目次

2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 3
2.6.6.2 単回投与毒性試験 9
2.6.6.3 反復投与毒性試験 9
2.6.6.4 遺伝毒性試験 10
2.6.6.5 がん原性試験 11
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 11
2.6.6.7 局所刺激性試験 16
2.6.6.8 その他の毒性試験 20
2.6.6.9 考察及び結論 31
2.6.6.10 図表 33
2.6.6.11 参考文献 33
2.6.7 毒性試験概要表 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 plasma concentration-time curve（血漿中濃度－時間曲線下面積）
$AUC_{0\text{-}7d}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 7 days（0 日から 7 日までの血漿中濃度－時間曲線下面積）
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）
C_{max}	maximum plasma concentration（最高血漿中濃度）
EFD	embryo-fetal development（胚・胎児発生）
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）
HYAL1, 2, 3, 4, 5	hyaluronidase 1, 2, 3, 4, 5（ヒアルロニダーゼ 1，2，3，4，5）
ICH	International Council for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
Ig	immunoglobulin（免疫グロブリン）
IHC	immunohistochemical（免疫組織化学）
IV	intravenous（静脈内）
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）
PCR	polymerase chain reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）
PND	postnatal day（生後日数）
PPND	pre- and postnatal development（出生前及び出生後の発生並びに母体の機能）
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）
rRbPH20	recombinant rabbit hyaluronidase PH20（遺伝子組換えウサギヒアルロニダーゼ PH20）
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction（逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応）
SC	subcutaneous（皮下）
SPAM1	sperm adhesion molecule 1（精子接着分子 1）
TK	toxicokinetic(s)（トキシコキネティクス）

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　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。

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）は，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。rHuPH20 は皮下投与した薬剤の拡散及び吸収を促進する目的で使用される分子量 60～65 kDa の単鎖糖タンパク質のエンドグリコシダーゼである。

ダラツムマブの毒性については，初回製造販売承認申請時に評価済みであることから，本申請に際してはダラツムマブと rHuPH20 の併用（Dara-rHuPH20）投与により皮下投与局所に及ぼす影響のみを評価した。一方，ダラツムマブと併用投与する rHuPH20 は新有効成分として皮下投与により一連の毒性試験を実施した。

rHuPH20 及び Dara-rHuPH20 投与による毒性試験は，「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価に関するガイドライン：医薬品規制調和国際会議（ICH）S6（R1）ガイドライン」，「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン：ICH S9 ガイドライン」及び「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス：ICH M3（R2）ガイダンス」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。

ダラツムマブ，rHuPH20 及び Dara-rHuPH20 の毒性試験の概略を以下及び【2.6.7.1】に示す。

2.6.6.1.1　ダラツムマブ

ダラツムマブの毒性は，Dara-IV 製剤の初回承認申請時に提出した資料に基づいて既に評価されている。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，毒性試験で汎用されるマウス，ラット，ウサギ，ミニブタ，カニクイザル及びアカゲザルの CD38 には結合しないため，初回承認申請時にはダラツムマブの重要な毒性試験として，チンパンジーを用いた反復投与毒性試験，並びにチンパンジー及びヒトの正常組織を用いた組織交差性試験を実施した。

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[1)]及び欧州連合[2)]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，ダラツムマブの新たな毒性試験を実施することはできない。したがって，新投与経路である皮下投与による影響は，Dara-rHuPH20 投与による局所忍容性のみウサギ及びミニブタを用いて評価した【2.6.6.7.2】。

なお，Dara-SC 製剤の臨床推奨用量であるダラツムマブ 1,800 mg をヒトに皮下投与したときの全身曝露量［8 回目投与後の 0 日から 7 日までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}7d}$）］【2.7.2.2.1.1 及び 2.7.2.2.3.1】は，Dara-IV 製剤の承認用量である 16 mg/kg のダラツムマブを静脈内投与したときの全身曝露量（7 回目投与後の $AUC_{0\text{-}7d}$）（初回承認申請時 CTD 2.7.2.2.1.2）と同程度であることから，皮下投与による全身曝露量は静脈内投与による全身曝露量を大きくは上回らないと考えられた。

2.6.6.1.2 rHuPH20

rHuPH20 の重要な毒性試験として，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）を実施した。受胎能は，サルを用いた 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，反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験の成績を基に評価した。rHuPH20 の毒性試験の概要を表 2.6.6-1 に示す。

ヒアルロニダーゼ（PH20）は，精子先体を含む成体雄の生殖器官に発現し[3)]，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[4)]。そのため，rHuPH20 の投与により産生された抗薬物抗体（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 rHuPH20 に対する 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。ADA の影響を評価した生殖発生毒性試験及び組織交差反応性試験の概要を表 2.6.6-2，PH20 の遺伝子発現プロファイルを評価した試験の概要を表 2.6.6-3 に示す。

ヒアルロン酸（HA）の構造は動物種間で共通しており[5)]，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 の毒性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間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[6)]，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。

rHuPH20 の用量（mg/kg）は，rHuPH20 の平均比活性（110,000 U/mg）を用いて U/kg に変換した。rHuPH20 の最高濃度（C_{max}）及び血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）はそれぞれ U/mL 及び U·h/mL で示した。

表 2.6.6-1 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 and 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 ICH 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】
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.				

[a] Specialized fertility endpoints were included in the 39-week monkey study: menstrual monitoring in females and testicular volume, semen analysis (sperm concentration, motility and morphology), testosterone and luteinizing hormone levels in males.

EFD = embryo-fetal development; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; LD = lactation day; PND = postnatal day; PPND = pre and postnatal development; SC = subcutaneous.
Note: See【2.6.7.1】for a full list of studies conducted with rHuPH20.

表 2.6.6-2 ADA の影響を評価した試験の概要

Study Type	Species/Strain	Doses Tested (mg/kg/dose), Method, Frequency of Administration	GLP	Report No./ Location in CTD
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	SC or IM[a]	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】

[a] Immunization regimens: (Set 1) intermittently with 0.05 mg rHuPH20 (0.1 mL of a 0.5 mg/mL solution of rHuPH20) with adjuvant, SC on Day 1, and IM on Day 8, 22, 36 and 57; (Set 2) without adjuvant, administered SC once daily for 28 days at 0.76 mg/kg/dose rHuPH20 (equivalent to 83,600 U/kg); or (Set 3) without adjuvant, administered SC once weekly for five weeks at 0.76 mg/kg/dose rHuPH20.

ADA = anti-drug antibody; EFD = embryo-fetal development; GLP = Good Laboratory Practice; IM = intramuscular; IV = intravenous; NZW = New Zealand White; PPND = pre and postnatal development; SC = subcutaneous.
Note: See【2.6.7.1】for a full list of studies conducted with rHuPH20.

表 2.6.6-3 PH20 の遺伝子発現プロファイルを評価した試験の概要

Study Type	Species/Strain	Method	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】

NZW = New Zealand White; RNA = ribonucleic acid; RNA-Seq = deep RNA sequencing; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction.
Note: See【2.6.7.1】for a full list of studies conducted with rHuPH20.

カニクイザルを用いた 7 日間連日反復皮下又は静脈内投与毒性試験，並びに 39 週間週 1 回反復皮下投与毒性試験では，rHuPH20 に対する忍容性は，それぞれ最高用量の 5 mg/kg/日及び 2 mg/kg/週まで良好であり，有害な影響はみられなかった。39 週間反復皮下投与毒性試験では，Day 183 以降に rHuPH20 の曝露量の低下が認められ，rHuPH20 に対する中和抗体産生と相関した。7 日間及び 39 週間反復投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）は，それぞれ最高用量の 5 mg/kg/日及び 2 mg/kg/週であった。

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（2.6.6.3.1.2）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 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及ぼす影響はみられなかった。したがって，rHuPH20 が受胎能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

CD-1 マウスを用いた EFD 試験では，最高用量の 18 mg/kg/日まで母動物に明らかな毒性は認められなかった。9 mg/kg/日以上の用量で，吸収胚数の増加，同腹胎児数の減少及び胎児体重の減少が認められた。本試験の母動物に対する NOAEL は 18 mg/kg/日，胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg/日であった。

CD-1 マウスを用いた PPND 試験では，最高用量 9 mg/kg/日まで母動物の生殖能，出生児の生死，成長及び機能発達，並びに F_2 児の発生に及ぼす有害な影響は認められず，F_0 母動物及び F_1 出生児に対する NOAEL はいずれも 9 mg/kg/日であった。

幼若 CD-1 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 の用量を生後 7 日（PND 7）～30 に連日皮下投与し，その後，PND 127（生殖発生毒性評価）又は 241（慢性毒性評価）まで週 1 回皮下投与した結果，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 投与による有害な影響はみられなかった。

rHuPH20 を皮下投与したときの局所刺激性は，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験，並びにマウス又はウサギを用いた生殖発生毒性試験の成績に基づいて評価した。これらの試験では，投与部位に局所刺激性に関連した有害な所見は認められなかった。

ADA 曝露が生殖発生に及ぼす影響をマウス及びウサギを用いて検討した。CD-1 マウスを用いた PPND 試験の補足試験では，妊娠後期の胎児から成熟期の出生児に至る全発生段階を通して ADA の曝露が認められたが，F_1 児の成長，機能発達及び生殖能に影響はみられなかった。また，ニュージーランドホワイト（NZW）ウサギを用いた雌雄の受胎能，並びに EFD 及び出生後の発達に関する試験では，ADA の曝露が投与期間を通じて認められたが，雌雄の受胎能，EFD，並びに出生児の発達及び交配に及ぼす影響はみられなかった。

組織交差反応性試験では，ウサギ抗 rHuPH20 抗体はヒト精巣の精細管で強い染色を示し，ヒト食道及び結腸組織の腸神経叢で弱い染色が認められた。ヒト抗 PH20 抗体及びヒト ADA はヒト精巣のみに特異的に結合した。また，マウス，ウサギ及びヒト組織を用いてヒアルロニダーゼ PH20 をコードする精子接着分子 1（SPAM1）／PH20 の遺伝子発現を解析した結果，SPAM1／PH20 が成人男性，並びにマウス及びウサギの成体雄の生殖器で主に発現していることが確認された。

2.6.6.1.3 ダラツムマブ及び rHuPH20 の併用（Dara-rHuPH20）

Dara-SC 製剤は多発性骨髄腫の治療を目的としていることから，ICH S9 ガイドラインに従い，Dara-rHuPH20 投与による全身への影響を評価するための毒性試験は実施しなかった。Dara-SC 製剤は皮下注製剤であることから，ウサギを用いた局所刺激性試験を実施した。また，ミニブタを用いた Dara-rHuPH20 の投与濃度又は投与方法を検討する試験の結果に基づき，Dara-rHuPH20 の局所刺激性を評価した。ウサギ及びミニブタは局所刺激性試験で汎用されること，並びにミニブタはヒトの皮膚と解剖学的に類似していることから [7)]，局所刺激性を評価する動物種として選択した。Dara-rHuPH20 の試験の概要を表 2.6.6-4 に示す。

表 2.6.6-4 Dara-rHuPH20 の試験の概要

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 PH20; SC = subcutaneous.
Note: See【2.6.7.1】for additional information on studies conducted with dara-rHuPH20.

ウサギに 20 mg/mL のダラツムマブと 200 又は 1,000 U/mL の rHuPH20 を併用単回皮下投与した試験では，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。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試験では，ほぼ全ての濃度で紅斑及び腫脹が認められたが，500 U/mL 以上の濃度では局所の腫脹も小さく，紅斑は軽度～なしであった。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試験では，全ての投与群で投与部位に腫脹がみられたが，投与 24 時間後には消失した。

以上の結果から，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いと判断した。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 rHuPH20

2.6.6.2.1.1 サルを用いた単回皮下又は静脈内投与試験

雌のカニクイザルを用いた薬物動態試験【4.2.2.2.2】の結果に基づき，単回投与毒性を評価した。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に影響はみられなかった。血液学的検査では，赤血球数，ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少，並びに網状赤血球の増加がみられたが，血漿中薬物濃度測定のための頻回採血による影響であると考えられた。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 rHuPH20

2.6.6.3.1.1 サルを用いた 7 日間反復皮下又は静脈内投与毒性試験

【参考資料 4.2.3.2.1】

カニクイザル（1 群雌雄各 2 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.0）及び 5 mg/kg/日（550,000 U/kg/日）の用量で 7 日間連日皮下又は静脈内投与し，死亡，一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，血液学的検査，血液凝固検査，血液生化学的検査，尿検査，剖検，器官重量，病理組織学的検査及びトキシコキネティクス（TK）を評価した【2.6.7.6】。

全ての群で，rHuPH20 投与による影響はみられなかった。

血漿中 rHuPH20 濃度（活性）の TK 解析では，Day 1 及び 7 における皮下投与後の雌雄併合した最高血漿中濃度到達時間の中央値は 1 時間であり，Day 7 における皮下又は静脈内投与の雌雄併合した 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（AUC_{last}）はそれぞれ 501.7 及び 8,733 U·h/mL であった。皮下投与による rHuPH20 の全身曝露量は，静脈内投与と比較して著しく低かった（Day 1 及び 7 の皮下投与後の AUC_{last} は静脈内投与と比較してそれぞれ 5.44%及び 5.74%であった）。

以上のとおり，カニクイザルに 5 mg/kg/日を 7 日間連日皮下又は静脈内投与したときの rHuPH20 の忍容性は，いずれも良好であった。したがって，本試験における NOAEL は両投与経路とも 5 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.3.1.2 サルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験

【評価資料 4.2.3.2.2】

カニクイザル（1 群雌雄各 6 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.0），0.02，0.2 及び 2 mg/kg/週（2,200，22,000 及び 220,000 U/kg/週）の用量で週 1 回，39 週間反復皮下投与した。臨床用量 30,000 U と比較して，ヒト等価用量（HED）換算で 100 倍以上の安全域が得られる 2 mg/kg を本試験の高用量に設定した。全ての群に 1 群雌雄各 2 例の回復群を設定し，投与終了後 4 週間休薬して回復性を評価した。評価項目は，死亡，一般状態，体重，呼吸数，血圧，心電図検査，眼科学的検査，血液学的

検査，血液凝固検査，血液生化学的検査，尿検査，剖検，器官重量及び病理組織学的検査とした。雌では月経周期，雄では精巣サイズ，精子検査（精子の濃度，運動性及び形態），テストステロン値及び黄体形成ホルモン値を評価した。TK，並びに総 ADA 及び中和抗体を評価した。さらに，カニクイザルの精巣，結腸の腸神経叢及び精子を用いて ADA の組織交差反応性を免疫組織化学（IHC）染色法により検討した【2.6.7.7】。

試験期間中に死亡はみられなかった。投与部位の病理組織学的変化を除き，いずれのパラメータにも rHuPH20 投与に関連した変化は認められなかった。病理組織学的検査では，投与期間終了時に 2 mg/kg/週群の雌雄全例及び 0.2 mg/kg/週群の雌雄各 4 例中 1 例で，投与部位皮下の血管周囲にリンパ形質細胞の軽微な浸潤が認められた。4 週間の回復期間後には，この所見は 2 mg/kg/週群の雄 2 例中 1 例でのみ認められ，2 mg/kg/週群の雌及び 0.2 mg/kg/週群ではみられなかったことから，回復性が示された。また，その重症度が軽微であったことから，有害ではないと考えられた。

TK 解析では，ほとんどの測定時点で，0.02 及び 0.2 mg/kg/週群の雌雄ともに血漿中 rHuPH20 濃度が定量下限（LLOQ）未満であった。2 mg/kg/週群では，C_{max} は Day 85 まで雌雄とも増加し，Day 183 及び 267 には低下した。雄では，Day 1，85 及び 183 の C_{max} はそれぞれ 12.5，28.8 及び 12.0 U/mL であり，AUC_{last} はそれぞれ 20.5，177.0 及び 89.6 U·h/mL であった。Day 267 に rHuPH20 は検出されなかった。雌では，全測定時点で rHuPH20 が検出され，Day 1，85，183 及び 267 の C_{max} はそれぞれ 20.8，64.7，64.2 及び 10.0 U/mL であり，AUC_{last} はそれぞれ 47.8，395.0，467.0 及び 56.2 U·h/mL であった。

反復投与後の曝露量の低下は中和抗体の産生と関連していると考えられた。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，4 週間の回復期間後には，中和抗体の抗体価は最大値の約 50%まで低下した。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。

IHC 染色法では，ADA はカニクイザルの精巣及び精子と組織交差反応性を示したが，結腸神経叢とは反応性を示さなかった。

以上のとおり，カニクイザルに rHuPH20 を 0.02，0.2 及び 2 mg/kg/週の用量で週 1 回，39 週間皮下投与した結果，投与部位の皮下にリンパ形質細胞の軽微な浸潤が認められたが，有害ではないと考えられた。TK 解析では，2 mg/kg/週群で rHuPH20 の全身曝露が認められ，雄及び雌でそれぞれ少なくとも 6 及び 9 カ月間検出可能であった。ADA の増加に関連した有害な変化は認められなかったが，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。したがって，本試験における NOAEL は 2 mg/kg/週と判断した。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 rHuPH20

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

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 rHuPH20

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。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 受胎能に関する試験

2.6.6.6.1.1 rHuPH20

カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1.2）の成績に基づき，受胎能を評価した。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 rHuPH20 投与による影響はみられなかった。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 rHuPH20

(1) マウスを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

【参考資料 4.2.3.5.2.1】

妊娠 CD-1 マウス（1 群雌 8 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5），1，3，10 及び 30 mg/kg/日（110,000，330,000，1,100,000 及び 3,300,000 U/kg/日）の用量で妊娠 6～15 日（GD 6～15）に連日皮下投与した。母動物を GD 17 に帝王切開して胎児を観察した。評価項目は，母動物の生死，一般状態，体重，剖検及び生殖パラメータ，並びに胎児の体重及び外表検査とした【2.6.7.11】。

母動物では，全ての群で死亡例は認められず，一般状態に rHuPH20 投与による影響はみられなかった。30 mg/kg/日群で GD 18 に体重の減少（溶媒対照群の 0.89 倍）がみられ，GD 6～18 に体重増加量の減少が認められた。30 mg/kg/日群の 3 例及び 10 mg/kg/日群の 1 例に脾臓の腫大がみられた。30 mg/kg/日群の 4 例で全胚吸収（100%胚吸収）が認められ，他の 4 例で同腹児数の減少がみられた。また，10 mg/kg/日群の 1 例で胚吸収率が高かった（68.8%）。1 及び 3 mg/kg/日群では rHuPH20 投与による影響は認められなかった。

胎児では，30 mg/kg/日群で胎児体重の減少が認められたが，全ての群で胎児の性比及び外表検査に rHuPH20 投与による影響は認められなかった。

以上のとおり，妊娠 CD-1 マウスに rHuPH20 を 1，3，10 及び 30 mg/kg/日の用量で，GD 6～15 に皮下投与した結果，30 mg/kg/日群で母動物の体重及び体重増加量の減少，同腹児数の減少，並びに胎児体重の減少，10 mg/kg/日以上の群で吸収胚数の増加及び脾臓の腫大が認められた。本試験の結果に基づき，マウスを用いた重要な EFD 試験の用量は，0，3，9 及び 18 mg/kg/日とした。

(2) マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験

【評価資料 4.2.3.5.2.2】

妊娠 CD-1 マウス（1 群雌 25 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5），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（主試験群）。評価項目は，死亡，一般状態，体重／体重増加量，生殖パラメータ，剖検，生存及び死亡胎児数，胎児体重，性比並びに胎児検査（外表，内臓及び骨格検査）とした。別途，サテライト群（1 群雌 36 例）を設定し，GD 6 及び 15 に TK 及び ADA を評価した【2.6.7.13】。

母動物では，rHuPH20 投与に関連した死亡は認められなかった。9 mg/kg/日群では主試験群の 25 例中 2 例，18 mg/kg/日群では主試験群及びサテライト群のそれぞれ 25 例中 1 例及び 36 例中 1 例が計画剖検前に死亡したが，毒性徴候（有害な一般状態，若しくは体重増加量又は体重の減少）は認められず，死亡例数に用量依存性もみられなかったことから，これらの死亡は rHuPH20 投与に関連しないものと考えられた。そのほかには，母動物に明らかな毒性は認められなかった。

胎児では，9 mg/kg/日以上の群で体重の有意な減少（溶媒対照群の 0.96 倍）が認められた。また，後期吸収胚数の増加がみられた（溶媒対照群の 0.1 に対して，9 及び 18 mg/kg/日群でそれぞれ 1.0 及び 1.2）が，統計学的に有意な差はみられず，生存胎児数に影響は認められなかった。全ての群で rHuPH20 投与に関連した外表，内臓，並びに骨格の奇形又は異常は認められなかった。

TK 解析では，GD 6 における 3，9 及び 18 mg/kg/日群の C_{max} はそれぞれ 3.44，30.5 及び 49.6 U/mL であり，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}）はそれぞれ 5.45，45.3 及び 120 U·h/mL であった。また，GD 15 における 3，9 及び 18 mg/kg/日群の C_{max} はそれぞれ 20.9，17.1 及び 99.2 U/mL であり，AUC_{24h} はそれぞれ 55.1，79.0 及び 363 U·h/mL であった。GD 6 及び 15 の C_{max} 及び AUC_{24h} は，おおむね用量に依存して増加した。

母動物の全例に ADA の発現が認められた。ADA の抗体価は，全ての rHuPH20 群で同程度であり，9 及び 18 mg/kg/日群でみられた用量依存的な胚吸収の増加と相関しなかったことから，ADA は EFD に有害な影響を及ぼさなかったことが示唆された。

以上のとおり，妊娠 CD-1 マウスに rHuPH20 を 3，9 及び 18 mg/kg/日の用量で，GD 6～15 に皮下投与した結果，全ての群で rHuPH20 への曝露が認められたが，母体毒性はみられなかった。9 及び 18 mg/kg/日群で胎児体重の減少及び後期吸収胚数の増加がみられたが，全ての群で rHuPH20 投与に関連した胎児の外表，内臓及び骨格の異常は認められなかった。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。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.3.1 rHuPH20

(1) マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

【評価資料 4.2.3.5.3.1】

妊娠 CD-1 マウス（1 群雌 25 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5），3，6 及び 9 mg/kg/日（330,000，660,000 及び 990,000 U/kg）の用量で GD 6～授乳 20 日（LD 20）に連日皮下投与した。母動物は自然分娩させ，F_1 出生児は同腹児数を調整し（1 群雌雄各 25 例），LD 20 に離乳させた後，約 90 日齢で交配させて生殖能を評価した。評価項目は，F_0 母動物の生死，一般状態，体重，分娩及び剖検，並びに F_1 出生児の生死，一般状態，体重／体重増加量，性成熟，交配，受胎能，剖検，器官重量（精巣及び精巣上体）及び機能検査（学習，記憶及び運動機能）とした。GD 6～22 に連日皮下投与した後，分娩しなかった動物は GD 23 に安楽死させ，剖検及び妊娠状態の観察を実施した。F_1 母動物は GD 18 に帝王切開し，F_2 胎児を観察した【2.6.7.14】。

