h] At Day 274 a neutralizing titer value for sample #42 (22960) was detected but there is no titer value for the initial screen for this sample on Day 274 available; samples #39, #43 and #47 had an initial screen value but no neutralizing titer determination was performed for these samples.

[§] Deviated sample; sample exceeded 5 freeze/thaw cycles (6 total).
- Titer not determined. Samples were deemed negative during the initial screen.

F = female; M = male.

2.6.5.4 F 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Electrochemiluminescent (ECL) Bridging Immunoassay

Report Title: Assessment of Cynomolgus EDTA Plasma in a Validated Method for the Electrochemiluminescent Detection of Antibodies to rHuPH20

Test Article: rHuPH20
Report No. R09050 (Attachment 8)
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Study System:	Determination of anti-drug antibodies in monkey plasma samples			
Dose (mg/kg/week)	**0 (Control)**	**0.02**	**0.2**	**2**
Day 7 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	ND	ND	0/1
Endpoint Titer	-	-	-	-
Day 14 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	ND	ND	2/6[a]
Endpoint Titer	-	-	-	320
Day 42 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	1/1	ND	ND
Endpoint Titer	-	2,560	-	-
Day 70 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	1/1	1/1	2/3[b]
Endpoint Titer	-	10,240	>81,920	655,360
Day 95 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	2/2	2/2
Endpoint Titer	-	-	327,680 - 1,310,720	327,680
Day 123 (Incidences)				
Screening assay pos.	0/1	1/1	ND	2/2
Endpoint Titer	-	163,840	-	81,920 - 5,242,880
Day 140 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	ND	4/4
Endpoint Titer	-	-	-	327,680 - 2,621,440[c]
Day 154 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	1/2	1/1
Endpoint Titer	-	-	1,310,720	2,621,440
Day 182 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	2/2	ND	ND
Endpoint Titer	-	40,960 - 163,840	-	-

(Continued)

2.6.5.4 F 薬物動態試験：反復投与後の吸収（皮下：抗 rHuPH20 抗体） - Immunogenicity - Anti-drug Antibody Analysis by Electrochemiluminescent (ECL) Bridging Immunoassay（続き）

Report Title: Assessment of Cynomolgus EDTA Plasma in a Validated Method for the Electrochemiluminescent Detection of Antibodies to rHuPH20

Test Article: rHuPH20
Report No. R09050 (Attachment 8)
Location in CTD: 4.2.3.2.2

Dose (mg/kg/week)	0 (Control)	0.02	0.2	2
Day 210 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	1/1	1/1	2/2
Endpoint Titer	-	163,840	1,310,720	327,680 - 655,360
Day 238 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	1/1	1/2
Endpoint Titer	-	-	5,242,880	41,943,040
Day 266 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	2/2	0/1	2/3[d]
Endpoint Titer	-	>40,960 - 327,680	-	2,621,440
Day 274 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	1/1	ND	1/1[e]
Endpoint Titer	-	20,480	-	-
Day 296 (Incidences)				
Screening assay pos.	ND	ND	0/1	ND
Endpoint Titer	-	-	-	-

[a] Sample # 40 was detected positive, but no endpoint titer was determined; sample #42 was evaluated but no result was reported.
[b] Sample # 41 was detected positive, but no endpoint titer was determined; sample #43 was evaluated but no result was reported.
[c] Anticipated titer value of 2,621,440 for sample #41.
[d] Sample # 42 was detected positive, but no endpoint titer was determined; sample #45 was evaluated but no result was reported.
[e] Sample # 40 was detected positive, but no endpoint titer was determined.

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

2.6.5.5 A 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Intradermal Administration of rHuPH20 in the Mouse

Report Title: Biodistribution of rHuPH20 in the Skin, Lymphatics, and Plasma after Intradermal Administration in the Mouse

Test Article: rHuPH20
Report No. R08127
Location in CTD: 4.2.2.3.1

Species: NCr nu/nu athymic mouse
Gender (M/F): Number of Animals: F: 5/timepoint
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, 1 mg/mL human serum albumin, pH 6.5
Method of Administration: Intradermal and intravenous (maximum plasma control group)
Dose: 0.00073 mg/animal (80 U/animal)
Assay: Microplate-based assay
Sampling Time: 0.0167, 0.25, 0.5, 1, 4, 8, and 24 h post-dose

Tissue/Organs	C_{max} (U/mL)	$T_{1/2}$ (minutes)
Plasma	BLQ	ND
Lymph node[a]	0.65 - 3.3	ND
Skin	10.1 - 23.0	12.9
Control group (untreated animals)	BLQ	ND
Control group IV administration	17.4	ND

[a] Lymph nodes include pooled cervical, axillary, brachial and inguinal lymph nodes on the site of injection.

