目次

略号一覧表 ....3
2.6.6 毒性試験の概要文 ....4
2.6.6.1 まとめ ....4
2.6.6.1.1 IGI, 10% ....4
2.6.6.1.2 rHuPH20 ....5
2.6.6.1.3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用 ....8
2.6.6.2 単回投与毒性試験 ....9
2.6.6.2.1 IGI, 10% ....9
2.6.6.2.2 rHuPH20 ....10
2.6.6.3 反復投与毒性試験 ....10
2.6.6.3.1 IGI, 10% ....10
2.6.6.3.2 rHuPH20 ....11
2.6.6.4 遺伝毒性試験 ....13
2.6.6.4.1 IGI, 10% ....13
2.6.6.4.2 rHuPH20 ....13
2.6.6.5 がん原性試験 ....13
2.6.6.5.1 IGI, 10% ....13
2.6.6.5.2 rHuPH20 ....14
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む） ....14
2.6.6.6.1 IGI, 10% ....14
2.6.6.6.2 rHuPH20 ....14
2.6.6.7 局所刺激性試験 ....19
2.6.6.7.1 IGI, 10% ....19
2.6.6.7.2 rHuPH20 ....20
2.6.6.7.3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用 ....21
2.6.6.8 その他の毒性試験 ....29
2.6.6.8.1 rHuPH20 ....29
2.6.6.9 考察及び結論 ....39
2.6.6.9.1 IGI, 10% ....39
2.6.6.9.2 rHuPH20 ....39
2.6.6.9.3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用 ....41
2.6.6.10 図表 ....41
2.6.6.11 参考文献一覧 ....41

表

表 2.6.6.1-1 IGI, 10%の毒性試験プログラム ....5

表 2.6.6.1-2 rHuPH20 の毒性試験プログラム ..... 6
表 2.6.6.1-3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用の毒性試験プログラム ..... 8
表 2.6.6.3-1 rHuPH20 のカニクイザル 7 日間反復投与毒性試験の試験デザイン ..... 11
表 2.6.6.3-2 rHuPH20 のカニクイザル 39 週間反復投与毒性試験の試験デザイン ..... 12
表 2.6.6.7-1 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下投与中の注入圧 ..... 23
表 2.6.6.7-2 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下投与前後の局所皮膚粘弾性 ..... 23
表 2.6.6.7-3 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下投与中の局所皮膚表面温度 ..... 23
表 2.6.6.7-4 ミニブタにヒト IgG（10%）持続皮下投与後の局所腫脹容積及び面積 ..... 24
表 2.6.6.7-5 ミニブタにヒト IgG（10%）持続皮下投与後の局所皮膚反応性スコア ..... 24
表 2.6.6.7-6 ミニブタに IGI, 10%皮下投与中の皮膚表面温度 ..... 27
表 2.6.6.7-7 ミニブタに IGI, 10%皮下投与中の注入圧 ..... 28
表 2.6.6.7-8 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与後の局所腫脹容積及び面積 ..... 28
表 2.6.6.7-9 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与後の局所皮膚反応性スコアの比較 ..... 28
表 2.6.6.8-1 rHuPH20 のマウス PPND 試験（抗 rHuPH20 抗体の影響）の試験デザイン（用量及び動物数） ..... 33
表 2.6.6.8-2 rHuPH20 のマウス PPND 試験（抗 rHuPH20 抗体の影響）の試験デザイン（投与期間及び抗 rHuPH20 抗体測定日） ..... 34
表 2.6.6.9-1 rHuPH20 の毒性試験における NOAEL に基づき算出された安全域 ..... 40

図

図 2.6.6.7-1 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の皮膚血流量の変化 ..... 26
図 2.6.6.7-2 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の皮膚血流量の変化率 ..... 26
図 2.6.6.7-3 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の最小血流灌流単位の発現数 ..... 27
図 2.6.6.8-1 第 1、3 及び 4 群の抗 rHuPH20 抗体価 ..... 30