用量は，先に実施したマウス EFD 試験（0，3，9 及び 18 mg/kg/日）【2.6.6.6.2.1(2)】に基づき設定した。マウス EFD 試験では，母体毒性は認められなかったが，9 mg/kg/日以上の群で後期吸収胚数の増加が認められた。この結果に基づき，最高用量を 9 mg/kg/日とし，以下，6 及び 3 mg/kg/日を設定した。

F_0 母動物では，6 及び 9 mg/kg/日群で 25 例中それぞれ 1 例（それぞれ LD 4 及び GD 17）の死亡が認められ，9 mg/kg/日群の 1 例（GD 16）を状態悪化のために安楽死させた。死亡の発生頻度は各群 10%未満（背景データ：15%未満）と低かったため，rHuPH20 投与による直接的な影響ではないと考えられた。全ての群で，母動物の生死，一般状態，体重／体重増加量，分娩及び剖検に rHuPH20 投与に関連した影響は認められなかった。

F_1 新生児の出生児数，性比及び体重に rHuPH20 投与に関連した影響は認められなかった。F_1 出生児では，溶媒対照群で PND 31 に雌 25 例中 1 例の死亡が認められたが，一般状態又は体重に有害な変化はみられず，剖検時にも異常はみられなかった。いずれの投与群においても，F_1 出生児の生死，一般状態，体重／体重増加量，機能検査（学習，記憶及び運動機能），性成熟，剖検及び器官重量（精巣及び精巣上体）に rHuPH20 投与に関連した影響は認められなかった。全ての群で雌雄 F_1 出生児の交配及び受胎能パラメータ値は同程度であり，統計学的に有意な差は認められなかった。全ての群で F_1 妊娠雌の黄体数，着床数，同腹児数，生存胎児数，早期及び後期吸収胚数，胎児体重，吸収胚率，並びに生存雄胎児率は同程度であり，F_2 胎児に及ぼす影響はみられなかった。F_2 胎児の外表検査では，rHuPH20 投与に関連した影響はみられなかった。

以上のとおり，F_0 母動物では，全ての群で rHuPH20 投与による有害な影響はみられなかった。したがって，F_0 母動物，並びに F_1 出生児の生殖能，成長及び機能発達に対する NOAEL は 9 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験

2.6.6.6.4.1 rHuPH20

(1) 幼若マウスを用いた用量設定試験

【参考資料 4.2.3.5.4.1】

幼若 CD-1 マウス（主試験群：1 群雌雄各 8 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5），1，3 及び 9 mg/kg/日（110,000，330,000 及び 990,000 U/kg/日）の用量で連日又は 3 及び 9 mg/kg/週（330,000 及び 990,000 U/kg/週）の用量で週 1 回，PND 7～42 に皮下投与した。検査項目は，一般状態，体重，臨床検査（血液学及び血液生化学的検査），剖検及び器官重量とした。TK 群では，対照群（雌雄各 9 例），rHuPH20 連日投与群（1 群雌雄各 39 例）及び rHuPH20 週 1 回投与群（1 群雌雄各 24 例）の PND 7（連日投与群のみ），28 及び 42 に TK 測定を実施した。ADA 測定群では，溶媒対照群（雌雄各 4 例）及び rHuPH20 群（1 群雌雄各 8 例）に PND 7～28 に連日又は週 1 回投与した。ADA 測定群（溶媒対照群：8 例，rHuPH20 投与群：各群 16 例）及び主試験群（各群 16 例）について，それぞれ PND 30 及び 44 に ADA の力価，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：精子に局在するマウスヒアルロニダーゼ）に対する交差反応性，並びに rHuPH20 に対する中和抗体を測定した【2.6.7.11】。

主試験群の連日又は週 1 回投与群では，全例が最終剖検日まで生存した。ADA 測定群（3 mg/kg/日群及び 3 mg/kg/週群の各群 16 例中 1 例）及び TK 群（3 mg/kg/日群の 78 例中 1 例，9 mg/kg/週群の 48 例中 1 例）で死亡が認められたが，発生頻度は低く，試験実施施設の背景データと同程度であり，用量依存性もみられなかったため，rHuPH20 投与に関連したものではないと考えられた。

一般状態及び剖検では，連日又は週 1 回投与群のいずれも，rHuPH20 投与に関連した変化は認められなかった。全ての連日投与群の雌で，体重及び体重増加量の用量依存的な増加が認められたが，対照群の体重と比較して，概して 10%以内の増加であり，有害ではないと考えられた。

血液学的検査では，1 mg/kg/日以上及び 3 mg/kg/週以上の群の雌雄で，好酸球数の増加がみられた。また，9 mg/kg/週群の雌雄で，網状赤血球数の増加が認められた。いずれも軽微な変化であったことから，有害ではないと考えられた。

平均 rHuPH20 濃度を表 2.6.6-5 に示す。各群雌雄ともに rHuPH20 濃度の定量可能な測定時点が 3 点未満であったため，TK パラメータは算出できなかった。

表 2.6.6-5 PND 7，28 及び 42 の幼若マウスに rHuPH20 を連日又は週 1 回皮下投与したときの血漿中平均 rHuPH20 濃度

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

- = <lower limit of quantification (<0.625 U/mL); F = female; M = male; NA = not applicable; SD = standard deviation; ID = insufficient data.
Data was rounded to one decimal place from the values in the TK report.

ADA が，PND 30 では 3 mg/kg/週群の 4 例を除き，rHuPH20 投与群のほぼ全例で，PND 44 では rHuPH20 投与群の全例で検出された。ADA の rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性は，両日ともに 1，3 及び 9 mg/kg/日群の 80%以上の動物で認められた。3 及び 9 mg/kg/週群では，rMuPH20 に対する交差反応性が 44～88%の動物で，rMuHyal5 に対する交差反応性が 73～100%の動物でみられた。中和抗体は，PND 44 に 3 及び 9 mg/kg/日群の 85%以上の動物でみられ，3 及び 9 mg/kg/週群では，それぞれ 44%及び 65%の動物で認められた。

以上のとおり，幼若マウスに rHuPH20 を連日又は週 1 回皮下投与したときの忍容性は 9 mg/kg の用量まで良好であり，有害な影響は認められなかった。

(2) 幼若マウスを用いた rHuPH20 及び ADA の 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）

【評価資料 4.2.3.5.4.2】

幼若 CD-1 マウス（生殖発生毒性評価サブセット：1 群雌雄各 30 例，慢性毒性評価サブセット：1 群雌雄各 25 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5）及び 1 mg/kg/日（110,000 U/kg/日）の用量で，PND 7～30 に連日皮下投与した。その後，生殖発生毒性評価サブセットでは PND 129 まで，慢性毒性評価サブセットでは PND 241 まで，rHuPH20 を 0 及び 1 mg/kg の用量で週 1 回皮下投与した。生殖発生毒性評価サブセット（1 群雌雄各 22 例）は，PND 87～90 に同居を開始し，最大 5 日間，交配させた。妊娠した雌は，GD 18 まで投与した後，剖検した。評価項目は，生死，一般状態，体重／体重増加量，剖検，器官重量及び病理組織学的検査とした。さらに，生殖発生毒性評価サブセットでは，性成

熟，交配，精子検査，受胎能，機能検査，胎児体重，胎児の性比及び胎児検査（外表，内臓及び骨格検査），慢性毒性評価サブセットでは，眼科学的検査，血液学及び血液生化学的検査を実施した。両サブセットで ADA の抗体価及び中和抗体，並びに rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性を評価した【2.6.7.15】。

生殖発生毒性評価サブセットでは，対照群の雌 2 例に後肢歩行異常がみられたことから，これらの動物を PND 19 及び 20 に安楽死させた。1 mg/kg 群では雌 1 例の死亡が PND 37 に認められたが，一般状態，体重，剖検及び病理組織学的検査に異常がみられなかったことから，死因は特定できなかった。また，雌 1 例を状態悪化のため PND 60 に安楽死させた。この動物では体重及び剖検に異常はみられなかったが，病理組織学的検査で脳に中等度の空胞化がみられため，これが状態悪化の原因と考えられた。脳の空胞化は雄ではみられず，雌 1 例のみにみられた変化であることから，rHuPH20 投与に関連した変化ではないと考えられた。妊娠雌 1 例が計画剖検日の GD 18 に早期分娩した。この動物では一般状態及び体重に影響はみられず，剖検及び病理組織学的検査にも所見は認められなかった。早期分娩は 1 例のみにみられたものであり，rHuPH20 投与に関連した変化ではないと考えられた。生殖発生毒性評価サブセットでは，1 mg/kg 群で生死，一般状態，体重／体重増加量，性成熟，交配，精子検査，受胎能，機能検査，剖検，器官重量，胎児体重，胎児の性比及び胎児検査に rHuPH20 投与に関連した変化は認められなかった。

慢性毒性評価サブセットでは，対照群の雌 1 例が PND 17 に死亡したが，一般状態及び体重に影響は認められなかった。また，対照群の雌 2 例を一般状態の悪化又は悪性リンパ腫のために，それぞれ PND 52 及び 113 に安楽死させた。1 mg/kg 群では，肢の損傷によって後肢歩行異常がみられた雄 1 例を PND 23 に安楽死させた。また，状態悪化した雄 1 例を PND 113 に安楽死させた。この動物の剖検では胸腺の腫大がみられ，病理組織検査では悪性リンパ腫が認められたことから，これが状態悪化の原因と考えられた。悪性リンパ腫は対照群にもみられた病変であることから，rHuPH20 投与に関連した変化ではないと考えられた。1 mg/kg 群の雌雄で投与部位の皮下組織に混合細胞性炎症を伴う軽微～中等度の混合性細胞浸潤が認められた。この変化は，組織学的に静止状態の細胞浸潤像を示し，炎症の発現頻度が低かったため，有害でないと考えられた。1 mg/kg 群の雌で造血亢進に伴う脾臓重量の増加が認められたが，投与部位の炎症に対する二次的又は反応性変化であると考えられた。慢性毒性評価サブセットでは，生死，一般状態，体重／体重増加量，眼科学的検査，血液学及び血液生化学的検査，並びに剖検に rHuPH20 投与に関連した変化は認められなかった。

生殖発生毒性及び慢性毒性評価サブセットで，1 mg/kg 群で全例に ADA の産生が認められ，中和抗体及び遺伝子組換え精子関連ヒアルロニダーゼ（rMuPH20 及び rMuHyal5）に対する ADA の交差反応性が高頻度に認められた。

以上のとおり，幼若マウスに rHuPH20 を 1 mg/kg の用量で最高 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 投与による有害な影響はみられなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

Dara-SC 製剤は，ダラツムマブ 1,800 mg（投与濃度：120 mg/mL）及び rHuPH20 30,000 U（投与濃度：2,000 U/mL）を臨床推奨用量として，15 mL の容量で皮下投与する予定である。

2.6.6.7.1 rHuPH20

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では，それぞれ投与 7 日目及び 39 週目に投与部位及び近傍リンパ節の肉眼的観察及び病理組織学的検査を実施した。7 日間皮下又は静脈内投与毒性試験の 5 mg/kg/日群［投与濃度：10.6 mg/mL（1,166,000 U/mL），投与容量：0.47 mL/kg］では，局所刺激性は認められなかった【4.2.3.2.1】。また，39 週間皮下投与毒性試験の 2 mg/kg/週群［投与濃度：1.0 mg/mL（110,000 U/mL），投与容量：2 mL/kg］では，投与部位の血管周囲にリンパ形質細胞の浸潤が認められたが，可逆的かつ軽微であることから有害ではないと考えられた【4.2.3.2.2】。

CD-1 マウスを用いた皮下投与による EFD 用量設定試験の 30 mg/kg/日群［投与濃度：6 mg/mL（660,000 U/mL），投与容量：5 mL/kg］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【4.2.3.5.2.1，4.2.3.5.2.2 及び 4.2.3.5.3.1】。

NZW ウサギを用いて生殖発生に及ぼす ADA の影響を検討した試験では，一般状態及び投与部位の皮膚スコアによって皮膚刺激性を評価した【4.2.3.7.7.3 及び 4.2.3.7.7.4】。雄の NZW ウサギを用いた皮下投与による生殖発生毒性試験の 0.76 mg/kg/週群［投与濃度：1.52 mg/mL（167,200 U/mL），投与容量：0.5 mL/kg］では，グレード 1，2 及び 3 の紅斑がそれぞれ雄 22 例中 12，4 及び 1 例の投与部位に認められた。紅斑は投与後 4 日以内に消失し，一過性にみられたことから有害ではないと考えられた【4.2.3.7.7.3】。雌の NZW ウサギを用いた皮下投与による生殖発生毒性試験の 0.76 mg/kg/週群［投与濃度：1.52 mg/mL（167,200 U/mL），投与容量：0.5 mL/kg］では，皮膚スコアの変化及び皮膚反応は認められなかった【4.2.3.7.7.4】。

以上のとおり，投与濃度及び体重当たりの投与容量が臨床使用を上回る条件で，rHuPH20 をカニクイザル，マウス及びウサギに皮下及び静脈内投与したが，局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.7.2 Dara-rHuPH20

2.6.6.7.2.1 ウサギを用いた単回投与局所刺激性試験

【評価資料 4.2.3.6.1】

雄の NZW ウサギ（1 群雄 6 例）に rHuPH20（溶媒：25 mmol/L 酢酸ナトリウム，60 mmol/L 塩化ナトリウム，140 mmol/L マンニトール，0.04%ポリソルベート 20，pH 5.5）を 200 又は 1,000 U/mL の濃度で単独又は 20 mg/mL の濃度のダラツムマブと併用で単回皮下投与（投与液量：14 mL，投与速度：5 mL/分）し，ダラツムマブと rHuPH20 を併用投与したときの局所刺激性を評価した（表 2.6.6-6）。動物は投与 4 日後に安楽死させ，剖検した。投与容量は，本試験実施時に想定された臨床試験の予定最大投与液量（120 mL）を体表面積の比較（表 2.6.6-7）により補正した量とした。rHuPH20 の濃度は試験実施時に臨床で想定されている範囲内であった。ダラツムマブは Dara-IV 製剤を用いたため，その濃度は臨床で静脈内投与するときに用いられている濃度であった。評価項目は，一般状態，体重，摂餌量，皮膚スコア，体温，剖検及び病理組織学的検査（投与部位及び腋窩リンパ節）とした【2.6.7.16】。

表 2.6.6-6 Dara-rHuPH20 のウサギ局所刺激性試験の実験デザイン

Group	Test Material	Daratumumab Concentration (mg/mL)	rHuPH20 Concentration (U/mL)	Dose Volume (mL)	Rate of Administration (mL/min)	Number of Male Rabbits
1	Formulation Buffer + rHuPH20	0	200	14	5	6
2	Formulation Buffer + rHuPH20	0	1,000	14	5	6
3	Dara-rHuPH20	20	200	14	5	6
4	Dara-rHuPH20	20	1,000	14	5	6

Dara-rHuPH20 = daratumumab in combination with rHuPH20; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.
The dose concentration of 20 mg/mL was the concentration that was used in the clinics.

表 2.6.6-7 体表面積の比較

Species	Body Weight	Surface Area	Dose Volume	Volume/m^2
Human	70 kg	1.8 m^2	120 mL	66.7
Rabbit	2 kg	0.19 m^2	14 mL	73.7

死亡例はみられなかった。一般状態及び皮膚観察では，全ての群で投与部位に紫色の変色，軽微な紅斑及び落屑が認められた。体重／体重増加量，摂餌量，体温，剖検及び病理組織学的検査に rHuPH20 単独投与及びダラツムマブと rHuPH20 の併用投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.6.7.2.2 ミニブタを用いた単回皮下投与による局所刺激性評価：rHuPH20 の至適濃度の検討

【参考資料 4.2.3.6.2，4.2.3.6.3】

rHuPH20 の至適濃度の検討のために，ミニブタを用いた 2 つの単回投与試験を実施した。

第 1 試験では，ユカタン系ミニブタ（雌 12 例）に 20 mg/mL の IgG と 0，200，500 又は 800 U/mL の rHuPH20 の混合液（溶媒：25 mmol/L 酢酸ナトリウム，60 mmol/L 塩化ナトリウム，140 mmol/L D-マンニトール，0.04%ポリソルベート 20，pH 5.5）100 mL を，シリンジポンプを用いて 2 又は 4 mL/分の注入速度で単回皮下投与し，rHuPH20 の至適濃度及び注入速度を検討した。動物の左右各 1 カ所に組成の異なる投与液を同じ速度でそれぞれ投与した。各注入速度で，組成の異なる各投与液は，それぞれ 1 例の動物に 1 カ所，計 4 例に投与した。注入圧を測定し，投与部位の紅斑，腫脹及び硬度を評価した。

いずれの投与速度及び濃度においても，注入圧は同程度であった。投与部位にみられた腫脹の発現頻度は，投与速度が速いほど低かった。しかし，いずれの投与速度及び濃度においても，腫脹は小さくて柔らかく，紅斑は軽微であった。これらの変化は，投与翌日には全て消失した。

第 2 試験では，ユカタン系ミニブタ（雌 18 例）に 100 mg/mL のダラツムマブ（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン，300 mmol/L ソルビトール，0.04%ポリソルベート 20，1 mg/mL メチオニン，pH 5.5）と 50，500，2,000 又は 5,000 U/mL の rHuPH20（溶媒：130 mmol/L 塩化ナトリウム，10 mmol/L ヒスチジン，pH 6.5）の混合液 16 mL を，シリンジポンプを用いて 3 mL/分の速度で単回皮下投与し，rHuPH20 の至適濃度を検討した。また，ダラツムマブの対照として IgG を用

いて，100 mg/mL の IgG と 50 又は 5,000 U/mL の rHuPH20 の混合液を単回皮下投与した。動物の左右各 1 カ所に組成の異なる投与液をそれぞれ投与した。組成の異なる各投与液は，それぞれ 1 例の動物に 1 カ所，計 6 例に投与した。注入圧を測定し，投与部位の紅斑，腫脹及び硬度を評価した。ダラツムマブの投与濃度は臨床使用時の濃度とほぼ同程度であり，rHuPH20 の最高濃度及び容量は，臨床使用時の濃度及び容量を超えていた。また，投与液の L-ヒスチジン，ソルビトール，ポリソルベート 20 及びメチオニンの処方は，Dara-SC 製剤と類似していた。

注入圧は，rHuPH20 濃度の増加に伴い低下した。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，腫脹は比較的小さくて柔らかく，紅斑は軽度～なしであった。これらの変化は 1 時間以内にほとんど消失し，投与翌日には全て消失した。

2.6.6.7.2.3 ミニブタを用いた単回皮下投与による局所刺激性評価：注射針径の影響の検討

【参考資料 4.2.3.6.4】

ユカタン系ミニブタ（雌 7 例）に 120 mg/mL のダラツムマブ（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン，300 mmol/L ソルビトール，0.04%ポリソルベート 20，1 mg/mL メチオニン，pH 5.5）と 2,000 U/mL の rHuPH20（溶媒：130 mmol/L 塩化ナトリウム，10 mmol/L ヒスチジン，pH 6.5）の混合液 15 mL を用手法又は 3 mL/分の投与速度でシリンジポンプを用いて単回皮下投与した。動物の左右各 1 カ所に 23，25 又は 27 ゲージの注射針を用いて投与し，120 mg/mL のダラツムマブ及び 2,000 U/mL の rHuPH20 を皮下投与するための注射針径の影響について検討した。シリンジポンプでは注射針径ごとに 1 例につき 1 カ所，計 4 例に投与し，用手法では 1 例に 23 及び 25 ゲージの注射針径で 1 カ所ずつ投与した。注入圧及び流路圧力を測定し，投与後に投与部位の腫脹の大きさを測定した。ダラツムマブ及び rHuPH20 の濃度及び容量は，臨床使用における濃度及び容量と同じであった。

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。全ての投与群で投与部位に腫脹がみられ，27 ゲージで最も大きかった。いずれの腫脹も投与 24 時間後には消失した。

2.6.6.7.2.4 Dara-rHuPH20 の局所刺激性のまとめ

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 を併用単回皮下投与した結果，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，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 を併用単回皮下投与し，rHuPH20 の至適濃度を検討した結果，rHuPH20 の 500 U/mL 以上の濃度では局所の腫脹は小さく，紅斑は軽度～なしであった。さらに，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併用単回皮下投与し，投与局所に及ぼす注射針径の影響を検討した結果，全ての投与群で投与部位に腫脹がみられたが，投与 24 時間後には消失した。

以上の結果から，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。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 rHuPH20

2.6.6.8.1.1 生殖発生毒性試験における ADA 評価

(1) マウス出生前及び出生後の発生並びに母体機能に対する ADA の影響

【参考資料 4.2.3.7.7.1】

本試験は，別途実施した PPND 試験（2.6.6.6.3.1(1)）の補足試験として実施し，rHuPH20 を投与した妊娠及び授乳期のマウス F_0 母動物，並びに F_1 胎児及び出生児への ADA の曝露を確認し，F_1 児の発生及び発育に及ぼす影響を評価した。

妊娠 CD-1 マウス（対照群：1 群雌 21 例，rHuPH20 群：1 群雌 42 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5），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。各群に 4 つのサブセットを設定し，F_1 胎児（サブセット 1），離乳前の F_1 新生児（サブセット 2），離乳後の F_1 新生児（サブセット 3）の ADA 及び TK（サブセット 4）を評価した（表 2.6.6-8）。また，サブセット 2 及び 3 には，ADA 測定のための血漿サンプル採取日が異なるサブグループ（それぞれサブセット 2A，2B 及び 2C，並びにサブセット 3A 及び 3B）を設定した。各サブセットの投与期間を表 2.6.6-9 に，ADA 測定のための血漿サンプル採取日を表 2.6.6-10 に示す。F_0 母動物の TK 用血漿サンプルは，GD 18 のサブセット 4 及び LD 21 のサブセット 3 から採取した。また，F_1 胎児及び F_1 出生児の TK 用血漿サンプルは，それぞれ GD 18 のサブセット 1（全生存胎児）及び PND 21 のサブセット 3（各群雌雄 1 例）から採取した。

ADA の有無は，サブセット 1，2 及び 3 の血漿サンプルを用いて，電気化学発光法によるブリッジング免疫原性アッセイで確認した。ADA が検出された血漿サンプルを用いて，rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性を評価した。そのほかの評価項目は，F_0 母動物及び F_1 児の生死，一般状態，体重及び剖検，F_0 母動物の妊娠期間，F_1 児の同腹児数，並びに TK とした【2.6.7.17A】。

表 2.6.6-8 ADA 評価のための試験デザイン

Group	Test Material	rHuPH20 (mg/kg/day)	rHuPH20 Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Mice			
					Subset 1	Subset 2[a]	Subset 3	Subset 4
1	Control	0	0	5	6	9	3	3
2	rHuPH20	3	0.6	5	12	18	6	6
3	rHuPH20	6	1.2	5	12	18	6	6
4	rHuPH20	9	1.8	5	12	18	6	6

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

表 2.6.6-9 rHuPH20 の投与スケジュール

Subset	Subgroup	Dose Administration Days	
		Start	End
1	-	GD 6	GD 16
2	A	GD 6	LD 4
	B	GD 6	LD 13
	C	GD 6	LD 21
3	A	GD 6	LD 21
	B	GD 6	LD 21
4	-	GD 6	GD 18

GD = gestation day; LD = lactation day; - = not applicable; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.