BLQ = below the limit of quantification (< ~0.3-0.7 U/mL); C_{max} = maximum concentration; F = female ; IV = intravenous; M = male; ND = not determined; $T_{1/2}$ = elimination half-life.

2.6.5.5 B 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse

Report Title: Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-Recombinant Human Hyaluronidase PH20 (rHuPH20)

Test Article: rHuPH20
Report No. 12214-B
Location in CTD: 4.2.2.3.2-2

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 10/group, F: 10/group
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Method of Administration: Intradermal
Dose: 0.00133 mg/animal (400 U/animal)
Radionuclide: [^{125}I]
Specific Activity of Test Item in Formulation: 8.31×10^6 dpm/µg
Assay: Liquid scintillation counting
Sampling Time: 5, 15, and 30 minutes and 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48 h post-dose

Tissue/Organs	T_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		AUC_t (ng eq·h/g)		AUC_{inf} (ng eq·h/g)		$T_{1/2}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Blood	1	1	66.3	89.7	309	425	RNR	427	RNR	5.7
Plasma	1	1	68.8	94.8	320	436	RNR	440	RNR	5.9
Gall bladder/bile	2	1	59.5	107	331	393	386	409	36.8	2.7
Heart	1	1	18.7	25.5	85.9	123	RNR	125	RNR	11.8
Kidney	1	1	67.6	71.5	365	344	401	RNR	19.5	RNR
Large intestine	4	1	19.4	21.2	156	126	RNR	128	RNR	6.6
Liver	1	1	24.4	30.2	133	180	RNR	189	RNR	13.5
Lung	1	1	35.3	50.9	188	272	RNR	281	RNR	13.2
Lymph node left axillary	0.0833	1	134	216	290	738	RNR	760	RNR	10.8
Lymph node right axillary	1	1	33.0	52.6	101	250	RNR	263	RNR	2.6
Lymph node left inguinal	0.5	2	261	70.3	565	825	592	RNR	12.7	RNR
Lymph node right inguinal	2	4	25.2	66.3	76.0	641	RNR	646	RNR	2.9
Lymph node mesenteric	1	1	25.0	28.5	194	182	RNR	187	RNR	11.4
Ovary	NA	1	NA	32.4	NA	164	NA	168	NA	4.0
Small intestine	1	1	18.0	17.5	163	178	167	181	7.5	7.5
Skin injection site	0.0833	0.25	7,724	10,143	8,842	18,010	9,364	18,326	14.8	9.5
Spleen	1	1	28.5	39.9	198	248	RNR	252	RNR	11.0
Testes	2	NA	18.2	NA	140	NA	RNR	NA	RNR	NA
Thyroid/parathyroid gland	8	24	4,821	9,945	197,972	318,908	NR	NR	NR	NR
Urinary bladder	4	1	135	76.2	1,097	479	RNR	482	RNR	5.6
Uterus	NA	1	NA	61.0	NA	349	NA	353	NA	10.6

AUC_{inf} = area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_t = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; ng eq = nanogram equivalent; NR = not reportable; RNR = result not reported because the AUC_{inf} was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800; T_{max} = time to maximum concentration; $T_{1/2}$ = elimination half-life.