## 略号一覧表

| 略号 | 略していない表現又は説明 | |
|---|---|---|
| ENP | Enteric nerve plexus | 腸管神経叢 |
| GD | Gestation day | 妊娠日 |
| 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 |
| flux | Blood perfusion units | 血液灌流単位 |
| HE | Hematoxylin and eosin | ヘマトキシリン・エオジン |
| HED | Human equivalent dose | ヒト等価用量 |
| Hyal (or HYAL) 1/2/3/4/5 | Hyaluronidase 1/2/3/4/5 | ヒアルロニダーゼ 1/2/3/4/5 |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use | 医薬品規制調和国際会議 |
| IHC | Immunohistochemistry | 免疫組織化学 |
| IgG | Immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| IGI, 10% | Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution | 免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10% |
| IGI, 10% with rHuPH20 (=TAK-771) | Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution with Recombinant Human Hyaluronidase PH20 | 免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%及び遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20（TAK-771） |
| IGI, 16% | Immune Globulin Infusion (Human), 16% Solution | 免疫グロブリン（ヒト）注射剤 16% |
| LD | Lactation day | 授乳日 |
| mRNA | Messenger RNA | メッセンジャーRNA |
| NMRI | Naval Medical Research Institute | — |
| 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 |
| PID | Primary immunodeficiency | 原発性免疫不全症候群 |
| PII | Primary irritation index | 一次刺激指数 |
| PND | Postnatal day | 生後日 |
| PPND | Pre- and postnatal developmental | 出生前及び出生後の発生 |
| rHuPH20 | Recombinant human hyaluronidase PH20 | 遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20 |
| 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 | Ribonucleic acid | リボ核酸 |
| RNA-Seq | RNA sequencing | 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-(q)PCR | (Quantitative) reverse transcriptase polymerase chain reaction | （定量的）逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 |
| SCID | Severe combined immunodeficiency | 重症複合免疫不全 |
| SII | Swelling/induration index | 腫脹／硬結指数 |
| SPAM1/Spam1 | Sperm adhesion molecule 1 (aka PH20) | 精子接着分子 1（別名：PH20） |
| TK | Toxicokinetics | トキシコキネティクス |
| U | Units | 単位 |

# 2.6.6 毒性試験の概要文

## 2.6.6.1 まとめ

TAK-771 は原発性免疫不全症候群（PID）の治療薬として開発され、免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%（IGI, 10%）が 1 バイアルと、遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20［rHuPH20、一般名：ボルヒアルロニダーゼ アルファ（遺伝子組換え）］が 1 バイアルの計 2 バイアルで構成されている。

IGI, 10%はヒト血漿から精製した内因性のヒト IgG を有効成分とする製剤であり、補充療法として使用される。IGI, 10%は国内では未承認であるが、海外では PID 及び特定の自己免疫疾患を含む様々な免疫不全症に対する治療薬として販売（販売名：KIOVIG 又は GAMMAGARD LIQUID）されている。IGI, 10%の製造工程は、[redacted]以外、当社の国内既承認品である皮下注用免疫グロブリン（ヒト）20%製剤（販売名：キュービトル 20%皮下注）の製造工程と同等である。IGI, 10%はキュービトル 20%皮下注と同じ製品特性（抗体スペクトラム、分子サイズ分布、サブクラス分布など）を有している。

rHuPH20 は投与部位のゲル状ヒアルロン酸を脱重合し、皮下組織の浸透性を高める。皮膚内でのヒアルロン酸のターンオーバーは速やかであるため[1]、rHuPH20 は TAK-771 の構成成分であるヒト IgG の拡散吸収を一時的に促進する。rHuPH20 を併用投与する皮下注用製剤が海外では複数承認されており、国内ではダラキューロ配合皮下注（製造販売元：ヤンセンファーマ株式会社）及びフェスゴ配合皮下注（製造販売元：中外製薬株式会社）が承認されている。

TAK-771 の安全性評価のための広範な非臨床毒性試験プログラムを実施した。IGI, 10%及び rHuPH20 の単剤又は併用投与による毒性試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）S6（R1）ガイドライン「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」、ICH M3（R2）ガイダンス「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」及び関連した適切な ICH ガイドラインに従い実施した。重要な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）に準拠して実施した。