表 2.6.6-10 ADA 測定のための血漿サンプル採取日

Subset	Subgroup	Sample Collection Time Points									
		Maternal Samples				Fetal/Pup Samples					
		GD	LD			GD	PND				
		18	6	15	23	18	6	15	23	30	60
1	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-
2	A	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-
	B	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-
	C	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-
3	A	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-
	B	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x

x = Sample collected; - = Not applicable; GD = gestation day; LD = lactation day; PND = postnatal day

rHuPH20 投与に関連した死亡はみられなかった。6 及び 9 mg/kg/日群の母動物 42 例中それぞれ 3 及び 5 例に死亡が認められた。6 mg/kg/日群の 1 例及び 9 mg/kg/日群の 2 例は，F_0 児の食殺及び妊娠時期の誤認による安楽死であり，rHuPH20 投与とは関連しなかった。そのほかの 5 例（6 mg/kg/日群の 2 例及び 9 mg/kg/日群の 3 例）の死亡は，GD 17 以降に認められ，6 mg/kg/日群の 1 例を除いて，投与後 2 時間以内にみられた。安楽死させた動物を除く死亡例は各群 10%未満と少数であり，PPND 試験の結果と同程度であったことから，rHuPH20 投与による直接的な影響ではないと考えられた。

F_0 母動物の一般状態，体重，妊娠期間及び剖検，並びに F_1 児の同腹児数，生死，一般状態，体重及び剖検に，rHuPH20 投与による有害な影響はみられなかった。この結果は，PPND 試験の結果と同じであった【4.2.3.5.3.1】。

ADA 測定では，rHuPH20 を投与した F_0 母動物の全例で GD 18 までに ADA が検出され，その力価の中央値は LD 23 まで持続的に増加した。F_1 胎児では，GD 18 のプール血漿で ADA が検出された。F_1 出生児における力価の中央値は雌雄ともに，PND 6 より PND 15 で高く，授乳終了時の PND 23 まで高値を示し，PND 60 まで検出された。

交差反応性検査では，GD 18 に 65%以上の母動物で rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性が認められ，LD 6～23 には全例にみられた。F_1 児では，rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性がそれぞれ GD 18 に 10%及び 50%の動物で認められ，PND 23 及び PND 6～30 に全例で認められた。

血漿中 rHuPH20 濃度は，ほとんどの F_0 母動物及び F_1 児で LLOQ 未満（<0.625 U/mL）であった。

以上のとおり，F_0 母動物に rHuPH20 を投与したとき，妊娠後期の胎児から出生児の成熟までの全発生・発達段階を通して，rMuPH20 及び rMuHyal5 に交差反応性を示す ADA の曝露が F_1 児に認められた。先に実施した PPND 試験【4.2.3.5.3.1】では，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ておらず，本補足試験の結果に基づくと，ADA の曝露は，F_1 児の生殖能，成長及び機能発達に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

(2) ウサギを用いた 3 種類の免疫感作条件による ADA 反応の検討

【参考資料 4.2.3.7.7.2】

本試験は，ウサギに rHuPH20 を皮下又は筋肉内投与し，ADA の陽性率，抗体価及びその時間推移を評価するために実施した。

非妊娠雌及び雄 NZW ウサギに rHuPH20 を以下の 3 種類の初回感作条件で投与した。条件 1 では，雌 4 例に rHuPH20 を 0.05 mg/回の用量で，Day 1 に完全フロイントアジュバントとともに 4 カ所［計 0.2 mg/日（22,000 U/日）］皮下投与し，Day 8，22 及び 36 に不完全フロイントアジュバントとともに 2 カ所［計 0.1 mg/日（11,000 U/日）］筋肉内投与した（表 2.6.6-11）。条件 2 では，雌 5 例にアジュバントを含まない rHuPH20 を 0.76 mg/kg/日（83,600 U/kg/日）の用量で 28 日間連日皮下投与した（表 2.6.6-12）。条件 3 では，雄 2 例及び雌 5 例にアジュバントを含まない rHuPH20 を 0.76 mg/kg/週（83,600 U/kg/日）の用量で週 1 回 5 週間皮下投与した（表 2.6.6-12）。対照群（雌 2 例）には溶媒（10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5）を 28 日間連日皮下投与した。ADA 力価を維持するため，全ての条件で，感作期間終了の約 2 週間後に追加感作を実施した。マウスの発生に対する rHuPH20 の NOAEL である 3 mg/kg【4.2.3.5.2.2】に基づき，体表面積で換算した 0.76 mg/kg を条件 2 及び 3 の用量に設定した。表 2.6.6-11 及び表 2.6.6-12 のとおりに雌雄のウサギから血液を採取したが，血漿中 ADA 力価は雌のみ測定した。また，条件 3 の雌について，遺伝子組換えウサギヒアルロニダーゼ PH20（rRbPH20）に対する交差反応性を評価した【2.6.7.17B】。

表 2.6.6-11 免疫感作条件 1

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

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

IM = intramuscular; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

表 2.6.6-12 免疫感作条件 2 及び 3

Group	No. of Animals	rHuPH20 (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Route	Dose Administration (Study Day)	Blood Collection Timepoints (Study Day)
2	2 females	0	0.5	SC	1-14[a], 16-28, 43[b]	Predose, 16, 30, 43, 57, 71, 85, 99, 112
3	5 females	0.76	0.5	SC	1-14[a], 16-28, 43[b]	Predose, 16, 30, 43, 57, 71, 85, 99, 112
4	5 females	0.76	0.5	SC	1, 8, 15, 22, 29, 50[c]	Predose, 19, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 119
5	2 males	0.76	0.5	SC	1, 8, 15, 22, 29, 50[c]	Predose, 19, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 119

[a] Dose was not administered on Study Day 15 to allow for a drug washout period prior to blood collection on Day 16, which allowed for a 48-hour washout period.
[b] The final injection on Study Day 43 was a booster injection delivered 2 weeks after the completion of the initial dose period.
[c] The final injection on Study Day 50 was a booster injection delivered 2 weeks after completion of the initial dose period.
rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

全ての条件で，Day 33 までに rHuPH20 群の雌に ADA 力価の増加が認められたが，溶媒対照群ではみられなかった。条件 1 では，条件 2 及び 3 と比較して，ADA 産生の遅延が認められたが，最大力価（Day 71）は同程度であった。条件 2 では，Day 30 に ADA 力価が最も高く，Day 57 まで定常状態を維持した。条件 3 では，ADA 力価は条件 2 と同様の推移を示し，Day 50～64 に最も高かった。

rRbPH20 に対する交差反応性が 80%以上の動物で認められた。

以上のとおり，雌ウサギに rHuPH20 を 0.76 mg/kg の用量で連日又は週 1 回皮下投与する免疫感作条件により，高い ADA 力価が維持されることが示された。ADA は rRbPH20 に交差反応性を示したため，受胎能，EFD 及び PPND に及ぼす ADA の影響を評価するための動物種として，ウサギは適切であると考えられた。

(3) 雄ウサギ受胎能及び生殖能に及ぼす ADA の影響

【評価資料 4.2.3.7.7.3】

本試験は，rHuPH20 を雄ウサギに皮下投与し，雄の受胎能に及ぼす ADA の影響を評価するために実施した。

雄 NZW ウサギ（1 群雄 22 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5）及び 0.76 mg/kg/週（83,600 U/kg/週）の用量で週 1 回，6 回皮下投与した後，抗体価を維持する目的で Day 57 に追加投与した。ADA 陽性の雄ウサギと無処置の雌ウサギ（1 群雌 22 例）を Day 44 に交配させ，雄の受胎能に及ぼす ADA の影響を評価した。雄及び雌はそれぞれ Day 85 及び GD 18 に剖検した。評価項目は，皮膚スコアを含む一般状態，体重／体重増加量，摂餌量，交配能，精子検査，生殖パラメータ，ADA の力価，rRbPH20 に対する交差反応性，並びに rHuPH20 及び rRbPH20 に対する中和抗体とした【2.6.7.17C】。

ADA は，Day 8 までに rHuPH20 群の雄全例で認められ，最終剖検日である Day 85 まで維持された。力価の中央値は，Day 8～29 にかけて増加し，Day 29～85 では，819,200 以上の力価中央値が維持された。rRbPH20 に対する交差反応は Day 15 以降に認められ，Day 29～85 には 90%以上の動物でみられた。交配前日に rHuPH20 群の雄の 82%で rHuPH20 に対する中和抗体がみられ，Day 43 及び 57 に rHuPH20 群の雄の 60%で rRbPH20 に対する中和抗体が認められた。

雄では，rHuPH20 投与又は ADA の産生に起因した計画外の死亡はみられなかった。rHuPH20 群の雄と交配した無処置の雌 1 例が GD 8 に死亡した。死亡例では，自発運動の低下，正向反射障害，中等度の脱水及び腹部膨満など一般状態の変化，並びに摂餌量の減少がみられたが，剖検で病変は認められなかった。この無処置雌の死因は特定できなかったが，この動物では rHuPH20 を投与していないことから，rHuPH20 投与との関連性はないものと考えられた。

一般状態では，グレード 1，2 及び 3 の紅斑が，それぞれ rHuPH20 群の雄 22 例中 12，4 及び 1 例の投与部位に認められたが，4 日以内に消失したため，有害ではないと考えられた。rHuPH20 投与に関連した体重，体重増加量及び摂餌量の変化，並びに剖検所見は認められなかった。精子検査では，rHuPH20 群に精子の運動能，数及び形態に ADA 産生の影響はみられなかった。交配した無処置妊娠雌の黄体数，着床数，胚の生存及び着床前・後の胚損失を含む，受胎能及び胚の評価に統計学的に有意な差はみられなかった。

以上のとおり，持続的な ADA 力価が rHuPH20 群の雄全例に交配前及び交配中に認められ，最終剖検時まで維持された。しかし，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。

(4) 雌ウサギの受胎能，胚・胎児発生及び出生後の発達に及ぼす ADA の影響の評価

【評価資料 4.2.3.7.7.4】

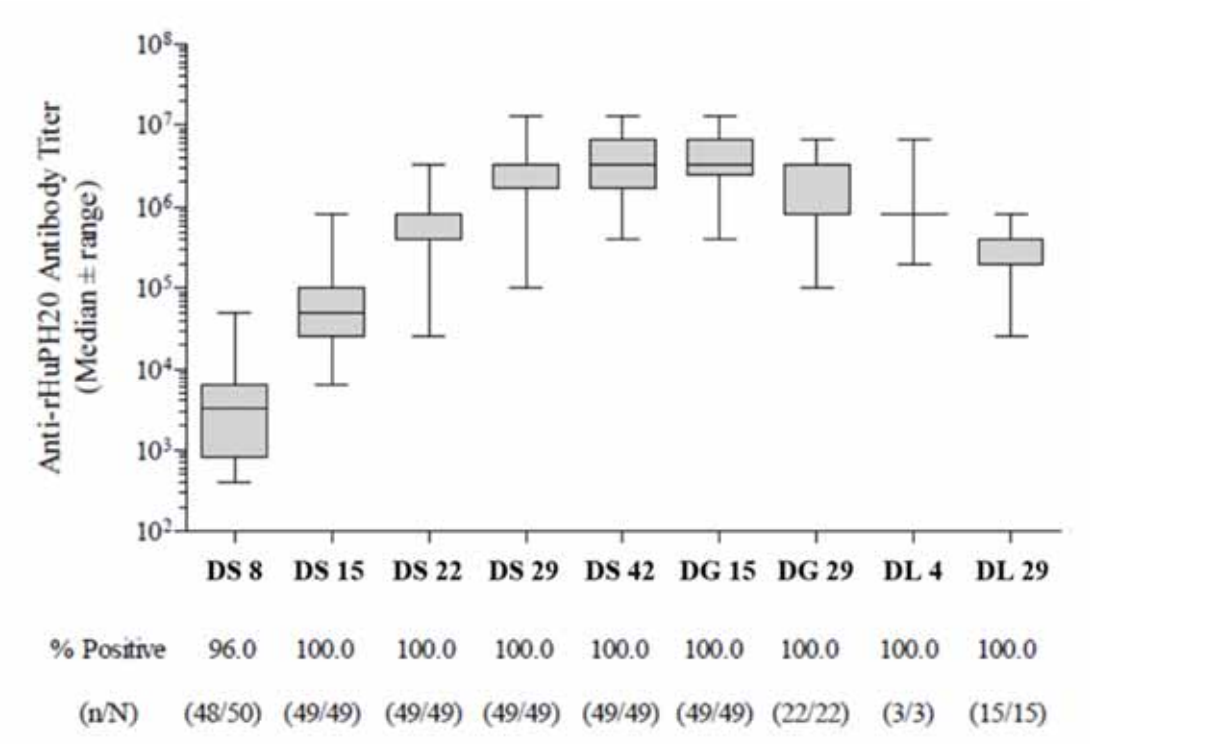
本試験は，rHuPH20 を雌ウサギに皮下投与し，雌の交配及び受胎能，並びに F_1 児の発生及び発達に及ぼす ADA の影響を評価するために実施した。

雌 NZW ウサギ（1 群雌 44 例）に rHuPH20 を 0（溶媒対照：10 mmol/L ヒスチジン，130 mmol/L 塩化ナトリウム，pH 6.5）及び 0.76 mg/kg/週（83,600 U/kg/週）の用量で週 1 回，6 回皮下投与し，Day 44 に無処置雄と交配させた後，帝王切開（Subgroup A：各群 22 例）又は自然分娩（Subgroup B：各群 22 例）させた。妊娠中の抗体価を維持するため，GD 15 に追加の皮下投与をした。F_0 母動物の交配及び受胎能，F_1 胎児の着床から硬口蓋閉鎖までの発生，並びに F_1 出生児の発達，行動，活動及び生殖能を評価した。F_0 母動物の皮膚スコアを含む一般状態，体重／体重増加量，摂餌量，剖検，生殖パラメータ（黄体数，着床数，生存・死亡胎児数，早・後期吸収胚数及び着床前・後の胚損失数），分娩及び哺育行動，F_1 胎児の生存，体重，性比及び胎児検査（外表・内臓・骨格検査），並びに F_1 出生児の生存，一般状態，体重，摂餌量，性成熟，発育パラメータ（発毛，開眼，空中立ち直り反応，聴覚驚愕反射及び瞳孔反射），神経行動学的検査，交配及び受胎能を評価した。また，サテライト群（1 群各 subgroup 雌 3 例）を設定し，F_0 母動物，F_1 胎児及び出生児の ADA の力価，rRbPH20 に対する交差反応性，並びに rHuPH20（F_0 母動物のみ）及び rRbPH20 に対する中和抗体を評価した【2.6.7.17D】。

ADA が，rHuPH20 群の交配前，妊娠及び授乳期間中の F_0 母動物（図 2.6.6-1），並びに GD 20 の F_1 胎児で検出された。F_1 出生児の ADA 力価の中央値は PND 4 に最も高く，F_1 出生児の 50%で交配時（PND 152 頃）にも ADA が検出された（図 2.6.6-2）。rRbPH20 に対する交差反応性が Day 22～GD 29 に F_0 母動物の 80%以上でみられ，Day 42 には F_0 母動物の全例で認められた。また，rHuPH20 及び rRbPH20 に対する中和抗体が Day 42（交配前），並びに GD 15 及び 29 に F_0 母動物の 75%以上で認められた。rRbPH20 に対する中和抗体が PND 4 に F_1 出生児の 30%でみられたが，これ以降，出生児への抗体移行の減少に一致して，力価の中央値は徐々に減少した。

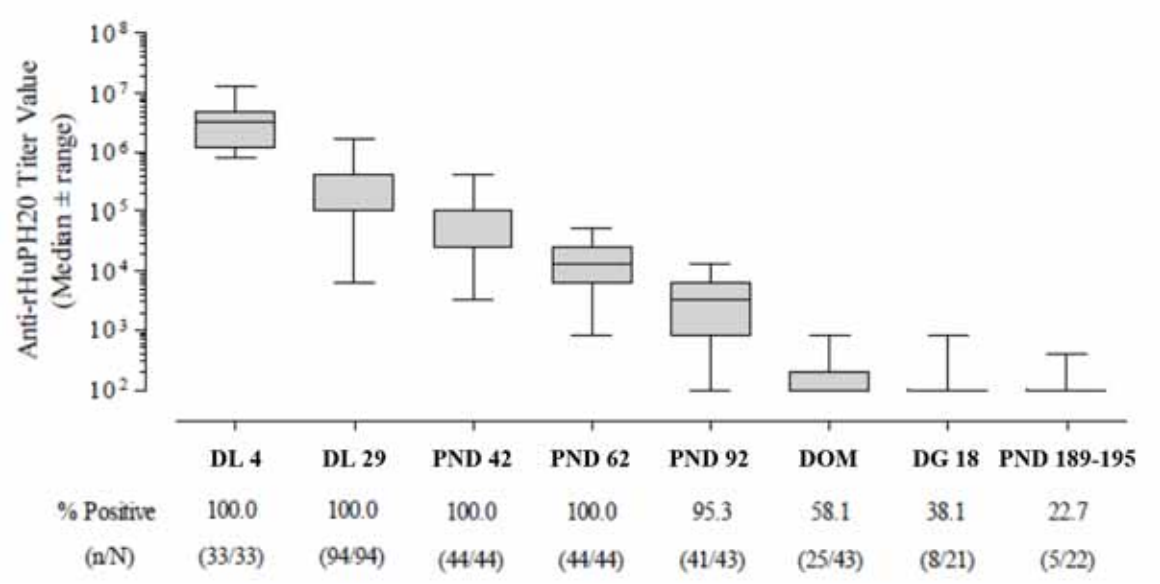
F_0 母動物では，溶媒対照群及び rHuPH20 群で 44 例中各 1 例が死亡し，溶媒対照群の 1 例を流産のために安楽死させた。いずれも原因を特定できなかったが，発生頻度が低いため，rHuPH20 及び ADA との関連性はないものと考えられた。生存動物の皮膚スコアを含む一般状態，体重／体重増加量，摂餌量，交配，妊娠期間，出産，哺育及び剖検に，rHuPH20 及び ADA に関連した影響はみられなかった。

F_1 児では，PND 69 に rHuPH20 群の雌 22 例中 1 例が死亡したが，1 例のみであったため，ADA との関連性はないものと考えられた。F_1 胎児の EFD（生存胎児数，体重，性比及び胎児検査），並びに F_1 出生児の一般状態，体重／体重増加量，摂餌量，性成熟，交配，受胎能，剖検，発育パラメータ及び神経行動学的検査に ADA に関連した影響はみられなかった。



Whisker means the range from minimum to maximum titer values. Box means the range from lower quartile to upper quartile.
DG = day of presumed gestation; DS = study day; LD = day of lactation; n/N = Number of anti-rHuPH20 antibody positive animals/total number of animals.

図 2.6.6-1 F_0 母動物の ADA 抗体価（中央値及び四分位数）



Whisker means the range from minimum to maximum titer values. Box means the range from lower quartile to upper quartile.
DG = day of presumed gestation; DL = day of lactation; DOM = day of mating; n/N = Number of anti-rHuPH20 antibody positive animals/total number of animals; PND = postnatal day.