2.6.5.5 C 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse

Report Title: Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase

Test Article: rHuPH20
Report No. 13184
Location in CTD: 4.2.2.3.3

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 11/group, F: 11/group
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Method of Administration: Intradermal and subcutaneous
Dose: 0.00173 mg/animal (100 U/animal)
Radionuclide: [^{125}I]
Specific Activity of Test Item in Formulation: 6.55×10^6 dpm/µg
Assay: Liquid scintillation counting
Sampling Time: 2, 5, 10, 15, 20, 30, and 45 minutes and 1, 2, 4, and 24 h post-dose

Biodistribution of Total Radioactivity Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20

Tissue/Organs	T_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		AUC_t (ng eq·h/g)		AUC_{inf} (ng eq·h/g)		$T_{1/2}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Blood	0.75	1	73.3	97.6	810	530	820	541	4.3	4.5
Plasma	0.75	1	76.8	100	845	559	858	572	4.4	4.5
Brain	0.75	2	3.8	6.1	8.9	31.6	RNR	32.2	RNR	4.1
Eye	2	1	17.9	26.1	206	168	208	171	4.0	4.4
Gall bladder/bile	4	0.75	94.1	112	1,213	743	NE	801	NE	6.4
Heart	0.75	1	22.7	27.0	196	148	201	153	4.8	5.0
Kidney	1	0.75	82.4	84.5	729	483	778	540	6.4	7.5
Injection site (skin)	0.033	0.033	12,369	19,675	22,270	50,306	25,410	58,050	9.4	9.5
Injection site (underlying muscle)	0.033	0.033	1,695	3,544	1,028	1,449	RNR	RNR	RNR	RNR
Large intestine	0.75	1	14.1	21.6	186	134	190	142	5.0	6.1
Liver	0.75	1	25.2	34.1	274	233	286	248	5.6	5.8
Lung	0.75	1	43.5	57.0	452	319	463	331	4.8	4.8
Lymph node mesenteric	0.75	1	19.1	35.8	236	238	240	244	4.4	4.9
Lymph node left inguinal	0.333	0.5	364	479	455	2,311	RNR	2,446	RNR	6.2

(Continued)

2.6.5.5 C 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse（続き）

Report Title: Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase

Test Article: rHuPH20
Report No. 13184
Location in CTD: 4.2.2.3.3

Biodistribution of Total Radioactivity Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20

Tissue/Organs	T_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		AUC_t (ng eq·h/g)		AUC_{inf} (ng eq·h/g)		$T_{1/2}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Lymph node right inguinal	2	2	36.0	131	90.6	1,186	NE	1,212	NE	4.5
Lymph node left axillary	0.75	0.5	20.7	197	230	905	RNR	949	RNR	5.4
Lymph node right axillary	0.75	0.75	19.6	50.9	61.4	112	RNR	RNR	RNR	RNR
Muscle	0.033	1	19.8	18.0	29.4	52.2	RNR	RNR	RNR	RNR
Ovary	NA	0.75	NA	38.3	NA	229	NA	236	NA	5.1
Small intestine	2	1	17.4	23.7	222	225	228	232	5.1	5.2
Spleen	0.75	1	27.9	53.0	306	290	312	297	4.6	4.7
Testes	4	NA	19.8	NA	269	NA	NE	NA	NE	NA
Thyroid/parathyroid gland	4	24	3,518	12,487	54,949	185,822	NE	NE	NE	NE
Urinary bladder	1	2	60.5	412	700	1,928	708	1,935	4.0	3.0
Uterus	NA	0.75	NA	76.2	NA	395	NA	404	NA	4.2

AUC_{inf} = area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_t = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; NE = parameter not estimable from data set; ng eq = nanogram equivalent; RNR = result not reported because the AUC_{inf} was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800; T_{max} = time to maximum concentration; $T_{1/2}$ = elimination half-life.

(Continued)

2.6.5.5 C 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse（続き）

Report Title: Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase

Test Article: rHuPH20
Report No. 13184
Location in CTD: 4.2.2.3.3

Biodistribution of Total Radioactivity Following Single Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20