### 2.6.6.1.1 IGI, 10%

IGI, 10%の安全性プロファイルはマウス、ラット及びウサギを用いて検討した。なお、いずれの試験結果もキュービトル 20%皮下注の承認申請時に提出済みである（2023 年 9 月 25 日承認）。マウス及びラットに IGI, 10%を静脈内投与した単回投与毒性試験において、IGI, 10%に関連した一般状態の変化及び病理組織学的所見は認められなかった。細菌を用いた復帰突然変異試験において、IGI, 10%により閾値（対照群の変異コロニー数に対して 1.67～2.5 倍）を超える突然変異頻度の増加は示されなかった。ウサギを用いた局所刺激性試験において、IGI, 10%を静脈内、動脈内及び静脈周囲投与したとき、良好な忍容性が示された。特記しない限り、IGI, 10%の投与量は IgG 量で示した。

IGI, 10%の毒性試験プログラムを表 2.6.6.1-1 に示す。

表 2.6.6.1-1　IGI, 10%の毒性試験プログラム

| 試験の種類 | 試験内容 | 試験番号 | 投与経路及び投与量又は投与容量 | GLP |
|---|---|---|---|---|
| 単回投与毒性試験 | マウス単回投与毒性(a) | PV0330101 | 静脈内：2500、5000及び10000 mg/kg | 適用 |
| | ラット単回投与毒性(a) | PV0340101 | 静脈内：2000 mg/kg | 適用 |
| 遺伝毒性試験 | ネズミチフス菌復帰突然変異試験 | [redacted]-UL-0159 | In vitro：0.12～10 mg/plate | 適用 |
| 局所刺激性試験 | ウサギ局所刺激性(b) | PV0350101 | 静脈内、動脈内及び静脈周囲：それぞれ10 mL、10 mL及び0.5 mL | 適用 |

Gamimune N 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、GAMMAGARD S/D：IGI, 10%の先行品（凍結乾燥品）、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%

(a)　GAMMAGARD S/D を比較対照として使用した。

(b)　GAMMAGARD S/D 及び Gamimune N 10%を比較対照として使用した。

### 2.6.6.1.2 rHuPH20

rHuPH20 の毒性試験にはマウス、ウサギ及びカニクイザルを使用した。ヒアルロン酸の構造は動物種間で共通していることから[1]、rHuPH20 はこれらの動物種においてヒアルロン酸を脱重合する。これらの動物種は一般毒性試験や生殖発生毒性試験に汎用されている。

rHuPH20 の非臨床安全性は、カニクイザル 7 日間及び 39 週間反復投与毒性試験、マウス胚・胎児発生毒性用量設定及び本試験、マウス出生前及び出生後の発生（PPND）試験並びにマウス幼若動物を用いた毒性試験で評価した。重要な試験の投与経路は、予定臨床投与経路である皮下投与とした。カニクイザル 7 日間反復投与毒性試験では静脈内投与も併せて検討した。rHuPH20 の投与量（mg/kg）は、rHuPH20 の平均比活性（110000 U/mg）を用いて U/kg に適宜換算した。トキシコキネティクス（TK）評価では血漿中ヒアルロニダーゼ活性を測定した。カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験、マウス胚・胎児発生毒性試験並びに幼若マウス 6 週間用量設定及び 8 ヵ月間反復投与毒性試験において、抗 rHuPH20 抗体産生を評価した。

その他の毒性試験では、抗 rHuPH20 抗体が主に精巣に発現する PH20［別名：精子接着分子 1（SPAM1）］に作用する可能性が考えられたため、雌雄ウサギの受胎能、胚・胎児発生及び出生児の発達並びにマウスの PPND に対する抗 rHuPH20 抗体の影響を評価した。さらに、抗 rHuPH20 抗体の正常組織に対する交差反応性を検討するため、ウサギ及びヒト組織を用いた組織交差反応性試験を実施した。また、マウス、ウサギ及びヒトの各組織での SPAM1/PH20 遺伝子発現プロファイルを明らかにするため、（定量的）逆転写ポリメラーゼ連鎖反応［RT-(q)PCR］及び RNA シークエンシング（RNA-Seq）法を用いた遺伝子発現解析試験を実施した。