図 2.6.6-2 F_1 児の ADA 抗体価（中央値及び四分位数）

以上のとおり，交配前及び妊娠期間中に高い抗体価の ADA 産生が母動物にみられたが，ADA は母動物の交配及び受胎能に影響を及ぼさなかった。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 5 カ月齢の出生児の 50%以上に認められた。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。

2.6.6.8.1.2 組織交差反応性試験

(1) 3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ ADA のウサギ正常組織に対する交差反応性：免疫蛍光標識法及び免疫組織化学的染色法の比較

【参考資料 4.2.3.7.7.5】

本試験は，3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ ADA のウサギ組織（精子，精巣及び腸神経叢）に対する交差反応性を評価するために実施した。

3 種類の免疫感作条件（アジュバントを含む又は含まない rHuPH20 の連日又は週 1 回投与）で産生された ADA をビオチン化した。ビオチン化ウサギ ADA を用いて免疫蛍光標識法及び IHC 染色法により，精子，精巣及び結腸腸神経叢に対する交差反応性を評価した。IHC 染色については，検出システム及び測定条件の異なる 2 種の手法（IHC 染色法 1：二次抗体にストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を用いた染色法，IHC 染色法 2：高濃度のビオチン標識ウサギ ADA を IHC 染色法 1 よりも長時間感作し，二次抗体にアビジン／ビオチン複合体を用いた染色法）を比較した【2.6.7.17E】。

免疫蛍光標識法では，3 種類の免疫感作条件で得られたビオチン標識ウサギ ADA は，精子及び精巣に強く結合したが，腸神経叢に対する結合は弱かった。

IHC 染色法 1 及び 2 ともに，精巣では，染色が生殖細胞及び精細管内の精子に限局してみられ，ウサギ精巣に対する ADA の反応性が確認された。一方，腸神経叢では，IHC 染色法 1 及び 2 の間で染色性に違いが認められた。IHC 染色法 1 では，アジュバントを用いず rHuPH20 を感作した 2 種類の条件で得られたビオチン標識ウサギ ADA ではウサギ腸神経叢に染色はみられなかったが，アジュバントを用いて rHuPH20 を感作したビオチン標識ウサギ ADA では腸神経叢に弱い染色が認められた。対照的に，IHC 染色法 2 では，3 種類の免疫感作条件で得られたビオチン標識ウサギ ADA で腸神経叢に弱い染色が認められた。腸神経叢でみられた染色は，染色強度，色及び細胞局在性が精巣でみられた染色と質的に異なり，灰色，境界不明瞭かつ細胞質にびまん性にみられ，rHuPH20 又はウサギ IgG により 2 次抗体を前吸収処理することによって部分的な染色になったため，非特異的であることが示唆された。

以上のとおり，免疫感作条件に関わらず，ウサギ ADA が精子及び精巣組織内のウサギ PH20 に交差反応性を示した。

(2) 正常ヒト組織を用いたウサギ ADA の組織交差反応性試験

【参考資料 4.2.3.7.7.6】

本試験は，アフィニティー精製ウサギ ADA を用いて，ヒト組織における PH20 発現を評価するために実施した。

IHC 染色法により，アフィニティー精製ウサギ ADA が 42 のヒト組織（各組織につき男女ドナー各 3 例）の内因性 PH20 に結合する可能性を評価した【2.6.7.17F】。

精巣の精細管にのみ，ウサギ ADA の特異的で強い染色が認められた。その染色性は，精子形成後期の精上皮細胞の細胞質に特異的にみられ，細胞膜でより強かった。また，結腸（男性 3 例中 2 例及び女性 3 例中 1 例）及び食道（女性 3 例中 1 例）の筋層内腸神経叢に特異的で弱い染色が認められた。これらの組織では，細胞質のみ染色され，細胞膜は染色されなかった。生体内で抗体が細胞質に到達することは非常に限られているため，腸神経叢の神経細胞でみられた弱い染色に臨床的意義は低いと考えられた。女性生殖器官，滑膜及び軟骨などを含む他の大部分の組織では特異的な染色は認められなかった。精巣及び腸神経叢でみられた特異的な染色は，ウサギ ADA を rHuPH20 とプレインキュベーションすることで阻害された。

以上のとおり，ウサギ ADA は，ヒト精巣では精細管の中心部（精子形成後期）にある精上皮細胞にのみ染色を示し，ヒト結腸及び食道に局在する腸神経叢の細胞質に弱い染色を示した。

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

【評価資料 4.2.3.7.7.7】

本試験は，ヒト組織に対するヒト抗 PH20 抗体及びヒト ADA の交差反応性を明らかにするために実施した。

血漿検体（原発性免疫不全症患者 3 名：検体 [redacted]，[redacted] 及び [redacted]，以下参照）からアフィニティー精製したヒト抗 PH20 抗体又はヒト ADA をビオチン標識（ビオチン標識ヒト抗体）し，精巣，結腸及び心臓の正常ヒト組織（精巣：男性ドナー3 名，結腸及び心臓：男女ドナー各 3 名）に対する結合性を評価した【2.6.7.17G】。なお，試験に用いた組織

は，ヒト組織を用いたウサギ ADA の交差反応性試験（2.6.6.8.1.2(2)）で染色が認められた精巣及び結腸，並びに染色が認められなかった心臓（陰性対照）を選択した。

検体 [redacted] は，rHuPH20 未投与患者から採取し，ヒト抗 PH20 IgG，IgA 及び IgM 抗体が検出された（[redacted]）。検体 [redacted] 及び [redacted] は，rHuPH20 を 800～6,400 U の用量で 3～4 週毎に皮下投与した患者から採取し，ADA が検出された（[redacted]）。

全ての血漿検体から得られたビオチン標識ヒト抗体は，ヒト精巣内の精祖細胞に染色性を示した。心臓及び結腸でも，全てのビオチン標識ヒト抗体による染色がみられたが，その染色性は，低く，不鮮明かつびまん性であり，1 次抗体の至適濃度で染色されず，その 2 倍の濃度でのみ染色されたこと又は色素顆粒も同時に染色されたことから，非特異的であると判断された。

以上のとおり，ヒト抗 PH20 抗体／ADA はヒト組織の精巣に特異的に結合し，心臓及び結腸への結合は非特異的であった。

2.6.6.8.1.3　遺伝子発現解析試験

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

【参考資料 4.2.3.7.7.8】

本試験は，マウス SPAM1／PH20 及びヒアルロニダーゼ 5（HYAL5）の発現量及び組織局在性を明らかにするために実施した。マウス SPAM1／PH20 及び HYAL5 は，ヒアルロニダーゼをコードする 2 つの遺伝子であり，主に，精巣及び精巣上体で mRNA が発現している。

胎児（GD 7～18）の全身，並びに幼若（PND 1～生後 3 週）及び雌雄の成体マウスの組織を用いて，マウス SPAM1／PH20 及び HYAL5 の発現を定量的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析により評価した【2.6.7.17H】。

胎児の全身では，いずれの発生段階でも SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。一方，HYAL5 の発現は，GD 16 から増加した。幼若マウスの精巣では，PND 7 に SPAM1／PH20 及び HYAL5 の発現はみられなかったが，PND 14 に SPAM1／PH20 の低い発現がみられ，PND 21 までに SPAM1／PH20 及び HYAL5 ともに高い発現が認められた。しかし，いずれの時点でも脳梁に SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。胎児の脳梁については，HYAL5 の発現解析を実施しなかった。雌雄成体マウスでは，精巣，精巣上体及び卵巣に SPAM1／PH20 の発現が認められ，精巣及び精巣上体に HYAL5 の発現が認められた。両遺伝子の精巣上体及び卵巣における発現は，いずれも精巣に比べて低かった［精巣上体：精巣の約 350 分の 1（SPAM1／PH20）及び約 250 分の 1（HYAL5），卵巣：精巣の約 2,000 分の 1（SPAM1／PH20）］。また，成体マウスの子宮頸部，子宮，膣，骨格筋及び脳梁には SPAM1／PH20 及び HYAL5 の発現はみられなかったが，皮膚に HYAL5 の低い発現が認められた。

(2) マウス脳梁における SPAM1／PH20 の発現

【参考資料 4.2.3.7.7.9】

本試験は，SPAM1／PH20 の発現が報告されているマウスの脳梁[8)] 及び脳皮質における SPAM1／PH20 の発現を明らかにするために実施した。

遺伝的背景が異なる 3 系統（C57BL／6，Nu／Nu 及び SCID）の成体雄マウス（17～19 週齢）の脳梁，脳皮質及び精巣（それぞれ 1 系統あたり雄 3 例の組織）を用いて，定量的 PCR 解析により SPAM1／PH20 の発現を評価した【2.6.7.17I】。

いずれの系統のマウスでも，精巣に SPAM1／PH20 の発現が認められたが，脳梁及び脳皮質には SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。

(3) 精巣及び結腸腸神経叢を含むウサギの特定組織における SPAM1／PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

【参考資料 4.2.3.7.7.10】

本試験は，成体ウサギの特定組織における SPAM1／PH20 の発現を明らかにするために実施した。

雌雄の成体 NZW ウサギ（5 カ月齢）の脳梁，脳皮質，精巣及び結腸腸神経叢（それぞれ雌雄各 3 例の組織）を用いて，定量的 PCR 解析により SPAM1／PH20 の発現を評価した【2.6.7.17J】。

全ての精巣に SPAM1／PH20 の高い発現が認められたが，脳皮質，脳梁及び結腸腸神経叢に SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。この結果は，ヒトの成人組織における SPAM1／PH20 発現プロファイルと一致した（2.6.6.8.1.3(6)）。

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

【参考資料 4.2.3.7.7.11】

本試験は，ウサギの胎児，並びに幼若及び成体ウサギの組織における SPAM1／PH20 の発現プロファイルを明らかにするために実施した。

ウサギ胎児（GD 11～29）の全身及び各種組織（結腸，心臓，卵巣，膵臓，胎盤，小腸，胃及び精巣），並びに幼若雄ウサギ（1～4 カ月齢）及び成体ウサギ（5 カ月～1 歳齢）の各種組織（幼若ウサギ：脳梁，脳皮質，精巣上体及び精巣，成体ウサギ：軟骨，結腸，心臓，腎臓，肝臓，肺，卵巣，膵臓，骨格筋，精巣，子宮頸部及び腟）を用いて，定量的 PCR 解析により SPAM1／PH20 の発現を評価した【2.6.7.17K】。

GD 14～23 の胎盤では，SPAM1／PH20 の低い発現が認められたが，GD 26 以降にはみられなかった。GD 11，14 及び 17 の胎児では，SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。幼若ウサギでは，脳梁及び脳皮質に SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。3 カ月齢の精巣に SPAM1／PH20 の低い発現が認められ，4 カ月齢には発現は著しく増加した。また，4 カ月齢の精巣上体に SPAM1／PH20 の低い発現が認められた。成体ウサギでは，精巣のみで SPAM1／PH20 の発現が認められた。

以上のとおり，ウサギ胎児では胎盤のみに SPAM1／PH20 の一過性で低い発現が認められた。成体ウサギでは，主に精巣に SPAM1／PH20 の発現がみられ，精巣上体にも SPAM1／PH20 が発現していると考えられた。幼若ウサギの精巣でみられた SPAM1／PH20 の経時的な発現パターンは，報告されている血液-精巣関門の発達時期と一致していた[9)]。

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

【参考資料 4.2.3.7.7.12】

本試験は，ヒト腸神経叢における SPAM1／PH20 発現の有無を明らかにするために実施した。

腸神経叢を豊富に含むヒト結腸（7 検体）を用いて，定量的 PCR 解析により SPAM1／PH20 の発現を評価した【2.6.7.17L】。

全てのヒト結腸腸神経叢に SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。

(6) ヒト成人及び胎児組織における SPAM1／PH20 遺伝子発現の定量的 PCR 解析

【参考資料 4.2.3.7.7.13】

本試験は，ヒト成人及び胎児組織における SPAM1／PH20 の発現量及び組織局在性を明らかにするために実施した。

スクリーニングにより SPAM1／PH20 の発現が特定された成人組織（14 種），胎児組織（9 種）及び初代培養細胞（ヒト神経細胞，星状細胞及びオリゴデンドロサイト前駆細胞）を用いて，定量的 RT-PCR 解析により SPAM1／PH20 の発現量を評価した【2.6.7.17M】。

成人組織では，精巣で SPAM1／PH20 の発現量が最も高く，骨／軟骨，精巣上体，腎臓，胎盤，骨格筋及び滑膜に SPAM1／PH20 の低い発現が認められた。胎児組織では，結腸，卵巣，膵臓，小腸，胃及び精巣に SPAM1／PH20 の低い発現が認められた。ヒト神経細胞，星状細胞及びオリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養細胞では，SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。

以上のとおり，主に成人の精巣に SPAM1／PH20 の発現が認められ，成人の骨／軟骨，精巣上体，腎臓，胎盤，骨格筋及び滑膜細胞，並びに胎児の結腸，卵巣，膵臓，小腸，胃及び精巣に低い発現がみられた。しかし，いずれの神経組織及び神経細胞にも SPAM1／PH20 の発現はみられなかった。

(7) ヒト，マウス及びウサギ由来の成人／成体及び胎児組織における SPAM1／PH20 及び他のヒアルロニダーゼ遺伝子発現の定量的 PCR 解析

【参考資料 4.2.3.7.7.14】

本試験は，ヒト，マウス及びウサギ組織における SPAM1／PH20 及びヒアルロニダーゼをコードする他の遺伝子（HYAL1，HYAL2，HYAL3 及び HYAL4）の発現プロファイルを明らかにするために実施した。

ヒト，マウス（CD-1，C57Bl／6，ICR 及び Webster）及びウサギ（NZW）の成人／成体及び胎児組織，並びに初代培養細胞（ヒト神経細胞，並びにヒト及びラット星状細胞及びオリゴデンドロサイト前駆細胞）を用いて，ディープ RNA シークエンシング（RNA-Seq）法（Illumina の HiSeq 2500）により SPAM1／PH20，HYAL1，HYAL2，HYAL3 及び HYAL4 の発現量を評価した【2.6.7.17N】。

SPAM1／PH20 の発現が，ヒト及びマウスでは成人／成体の精巣のみに，ウサギでは成体の精巣及び精巣上体にのみに認められた。SPAM1／PH20 の発現は男性／雄の生殖器に限られ，神経由来組織にはみられなかった。

HYAL1，2及び3の発現が，ヒト，マウス及びウサギの成人／成体及び胎児において脳，脳梁及び腸管神経叢などの神経由来組織を含む様々な組織，並びに初代培養細胞に認められた。HYAL4の低い発現が，ヒトの成人及び胎児組織，並びにウサギ成体組織の一部にみられた。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 ダラツムマブ

ダラツムマブの毒性は，Dara-IV製剤の初回承認申請時に提出した資料に基づいて既に評価されている。したがって，ダラツムマブを新投与経路である皮下投与したときの毒性は，局所刺激性のみDara-rHuPH20投与によりウサギ及びミニブタで評価した（2.6.6.7.2）。

2.6.6.9.2 rHuPH20

カニクイザルを用いた7日間反復皮下又は静脈内投与毒性試験では，最高用量の5 mg/kg/日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影響は認められなかった。皮下投与による血漿中rHuPH20濃度は静脈内投与に比べて低かったが，試験を通してrHuPH20の全身曝露が認められたため，rHuPH20の皮下又は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。

カニクイザルを用いた39週間反復皮下投与毒性試験では，最高用量の2 mg/kg/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影響は認められなかった。0.02及び0.2 mg/kg/週群の血漿中rHuPH20濃度はほとんどLLOQ未満であった。2 mg/kg/週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，測定可能であった。反復投与後にみられたrHuPH20の曝露量の著しい減少は中和抗体の産生と関連していると考えられたが，中和抗体の産生に関連した有害な影響はみられなかった。

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の成績に基づいて評価した。最高用量の2 mg/kg/週まで雌の月経周期，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rHuPH20投与による影響はみられなかった。マウスを用いたEFD試験では，9 mg/kg/日群の主試験群で25例中2例，18 mg/kg/日群の主試験群及びサテライト群でそれぞれ25例中1例及び36例中1例の母動物が計画剖検前に死亡したが，死亡例数に用量依存性はみられなかった。用量設定試験を含むマウスを用いたEFD試験では，9 mg/kg/日以上の用量で吸収胚数の増加（統計学的有意差なし），同腹児数の減少及び胎児体重の減少が認められた。そのほか，EFDに及ぼすrHuPH20の影響はみられなかった。ヒアルロニダーゼは胚発生中の心臓形成に必要なヒアルロン酸を分解する。また，ヒアルロン酸合成酵素欠損マウス及びヒアルロン酸を分解した全胚を用いた実験において，正常な心臓発生におけるヒアルロン酸の重要性が示されている。そのため，rHuPH20による，発生中の胚におけるヒアルロン酸分解が胚・胎児毒性に関与した可能性が考えられるが，EFD試験の胎児におけるrHuPH20の曝露量を測定していないため，胚・胎児毒性の原因がrHuPH20であると結論付けることはできない。マウスを用いたPPND試験では，6及び9 mg/kg/日群で25例中それぞれ1例のF_0母動物が死亡し，9 mg/kg/日群のF_0母動物1例を状態悪化のために安楽死させた。しかし，最高用量の9 mg/kg/日まで母動物の生殖能，分娩及び哺育，

並びに F_1 児の生死，性成熟，発達（学習及び記憶）及び生殖能に有害な影響はみられなかった。マウスを用いた EFD 試験及び PPND 試験における死亡の発現頻度は各群 10%未満であり，マウスにヒトタンパク質を投与した毒性試験の背景データ（15%未満）の範囲内であった。また，これまでに実施した非臨床試験において，rHuPH20 投与による皮下組織の変化に起因する細菌感染症はみられていない。したがって，マウスを用いた EFD 試験及び PPND 試験で認められた母動物の死亡及び瀕死は，rHuPH20 投与の直接作用ではなく，ヒトタンパク質投与が原因である可能性が考えられた。

皮下投与による rHuPH20 の曝露量は，概して低く，ヒトにおける曝露量は定量下限未満であると考えられ，Dara-SC 製剤の臨床試験では測定していない【2.7.2.3.1.1】。したがって，rHuPH20 の安全域は，NOAEL に基づく HED 及び臨床推奨用量 30,000 U に基づいて算出した。rHuPH20 の反復投与毒性試験，EFD 試験及び PPND 試験における NOAEL，HED 及び安全域を表 2.6.6-13 に示す。NOAEL の HED は，ヒトに rHuPH20 を 30,000 U の用量で投与した場合の約 45～296 倍であった。マウスを用いた EFD 試験において胚・胎児毒性がみられたが，胎児に対する NOAEL である 3 mg/kg/日（330,000 U/kg/日）は臨床推奨用量の 45 倍の用量であったことから，胚・胎児毒性に対する rHuPH20 の安全域は広いと考えられた。

表 2.6.6-13 HuPH20 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.[10)]

[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.

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 の用量を PND 7～30 に連日皮下投与し，その後，PND 129 又は 241 まで週 1 回皮下投与し

たが，成長，機能発達，雌雄の受胎能，生殖能及び胎児発生に rHuPH20 投与による有害な影響はみられなかった。

rHuPH20 の独立した局所刺激性試験は実施しなかったが，皮下投与によるカニクイザルを用いた反復投与毒性試験，並びにマウス又はウサギを用いた生殖発生毒性試験で，局所刺激性を評価した。カニクイザルを用いた 39 週間反復皮下投与毒性試験では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 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。

SPAM1／PH20 遺伝子の発現を逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）法及び RNA-Seq 法を用いて評価したところ，公表文献と同様に，SPAM1／PH20 の発現は，主にヒト，マウス及びウサギの成人男性／成体雄の生殖器に認められた [3)]。また，組織交差反応性試験を実施し，ヒト組織にある PH20 に対する ADA の結合性を評価したところ，ヒト抗 PH20 抗体／ADA は精巣にのみ特異的に結合した。したがって，ADA は主に精巣に内在する PH20 に影響を及ぼすと考えられたことから，マウス及びウサギを用いて受胎能及び出生児の発達に及ぼす ADA の影響を評価した。マウスを用いた PPND 試験の補足試験では，妊娠後期から成体までの全ての発達段階で F_1 児への ADA の曝露が認められた。ADA が rMuPH20 及び rMuHyal5 に交差反応性を示したため，マウスで PH20 及び Hyal5 に及ぼす影響が想定されたが，PPND 試験では F_1 児の生殖能，成長及び機能発達に及ぼす ADA の影響はみられなかった。ウサギを用いた雄の受胎能試験，並びに雌の受胎能，EFD 及び出生児の発達を評価した試験では，雌雄の受胎能，EFD，並びに出生児の成長，成熟及び生殖能に及ぼす ADA の影響はみられなかった。

以上のとおり，反復投与試験では rHuPH20 の良好な忍容性が認められた。EFD 試験では，9 mg/kg/日以上の用量で胎児毒性が認められたが，催奇形性はみられなかった。組織交差反応性試験及び遺伝子発現解析試験では，PH20 が主に成人男性及び成体雄の生殖器で検出されたが，受胎能に及ぼす rHuPH20 の影響はみられなかった。雌雄の受胎能，EFD 及び出生児の発達に ADA 産生による有害な影響はみられなかった。

2.6.6.9.3 Dara-rHuPH20

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

2.6.6.10 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献

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

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

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

4） 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.

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

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

7） Kang DW, et al. Recombinant human hyaluronidase PH20 (rHuPH20) facilitates subcutaneous infusions of large volumes of immunoglobulin in a swine model. Drug Deliv Transl Res. 2012;2:254-64.

8） Preston M, et al. Digestion products of the PH20 hyaluronidase inhibit remyelination. Ann Neurol. 2013;73:266-80.

9） Sun EL, et al. Formation of the blood-testis barrier in the rabbit. Cell Tissue Res. 1986;243:575-8.

10） 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.

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験

一覧表

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses[a] mg/kg/dose	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Single-Dose Toxicity									
rHuPH20		Single ascending doses were evaluated in Pharmacokinetics Report No. R07060/4.2.2.2.2							
Daratumumab-rHuPH20		No studies were conducted.							
Repeat-Dose Toxicity									
rHuPH20									
Nonpivotal	Monkey/ Cynomolgus	IV or SC, once daily (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0)	7 days	0 (IV and SC); 5 (IV); 5 (SC) (0; 550,000; 550,000 U/kg)	[redacted]	Yes	Yes	[redacted] USA	R08056/ 4.2.3.2.1
Pivotal	Monkey/ Cynomolgus	SC, once weekly (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0)	39 weeks with 4-week recovery	0; 0.02; 0.2; 2 (0; 2,200; 22,000; 220,000 U/kg)	[redacted]	Yes	Yes	[redacted] USA	R09050/ 4.2.3.2.2
Daratumumab-rHuPH20		No studies were conducted.							
Genotoxicity									
rHuPH20		No studies were deemed necessary due to the nature of the products.							
Daratumumab-rHuPH20		No studies were conducted.							
Carcinogenicity									
rHuPH20		No studies were deemed necessary conducted as per ICH S6 (R1) and S9 guidelines.							
Daratumumab-rHuPH20		No studies were conducted.							

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験

一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses[a] mg/kg/dose	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity									
rHuPH20									
EFD Dose range-finding	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	GD6 to 15	0; 1; 3; 10; 30 (0; 110,000; 330,000; 1,100,000; 3,300,000 U/kg)	[redacted]	No	No	[redacted], USA	R07046/ 4.2.3.5.2.1
EFD Pivotal	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	GD6 to 15	0; 3[b]; 9; 18[b] (0; 330,000; 990,000; 1,980,000 U/kg)	[redacted]	Yes	Yes	[redacted], USA	R08176/ 4.2.3.5.2.2
PPND Pivotal	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	GD6 to 22 or GD6 to LD20	0; 3; 6; 9 (0; 330,000; 660,000; 990,000 U/kg)	[redacted]	No	Yes	[redacted], USA	R09058/ 4.2.3.5.3.1
Juvenile Toxicity Dose range-finding	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily or weekly (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	PND7 to 42	0 (daily); 1; 3; 9 (0; 110,000; 330,000; 990,000 U/kg)	[redacted]	Yes	No	[redacted], USA	13123/ 4.2.3.5.4.1
Juvenile Life-Time Toxicity Pivotal	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily from PND7 to 30 and weekly after PND30 (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	Juvenile Subset: PND7 to 129 Chronic Subset: PND7 to 241	0; 1 (0; 110,000 U/kg)	[redacted]	No	Yes	[redacted], USA	15028/ 4.2.3.5.4.2
Daratumumab-rHuPH20	No studies were conducted.								