Tissue/Organs	T_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		AUC_t (ng eq·h/g)		AUC_{inf} (ng eq·h/g)		$T_{1/2}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Blood	0.75	0.75	104	84.5	525	122	536	RNR	4.4	RNR
Plasma	0.75	0.75	106	84.2	547	932	560	947	4.5	4.5
Brain	0.75	2	6.0	48.9	10.2	102	12.2	102	1.3	3.0
Eye	0.75	2	26.6	26.0	160	219	163	224	4.0	4.5
Gall bladder/bile	1	2	83.2	113	194	1,268	RNR	1,298	RNR	4.7
Heart	0.75	0.75	31.6	30.2	148	211	152	219	4.6	5.2
Kidney	0.75	0.75	111	88.2	600	590	649	642	6.2	6.5
Injection site (skin)	0.5	0.25	6,488	8,654	14,010	14,511	15,443	RNR	7.9	RNR
Injection site (underlying muscle)	0.083	0.333	5,520	2,476	3,436	7,338	RNR	7,386	RNR	3.7
Large intestine	0.75	0.75	22.1	15.2	134	152	137	167	4.7	7.3
Liver	0.75	0.75	34.6	30.6	193	305	203	330	5.5	6.6
Lung	0.75	0.75	60.8	49.0	323	416	332	434	4.7	5.4
Lymph node mesenteric	0.75	0.75	31.6	40.8	202	268	207	278	4.5	5.3
Lymph node left inguinal	0.5	0.75	493	266	865	2,368	897	2,391	6.6	3.8
Lymph node right inguinal	4	2	35.7	241	474	686	NE	NE	NE	NE
Lymph node left axillary	1	1	75.7	117	604	610	616	626	4.4	4.9
Lymph node right axillary	0.5	1	115	80.4	172	201	RNR	RNR	RNR	RNR
Muscle	0.75	1	13.2	18.8	28.3	50.6	RNR	RNR	RNR	RNR
Ovary	NA	0.75	NA	35.5	NA	256	NA	264	NA	5.0
Small intestine	1	4	26.2	26.9	146	360	155	NE	6.0	NE
Spleen	2	1	39.2	42.3	273	414	279	423	4.4	4.8
Testes	2	NA	22.8	NA	205	NA	208	NA	4.2	NA
Thyroid/parathyroid gland	4	24	3,761	14,767	71,569	243,430	NE	NE	NE	NE
Urinary bladder	2	0.75	142	128	834	1,065	841	1,147	3.4	7.1
Uterus	NA	0.75	NA	77.7	NA	523	NA	621	NA	8.6

AUC_{inf} = area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_t = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum concentration; NA = not applicable; NE = parameter not estimable from data set; ng eq = nanogram equivalent; RNR = result not reported because the AUC_{inf} was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800; T_{max} = time to maximum concentration; $T_{1/2}$ = elimination half-life.

2.6.5.5 D 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse

Report Title: **Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**

Test Article: rHuPH20
Report No. 13128
Location in CTD: 4.2.2.3.4

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 10/group, F: 10/group
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Method of Administration: Intravenous
Dose: 0.004 mg/animal (200 U/animal)
Radionuclide: [^{125}I]
Specific Activity of Test Item in Formulation: 6.43×10^6 dpm/µg
Assay: Liquid scintillation counting and quantitative whole body autoradiography
Sampling Time: 2, 5, 10, 15, and 30 minutes and 1, 2, 8, 24, and 48 h post-dose (one animal/sex/timepoint)

Liquid Scintillation Counting

Tissue/Organs	T_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		AUC_t (ng eq·h/g)		AUC_{inf} (ng eq·h/g)		$T_{1/2}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Blood	0.5	0.033	245	933	1,127	1,900	1,132	1,924	7.9	6.8
Plasma	0.5	0.033	247	1,514	1,136	1,874	1,147	1,898	3.5	4.0
Brain	0.5	0.033	10.7	17.3	47.6	69.3	48.6	70.6	12.2	6.9
Eye	0.5	0.5	53.7	69.5	311	428	315	432	3.6	6.2
Gall bladder/bile	0.25	0.167	548	993	2,201	2,900	2,240	2,947	11.1	10.7
Heart	0.5	0.033	67.8	110	319	622	324	632	10.1	7.3
Kidney	0.5	0.5	212	260	1,255	1,357	1,382	1,424	18.6	8.7
Large intestine	0.5	0.5	38.2	71.9	265	416	268	428	6.4	7.7
Liver	0.167	0.083	2,262	2,634	2,634	3,517	2,986	RNR	20.1	RNR
Lung	0.5	0.167	2,353	3,123	8,235	9,661	8,386	9,742	9.4	7.1
Lymph node inguinal	0.5	8	100	358	268	4,369	283	RNR	1.8	RNR
Lymph node mesenteric	0.5	0.5	64.9	137	341	871	355	884	5.0	7.0
Muscle	1	0.5	65.4	37.3	133	245	138	256	1.6	12.5
Ovary	NA	0.033	NA	246	NA	820	NA	830	NA	6.1
Small intestine	0.5	0.5	54.2	67.6	308	522	312	537	9.9	8.8