rHuPH20 は遺伝子組換えヒトタンパク質であることから、ICH S6（R1）ガイドラインに従い遺伝毒性試験は実施していない。ヒアルロニダーゼの臨床使用経験が豊富であること、予定臨床用量で皮下投与した場合、ヒトにおいて意味のある rHuPH20 の全身曝露は認められないと考えられること、非臨床試験において過形成、増殖又は腫瘍に関する所見が認められなかったことから、ICH S6（R1）ガイドラインに従いがん原性試験は実施していない。

rHuPH20 の毒性試験プログラムを表 2.6.6.1-2 に示す。

表 2.6.6.1-2 rHuPH20 の毒性試験プログラム

| 試験の種類 | 試験内容 | 試験番号 | 投与経路及び投与量 | GLP |
|---|---|---|---|---|
| 反復投与毒性試験 | カニクイザル 7 日間反復静脈内及び皮下投与毒性試験 | R08056 | 静脈内及び皮下：5 mg/kg | 適用 |
| | カニクイザル 39 週間反復皮下投与毒性試験 | R09050 | 皮下：0.02、0.2 及び 2 mg/kg | 適用 |
| 生殖発生毒性試験 | マウス胚・胎児発生用量設定試験 | R07046 | 皮下：1、3、10 及び 30 mg/kg | 非適用 |
| | マウス胚・胎児発生毒性試験 | R08176 | 皮下:3､9 及び 18 mg/kg | 適用 |
| | マウス出生前及び出生後発生試験 | R09058 | 皮下 : 3､6 及び 9 mg/kg | 適用 |
| | 幼若マウス 6 週間用量設定試験 | 13123 | 皮下 : 1､3 及び 9 mg/kg | 非適用 |
| | 幼若マウス 12 週間忍容性試験 | 13125 | 皮下：3 及び 9 mg/kg | 非適用 |
| | 幼若マウス 8 ヵ月間反復投与毒性試験 | 15028 | 皮下：1 mg/kg | 適用 |
| その他の毒性試験 | ウサギ免疫感作後抗 rHuPH20 抗体反応試験 | 12124 | 皮下／筋肉内：0.1～0.2 mg/匹又は皮下：0.76 mg/kg | 非適用 |
| | 雄ウサギ受胎能試験での抗 rHuPH20 抗体の影響 | 12208 | 皮下：0.76 mg/kg | 適用 |
| | 雌ウサギ出生後の評価を含む受胎能及び胚・胎児発生毒性試験での抗 rHuPH20 抗体の影響 | 12195 | 皮下：0.76 mg/kg | 適用 |
| | マウス出生前及び出生後発生試験での抗 rHuPH20 抗体の影響 | 12096 | 皮下 : 3､6 及び 9 mg/kg | 非適用 |
| | ウサギ抗 rHuPH20 抗体の正常ウサギ組織に対する交差反応性 | 12124-SR | NA | 非適用 |
| | ウサギ抗 rHuPH20 抗体の正常ヒト組織に対する交差反応性 | 12058 | NA | 非適用 |
| | ヒト抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体の正常ヒト組織に対する交差反応性 | 13086 | NA | 適用 |
| | マウス胎児、幼若動物及び成体組織での遺伝子発現解析（RT-qPCR） | 12196 | NA | 非適用 |
| | マウス脳梁での遺伝子発現解析（RT-PCR） | 12210 | NA | 非適用 |
| | ウサギ組織での遺伝子発現解析（RT-qPCR） | 13091 | NA | 非適用 |
| | ウサギ胎児、幼若動物及び成体組織での遺伝子発現解析（RT-qPCR） | 13116 | NA | 非適用 |
| | ヒト結腸 ENP での遺伝子発現解析（RT-qPCR） | 12147 | NA | 非適用 |
| | ヒト成人及び胎児組織での遺伝子発現解析（RT-qPCR） | 12197 | NA | 非適用 |
| | マウス、ウサギ及びヒトの成体／成人及び幼若動物又は胎児組織での遺伝子発現解析（RNA-Seq） | 14077 | NA | 非適用 |

ENP：腸管神経叢、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、NA：該当なし、PH20：精子接着分子 1（別名：SPAM1）、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、RNA：リボ核酸、RNA-Seq：RNA シークエンシング、RT-(q)PCR：（定量的）逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