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験

一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses[a] mg/kg/dose	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Local Tolerance									
rHuPH20 *Daratumumab-rHuPH20*		Local tolerance of rHuPH20 was evaluated as part of the repeat-dose toxicity and developmental and reproductive toxicity studies.							
Local tolerance	Rabbit/ NZW	SC Rate: 5 mL/min, syringe pump (25 mmol/L sodium acetate, 60 mmol/L NaCl, 140 mmol/L mannitol, 0.04% polysorbate 20, pH 5.5)	Once	Formulation buffer + rHuPH20 (200 or 1,000 U/mL) Daratumumab (20 mg/mL) + rHuPH20 (200 or 1,000 U/mL) 14 mL of mixture	[redacted] (rHuPH20) [redacted] (daratumumab)	No	Yes	[redacted] USA	T-2014-031/ 4.2.3.6.1
Assessment of different rHuPH20 concentrations and infusion rates	Mini-pig/ Yucatan[c]	SC Rate: 2 or 4 mL/min, syringe pump (25 mmol/L sodium acetate, 60 mmol/L NaCl, 140 mmol/L mannitol, 0.04% polysorbate 20, pH 5.5)	Once	IgG (20 mg/mL) + rHuPH20 (200, 500 or 800 U/mL) 100 mL of mixture	[redacted] (IgG) [redacted] (rHuPH20)	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	15036/ 4.2.3.6.2
Assessment of different rHuPH20 concentrations with high concentration daratumumab	Mini-pig/ Yucatan[c]	SC Rate: 3 mL/min, syringe pump (daratumumab: 10 mmol/L histidine, 300 mmol/L sorbitol, 0.04% polysorbate 20, 1 mg/mL methionine, pH 5.5, rHuPH20: 130 mmol/L sodium chloride, 10 mmol/L histidine, pH 6.5)	Once	Daratumumab (100 mg/mL) + rHuPH20 (50, 500, 2,000 or 5,000 U/mL) Human IgG1κ[d] + rHuPH20 (50 or 5,000 U/mL) 16 mL of mixture	[redacted] (daratumumab) [redacted] (rHuPH20) [redacted] (IgG)	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	16020/ 4.2.3.6.3

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験

一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain/ Sex	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses[a] mg/kg/dose	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Local Tolerance (Continued)									
Daratumumab-rHuPH20									
Assessment of needle size on SC infusion sets and manual injection[e]	Mini-pig/ Yucatan[c]	SC Rate: 3 mL/min, syringe pump or 5 min, manual push (daratumumab: 10 mmol/L histidine, 300 mmol/L sorbitol, 0.04% polysorbate 20, 1 mg/mL methionine, pH 5.5, rHuPH20: 130 mmol/L sodium chloride, 10 mmol/L histidine, pH 6.5)	Once	Daratumumab (120 mg/mL) + rHuPH20 (2,000 U/mL) 15 mL of mixture	[redacted] (daratumumab) [redacted] (rHuPH20)	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	16093/ 4.2.3.6.4
Other Toxicity Studies									
Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies in Developmental and Reproduction Toxicity Studies									
rHuPH20									
Satellite PPND	Mouse/ Crl:CD-1 (ICR)/ Female	SC, once daily (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	GD6 to 16, GD18, LD4, 13 or 21	rHuPH20: 0; 3; 6; 9 (0; 330,000; 660,000; 990,000 U/kg)	[redacted]	Yes	No	[redacted] USA	12096/ 4.2.3.7.7.1
Immunization Procedures	Rabbit/ NZW/ Female Male	Set 1: SC/IM (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	Set 1: Days 1,8, 22, 36, 57	rHuPH20: See footnote[f] Set 1: 0.2 mg/animal SC on Day 1 with CFA, 0.1 mg/animal IM with IFA on the following days	[redacted] (females) [redacted] (males)	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	12124/ 4.2.3.7.7.2
		Set 2: SC daily	Set 2: Days 1 to 14, 16 to 28, 43	Set 2: 0.76 mg/kg SC					
		Set 3: SC weekly	Set 3: Days 1, 8, 15, 22, 29, 50	Set 3: 0.76 mg/kg SC					

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験

一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain/ Sex	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses[a] mg/kg/dose	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)									
Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies in Developmental and Reproduction Toxicity Studies (Continued)									
rHuPH20									
Effects of ADA on Male Fertility	Rabbit/ NZW/ Male	SC (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	Days 1, 8, 15, 22, 29, 43, 57	rHuPH20: 0; 0.76 (0; 83,600 U/kg)	[redacted]	No	Yes	[redacted], USA	12208/ 4.2.3.7.7.3
Effects of ADA on Female Fertility, EFD and PPND Assessments	Rabbit/ NZW/ Female	SC (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0)	Days 1, 8, 15, 22, 29, 42 and 59 (GD15)	rHuPH20: 0; 0.76 (0; 83,600 U/kg)	[redacted]	No	Yes	[redacted], USA	12195/ 4.2.3.7.7.4
Daratumumab-rHuPH20		No studies were conducted.							

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験

一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain	Route Tissue Type	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)							
Tissue Cross-Reactivity Studies							
rHuPH20							
ADA Characterization/ Tissue Cross-Reactivity	Rabbit/ NZW	NA - in vitro study Rabbit polyclonal anti-rHuPH20 antibody/ Rabbit Tissues	[redacted]	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	12124-SR[g]/ 4.2.3.7.7.5
Tissue Cross-Reactivity	Human	NA - in vitro study Rabbit polyclonal anti-rHuPH20 antibody/ Human tissues	[redacted]	No	No	[redacted] UK	12058/ 4.2.3.7.7.6
Tissue Cross-Reactivity	Human	NA - in vitro study Human polyclonal, rabbit polyclonal and mouse monoclonal anti-rHuPH20/HuPH20 antibody/ Human tissues	[redacted]	No	Yes	[redacted] USA	13086/ 4.2.3.7.7.7
Daratumumab-rHuPH20		No studies were deemed necessary.					
Gene Expression Studies related to SPAM1/PH20							
rHuPH20							
Gene Expression	Mouse/ C57Bl/6, CD-1, ICR Balb/c	NA - in vitro study RT-qPCR/ fetal, juvenile, adult tissues	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	12196/ 4.2.3.7.7.8
Gene Expression	Mouse/ C57Bl/6, Nu/Nu, SCID	NA - in vitro study RT-qPCR/ several tissues	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	12210/ 4.2.3.7.7.9
Gene Expression	Rabbit/ NZW	NA - in vitro study RT-qPCR/ several tissues	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	13091/ 4.2.3.7.7.10
Gene Expression	Rabbit/ NZW	NA - in vitro study RT-qPCR/ fetal, juvenile, adult tissues	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	13116/ 4.2.3.7.7.11
Gene Expression	Human	NA - in vitro study RT-qPCR/ Colon containing enteric neural plexus	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	12147/ 4.2.3.7.7.12

(Continued)

2.6.7.1 毒性試験

一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	Species/ Strain	Route Tissue Type	Duration of Dosing	Doses[a] mg/kg/dose	Batch	TK	GLP	Testing Facility	Study No./ Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)									
Gene Expression Studies related to SPAM1/PH20 (Continued)									
rHuPH20									
Gene Expression	Human	NA - in vitro study RT-qPCR/ human adult and fetal tissues and human primary cells	NA	NA	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	12197/ 4.2.3.7.7.13
Gene Expression	Human, Mouse/ CD-1, C57Bl/6, ICR, Webster, Rabbit/ NZW	Deep RNA sequencing	NA	NA	NA	No	No	Halozyme San Diego, CA USA	14077/ 4.2.3.7.7.14
Daratumumab-rHuPH20		No studies were deemed necessary.							

[a] For repeat-dose toxicity and reproductive and developmental studies, the NOAEL is underlined
[b] Developmental NOAEL is 3 mg/kg/dose, while maternal NOAEL is 18 mg/kg/dose.
[c] Assessment in sedated mini-pigs.
[d] Human IgG1κ + rHuPH20 was included as a comparator.
[e] Assessment of needle size 23-, 25- or 27-gauge.
[f] On Day 1, animals received 4 SC injections of 100 µL of a 1:1 emulsion of rHuPH20 (1 mg/mL) and CFA. On subsequent days, animals received 4 IM injections of 50 µL of a 1:1 emulsion of rHuPH20 and IFA into the hind limbs.
[g] Supplemental report for 12124/4.2.3.7.7.2: This study evaluated the time course and magnitude of anti-rHuPH20 antibody development in female NZW rabbits administered rHuPH20 by different dosing regimens. The results from this study were used to support the selection of an appropriate dosing strategy for anti-rHuPH20 antibody DART studies in the NZW rabbit.

ADA = anti-drug antibody; CFA = Complete Freund's Adjuvant; [redacted]; DART = developmental and reproductive toxicity; EFD = embryo-fetal development; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IFA = Incomplete Freund's Adjuvant; IgG = immunoglobulin G; IM = intra-muscular; IV = intravenous; LD = lactation day; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; NOAEL = no-observed-adverse-effect-level; NZW = New Zealand White; PND = postnatal day; PPND = pre/postnatal development; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetics.

Note: The nonclinical toxicology program to support IV administration of daratumumab in patients with hematological cancers was submitted in the original Marketing Authorisation Applications and the results can be applied to daratumumab SC (2.6.1).

2.6.7.2 トキシコキネティクス

トキシコキネティクス試験の一覧表 **Test Article:** Daratumumab-rHuPH20

Type of Study	**Species/ Strain**	**Route (Vehicle/Formulation)**	**Dose (mg/kg/dose)**	**GLP Compliance**	**Study No./ Location in CTD**
Daratumumab	Toxicokinetics of daratumumab was already evaluated in NDA for IV formulation (2017).				
rHuPH20					
7-day repeat-dose toxicity study	Monkey/ Cynomolgus	IV and SC (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0)	0; 5 (0; 550,000 U/kg) Once daily	Yes	R08056/ 4.2.3.2.1
39-week repeat-dose toxicity study with a 4-week recovery period	Monkey/ Cynomolgus	SC (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0)	0; 0.02; 0.2; 2.0 (0; 2,200; 22,000; 220,000 U/kg) Once weekly	Yes	R09050/ 4.2.3.2.2
Embryo-fetal development	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	0; 3; 9; 18 (0; 330,000; 990,000; 1,980,000 U/kg) Once daily	Yes	R08176/ 4.2.3.5.2.2
Juvenile dose range-finding	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5)	0; 1; 3; 9 (0; 110,000; 330,000; 990,000 U/kg) Once daily or weekly	No	13123/ 4.2.3.5.4.1

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.3 トキシコキネティクス

トキシコキネティクス試験成績の一覧表

Test Article: rHuPH20

Dose/ Route	Parameter	Monkey/ Cynomolgus		Study Duration	GLP Compliance	Study No./ Location in CTD
		Day 1[a]	Day 7[a]			
5 mg/kg/day/ IV	AUC_{last} (U·h/mL)	11,800	8,733	7 days	Yes	R08056/ 4.2.3.2.1
	C_{max} (U/mL)	NC	NC			
	Median T_{max} (h)	NC	NC			
5 mg/kg/day/ SC	AUC_{last} (U·h/mL)	641.7	501.7			
	C_{max} (U/mL)	200	115			
	Median T_{max} (h)	1.0	1.0			
Dose/ Route	**Parameter**	**Monkey/ Cynomolgus**		**Study Duration**	**GLP Compliance**	**Study No./ Location in CTD**
		M	F			
0.02 mg/kg/week/ SC	Below baseline plasma levels	-	-	39 weeks	Yes	R09050/ 4.2.3.2.2
0.2 mg/kg/week/ SC	Below baseline plasma levels	-	-			
2 mg/kg/week/ SC	Day 1: AUC_{last} (U·h/mL)	20.5	47.8			
	C_{max} (U/mL)	12.5	20.8			
	Median T_{max} (h)	2.0	2.0			
	Day 85: AUC_{last} (U·h/mL)	177.0	395.0			
	C_{max} (U/mL)	28.8	64.7			
	Median T_{max} (h)	6.0	4.0			
	Day 183: AUC_{last} (U·h/mL)	89.6	467.0			
	C_{max} (U/mL)	12.0	64.2			
	Median T_{max} (h)	4.0	4.0			
	Day 267: AUC_{last} (U·h/mL)	NC	56.2			
	C_{max} (U/mL)	NC	10.0			
	Median T_{max} (h)	NC	4.0			

(Continued)

2.6.7.3 トキシコキネティクス

トキシコキネティクス試験成績の一覧表（続き）

Test Article: rHuPH20

Dose/ Route	Parameter	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)		Study Duration	GLP Compliance	Study No./ Location in CTD
		GD6	GD15			
3 mg/kg/day/ SC	AUC_{24h} (U·h/mL)	5.45	55.1	GD6 to 15	Yes	R08176/ 4.2.3.5.2.2
	C_{max} (U/mL)	3.44	20.9			
9 mg/kg/day/ SC	AUC_{24h} (U·h/mL)	45.3	79.0			
	C_{max} (U/mL)	30.5	17.1			
18 mg/kg/day/ SC	AUC_{24h} (U·h/mL)	120	363			
	C_{max} (U/mL)	49.6	99.2			
1 mg/kg/day/ SC	Below baseline plasma levels	-		PND7 to 42	No	13123/ 4.2.3.5.4.1
3 mg/kg/day/ SC	Below baseline plasma levels	-				
9 mg/kg/day/ SC	Below baseline plasma levels	-				

[a] Combined genders (2M and 2F).

- = below detection limit; AUC_{24h} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; AUC_{last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum observed plasma concentration; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NC = Not calculated; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; T_{max} = time to maximum observed plasma concentration.

2.6.7.4 毒性試験

被験物質の一覧表

Test Article: rHuPH20

Batch No.	Purity (%)[a]	Specified Impurities (%)		Type of Study	Study No./ Location in CTD
		不純物B*	不純物A*		
[redacted]	94.7	3.7	1.4	Repeat-dose toxicity (GLP)	R08056/4.2.3.2.1
[redacted]	94.7	3.7	1.4	Repeat-dose toxicity (GLP)	R09050/4.2.3.2.2
[redacted]	94.1	3.8	2.1		
[redacted][b]	95.9	3.9	0.2	Embryo-fetal development (non-GLP)	R07046/4.2.3.5.2.1
[redacted][c]	93.7	3.9	2.4	Embryo-fetal development (GLP)	R08176/4.2.3.5.2.2
[redacted][c]	93.7	3.9	2.4	Pre/postnatal development (GLP)	R09058/4.2.3.5.3.1
[redacted]	95.8	2.8	1.4	Juvenile toxicity (non-GLP)	13123/4.2.3.5.4.1
[redacted]	96.3	3.0	<LOQ	Juvenile toxicity and life-time toxicity (GLP)	15028/4.2.3.5.4.2
[redacted]	95.7	3.3	1.0	Local tolerance (GLP)	T-2014-031/4.2.3.6.1
[redacted]	-	-	-	Local tolerance (non-GLP)	15036/4.2.3.6.2
[redacted]	-	-	-	Local tolerance (non-GLP)	16020/4.2.3.6.3
[redacted]	-	-	-	Local tolerance (non-GLP)	16093/4.2.3.6.4
[redacted][c]	93.7	3.9	2.4	Other toxicity studies (non-GLP)	12096/4.2.3.7.7.1
[redacted](females)	-	-	-	Other toxicity studies (non-GLP)	12124/4.2.3.7.7.2
[redacted]	96.3	3.0	0.6	Other toxicity studies (GLP)	12208/4.2.3.7.7.3
[redacted]	96.3	3.0	0.6	Other toxicity studies (GLP)	12195/4.2.3.7.7.4
[redacted](males)	-	-	-	Other toxicity studies (non-GLP)	12124-SR/4.2.3.7.7.5

[a] Source for drug substance purity is the certificate of analysis appended to the final study report unless otherwise noted.
[b] Source: [redacted] Statement of Testing.
[c] Source: [redacted] Certificate of Analysis.

- = information not available; GLP = Good Laboratory Practice; LOQ = limit of quantification; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.

The toxicity of daratumumab were evaluated at the previous NDA and no new study has been conducted for this submission excerpt for a combination study with rHuPH20.

(Continued)

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.4 毒性試験

被験物質の一覧表（続き）

Test Article: Daratumumab

Batch No.	Purity (%)	Type of Study	Study No./ Location in CTD
Proposed Specification:	≥95		
[redacted][a]	97.7 (reduced)	Local tolerance (GLP)	T-2014-031/4.2.3.6.1

[a] DARA FVP CLIN. 100 mg/vial OI+BPACK F2P2

GLP = Good Laboratory Practice; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.

The toxicity of daratumumab were evaluated at the previous NDA and no new study has been conducted for this submission excerpt for a combination study with rHuPH20.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

Test Article: rHuPH20

Single ascending doses were evaluated in Pharmacokinetics Report No. R07060/4.2.2.2.2.

2.6.7.6 反復投与毒性試験

重要な試験以外の試験

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

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Duration of Dosing: 7 days
Study No. R08056
Initial Age: Approximately 3 years
Duration of Postdose: None
Location in CTD: 4.2.3.2.1
Date of First Dose: [redacted]
Method of Administration: IV or SC, once daily
GLP Compliance: Yes
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0 in sterile water for injection
Lot Number: [redacted]
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg (IV, SC)

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (IV and SC) [0]**		**5 (IV) [550,000]**		**5 (SC) [550,000]**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics:						
AUC_{last} (U·h/mL)						
Day 1	NA		11,800		641.7	
Day 7	NA		8,733		501.7	
C_{max} (U/mL)						
Day 1	NA		NA		200	
Day 7	NA		NA		115	
Median T_{max} (h)						
Day 1	NA		NA		1.0	
Day 7	NA		NA		1.0	
Mortality and Clinical Observation	-		-		-	
Body Weight	-		-		-	
Food Consumption	-		-		-	
Ophthalmology	-		-		-	
Hematology	-		-		-	
Coagulation Test	-		-		-	
Serum Chemistry	-		-		-	
Urinalysis	-		-		-	
Gross Pathology	-		-		-	
Organ Weight	-		-		-	
Histopathology	-		-		-	

- = no noteworthy finding; AUC_{last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NA = not available; NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; T_{max} = time to maximum observed plasma concentration.

2.6.7.7 反復投与毒性試験

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

Species/Strain: Monkey/Cynomolgus
Duration of Dosing: 39 weeks
Study No. R09050
Initial Age: Approx. 4 to 7 years
Duration of Postdose: 4 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2.2
Date of First Dose: [redacted]
Method of Administration: SC, once weekly
GLP Compliance: Yes
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.0 in sterile water for injection
Lot Number: [redacted], [redacted]
Special Features: Exploratory (non-GLP) additional ADA cross-reactivity of tissues using IHC was conducted[a].
No Observed Adverse Effect Level: 2 mg/kg/dose

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**0.02 [2,200]**		**0.2 [22,000]**		**2 [220,000]**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: Main	4	4	4	4	4	4	4	4
Number of Animals: Recovery	2	2	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics:								
Day 1 AUC_{last} (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	20.5	47.8
C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12.5	20.8
Day 85 AUC_{last} (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	177.0	395.0
C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	28.8	64.7
Day 183 AUC_{last} (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	89.6	467.0
C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12.0	64.2
Day 267 AUC_{last} (U·h/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	56.2
C_{max} (U/mL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10.0
Mortality and Clinical Observation	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Testicular Examination[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Menstrual Cycle Monitoring	-	-	-	-	-	-	-	-
ECG, Blood Pressure, Respiratory Rate[b]	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation Test	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Hormone Analysis in Males[c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Semen Analysis[d]								
Gross Autopsy	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (animal incidence/examined):								
Injection site - minimal subcutaneous perivascular lymphoplasmacytic infiltration	0/4 (main) 0/2 (recovery)	0/4 (main) 0/2 (recovery)	0/4 (main) 0/2 (recovery)	0/4 (main) 0/2 (recovery)	1/4 (main) 0/2 (recovery)	1/4 (main) 0/2 (recovery)	4/4 (main) 1/2 (recovery)	4/4 (main) 0/2 (recovery)

(Continued)

2.6.7.7 反復投与毒性試験（続き）

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

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**0.02 [2,200]**		**0.2 [22,000]**		**2 [220,000]**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: Main	4	4	4	4	4	4	4	4
Number of Animals: Recovery	2	2	2	2	2	2	2	2
ADA (animal incidence/examined)								
Day 42	0/12		3/12		11/12		11/12	
Peak median ADA titer	NA		156,250 (Days 140, 210, 238, 266, 274)		781,250 (Day 238)		781,250 (Days 182, 210, 238, 266, 274)	
Neutralizing Activity (animal incidence[e]/examined)								
Day 154	0/12		5/12		11/12		10/12	
Day 210	0/12		6/12		11/12		10/12	
Day 238	0/12		6/12		11/12		11/12	
Noteworthy Findings	After the 4-week recovery period, rHuPH20 neutralizing activity dropped or were undetectable in the 0.02 mg/kg/week group and had dropped approximately 50% from peak levels in 0.2 and 2.0 mg/kg/week. IHC analyses revealed that cynomolgus monkey ADA generated after weekly rHuPH20 subcutaneous administration react with monkey testis, but not colon ENP. Specific binding of cynomolgus monkey ADA to PH20 localized to cynomolgus monkey sperm was confirmed using IHC methods.							

[a] Testicular volume was determined for all males during acclimation, during the dosing period (at Weeks 5, 18 and 38), and during the last week of the recovery period (Week 43).
[b] ECG was measured during acclimatization, during the dosing period (Weeks 13 and 36) and during the recovery period (Week 43). The blood pressure and respiration rate were monitored during Week 36 and during the recovery period (Week 43).
[c] Serum testosterone and luteinizing hormone were analyzed for males on days -21, -6, 7, 35, 63, 91, 119, 147, 175, 205, 231, 259 and 295.
[d] Semen was collected during acclimation, during dosing at Week 12 to 13, 26 to 27, 36 to 37 and during recovery at Week 43 to 44. The sperm were observed for morphology under the light microscopy. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA-IVOS) was used for sperm concentration and motility (%) evaluation.
[e] Number of animals with neutralizing activity by the day of examination.

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

- = no noteworthy findings; ADA = anti-drug antibodies; AUC_{last} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum plasma concentration; ECG = electrocardiogram; ENP = enteric neural plexus; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; IgG = immunoglobulin G; IHC = immunohistochemistry; M = male; NA = not available (lower limit of quantitation or below the lower limit of quantitation); NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

Test Article: rHuPH20

Since rHuPH20 is a naturally occurring protein with all-natural amino acids, no genotoxicity studies were conducted based on ICH S6 (R1) guideline.

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

Test Article: rHuPH20

Since rHuPH20 is a naturally occurring protein with all-natural amino acids, no genotoxicity studies were conducted based on ICH S6 (R1) guideline.

2.6.7.10　がん原性試験

Test Article: rHuPH20

Since rHuPH20 is a naturally occurring protein with all-natural amino acids and the used only in combination with daratumumab for the treatment of multiple myeloma, no carcinogenicity studies were conducted based on ICH S6 (R1) and S9 guidelines.