(Continued)

2.6.5.5 D 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse（続き）

Report Title: **Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**

Test Article: rHuPH20
Report No. 13128
Location in CTD: 4.2.2.3.4

Liquid Scintillation Counting

Tissue/Organs	T_{max} (h)		C_{max} (ng eq/g)		AUC_t (ng eq·h/g)		AUC_{inf} (ng eq·h/g)		$T_{1/2}$ (h)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Skin	1	8	128	214	702	3,108	743	RNR	14.9	RNR
Spleen	0.167	0.167	474	591	1,874	2,501	2,146	2,708	20.1	14.0
Testes	2	NA	67.3	NA	429	NA	430	NA	5.6	NA
Thyroid/parathyroid gland	8	8	29,067	19,885	956,726	554,033	1,176,107	RNR	19.9	RNR
Urinary bladder	1	1	215	214	850	1,763	855	1,778	8.1	6.2
Uterus	NA	0.5	NA	190	NA	1,378	NA	1,409	NA	8.2

AUC_{inf} = area under the concentration-time curve from time 0 extrapolated to infinity; AUC_t = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; ng eq = nanogram equivalent; RNR = result not reported because the AUC_{inf} was extrapolated by more than 20% or Rsq was < 0.800; T_{max} = time to maximum concentration; $T_{1/2}$ = elimination half-life.

(Continued)

2.6.5.5 D 薬物動態試験：組織分布 - Biodistribution Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse（続き）

Report Title: **Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**

Test Article: rHuPH20
Report No. 13128
Location in CTD: 4.2.2.3.4

Tissue / Organs	**Quantitative Whole-Body Autoradiography Concentrations of Total Radioactivity (ng eq/g) 5 Minutes**	
	M: 1	**F: 1**
Brain	7.3	7.0
Eye	13.7	15.2
Gall bladder/bile	313.6[a]	79.2[a]
Kidney	109.4	124.8
Large intestine	35.2[a]	14.8
Liver	1,403.0[b]	1,798.2[b]
Lung	1,880.4[b]	233.9
Lymph node (inguinal)	NQ	NQ
Lymph node (mesenteric)	35.0	31.6
Myocardium	80.1	74.8
Ovary	NA	135.9[a]
Skeletal muscle (dorsal)	16.0	18.3
Skin	22.8	19.6
Small intestine	22.0	25.2
Spleen	282.4	378.0
Testis	14.4	NA
Thyroid/parathyroid gland	214.7	NQ
Urinary bladder wall	21.7	14.3
Urinary bladder content	21.7	12.6
Uterus	NA	34.2

[a] Suspect contamination by flair.
[b] Outside the calibration curve range.

F = female; M = male; NA = not applicable; ng eq = nanogram equivalent; NQ = non-quantifiable.

2.6.5.6　薬物動態試験：血漿タンパク結合及び血球移行

Test Article: rHuPH20

No studies on plasma protein binding or distribution into red blood cells were conducted with rHuPH20.

2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Test Article: rHuPH20

Toxicokinetics in pregnant animals were determined as part of the embryo-fetal development study in mice (2.6.4.3.2.1).

2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験

Test Article: rHuPH20

No other distribution studies were conducted with rHuPH20.

2.6.5.9　薬物動態試験：*In vitro* における代謝

Test Article: rHuPH20

No studies on in vitro metabolism of rHuPH20 were conducted as it is a biotechnology-derived pharmaceutical.

2.6.5.10　薬物動態試験：*In vivo* における代謝

Test Article: rHuPH20

No studies on in vivo metabolism of rHuPH20 were conducted as it is a biotechnology-derived pharmaceutical.

2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路

Test Article: rHuPH20

No studies on proposed metabolic pathways of rHuPH20 were conducted as it is a biotechnology-derived pharmaceutical.