カニクイザルを用いた 7 日間反復投与毒性試験（投与量：0 及び 5 mg/kg、1 日 1 回、皮下又は静脈内投与）では、rHuPH20 投与に関連した有害な影響は認められなかった。本試験の無毒性量（NOAEL）は静脈内及び皮下投与のいずれも 5 mg/kg であった。

カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験（投与量：0、0.02、0.2 又は 2 mg/kg、週 1 回、皮下投与）では、試験した最高用量まで被験物質に関連した毒性は認められなかった。NOAEL は 2 mg/kg であった。血漿中ヒアルロニダーゼ活性は 2 mg/kg 群でのみで検出され、雌雄ともに Day 85 に試験期間を通して最高値に達した。その後、Day 267 では雄の値は定量下限未満となり、雌の値も Day 1 より低値であった。抗 rHuPH20 抗体及び中和抗体の抗体価には用量反応性がみられ、いずれも投与期間を通して概ね上昇した。反復投与後の曝露量の減少は中和抗体価の上昇と相関していた。

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 まで雌雄受胎能への影響を示唆する所見はみられなかった。

マウス胚・胎児発生毒性試験（投与量：0、3、9 及び 18 mg/kg、皮下投与）では、18 mg/kg までの投与で明らかな母動物毒性は観察されず、母動物に対する NOAEL は 18 mg/kg と判断した。胎児では 9 及び 18 mg/kg 群で胎児体重減少及び後期吸収胚数の増加が認められた。したがって、胚・胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg と判断した。催奇形性は認められなかった。

マウス PPND 試験（投与量：0、3、6 及び 9 mg/kg、皮下投与）では、9 mg/kg までの投与で明らかな F0 母動物毒性（一般毒性、分娩及び哺育）並びに F1 出生児の生存及び発達（性成熟、学習・記憶、運動機能及び生殖能）に対する影響は観察されず、NOAEL はいずれも 9 mg/kg と判断した。

幼若マウス 8 ヵ月間反復投与毒性試験（投与量：0 及び 1 mg/kg、皮下投与）では、生殖毒性及び慢性毒性に関するいずれの評価項目に対しても、rHuPH20 に関連した有害所見は認められなかった。rHuPH20 を投与した全動物に抗 rHuPH20 抗体が認められ、rHuPH20 中和活性が高頻度で認められ、遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ PH20（rMuPH20）及び遺伝子組換えマウスヒアルロニダーゼ 5（rMuHyal5）に対する交差反応性が認められた。

rHuPH20 の局所刺激性は、カニクイザル 7 日間及び 39 週間反復投与毒性試験、マウス胚・胎児発生毒性試験及び PPND 試験並びにウサギを用いた抗 rHuPH20 抗体の影響を検討した生殖発生毒性試験に基づき評価した。いずれの試験でも投与部位における局所刺激性を示す毒性所見は認められなかった。

雄ウサギを用いた受胎能試験（投与量：0 及び 0.76 mg/kg、皮下投与）並びに雌ウサギを用いた出生後の評価を含む受胎能及び胚・胎児発生毒性試験（投与量：0 及び 0.76 mg/kg、皮下投与）において抗 rHuPH20 抗体の影響を検討した。これらの試験では交配前から試験終了まで F0 雌雄ウサギに抗 rHuPH20 抗体産生が認められた。また、雌ウサギ試験では、母動物から移行した抗 rHuPH20 抗体が胎児及び出生児から検出された。しかし、雌雄受胎能、胚・胎児発生並びに出生児の発達に抗 rHuPH20 抗体の影響は認められなかった。

マウス PPND 試験での F0 母動物及び F1 世代の循環血中抗 rHuPH20 抗体の存在を確認するために実施した補足試験（投与量：0、3、6 及び 9 mg/kg、皮下投与）では、母動物並びに妊娠後期から成熟期までの胎児及び出生児に抗 rHuPH20 抗体が認められたが、F1 世代の成長、機能発達及び生殖能に影響はみられなかった。

ヒト抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体のヒト組織に対する結合性を評価した組織交差反応性試験では、精巣に特異的な結合が認められた。