2.6.7.11　生殖発生毒性試験

重要な試験以外の試験　　**Test Article:** rHuPH20

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose Period	Doses (mg/kg/dose)	Number of Animals per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No./ Location in CTD
Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5 in sterile water for injection) Lot No. [redacted]	GD6 to 15	0; 1; 3; 10; 30 [110,000; 330,000; 1,100,000; 3,300,000 U/kg]	8 (presumed pregnant females)	≥**10 mg/kg/dose**: ↑ resorptions (10 mg/kg: 1/7 dams with 68.8% resorption, 30 mg/kg: 4/8 dams with 100% resorption), enlarged spleens (10 mg/kg: 1/8, 30 mg/kg: 3/8 dams, at 0.234-0.379 g) **30 mg/kg/dose**: ↓ maternal body weights on GD18 (88.7% of controls), ↓ maternal body weight gains from GD6 to 18 (73.2% of controls), ↓ litter size (live fetuses), ↓ fetal body weights (92% of controls)	No	R07046/4.2.3.5.2.1
Mouse/ Crl:CD-1(ICR)	SC, once daily or weekly (10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5 in sterile water for injection) Lot No. [redacted]	PND7 to 42	0; 1; 3; 9 (daily) [0; 110,000; 330,000; 990,000 U/kg] 3, 9 (weekly) [330,000; 990,000 U/kg]	8/sex (main study); 4 or 8/sex (antibody subset); 9, 24 or 39/sex (TK subset)	≥**1 mg/kg/dose** (daily): ↑ Mean body weights in female mice (1 mg/kg/dose: 109.9%, 3 mg/kg/dose: 108.3%, 9 mg/kg/dose: 111.6% compared with mean body weights in controls), ↑ Body weight gains in female mice, ↑ Eosinophils ≥**3 mg/kg/dose** (weekly): ↑ Eosinophils **9 mg/kg/dose** (weekly): ↑ Reticulocytes All mice assigned to the main daily or weekly study groups survived to scheduled sacrifice. Limited mortality was observed in the antibody (1/16 each in the 3 mg/kg/day and 3 mg/kg/week groups) and TK subsets (1/78 in the 3 mg/kg/day group and 1/48 in 9 mg/kg/week group). TK parameters could not be calculated since there were less than three quantifiable rHuPH20 concentration values for each group/sex/timepoint. ADA titers and cross reactivity[a]	No	13123/4.2.3.5.4.1

[a] At PND30, nearly all animals treated with rHuPH20 were ADA positive, with the exception of four animals in the weekly 3 mg/kg/dose group. By PND44, there was 100% incidence of ADA for all animals treated with rHuPH20. Median ADA titers were consistently higher (4x to >100x) in the daily rHuPH20 treatment groups compared with the weekly treatment groups at the same time point. Median titers increased between PND30 and 44 in all rHuPH20 treatment groups. Cross-reactivity of ADA to rMuPH20 and rMuHyal5 was observed in the majority of the animals administered rHuPH20 daily on PND30 and 44. Animals administered rHuPH20 weekly demonstrated ADA cross-reactive to rMuPH20 and rMuHyal5, ranging in incidence from 44 to 88% and 73 to 100%, respectively. Furthermore, rHuPH20 neutralizing activity was observed at a higher incidence in the daily versus weekly rHuPH20 treatment groups. On PND44, >85% of the animals in the daily treatment groups had neutralizing responses, whereas only 44 and 65% of the animals at weekly 3 and 9 mg/kg/dose generated a neutralizing response, respectively.

ADA = anti-drug antibodies; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; NaCl = sodium chloride; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rMuHyal5 = recombinant murine hyaluronidase 5; rMuPH20 = recombinant murine hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetics.

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

Test Article: rHuPH20

Fertility in males and females was evaluated in repeat-dose toxicity study Report No. R09050/4.2.3.2.2. No studies were conducted due to limited patient population.

2.6.7.13　生殖発生毒性試験 - 胚・胎児発生に関する試験

Report Title: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice **Test Article:** rHuPH20

Design similar to ICH 4.1.3? Yes **Dosing Period:** GD6 to 15 (10 doses) **Study No.** R08176
Species/Strain: Mouse/Crl:CD-1(ICR) **Day of Mating:** GD0 **Day of C-Section:** GD18 **Location in CTD:** 4.2.3.5.2.2
Initial Age: 63 days **Method of Administration:** SC, once daily **Lot Number:** [redacted]
Special Features: Retrospective ADA analyses[a] **GLP Compliance:** Yes **Date of First Dose:** [redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5 in sterile water for injection
No Observed Adverse Effect Level: Maternal: 18 mg/kg/dose, Developmental: 3 mg/kg/dose

Dose (mg/kg/dose) [U/kg/dose]	0 (Control)	3 [330,000]	9 [990,000]	18 [1,980,000]
Females				
Number of Females, Main Study	25	25	25	25
Number of Females, TK Study	0	36	36	36
Number Pregnant, Main Study	24	24	23	23
Number Died/Euthanized Moribund (Main and TK Study)[b]	0	0	2[c]	2[d]
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
TK GD6: AUC_{24h} (U·h/mL)	NA	5.45	45.3	120
C_{max} (U/mL)	NA	3.44	30.5	49.6
GD15: AUC_{24h} (U·h/mL)	NA	55.1	79.0	363
C_{max} (U/mL)	NA	20.9	17.1	99.2
Clinical Observation	-	-	-	-
Body Weight / Body Weight Gain	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-
Number of Corpora Lutea	-	-	-	-
Number of Implantations	-	-	-	-
Mean Number of Early Resorptions	-	-	-	-
Mean Number of Late Resorptions	0.1	0.2	1.0	1.2[e]
Mean Number of Live Fetuses	-	-	-	-
Percent Live Male Fetuses	-	-	-	-
Fetuses				
Number of Fetuses Evaluated	298	285	232	256
Mean Fetal Body Weight (g)	1.36	1.36	1.30[f]	1.30[f]
Gross External Observations	-	-	-	-
Soft Tissue Examination	-	-	-	-
Skeletal Examination	-	-	-	-

(Continued)

2.6.7.13　生殖発生毒性試験 - 胚・胎児発生に関する試験（続き）

Report Title: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice **Test Article:** rHuPH20

[a] Retrospective analysis of a subset of GD6 and 15 plasma TK samples was performed to determine the presence of ADA, titer, and isotype. All mice tested for ADA showed development of antibody titers. ADA titer ranges were similar in mice administered 3, 9 and 18 mg/kg/dose rHuPH20 and were predominantly isotype IgG.

[b] A low incidence of mortality was considered not related to rHuPH20 treatment. Unscheduled deaths occurred in 2/25 main study mice at 9 mg/kg/dose, and 1/25 main study mice and 1/36 TK study mice at 18 mg/kg/dose.

[c] Two main study mice were found dead on GD9 and 11. The cause of death could not be determined, there were no adverse clinical signs or effects on body weight gains. All tissues appreared normal at necropsy.

[d] One main study and one TK study mouse were found dead on GD14 and 15. The cause of death could not be determined, there were no adverse clinical signs or effects on body weight gains. All tissues appeared normal at necropsy.

[e] A non-statistically significant increase in the number of late resorptions was seen at 9 and 18 mg/kg/dose but was considered test article related.

[f] Significantly different from vehicle controls, ($p \leq 0.05$).

- = no noteworthy finding; ADA = anti-drug antibodies; AUC_{24h} = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; C_{max} = maximum plasma concentration; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IgG = immunoglobulin G; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; TK = toxicokinetic.

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

Report Title: Subcutaneous Developmental and Perinatal/ Postnatal Reproduction Toxicity Study of rHuPH20 in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation

Test Article: rHuPH20

Design similar to ICH 4.1.2? Yes
Dosing Period: GD6 to 22 (mice that did not deliver a litter) or GD6 to LD20
Study No. R09058
Species/Strain: Mouse/Crl:CD-1(ICR)
Day of Mating: GD0
Day of C-Section: GD18 (F_1 females)
Location in CTD: 4.2.3.5.3.1
Initial Age: 63 days
Method of Administration: SC, once daily
Lot Number: [redacted]
Special Features: None
GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5 in sterile water for injection
No Observed Adverse Effect Level: F_0 females: 9 mg/kg/dose, F_1 generation: 9 mg/kg/dose

Dose (mg/kg/dose) [U/kg/dose]	0 (Vehicle)	3 [330,000]	6 [660,000]	9 [990,000]
F_0 females				
Number of Females	25	25	25	25
Number Pregnant	22	20	21	20
Number Died or Euthanized Moribund [a]	0	0	1[b]	2[c]
Clinical Observation	-	-	-	-
Body Weight / Body Weight Gain	-	-	-	-
Natural Delivery [d]	-	-	-	-
Gross Pathology [d]	-	-	-	-
F_1 litters (preweaning)				
Number of Litters Evaluated	22	19	19	17
Clinical Observation	-	-	-	-
Gross Pathology on LD21	-	-	-	-
F_1 Growth and Development (postweaning)				
Number of Litters Evaluated	22	19	19	17
Clinical Observation	-	-	-	-
Body Weight / Body Weight Gain [e]	-	-	-	-
Age of Sexual Maturation	-	-	-	-
Passive Avoidance Test (Learning, Short- / Long-Term Retention)	-	-	-	-
Motor Activity Test	-	-	-	-
F_1 Mating Performance (Males / Females)				
Number Evaluated	23 / 23	25 / 25	25 / 25	24 / 25
Number Died or Euthanized Moribund	0 / 1[f]	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Number of Mated	23 / 23	25 / 25	25 / 25	24 / 25
Number of Fertile Males / Pregnant Females	18 / 18	23 / 23	24 / 24	21 / 22
Number Aborted or with Total Resorption of Litter [g]	0	0	0	0
Gross Autopsy including Litter Parameters [g]	-	-	-	-
Organ Weight of Testis / Epididymides (Males)	-	-	-	-

(Continued)

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

Report Title: Subcutaneous Developmental and Perinatal/ Postnatal Reproduction Toxicity Study of rHuPH20 in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation　　**Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg/dose) [U/kg/dose]	**0 (Vehicle)**	**3 [330,000]**	**6 [660,000]**	**9 [990,000]**
F_2 Fetuses				
Mean Number of Live Fetuses	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-
Gross External Observation	-	-	-	-

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

[b] One mouse at 6 mg/kg/day was found dead on LD4, clinical observation of purple discoloration on the back on GD16, unremarkable body weights, and all tissues appeared normal at necropsy.

[c] One mouse at 9 mg/kg/day was found dead on GD17, clinical observations of cold to touch and purple tail on GD15, unremarkable body weights, and all tissues appeared normal at necropsy. Another mouse at 9 mg/kg/day was euthanized on GD16 due to adverse clinical observations of decreased motor activity, prostrate, pale ears, pale extremities, cold to touch, blue discolored extremities, mild dehydration and bradypnea on GD16, unremarkable body weights, and all tissues appeared normal at necropsy.

[d] Values for the duration of gestation, averages for implantation sites per delivered litter, litter sizes, surviving pups per litter, percent male pups per number of pups sexed per litter, live litter size at weighing and pup weight per litter were comparable among the four dosage groups and did not significantly differ.

[e] Reflecting lower weights at weaning for both male and female mice, average body weights for male mice in the 9 mg/kg/day group were statistically significantly reduced on PND22, 29 and 36 (86.2%, 88.8% and 94.1% of control group values, respectively) and in female mice, average body weights for female mice in the 9 mg/kg/day group were significantly reduced on PND22 (87.2% of the control group value). However, for both sexes, body weight gains were comparable among the groups for the entire postweaning period.

[f] One mouse in the vehicle control group was found dead on PND31, with no adverse clinical observations, unremarkable body weights, and all tissues appeared normal at necropsy.

[g] The litter averages for corpora lutea, implantations, litter sizes, live fetuses, early and late resorptions, fetal body weights, percent resorbed conceptuses, and percent live male fetuses were comparable among the four dosage groups and did not significantly differ.

- = no notewrthy finding; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day; NaCl = sodium chloride; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.15　生殖発生毒性試験 - 新生児を用いた試験

Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse **Test Article:** rHuPH20

Species/Strain: Mouse/CD-1(ICR) **Duration of Dosing:** PND7 to 129[a] (Juvenile Subset), PND7 to 241 (Chronic Subset) **Study No.** 15028

Initial Age: PND7 **Duration of Postdose:** NA **Location in CTD:** 4.2.3.5.4.2

Date of First Dose: [redacted] **Method of Administration:** SC, once daily[b] **GLP Compliance:** Yes

Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl (pH 6.5) and sterile water for injection **Lot Number:** [redacted]

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: NA

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**1 [110,000]**	
Juvenile Subset				
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	30	30	30	30
Noteworthy Findings				
Mortality	0	2	0	3
Unscheduled Euthanasia	0	2[c]	0	1[c]
Found Dead	0	0	0	1[d]
Early Delivery	NA	0	NA	1
Clinical Observation	-	-	-	-
Body Weight / Body Weight Gain	-	-	-	-
Behavior Assessment	-	-	-	-
Sexual Maturation	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-
Number of Examined	22	21	22	21
Mating and Fertility	-	-	-	-
Sperm Evaluation	-	NA	-	NA
Maternal Body Weight / Maternal Body Weight Gain	NA	-	NA	-
Ovarian and Uterine Examinations (GD18)	NA	-	NA	-
Fetal Examination				
Number of Examined	NA	21	NA	21
Body Weight	NA	-	NA	-
Sex ratio	NA	-	NA	-
External Examination	NA	-	NA	-
Visceral Examination	NA	-	NA	-
Skeletal Examination	NA	-	NA	-

(Continued)

Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse **Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**1 [110,000]**	
Juvenile Subset (Continued)				
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	30	30	30	30
Anti-Drug Antibodies[e]				
PND30[f]	0/24		24/24	
PND60[f]	2/24		24/24	
PND90[f]	4/24		24/24	
PND129	5/36		36/36	
GD18	1/22		22/22	
Median Anti-rHuPH20 Antibody Titers				
PND30	<100		102,400	
PND60	250		1,638,400	
PND90	100		4,915,200	
PND129	400		3,276,800	
GD18	200		819,200	
Cross-Reactivity to Murine PH20/Hyal5	rMuPH20 / rMuHyal5		rMuPH20 / rMuHyal5	
PND30 to 129	0-50% / 0-100%		76-100% / 90-100%	
GD18	0% / 0%		91% / 100%	
rHuPH20 Neutralizing Activity				
PND30	NA		75%	
PND60	NA		79%	
PND90	NA		92%	
PND129	0%		97%	
GD18	0%		100%	

(Continued)

2.6.7.15　生殖発生毒性試験 - 新生児を用いた試験（続き）

Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse **Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**1 [110,000]**	
Chronic Subset				
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	25	25	25	25
Noteworthy Findings				
Mortality	0	3	2	0
Unscheduled Euthanasia	0	2[c]	2[c]	0
Found Dead	0	1[d]	0	0
Clinical Observation	-	-	-	-
Body Weight / Body Weight Gain	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-
Hematology (PND160)	-	-	-	-
Clinical Chemistry (PND160)	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-
Organ Weight				
Number of examined	25	22	23	25
Terminal Euthanasia (PND241)				
Spleen[g]				
Absolute weight (g)	-	0.133	-	0.163*
Relative to body weight (%)	-	0.386	-	0.456*
Relative to brain weight (%)	-	23.8	-	28.8*
Histopathology[h]				
Number of examined	25	22	23	25
Terminal Euthanasia (PND241)				
Noteworthy Findings	-	-	-	-
Administration site 1[i]: Examined	25	22	21	25
Mixed cell infiltration; subcutaneous tissue	(0)	(1)	(14)	(20)
Minimal	0	1	7	9
Mild	0	0	5	7
Moderate	0	0	2	4
Mixed cell inflammation; subcutaneous tissue	(1)	(0)	(2)	(2)
Minimal	1	0	2	1
Mild	0	0	0	1

(Continued)

2.6.7.15　生殖発生毒性試験 - 新生児を用いた試験（続き）

Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse **Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**1 [110,000]**	
Chronic Subset (Continued)				
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	25	25	25	25
Histopathology[h] (Continued)				
Administration site 2[i]: Examined	25	22	21	25
Mixed cell infiltration; subcutaneous tissue	(0)	(5)	(9)	(20)
Minimal	0	5	6	13
Mild	0	0	3	7
Mixed cell inflammation; subcutaneous tissue	(0)	(0)	(2)	(0)
Minimal	0	0	2	0
Administration site 3[i]: Examined	25	22	21	25
Mixed cell infiltration; subcutaneous tissue	(0)	(2)	(13)	(23)
Minimal	0	2	8	8
Mild	0	0	5	9
Moderate	0	0	0	6
Mixed cell inflammation; subcutaneous tissue	(0)	(0)	(1)	(6)
Minimal	0	0	1	4
Mild	0	0	0	2
Administration site 4[i]: Examined	25	22	21	25
Mixed cell infiltration; subcutaneous tissue	(0)	(3)	(12)	(20)
Minimal	0	3	8	19
Mild	0	0	3	1
Moderate	0	0	1	0

(Continued)

Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse **Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Control) [0]**		**1 [110,000]**	
Chronic Subset (Continued)				
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals	25	25	25	25
Anti-Drug Antibodies[e]				
PND30[f]	0/20		20/20	
PND90[f]	0/20		20/20	
PND180	0/47		48/48	
PND241	1/47		49/49	
Median Anti-rHuPH20 Antibody Titers				
PND30	<100		102,400	
PND90	<100		3,276,800	
PND180	<100		3,276,800	
PND241	100		3,276,800	
Cross-Reactivity to Murine PH20/Hyal5	rMuPH20 / rMuHyal5 (PND241 only)		rMuPH20 / rMuHyal5	
PND30 to 241	0% / 0%		60-100% / 100%	
rHuPH20 Neutralizing Activity				
PND30	NA		78%	
PND90	NA		100%	
PND180	0%		97%	
PND241	0%		98%	

[a] Twenty-two mice/sex/group selected for reproductive evaluations in Juvenile Subset were placed into cohabitation on PND87 to 90 and pregnant females were administered until GD18.
[b] From PND7 to 30, then once weekly thereafter through the day prior to scheduled euthanasia (Juvenile Subset: GD18 or PND129; Chronic Subset: PND241).
[c] Each of the unscheduled necropsies was considered to be unrelated to rHuPH20.
[d] One female was found dead in the absence of adverse clinical signs, effects on body weight, macroscopic observations or microscopic findings.
[e] The number of ADA positive samples/the number of samples that were analyzed
[f] Blood samples were collected prior to dosing from 2 or 3 animals per sample per sex per group on PND30, 60 (only Juvenile Subset) and 90 and pooled to ensure adequate sample volume.
[g] These increased weights correlated microscopically with increased incidence of increased hematopoiesis in females in the 1 mg/kg/dose rHuPH20 group in the Chronic Subset, and both of these findings were considered most likely to be a secondary/reactive response to the inflammation at the site of rHuPH20 administration.
[h] Numbers in parentheses represent the number of animals with the finding.
[i] Injections were administered to four approximately equal areas on the dorsum (areas 1, 2, 3 and 4; areas 1 and 3 being closest to the shoulders, areas 4 and 2 closest to the tail). For each animal, daily doses were administered in these areas in sequence (i.e., area 1 on the day of the first dose, area 2 on the day of the second dose, area 3 on the day of the third dose, area 4 on the day of the fourth dose, continuing in this pattern until an injection had been made in each area and then repeating the sequence beginning on the day of the fifth dose).

* $p \leq 0.01$, Bartlett's Test

- = no noteworthy finding; ADA = anti-drug antibodies; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rMuHyal5 = recombinant murine hyaluronidase 5; rMuPH20 = recombinant murine hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.16　A　局所刺激性試験

Report Title: Daratumumab: Local Tolerance Study of Daratumumab Mixed with rHuPH20 by Subcutaneous Administration in New Zealand White Rabbits

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Species/Strain: Rabbit/NZW
Initial Age: 2.5 months at receipt
Date of Dose: [redacted]

Duration of Dosing: Once on Day 1

Method of Administration: SC, at a dose volume of 14 mL at a rate of 5 mL/min
Vehicle: 25 mmol/L sodium acetate, 60 mmol/L NaCl, 140 mmol/L mannitol, 0.04% polysorbate 20 at pH 5.5

Study No. T-2014-031
Location in CTD: 4.2.3.6.1
GLP Compliance: Yes
Lot Number: [redacted] for Daratumumab [redacted] for rHuPH20

Special Features: Animals were euthanized on Day 4, examined for gross necropsy findings, and the injection site and axillary lymph nodes were examined for histopathological findings.

Dose of Daratumumab (mg/mL)	**0 (Formulation buffer)**		**20**	
Dose of rHuPH20 (U/mL)	**200**	**1,000**	**200**	**1,000**
No. of Animals Examined (Males)	**6**	**6**	**6**	**6**
Noteworthy Findings	Well tolerated with no mortality with rHuPH20 alone or in combination with daratumumab. Minimal clinical signs and skin reactions (barely perceptible erythema and flaking, and purple discolorations at the injection site) were observed in all groups. rHuPH20 alone or in combination with daratumumab had no effect on body weight, body weight gain, food consumption or body temperature. No macroscopic or microscopic findings at injection sites with rHuPH20 alone or in combination with daratumumab.			

GLP = Good Laboratory Practice; NaCl = sodium chloride; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.16　B　局所刺激性試験

Test Article: rHuPH20

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose Period	Doses (mg/kg/dose)	Number of Animals per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No./ Location in CTD
Mini-pig/ Yucatan	SC dose volume of 100 mL Rate: 2 or 4 mL/min, syringe pump (25 mmol/L sodium acetate, 60 mmol/L NaCl, 140 mmol/L mannitol, 0.04% polysorbate 20, pH 5.5)	Once on Day 1	Human IgG (20 mg/mL) + rHuPH20 (0, 200, 500 or 800 U/mL)	4 females/group (Total: 12 females)	Infusion pressures were low and similar at both flow rates (~40 to 60 mmHg or ~1 PSI). Increased frequency of swelling was seen in the 2 mL/min flow rate (10 of 12 infusions) vs the 4 mL/min flow rate (3 of 12 infusions) that resulted in less local swelling and erythema. Erythema and swelling resolved within 1 day. Overall, the 4 mL/min flow rate resulted in a lower frequency of erythema, visible swelling, local infusion site firmness than the 2 mL/min flow rate.	No	15036/4.2.3.6.2

GLP = Good Laboratory Practice; IgG = immunoglobulin G; NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.16　C　局所刺激性試験

Report Title: Assessment of Subcutaneous Administration of 100 mg/mL Daratumumab with Varying Concentrations of Recombinant Human Hyaluronidase PH20 (rHuPH20) in the Miniature Swine Model

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Species/Strain: Mini-pig/Yucatan
Initial Age: >3 months at receipt
Body Weight: ~12 kg
Date of Dose: [redacted]

Duration of Dosing: Once on Day 1

Method of Administration: SC, at a dose volume of 16 mL at a rate of 3 mL/min

Vehicle: Daratumumab: 10 mmol/L histidine, 300 mmol/L sorbitol, 0.04% polysorbate 20, 1 mg/mL methionine, pH 5.5
rHuPH20: 130 mmol/L NaCl, 10 mmol/L histidine, pH 6.5
IgG1κ: 10 mmol/L histidine, 300 mmol/L sorbitol, 0.04% polysorbate 20, 1 mg/mL methionine, pH 5.5

Study No. 16020
Location in CTD: 4.2.3.6.3
GLP Compliance: No
Lot Number:
[redacted] for Daratumumab
[redacted] for rHuPH20
[redacted] for Human Gamma Globulin

Special Features: Local infusion site swelling/bleb area and volume were measured using a digital caliper when visible. Local infusion sites were also qualitatively assessed for appearance (erythema) and firmness (induration) using a 5 point scoring system (see footnote).

Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses	Noteworthy Findings
6 females/group (Total: 18 females)	SC Rate: 3 mL/min (syringe pump)	Once	daratumumab [a] (100 mg/mL) + rHuPH20 (50, 500, 2,000 or 5,000 U/mL) Human IgG [b] (100 mg/mL) + rHuPH20 (50 or 5,000 U/mL)	Formulations with ≥500 U/mL of rHuPH20 showed relatively small local swelling that were mainly soft to the touch with mild to no erythema present. These all resolved by the following day, with many resolving within an hour.

[a] Assessment of different rHuPH20 concentrations with high concentration daratumumab in sedated mini-pigs.
[b] Human IgG + rHuPH20 was included as a comparator.

GLP = Good Laboratory Practice; IgG = immunoglobulin G; NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

Scale	Erythema Formation	Swelling Formation	Swelling/Induration Firmness
0	No erythema	No swelling	No perceptible difference in firmness after injection
1	Very slight erythema (barely perceptible)	Very slight swelling	Very slightly firm (barely perceptible)
2	Well defined erythema	Slight swelling	Mildly firm
3	Moderate to severe erythema	Moderate swelling	Moderately firm
4	Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation	Severe swelling	Very firm

2.6.7.16　D　局所刺激性試験

Report Title: Evaluation of In-Line Pressures and Applied Forces Required for Subcutaneous Administration of 120 mg/mL Daratumumab with Recombinant Human Hyaluronidase PH20 (rHuPH20) in the Miniature Swine Model

Test Article: Daratumumab-rHuPH20

Species/Strain: Mini-pig/Yucatan
Initial Age: >3 months at receipt
Body Weight: ~12 kg
Date of Dose: [redacted]

Duration of Dosing: Once on Day 1

Method of Administration: SC, at a dose volume of 15 mL at a rate of 3 mL/min

Vehicle: Daratumumab: 10 mmol/L histidine, 300 mmol/L sorbitol, 0.04% polysorbate 20, 1 mg/mL methionine, pH 5.5
rHuPH20: 130 mmol/L NaCl, 10 mmol/L histidine, pH 6.5

Study No. 16093
Location in CTD: 4.2.3.6.4
GLP Compliance: No
Lot Number: [redacted] for Daratumumab [redacted] for rHuPH20

Special Features: A series of infusion sets were evaluated for subcutaneous administration of 120 mg/mL Daratumumab with rHuPH20 in the Yucatan mini-pig.

Sex/No. Per Group	Route	Duration of Dosing	Doses	Noteworthy Findings
6 females/infusion group; 1 female/manual push	SC (with various infusion sets) [a] Rate: 3 mL/min (syringe pump) or 5 min (manual push)	Once	daratumumab (120 mg/mL) + rHuPH20 (2,000 U/mL)	The 27-gauge needle required too much force for a comfortable manual push and created the largest bleb. The 23-gauge needle produced the smallest bleb with manual injection. Twenty-four hours after the infusion each infusion site was inspected for signs of local swelling. No discernable bleb was detected in any animal during this assessment.

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

GLP = Good Laboratory Practice; NaCl = sodium chloride; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.17　A　その他の毒性試験 - その他の試験

Evaluation of ADA in Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction

Report Title: Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies Following Administration of rHuPH20 by Subcutaneous Injection in Mice (Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study Design)　**Test Article:** rHuPH20

Species/Strain: Mouse/Crl:CD-1(ICR)　**Duration of Dosing:** GD6 through 16, GD18, LD4, 13 or 21　**Study No.** 12096
Initial Age: ~63 days at receipt　**Day of Mating:** GD0　**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.1
Date of First Dose: [redacted]　**Method of Administration:** SC, once daily　**GLP Compliance:** No
Vehicle: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl (pH 6.5), sterile water for injection　**Lot Number:** [redacted]

Special Features: Satellite study to evaluate ADA in pregnant and postpartum lactating mice and their offspring (fetuses and pups) in support of a previous GLP PPND study (R09058/4.2.3.5.3.1), including ADA titers, cross reactivity to rMuPH20 and rMuHyal5

Dose (mg/kg) [U/kg]	0 (Vehicle)	3 [330,000]	6 [660,000]	9 [990,000]
Number of Animals (dosing days)				
Subset 1 (GD6 to 16 for ADA)	6	12	12	12
Subset 2 (A; GD6 to LD4, B; GD6 to LD13 and C; GD6 to LD21 for ADA)	9	18	18	18
Subset 3 (GD6 to LD21 for ADA retention)	3	6	6	6
Subset 4: rHuPH20 plasma concentration (GD6 to 18)	3	6	6	6
Number Died or Euthanized Moribund (day of scheduled euthanasia)[a]				
Subset 1 (GD18)	0	0	0	0
Subset 2A (LD6)	0	0	1	1
Subset 2B (LD15)	0	0	1	1
Subset 2C (LD23)	0	0	1	1
Subset 3 (LD23)	0	0	0	1
Subset 4 (GD18)	0	0	0	1
Range of Plasma Concentration of rHuPH20 (U/mL)[b]				
GD18 Maternal (Subset 4)	BQL	BQL - 145	BQL - 13.7	BQL - 30.9
GD18 Fetal Pooled (Subset 1)	BQL	BQL	BQL	BQL - 114
LD21 Maternal (Subset 3)	BQL	BQL	BQL	BQL - 0.834
LD21 Pup (Subset 3)	BQL	BQL	BQL	BQL
Maternal Median ADA Titers[c]				
GD18 (Subset 1)	-		51,200	
LD6 (Subset 2A)	-		819,200	
LD15 (Subset 2B)	-		1,638,400	
LD23 (Subset 2C and 3)	-		3,276,800	

(Continued)

Evaluation of ADA in Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction

Report Title: Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies Following Administration of rHuPH20 by Subcutaneous Injection in Mice (Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study Design) **Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 (Vehicle)**	**3 [330,000]**	**6 [660,000]**	**9 [990,000]**
Median ADA Titers from Individuals[d,e]				
PND30 (Subset 3A, Male)	-	102,400	153,600	128,000
PND30 (Subset 3A, Female)	-	204,800	102,400	128,000
PND60 (Subset 3B, Male)	-	25,600	51,200	51,200
PND60 (Subset 3B, Female)	-	38,400	51,200	19,200
Incidence of Cross-Reactivity to rMuPH20 and rMuHyal5 in Maternal Plasma Samples[f]			rMuPH20 / rMuHyal5	
GD18 (Subset 1)	NA		67% / 78%	
LD6 (Subset 2A)	NA		100% / 100%	
LD15 (Subset 2B)	NA		100% / 100%	
LD23 (Subset 2C and 3)	NA		100% / 100%	
Incidence of Cross-Reactivity to rMuPH20 and rMuHyal5 in Fetal/Pup Plasma Samples[f]			rMuPH20 / rMuHyal5	
GD18 (Subset 1)	NA		10% / 50%	
PND6 (Subset 2A)	NA		87% / 100%	
PND15 (Subset 2B)	NA		93% / 100%	
PND23 (Subset 2C)	NA		100% / 100%	
PND30 (Subset 3A)	NA		55% / 100%	
PND60 (Subset 3B)	NA		48% / 74%	

Note: All other in-life data measured on the current satellite PPND study (e.g., clinical observations, body weights, necropsy and reproductive parameters) were consistent with the GLP PPND study (R09058/4.2.3.5.3.1).

(Continued)

2.6.7.17　A　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

Evaluation of ADA in Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction

Report Title: Evaluation of Anti-rHuPH20 Antibodies Following Administration of rHuPH20 by Subcutaneous Injection in Mice (Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study Design) **Test Article:** rHuPH20

[a] Two mice in the 6 mg/kg/day dose group and three mice in the 9 mg/kg/day dose group were found dead on or after GD17. These early deaths were not considered directly related to the test article. The other three deaths (one in the 6 mg/kg/day dose group and two in the 9 mg/kg/day dose group) were unscheduled euthanizations of mice that had mistimed pregnancies (two mice) or that had presumably delivered and cannibalized its litter (one mouse).

[b] Hyaluronidase activity was more frequently detected in maternal versus fetal or pup samples, and in the 9 mg/kg/day dose group versus the lower dose groups, however, the majority of samples were BQL. Although the assay has been validated for measurement of hyaluronidase activity in the CD-1 mouse plasma matrix, the potential impact of anti-rHuPH20 antibodies on the assay method was not evaluated. Therefore, the accuracy of the rHuPH20 content values is unknown, since all samples are presumed to contain anti-rHuPH20 antibodies which may interfere with the assay.

[c] Median anti-rHuPH20 antibody titers are reported by subset for all maternal mice dosed with rHuPH20 (3, 6 and 9 mg/kg/day dose groups). There was no significant correlation (non-parametric Spearman's correlation, p = 0.3313) between the maternal anti-rHuPH20 titer values and rHuPH20 dose group, suggesting that within the range of rHuPH20 doses administered in this study, the antibody levels in the F_0 maternal animals were comparable.

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

[e] No notable differences in anti-rHuPH20 antibody titers in the pups by sex were observed.

[f] A qualitative assessment of the cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to the murine homologues of SPAM1/PH20 and Hyal5 was performed on all maternal and offspring plasma samples that were positive for anti-rHuPH20 antibodies. Incidence for maternal mice and fetuses/pups is reported for all three rHuPH20 dose levels (3, 6 and 9 mg/kg/day) combined. While the incidence of measured cross-reactivity declined in pup samples between PND23 and 60, there was a corresponding decline in overall anti-rHuPH20 antibody titer over the same time frame.

- = no noteworthy findings; ADA= anti-drug antibody; BQL = below assay limit of quantification (<0.625 U/mL); GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day (postpartum day); MuHyal5 = murine hyaluronidase 5; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; PND = postnatal day; PPND = pre/postnatal development; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rMuHyal5 = recombinant murine hyaluronidase 5; rMuPH20 = recombinant murine hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　B　その他の毒性試験 - その他の試験

ADA Response in Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures

Report Title: Antibody Response Against rHuPH20 in New Zealand White Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures **Test Article:** rHuPH20

Species/Strain: Rabbit/ NZW
Initial Age: ~4 months at receipt
Date of First Dose: [redacted]

Duration of Dosing: Days 1, 8, 22, 36, 57 (Group 1); Days 1 to 14, 16 to 28, 43 (Groups 2, 3)[a]; Days 1, 8, 15, 22, 29, 50 (Groups 4)[b]
Method of Administration: SC/IM (Group 1); SC (Groups 2, 3, 4)
Vehicle: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl (pH 6.5) and Sterile Water for Injection

Study No. 12124
Location in CTD: 4.2.3.7.7.2
GLP Compliance: No
Lot Number: [redacted]

Special Features: Evaluation of the incidence, time course and magnitude of circulating ADA in non-pregnant female rabbits after SC or IM administration of rHuPH20 in support of GLP studies 12208/4.2.3.7.7.3 and 12195/4.2.3.7.7.4

Immunization Regimen	**Set 1**	**Set 2**		**Set 3**
Group No.	**Group 1**	**Group 2**	**Group 3**	**Group 4**
Dose of rHuH20	**Initial: 0.2 mg [22,000 U] SC with CFA 2nd-5th: 0.1 mg [11,000 U] IM with IFA**	**0 mg/kg/dose [0 U/kg]**	**0.76 mg/kg/dose [83,600 U/kg]**	**0.76 mg/kg/dose [83,600 U/kg]**
Number of Animals Evaluated (Females)	4	2	5	5[c]
Median Anti-rHuPH20 Titer Values	Day (Titer)	Day (Titer)	Day (Titer)	Day (Titer)
	Predose (negative)	Predose (negative)	Predose (negative)	Predose (negative)
	33 (76,800)	16 (negative)	16 (102,400)	19 (128,000)
	43 (307,200)	30 (negative)	30 (1,638,400)	36 (614,400)
	57 (307,200)	43 (negative)	43 (1,638,400)	50 (819,200)
	71 (3,276,800)	57 (negative)	57 (1,638,400)	64 (819,200)
	85 (1,228,800)	71 (negative)	71 (819,200)	78 (409,600)
	99 (819,200)	85 (negative)	85 (409,600)	92 (409,600)
	113 (614,400)	99 (negative)	99 (204,800)	106 (204,800)
	126 (1,228,800)	112 (negative)	112 (409,600)	119 (204,800)
Incidence of Cross-Reactivity to rRbPH20 at Each Time Point (females in Group 4 only)[d]				
Day 19	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 36	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 50	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 64	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 78	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 92	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 106	ND	NA	ND	100% (5/5)
Day 119	ND	NA	ND	80% (4/5)

(Continued)

2.6.7.17　B　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

ADA Response in Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures

Report Title: Antibody Response Against rHuPH20 in New Zealand White Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures **Test Article:** rHuPH20

[a] Dose was not administered on Day 15 to allow for a drug washout period prior to blood collection on Day 16, which allowed for a 48-hour washout period.
[b] Female NZW rabbits were administered rHuPH20 using one of three different dosing regimens: (Set 1) intermittently with adjuvant (Group 1); (Set 2) SC without adjuvant at a dose of 0.76 mg/kg once daily for 28 days and Day 43 (Group 3); or (Set 3) SC once weekly without adjuvant for five weeks and Day 50 (Group 4). Group 2 animals received once daily SC administration of the rHuPH20 vehicle for 28 days.
[c] Two male rabbits were administered rHuPH20 in the same dosing regimen as Set 3 and sampled at the same timing, but analysis was not conducted.
[d] The antibodies in Group 4 also showed binding to endogenous rabbit PH20 in sperm and testis tissue in immunofluorescence labeling and IHC assays.

ADA= anti-drug antibody; CFA = complete Friend’s adjuvant; GLP = Good Laboratory Practice; IFA = incomplete Freund’s adjuvant; IHC = immunohistochemistry; IM = intramuscular; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; ND = not determined; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rRbPH20 = recombinant rabbit hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.17　C　その他の毒性試験 - その他の試験

Effects of ADA on Male Fertility and General Reproduction

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Male Fertility and General Reproduction in the New Zealand White Rabbit **Test Article:** rHuPH20

Species/Strain: Rabbit/NZW
Initial Age: Males: ~4 months at receipt
Females: ~6 months at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Duration of Dosing: 7 doses total on Days 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57
Day of Mating: GD0
Day of C-Section: GD18
Method of Administration: SC
Study No. 12208
Location in CTD: 4.2.3.7.7.3
GLP Compliance: Yes
Lot No: [redacted]

Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl (pH 6.5) in sterile water for injection

Special Features: Evaluation of ADA titers, cross-reactivity to rRbPH20, and neutralizing activity in treated males. Evaluation of semen parameters in treated males and mating outcome through implantation by conducting C-section of non-treated females that had been mated to ADA positive males.

Dose (mg/kg/dose) [U/kg]	**0 [0] (Control)**	**0.76[a] [83,600]**
Number of Males	22	22
Number Died or Euthanized Moribund	0	0
Number of Males Mated	20	21
Dermal Scoring		
Erythema: Grade 1 (No. obs./No. animals w/ obs.)	0/0	24/12[b,c]
Erythema: Grade 2 (No. obs./No. animals w/ obs.)	2/1	10/4[c]
Erythema: Grade 3 (No. obs./No. animals w/ obs.)	0/0	2/1[c]
Clinical Observation excluding Dermal Score	-	-
Body Weight / Body Weight Gain / Food Consumption	-	-
Sperm Analysis		
Sperm Motility [Motile Percent (%)]		
Day 37	81.3	86.1
Day 49	87.0	93.4
Day 71	87.2	88.5
Sperm Concentration (Count/ 10^{-6} mL)		
Day 37	113.50	129.22
Day 49	90.22	119.64
Day 71	31.79	52.67
Sperm Morphology (Mannually recorded)	-	-
Gross Pathology	-	-
Reproductive Organ Weights	-	-

(Continued)

2.6.7.17　C　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

Effects of ADA on Male Fertility and General Reproduction

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Male Fertility and General Reproduction in the New Zealand White Rabbit		**Test Article:** rHuPH20
Dose (mg/kg/dose) [U/kg]	**0 [0] (Control)**	**0.76[a] [83,600]**
Additional Examinations[d]		
ADA Median Titer Value		
Day 1	Negative	Negative
Day 8	NA	1,600
Day 15	NA	19,200
Day 29	NA	2,457,600
Day 43	Negative	819,200
Day 57	NA	1,638,400
Day 85	NA	6,553,600
Incidence (%) Cross Reactivity of ADA to rRbPH20		
Day 1	NA	0%
Day 8	NA	0%
Day 15	NA	4.5%
Day 29	NA	>90%
Day 43	NA	>90%
Day 57	NA	>90%
Day 85	NA	>90%
Incidence (%) ADA Neutralizing Activity to rHuPH20 / rRbPH20		
Day 43	NA / NA	82% / 60%
Day 57	NA / NA	NA / 60%

(Continued)

2.6.7.17　C　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

Effects of ADA on Male Fertility and General Reproduction

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Male Fertility and General Reproduction in the New Zealand White Rabbit		**Test Article:** rHuPH20
Dose (mg/kg/dose) [U/kg]	**0 [0] (Control)**	**0.76[a] [83,600]**
Females (Untreated and Mated with Treated Males)		
Number Died or Sacrificed Moribund	0	1[e]
Number Pregnant	17	21
Number of Corpora Lutea	-	-
Number of Implantations	-	-
Number of Live Fetuses	-	-
Number of Pre- / Post- Implantation Loss	-	-

[a] All rHuPH20-dosed animals had anti-rHuPH20 antibodies prior to mating and through termination.
[b] Significantly different from the control group value ($p \leq 0.01$).
[c] These reactions were noted after the 5th dose and resolved within 4 days of each dose and were therefore not considered adverse.
[d] For all male rabbits, blood samples for plasma analysis of ADA were collected on Days 1, 8, 15, 22, 29, 43 and 57, and on the day of necropsy (Day 85). Plasma samples from rHuPH20-treated rabbits at all time points and from vehicle control-treated rabbits on Day 1 and 43 were assayed for the presence of anti-rHuPH20 binding antibody titers. Antibody analyses also included cross-reactivity of antibodies from rHuPH20-dosed males to rRbPH20 at each interval and anti-rHuPH20 neutralizing activity of plasma samples from rHuPH20-dosed males on Day 43.
[e] A single untreated female that was mated by a rHuPH20-treated male was found dead on GD8. The cause of death was not determined. Because the female was not treated with rHuPH20 and an occasional death occurs in the control population, the death was not considered related to rHuPH20 treatment.

- = no noteworthy finding, ADA = anti-drug antibodies; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; No. obs./No. animals w/ obs. = total number of observations/number of rabbits with observations; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rRbPH20 = recombinant rabbit hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.17　D　その他の毒性試験 - その他の試験

Effects of ADA on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments in the New Zealand White Rabbit **Test Article:** rHuPH20

Species/Strain: Rabbit/NZW
Initial Age: ~6 months at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Duration of Dosing: Days 1, 8, 15, 22, 29, 42 and 59 (GD15)
Day of Mating: GD0
Day of C-Section: GD29 (Subgroup A) or LD29 (Subgroup B was allowed for natural delivery)
Method of Administration: SC
Study No. 12195
Location in CTD: 4.2.3.7.7.4
GLP Compliance: Yes
Lot No: [redacted]
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L histidine, 130 mmol/L NaCl (pH 6.5) in sterile water for injection

Special Features: Evaluation of ADA, including satellite groups for assessment in fetuses and pups.[a] Postnatal observations of F_1 generation were conducted preweaning through adulthood to include sexual maturation, neurobehavioral testing and assessment of fertility and mating outcome.

Dose (mg/kg/dose) [U/kg]	0 [0] (Control)	0.76 [83,600]
F_0 Females		
Number of Animals	44	44
Number Died or Euthanized Moribund[b]	2[c]	1[d]
Number Mated	43	41
Number Pregnant	40	37
Number Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0
F_0 Dams (Subgroup A)		
Number of Animals	22	22
Clinical Observation including Dermal Scoring	-	-
Body Weight /Body Weight Gain / Food Consumption	-	-
Gross Autopsy (Caesarian Section) on GD29	-	-
Number of Corpora Lutea	-	-
Number of Implantations	-	-
Live / Dead Fetuses	-	-
Early / Late Resorptions	-	-
Pre- / Post- Implantation Loss	-	-
F_0 Dams (Subgroup B)		
Number of Animals	22	22
Clinical Observation including Dermal Score	-	-
Natural Delivery	-	-
Gross Autopsy on LD29	-	-

(Continued)

2.6.7.17　D　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

Effects of ADA on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments in the New Zealand White Rabbit　　**Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg/dose) [U/kg]	**0 [0] (Control)**	**0.76 [83,600]**
Maternal ADA: Median Titer Values / % Incidence Cross Reactivity to rRbPH20	Titer / rRbPH20	Titer / rRbPH20
Day 8	NA	1,600 / 0%
Day 15	NA	51,200 / 4%
Day 22	NA	409,600 / >80%
Day 29	NA	3,276,800 / 100%
Day 42	NA	3,276,800 / 100%
GD15	NA	3,276,800 / >90%
GD29	Negative / NA	3,276,800 / >80%
LD4 (Subgroup B, Satellite)	NA	819,200 / >60%
LD29	NA	409,600 / >50%
Maternal ADA: % Incidence rHuPH20 Neutralizing Activity / % Incidence rRbPH20 Neutralizing Activity	rHuPH20 / rRbPH20	rHuPH20 / rRbPH20
Day 42	NA	>75% / ≥60%
GD15	NA	>75% / ≥60%
GD29	NA	>75% / ≥60%

(Continued)

2.6.7.17　D　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

Effects of ADA on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments in the New Zealand White Rabbit　　**Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 [0] (Control)**	**0.76 [83,600]**
F_1 Fetuses		
Number of Live Fetuses	7.2	7.0
Body Weight (g)	46.91	47.37
Mean Percent of Male (%)	41.2	53.8[e]
Gross External Observation	-	-
Soft Tissue Examination	-	-
Skeletal Examination	-	-
F_1 Generation ADA: Median Titer Value / % Incidence Cross Reactivity to rRbPH20 / % incidence rRbPH20 neutralizing Activity	Titer / rRbPH20 / Neutralizing	Titer / rRbPH20 / Neutralizing
GD20 (Subgroup A, Satellite)	NA	204,800 / >30% / 0%
F_1 Litters (Preweaning)		
Number of Litters Evaluated	16	15
F_1 Generation ADA: Median Titer Value / % Incidence Cross Reactivity to rRbPH20 / % incidence rRbPH20 neutralizing Activity	Titer / rRbPH20 / Neutralizing	Titer / rRbPH20 / Neutralizing
LD4 (Subgroup B, Satellite)	NA	3,276,800 / 100% / 30%
LD29	NA	409,600 / >40% / NA

(Continued)

2.6.7.17　D　その他の毒性試験 - その他の試験（続き）

Effects of ADA on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments

Report Title: Effects of Anti-rHuPH20 Antibodies on Female Fertility and Embryo-Fetal Development with Postnatal Assessments in the New Zealand White Rabbit **Test Article:** rHuPH20

Dose (mg/kg) [U/kg]	**0 [0] (Control)**	**0.76 [83,600]**
F_1 Offspring (Postweaning)		
Number Evaluated (M / F)	22 / 22	22 / 22
Number Died or Euthanized Moribund (M / F)	0 / 0	0 / 1[f]
Clinical Observation including Viability	-	-
Body Weight / Body Weight Gain / Food Consumption	-	-
Developmental Milestones	-	-
Sexual Maturation	-	-
Open Field Performance	-	-
Number of Mated (M / F)	19 / 20	19 / 21
Number of Fertile (M / F)	19 / 19	15 / 17
Number of Females Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0
Necropsy	-	-
F_1 Generation ADA: Median Titer Value		
PND42	NA	76,800
PND62	NA	12,800
PND92	NA	3,200
Day of Mating (PND157)	NA	200
GD18 (female)	NA	Negative
PND189 to 195 (male)	NA	Negative

[a] Anti-rHuPH20 antibody titers were measured in female rabbit plasma samples at weekly intervals from baseline through Day 29, on Day 42, and in maternal plasma on GD15 and 29. A satellite group of 3 additional rabbits per group per interval was included to assess maternal and fetal/pup levels of anti-rHuPH20 antibodies on GD20 and PND4. In addition, cross reactivity of plasma IgG to rRbPH20 was evaluated at the same intervals and in vitro neutralization of rHuPH20 was evaluated on Day 42, GD15 and 29, while in vitro neutralization of rRbPH20 was evaluated on Day 42, GD15 and 29, and LD4. In the buffer control-treated animals, antibody testing was performed at baseline on Day 1 and again at GD29.