2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

Test Article: rHuPH20

No studies on induction or inhibition of drug-metabolizing enzymes by rHuPH20 were conducted as it is a biotechnology-derived pharmaceutical.

2.6.5.13　A　薬物動態試験：排泄 - Excretion Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse

Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal Injection of ^{125}I-Recombinant Human Hyaluronidase PH20 (rHuPH20)**

Test Article: rHuPH20
Report No. 12214-B
Location in CTD: 4.2.2.3.2-2

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 1/group, F: 1/group
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Method of Administration: Intradermal
Dose: 0.00133 mg/animal (400 U/animal)
Radionuclide: [^{125}I]
Specific Activity of Test Item in Formulation: 8.31×10^6 dpm/µg
Assay: Liquid scintillation counting
Sampling Time: 6, 12, 24, 36 and 48 hours post-dose

Total Recoveries of Radioactivity Through 48 hours Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)

Excretion Route	Male	Female
Urine	64.4	21.5
Cage wash	16.4	50.0
Feces	16.1	12.8
Total	96.8	84.2

F = female; M = male.

2.6.5.13　B　薬物動態試験：排泄 - Excretion Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse

Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**

Test Article: rHuPH20
Report No. 13184
Location in CTD: 4.2.2.3.3

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 1/group, F: 1/group
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Method of Administration: Intradermal and subcutaneous
Dose: 0.00173 mg/animal (100 U/animal)
Radionuclide: [^{125}I]
Specific Activity of Test Item in Formulation: 6.55×10^6 dpm/µg
Assay: Liquid scintillation counting
Sampling Time: 2, 6, 12 and 24 hours post-dose

Total Recoveries of Radioactivity Through 24 hours Following Single Intradermal Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)

Excretion Route	Male	Female
Urine	48.5	54.1
Cage wash	48.3	39.4
Feces	5.0	5.5
Tissues + carcass	6.0	7.6
Total	107.8	106.6

F = female; M = male.

(Continued)

2.6.5.13　B　薬物動態試験：排泄 - Excretion Following Single Intradermal or Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse（続き）

Report Title: **Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intradermal or Subcutaneous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase**

Test Article: rHuPH20
Report No. 13184
Location in CTD: 4.2.2.3.3

	Total Recoveries of Radioactivity Through 24 hours Following Single Subcutaneous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)	
Excretion Route	**Male**	**Female**
Urine	99.8	90.5
Cage wash	17.7	11.3
Feces	6.7	12.3
Tissues + Carcass	6.9	11.1
Total	131.1	125.1

2.6.5.13　C　薬物動態試験：排泄 - Excretion Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in the Mouse

Report Title: Analysis of Stability in Mouse Whole Blood and Plasma of ^{125}I-labelled Hyaluronidase and Pilot Pharmacokinetic, Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mouse Following Single Intravenous Injection of ^{125}I-Hyaluronidase

Test Article: rHuPH20
Report No. 13128
Location in CTD: 4.2.2.3.4

Species: CD-1 mouse
Gender (M/F): Number of Animals: M: 1/group, F: 1/group
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Method of Administration: Intravenous
Dose: 0.004 mg/animal (200 U/animal)
Radionuclide: [^{125}I]
Specific Activity of Test Item in Formulation: 6.43×10^6 dpm/µg
Assay: Liquid scintillation counting
Sampling Time: 6, 12, 24, 36 and 48 hours post-dose

Total Recoveries of Radioactivity Through 48 hours Following Single Intravenous Administration of ^{125}I-rHuPH20 in Mice (% of Administered Dose)

Excretion Route	Male	Female
Urine	64.4	38.0
Cage wash	16.4	31.7
Feces	17.4	15.4
Tissues + carcass	2.1	5.1
Total	100.2	90.0

F = female; M = male.

2.6.5.14　薬物動態試験：胆汁中排泄

Test Article: rHuPH20

No studies on excretion into bile were conducted with rHuPH20.

2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用

Test Article: rHuPH20

No pharmacokinetic studies on drug-drug interactions were conducted with rHuPH20.

2.6.5.16　薬物動態試験：その他

Test Article: rHuPH20

No other PK studies were conducted with rHuPH20.