マウス、ウサギ及びヒトの成体／成人及び幼若動物又は胎児組織並びにマウス及びヒト初代培養細胞を用いて、SPAM1/PH20 遺伝子発現を RT-(q)PCR 法及び RNA-Seq 法を用いた一連の試験により評価した。RT-(q)PCR 法では、マウス、ウサギ及びヒトの成体／成人雄性生殖器で SPAM1/PH20 の高い発現が認められた一方、他の多くの組織での発現は低かった。RNA-Seq 法では、SPAM1/PH20 の発現はマウス、ウサギ及びヒトの成体／成人雄性生殖器のみで認められ、他の組織では認められなかった。これらの試験による様々な発生段階でのマウス、ウサギ及びヒト組織を用いた評価から、SPAM1/PH20 は主として成体／成人雄性生殖器に発現することが確認された。

### 2.6.6.1.3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用

rHuPH20 は局所で作用する薬剤であり、全身曝露はあってもわずかであることから、IGI, 10%及び rHuPH20 の併用は、単剤と異なる安全性プロファイルを示すとは考えられない。したがって、rHuPH20 は IGI, 10%の全身作用及び安全性に影響を及ぼさないと考えられる。

ウサギ及び重症複合免疫不全（SCID）マウスを用いて IGI, 10%及び rHuPH20 の併用投与による反復投与局所刺激性試験を実施した。また、ミニブタに IGI, 10%の大量持続皮下投与時の局所皮膚反応に対する rHuPH20 皮下投与の作用を評価した。

ウサギ、マウス及びミニブタは局所刺激性試験で汎用されることから適切な動物種として選択した。ミニブタとヒトの皮膚は、表皮の厚さ及び皮下組織への密着を含む形態学的及び生理学的特性が類似している[2][3]。また、ミニブタは単回で 1 ヵ月の臨床投与量に相当する IGI, 10%の投与が可能となるほど十分に大きい。

IGI, 10%及び rHuPH20 併用の毒性試験プログラムを表 2.6.6.1-3 に示す。

**表 2.6.6.1-3　IGI, 10%及び rHuPH20 併用の毒性試験プログラム**

| 試験の種類 | 試験内容 | 試験番号 | 投与経路及び<br>投与量又は投与容量 | GLP |
|---|---|---|---|---|
| 局所刺激性試験 | ウサギ局所刺激性 | AU0206W01 | 皮下：<br>rHuPH20 500 又は 5000 U/kg（0.1 又は 1 mL/kg）＋IGI, 10% 5 mL/kg | 非適用 |
| | SCID マウス局所刺激性 | R09131 | 皮下：<br>rHuPH20 100 U/匹（0.1 mL/匹）＋IGI, 10% 0.1 mL/匹 | 非適用 |
| | ミニブタ局所皮膚反応性 | 11018 | 皮下：<br>rHuPH20 2240 U/匹（14 mL/匹）＋ヒト IgG (10%) (a) 300 mL/匹 | 非適用 |
| | ミニブタ局所皮膚反応性 | 11028 | 皮下：<br>rHuPH20 2240 U/匹（14 mL/匹）＋IGI, 10% 300 mL/匹 | 非適用 |

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IgG：免疫グロブリン G、IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、SCID：重症複合免疫不全、U：単位
(a) Gamma Globulin Powder（BioMed Supply Inc.）10%溶液を使用した。

ウサギに IGI, 10%を rHuPH20 と併用反復皮下投与し、局所刺激性を検討した。投与部位の病理組織学的検査では、rHuPH20 及び IGI, 10%の併用並びに IGI, 10%単独投与のいずれにも

炎症反応が認められた。これはヒト IgG に対するウサギの免疫応答の結果と考えられた。rHuPH20 単独投与では、反応は認められなかったか、軽微な反応のみであった。

異種タンパク質の免疫系への影響を除外するために SCID マウスに IGI, 10%を rHuPH20 と併用反復皮下投与し、局所刺激性を評価した。IGI, 10%の反復皮下投与は、rHuPH20 との併用又は単独のいずれについても有害作用を認めず、良好な忍容性を示した。

ミニブタの腹部に高容量の IGI, 10%［又はヒト IgG（10%）］を皮下投与したときの局所皮膚反応に対する rHuPH20 の影響を評価した。一連の試験結果から、rHuPH20 の皮下投与により、IGI, 10%の大量皮下投与に伴う局所皮膚反応（腫脹／硬結、皮膚血流量低下、注入圧上昇、病理組織学的変化等）が軽減されることが示された。