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

[c] One rabbit was found dead on GD31, and one aborted and was euthanized on GD22.

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

[e] The percent of male fetuses (represents the sex ratio) in the rHuPH20-treated group was significantly ($p \leq 0.05$) higher than the buffer control-treated group. The difference in the sex ratio was attributed to normal variation in rabbits based on the historical control database where a wide range of male fetuses is reported (range of means per study: 38.2-56.7%).

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

- = no noteworthy finding; ADA = anti-drug antibodies; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IgG = immunoglobulin G; LD = lactation day; M = male; NA = not applicable; NaCl = sodium chloride; NZW = New Zealand White; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rRbPH20 = recombinant rabbit hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous.

2.6.7.17　E　その他の毒性試験 - その他の試験

ADA in Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures: Comparison of Immunofluorescence Labeling and Immunohistochemical Methods in Select Normal Rabbit Tissues

Report Title: **Antibody Response Against rHuPH20 in New Zealand White Rabbits Following Three Separate Immunization Procedures: Immunofluorescence Labeling and Comparison of Immunohistochemical Methods and Conditions for Evaluating Potential Tissue Cross-Reactivity of Rabbit Anti-rHuPH20 Polyclonal Antibodies in Select Normal Rabbit Tissues (Non-GLP)**　**Test Article:** rHuPH20

Study Type: ADA Characterization and Tissue Cross-Reactivity　**Study No.** 12124-SR
Methods: Immunofluoresence and IHC staining　**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.5
Antibody reagents: Rabbit anti-rHuPH20 pAbs generated from three different immunization methods　**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Rabbit - NZW/sperm, testis, colon containing ENP
Special Features: Evaluation of rabbit anti-rHuPH20 polyclonal antibodies (Rb anti-PH20 pAbs) developed by different immunization methods to bind to rabbit PH20 in sperm and testis. Subreport for 12124/4.2.3.7.7.2. IHC Staining 1 used a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate for detection. IHC Staining 2 used an avidin/biotin complex system for detection and, to enhance the sensitivity of the method, an increased concentration of the biotinylated Rb anti-rHuPH20 pAbs and an increased time of detection were used.

Immunization Method	Weekly Dosing with Adjuvant	Daily Dosing without Adjuvant	Weekly Dosing without Adjuvant
Immunofluorescence	All three biotinylated Rb anti-rHuPH20 pAbs produced strong binding in the testis, but weak fluorescence intensity signal when tested with ENP.		
IHC Staining 1	Cross-reactivity of biotinylated Rb anti-rHuPH20 pAbs to the testis, localized in germinal cells and sperm in the seminiferous tubules		
	Weak binding to ENP	No binding to ENP of the rabbit colon	No binding to ENP of the rabbit colon
IHC Staining 2	Cross-reactivity of biotinylated Rb anti-rHuPH20 pAbs to the testis, localized in germinal cells and sperm in the seminiferous tubules		
	Weak staining of the ENP	Weak staining of the ENP	Weak staining of the ENP
Noteworthy findings	The three Rb anti-rHuPH20 pAbs generated by different immunization methods all bound to rabbit PH20 in sperm and testis tissue. The staining by Rb anti-rHuPH20 pAbs observed in ganglion (neural) cells of rabbit colon containing ENP was determined to be nonspecific.		

ADA = anti-drug antibodies; ENP = enteric neural plexus; GLP = Good Laboratory Practice; IHC = immunohistochemistry; NZW = New Zealand White; Rb anti-rHuPH20 pAb = rabbit anti-rHuPH20 polyclonal antibody; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.

2.6.7.17　F　その他の毒性試験 - その他の試験

A Tissue Cross-Reactivity Study of a Rabbit Anti-rHuPH20 Polyclonal Antibody in Selected Human Tissues

Report Title: Immunohistochemical Analysis of the Human Tissue Cross-Reactivity of an Antibody to Recombinant Human Hyaluronidase PH20 (rHuPH20)	**Test Article:** rHuPH20
Study Type: Tissue Cross-Reactivity	**Study No.** 12058
Methods: IHC staining	**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.6
Antibody reagent: Affinity purified Rb anti-rHuPH20 pAb	**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Human/adrenal gland, bladder, bone marrow, brain-cerebellum, brain-cortex, breast, colon, eye-retina, fallopian tube, heart, ileum, kidney-cortex, liver, lung-parenchyma, lung-bronchus, lymph node, ovary, pancreas, parathyroid, parotid, peripheral nerve, pituitary, placenta, prostate, skeletal muscle, skin, spinal cord, spleen, stomach, testis, thymus, thyroid, tonsil, ureter, uterus-cervix, uterus-endometrium, appendix, duodenum, nasopharynx, esophagus, cartilage, synovium	
Special Features: Assess PH20 expression in human tissues using an affinity purified Rb anti-rHuPH20 pAb reagent (Study Phase 1), then confirm specificity by blocking with rHuPH20 (Study Phase 2).	
Study Phase 1	Strong specific Rb anti-rHuPH20 pAb binding was only observed in the seminiferous tubules of testis. The immunostaining pattern revealed specific staining in the cytoplasm with greater intensity associated with the cell membrane of germinal epithelium in late stages of spermatogenesis. Weak specific immunoreactivity was demonstrated in the ENP of the colon within the muscle wall (2/3 males and 1/3 females) and within the esophageal muscle wall (1/3 females and 0/3 males).
Study Phase 2	This specific binding to the testis was blocked by pre-incubation of the Rb anti-rHuPH20 pAb with rHuPH20. There was no specific staining observed with a control rabbit IgG or an assay control containing no primary antibody.
Noteworthy findings	Immunoreactivity of the Rb anti-rHuPH20 pAb is limited to germinal epithelium in the central portion of the seminiferous tubules (late stages of spermatogenesis) and weak staining in the cytoplasm of the ENP located in the esophagus and colon.

ENP = enteric neural plexus; IgG = immunoglobulin G; IHC = immunohistochemistry; GLP = Good Laboratory Practice; Rb anti-rHuPH20 pAb = rabbit anti-rHuPH20 polyclonal antibody; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.

2.6.7.17　G　その他の毒性試験 - その他の試験

A Tissue Cross-Reactivity Study of Biotinylated Human Anti-PH20 And Human Anti-rHuPH20 Antibodies in Selected Normal Human Tissues

Report Title: A Tissue Cross-Reactivity Study of Biotinylated [redacted] Plasma Sample [redacted] and [redacted] Samples [redacted] and [redacted] in Selected Normal Human Tissues **Test Article:** rHuPH20

Study Type: Tissue Cross-Reactivity
Methods: IHC staining
Antibody reagent: Biotinylated affinity purified human anti-PH20/anti-rHuPH20 antibodies from three patients (One from [redacted], two from [redacted])
Species/Tissues Evaluated: Human/colon, heart, testis
Special Features: Determine cross-reactivity of human anti-rHuPH20 to human tissues.

Study No. 13086
Location in CTD: 4.2.3.7.7.7
GLP Compliance: Yes

Sample No.	[redacted][a]	[redacted][b]	[redacted][b]
Reactivity to PH20 or rHuPH20	Human anti-PH20 antibodies (IgG, IgA, IgM)	Human anti-rHuPH20 antibodies (IgG, IgA, IgM)	Human anti-rHuPH20 antibodies (IgG, IgA, IgM)
Tissue Cross Reactivity	All three human test articles as well as the positive control antibodies positively stained spermatogenic cells within the testis. The staining observed in the heart and colon tissues was interpreted as non-specific.		

[a] rHuPH20 naïve patient from [redacted].
[b] Patients treated with rHuPH20 from [redacted].

IgA = immunoglobulin A; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; IHC = immunohistochemistry; GLP = Good Laboratory Practice; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20.

2.6.7.17　H　その他の毒性試験 - その他の試験

Quantitative PCR Analysis of SPAM1/PH20 and HYAL5 Gene Expression in the Mouse

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 and HYAL5 Gene Expression in the Mouse **Test Article:** rHuPH20

Study Type: Gene Expression **Study No.** 12196
Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from murine tissues **Location in CTD:** 4.2.3.7.7.8
qPCR probe specificity: Murine SPAM1/PH20 and HYAL5 **GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Mouse (C57Bl/6, CD-1 and ICR Balb/c)/adult brain, cerebellum, colon, kidney, liver, lung, ovary, cervix, uterus, vagina, pancreas, prostate, skeletal muscle, skin, stomach, testis, thymus, uterus, eye, heart, lymph, placenta, spleen, cartilage, epididymis, esophagus, small intestine; juvenile PND1 to 21 testis, heart, corpus callosum; fetal GD7 to 18 whole embryos
Special Features: Determine the expression levels and localization of murine SPAM1/PH20 and HYAL5 in murine tissues at the RNA level using qPCR.

	SPAM1/PH20	HYAL5
Gene Expression		
Fetal whole embryo (copies/µg cDNA)		
GD7 to 15	BQL	BQL
GD16	BQL	216
GD17	BQL	247
GD18	BQL	5,253
Juvenile testis (copies/µg cDNA)		
PND7	BQL	BQL
PND14	14	BQL
PND21	53,443	161,851
Juvenile Corpus callosum		
PND1 to 7	BQL	NA
Adult tissues (copies/µg cDNA)	Positive at testis (28,520), epididymis (79), ovary (13) Negative at cervix, uterus, vagina, colon, heart, kidney, skeletal muscle, skin, corpus callosum, prostate, cortex	Positive at testis (58,814), epididymis (225) Low positive at skin Negative at cervix, ovary, uterus, vagina, colon, heart, kidney, skeletal muscle, corpus callosum, prostate, cortex
Noteworthy findings	Expression of murine SPAM1/PH20 and HYAL5 occurs predominantly in the testis and begins approximately between PND14 and 21. In addition, both genes are also expressed in the epididymis at low levels (approximately 250-350-fold lower levels as compared to testis). There is also low expression of SPAM1/PH20 in the ovary (approximately 2,000-fold lower compared to testis).	

BQL = below the quantitation limit; cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; HYAL5 = hyaluronidase 5; NA = not applicable; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　I　その他の毒性試験 - その他の試験

Expression of SPAM1/PH20 in the Corpus Callosum of the Murine Brain

Report Title: Examining the Expression of PH20/SPAM1 in the Corpus Callosum of Murine Brain – A Preliminary Study	**Test Article:** rHuPH20
Study Type: Gene Expression	**Study No.** 12210
Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from murine tissues	**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.9
qPCR probe specificity: Murine SPAM1/PH20	**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Mouse (C57Bl/6, Nu/Nu, SCID)/adult male corpus callosum, cortex, testis	
Special Features: Determine the expression levels of murine SPAM1/PH20 in murine corpus callosum at the RNA level using RT-qPCR.	
Gene Expression of SPAM1/PH20 SPAM1/PH20 is not expressed in the murine corpus callosum using RT-qPCR conditions that readily detected expression in the testis	

cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; GLP = Good Laboratory Practice; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　J　その他の毒性試験 - その他の試験

RT–qPCR Analysis of SPAM1/PH20 Gene Expression in Specific Rabbit Tissues Including Testis and Enteric Neural Plexus of the Colon

Report Title: **Reverse Transcriptase (RT) – Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Analysis of SPAM1 Gene Expression in Specific Rabbit Tissues Including Testis and Enteric Neural Plexus of the Colon**	**Test Article:** rHuPH20
Study Type: Gene Expression	**Study No.** 13091
Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from rabbit tissues	**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.10
qPCR probe specificity: European brown rabbit SPAM1/PH20	**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Rabbit (NZW)/testis, cortex, corpus callosum, ENP of colon	
Special Features: Determine whether SPAM1/PH20 mRNA is expressed in a select panel tissues isolated from adult (5 months of age) male and female rabbit	
Gene Expression of SPAM1/PH20	SPAM1/PH20 expression level was high in all three testis samples. In contrast, there was no SPAM1/PH20 detected in the brain cortex, brain corpus callosum or colon ENP samples.

cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; ENP = enteric neural plexus; GLP = Good Laboratory Practice; mRNA = messenger ribonucleic acid; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　K　その他の毒性試験 - その他の試験

Quantitative PCR Analysis of SPAM1/PH20 Gene Expression in Fetal, Juvenile and Adult Tissues of the Rabbit

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 Gene Expression in Fetal and Adult Tissues of the New Zealand White Rabbit	**Test Article:** rHuPH20
Study Type: Gene Expression	**Study No.** 13116
Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from rabbit tissues	**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.11
qPCR probe specificity: European brown rabbit SPAM1/PH20	**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Rabbit (NZW)/ Adult: cartilage, colon, heart, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, skeletal muscle, testis, cervix, uterus and vagina (5 months to 1 year old) Fetuses: whole fetuses and placentas at GD11, 14 and 17 and from fetal colon, heart, ovary, pancreas, placenta, small intestine, stomach, testis at GD20, 23, 26 and 29 Juvenile: corpus callosum, cortex, epididymis and testis (one to four months old, male)	
Special Features: Analysis of the spatial and temporal expression of SPAM1/PH20 mRNA in adult and fetal tissues of the NZW rabbit, as well as reproductive and neuronal tissues from juvenile animals	
Gene Expression of SPAM1/PH20	
Fetal tissues	Whole embryo: ND at GD11, 14 and 17 Placenta: Low expression at GD14, 17, 20 and 23 and ND at GD11, 26 and 29
Juvenile tissues	Testis: Low expression at 3 months of age and high expression at 4 months of age Epididymis: Low expression at 4 months of age Corpus callosum and brain cortex: ND
Adult tissues	Testis: High expression
Noteworthy findings	During fetal development there was transient, low level expression of SPAM1/PH20 only in the placenta, while in the adult expression is primarily in the testis and epididymis. The temporal expression pattern of SPAM1/PH20 expression in the testis from juvenile animals coincides with the reported development of the blood-testis barrier. All other fetal, juvenile and adult tissues tested were below the LLOQ for the SPAM1/PH20 RT-qPCR assay.

cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LLOQ = lower limit of quantitation; mRNA = messenger ribonucleic acid; ND = Not detected; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　L　その他の毒性試験 - その他の試験

Quantitative PCR Analysis of SPAM1/PH20 Gene Expression in the Enteric Neural Plexus of Human Colon

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 Gene Expression in the Enteric Neural Plexus of Human Colon	**Test Article:** rHuPH20
Study Type: Gene Expression	**Study No.** 12147
Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from human tissues	**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.12
qPCR probe specificity: Human SPAM1/PH20	**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated: Human/ENP, testis	
Special Features: Human ENP cDNA samples were evaluated for the presence SPAM1/PH20 mRNA transcripts RT-qPCR. Human testis cDNA samples were also evaluated using RT-qPCR to serve as a positive control.	
Gene Expression of SPAM1/PH20	There was no expression of SPAM1/PH20 in human colon ENP, however, expression of SPAM1/PH20 in human testis was confirmed.

cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; ENP = enteric neural plexus; GLP = Good Laboratory Practice; mRNA = messenger ribonucleic acid; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　M　その他の毒性試験 - その他の試験

Quantitative PCR Analysis of SPAM1/PH20 Gene Expression in Human Adult and Fetal Tissues

Report Title: Quantitative PCR Analysis of SPAM1 Gene Expression in Human Adult and Fetal Tissues **Test Article:** rHuPH20

Study Type: Gene Expression
Study No. 12197
Methods: RT-qPCR of cDNA reverse transcribed from RNA isolated from human tissues
Location in CTD: 4.2.3.7.7.13
qPCR probe specificity: Human SPAM1/PH20
GLP Compliance: No
Species/Tissues Evaluated: Human/
Adult: brain, breast, cartilage, cecum, cerebellum, colon, colon (ascending), colon (descending), colon (transverse), corpus callosum, cortex, duodenum, esophagus, fallopian tube, heart, ileocecum, ileum, jejunum, kidney, leukocytes, liver, lung, ovary, pancreas, placenta, prostate, rectum, skeletal muscle, skin, small intestine, spleen, stomach, synovium, testis, thymus, uterus, uterus (cervix)
Fetal: brain, cerebellum, colon, cortex, esophagus, heart, kidney, liver, lung, ovary, pancreas, prostate, skeletal muscle, skin, small intestine, spleen, stomach, testis, thymus, uterus
Primary human cell culture: neurons, astrocytes, oligodendrocyte precursor cells
Special Features: Determine the expression levels and tissue localization of SPAM1/PH20 in both adult and fetal human tissues, using RT-qPCR.

Gene Expression of SPAM1/PH20

Fetal tissues	Of the 20 fetal tissue cDNAs tested for SPAM1/PH20 expression, four exhibited mean C(t) levels above the LLOQ and five tissues showed mean C(t) values between the LOD and LLOQ. Total RNA was then isolated from the nine fetal tissues identified in the cDNA screen for SPAM1/PH20 expression and analyzed by RT-qPCR. Of the nine fetal tissues analyzed by RT-qPCR, six tissues were positive for SPAM1/PH20 gene expression with low levels of SPAM1/PH20 expression observed in colon, ovary, pancreas, small intestine, stomach and testis.
Adult tissues	Of these 37-adult tissue cDNAs, six showed mean C(t) levels above the LLOQ. Eight other tissues had mean C(t) levels between the LOD and LLOQ. Total RNA was then isolated from the 14 adult tissues identified in the cDNA SPAM1/PH20 expression screen, and further analyzed by RT-qPCR. Of these 14 tissues, SPAM1/PH20 expression was highest in the male reproductive tract but could be detected at levels near the LOD in other tissues including bone/cartilage, epididymis, kidney, placenta, skeletal muscle and synovium.
Noteworthy findings	The distribution profile for SPAM1/PH20 transcripts in vivo is primarily found in adult testis. Lower levels of expression were also observed in adult bone/cartilage, epididymis, kidney, placenta, skeletal muscle and synovium, and fetal colon, ovary, pancreas, small intestine, stomach and testis. SPAM1/PH20 mRNA was not detected in any of the neuronal tissues and/or neuronal cells tested.

cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; C(t) = cycle threshold, GLP = Good Laboratory Practice; LOD = limit of detection; LLOQ = lower limit of quantitation; mRNA = messenger ribonucleic acid; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.

2.6.7.17　N　その他の毒性試験 - その他の試験

Expression of SPAM1/PH20 and Other Hyaluronidases in Various Adult and Fetal Tissues from Mouse, Rabbit, and Human as Assessed by RNA-Seq

Report Title: Expression of SPAM1/PH20 and Other Hyaluronidases in Various Adult and Fetal Tissues from Human, Mouse, and Rabbit as Assessed by High-Throughput Deep RNA Sequencing (Non-GLP): an Interim Summary　**Test Article:** rHuPH20

Study Type: Gene Expression　**Study No.** 14077
Methods: RNA-Seq　**Location in CTD:** 4.2.3.7.7.14
RNA Transcripts Profiled: SPAM1/PH20, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4　**GLP Compliance:** No
Species/Tissues Evaluated:

Human/
- Adult: bone (cartilage), brain, corpus callosum, enteric neural plexus (ENP), epididymis, kidney, placenta, prostate, skeletal muscle, skin, synovium, testis
- Fetal: colon, kidney, ovary, pancreas, prostate, small intestine, stomach, testis
- Primary cell cultures: oligodendrocyte precursors, neurons, astrocytes

Mouse (CD-1, C57Bl/6, ICR, Webster)/
- Adult: corpus callosum, brain, cervix, colon, cortex, epididymis without sperm, epididymis, kidney, ovary, skeletal muscle, testis, uterus, vagina
- Fetal: whole embryos (GD15, 16, 17 and 18), brain (GD18), embryo (GD18), intestines (GD18), placenta (GD18)
- Primary cell cultures: oligodendrocyte precursors, astrocytes

Rabbit (NZW)/
- Adult: corpus callosum, cortex, epididymis, testis each at 1, 2, 3 and 4 months
- Fetal: colon, placenta, small intestine, stomach each at GD23

Special Features: Determine the transcriptional profile of SPAM1/PH20 and other hyaluronidases in human, murine and rabbit tissues using RNA-Seq

Noteworthy findings	The RNA-Seq results demonstrate that expression of SPAM1/PH20 is highly specific and restricted to the adult male reproductive tract in human, mouse and rabbit. There was no SPAM1/PH20 expression detected in any RNA samples obtained from tissues of neuronal origin, including brain, corpus callosum and ENP. Expression of HYAL1, 2 and 3 mRNAs was observed in a broad range of adult/fetal tissue types and/or primary cell cultures in human, mice and rabbit. Levels of HYAL4 expression were low and limited to a few tissue samples in human (bone, placenta, testis and ovary) and rabbit (testis from 3 and 4 month old animals). Murine Hyal4 mRNA expression was not detected in any of the RNA samples tested.

ENP = enteric neural plexus; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; HYAL1, 2, 3, 4 = hyaluronidase 1, 2, 3, 4; mRNA = messenger ribonucleic acid; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA = ribonucleic acid; RNA-Seq = deep ribonucleic acid sequencing; SPAM1 = sperm adhesion molecule 1.