## 2.6.6.2 単回投与毒性試験

### 2.6.6.2.1 IGI, 10%

#### 2.6.6.2.1.1 マウスにおける IGI, 10%の単回静脈内投与毒性試験

（試験番号 PV0330101、添付資料番号 4.2.3.1-1、評価資料）

本試験において、3 ロットの IGI, 10%を評価した。2 ロットの GAMMAGARD S/D[1]（注射用水に溶解して 100 mg/mL 濃度で使用）を比較対照として使用した。Naval Medical Research Institute（NMRI）マウス（雌雄各 5 匹／群）に 2500、5000 及び 10000 mg/kg の IGI, 10%又は GAMMAGARD S/D をそれぞれ 25、50 及び 100 mL/kg の容量（投与可能最大容量）で単回静脈内投与した。陰性対照群には IGI, 10%の製剤緩衝液（グリシン 0.25 mol/L 溶液：25、50 及び 100 mL/kg）又は生理食塩液（100 mL/kg）を投与した。行動変化を含む一般状態について動物を 14 日間観察した。全身の健康状態を示す指標として Day 0、7 及び 14 に体重を測定し、死亡数を記録した。観察期間終了時に生存動物を安楽殺し、剖検した。

投与に関連した死亡率は、IGI, 10% 10000 mg/kg 群で約 7%（2/30 匹）並びに GAMMAGARD S/D 10000 mg/kg 及び 5000 mg/kg 群でそれぞれ 100%（20/20 匹）及び 40%（8/20 匹）であった。また、IGI, 10% 5000 mg/kg 群の雌 1 匹が Day 6 に機械的損傷により死亡したが、投与との関連はないと判断された。

生存マウスでは、呼吸困難及び／又は行動性低下が IGI, 10% 10000 mg/kg 群で約 57%（16/28 匹）及び GAMMAGARD S/D 5000 mg/kg 群で 50%（6/12 匹）に認められた。IGI, 10%投与動物の体重増加量は、3 用量群全てにおいて生理食塩液投与群とほぼ同じかわずかに高かった。

肉眼的病理所見（容量過負荷を示唆）は、IGI, 10%又は GAMMAGARD S/D の投与中又は投与後に死亡したマウスのみに認められた。これらの動物の主な死因は急性心不全であり、マウスに大容量の投与液を急速に投与したことによる心機能低下に関連すると考えられた。心臓拡張、肺浮腫、腹腔内出血及び肝破裂も認められ、これらの所見は、心機能が低下しているマウスに大容量の投与液を急速に投与したことに関連すると考えられた。

この他、肺出血が計画殺動物のみに観察され、安楽殺方法（炭酸ガス吸入）に関連した所見と考えられた。

---

[1] IGI, 10%の先行品（凍結乾燥品）。日本では、ガンマガード静注用2.5 gが1986年から、ガンマガード静注用5 gが2019年から販売され、ガンマガード静注用2.5 gは2020年に承認整理された。

以上より、マウスにおける IGI, 10%の NOAEL は 5000 mg/kg であった。

#### 2.6.6.2.1.2 ラットにおける IGI, 10%の単回静脈内投与毒性試験

（試験番号 PV0340101、添付資料番号 4.2.3.1-2、評価資料）

本試験において、3 ロットの IGI, 10%を評価した。2 ロットの GAMMAGARD S/D（注射用水に溶解して 100 mg/mL 濃度で使用）を比較対照として使用した。Sprague Dawley ラット（雌雄各 5 匹／群）に、2000 mg/kg の IGI, 10%又は GAMMAGARD S/D を、陰性対照として IGI, 10%の製剤緩衝液（グリシン 0.25 mol/L 溶液）又は生理食塩液を、20 mL/kg の容量（急速静脈内投与可能最大容量）で単回静脈内投与した。

行動変化を含む一般状態について、動物を 14 日間観察した。全身の健康状態を示す指標として Day 0、7 及び 14 に体重を測定した。観察期間終了時に炭酸ガス吸入により生存動物を安楽殺し、剖検した。

全動物が試験期間を通して生存した。急性毒性を示す一般状態所見として、行動性低下及び／又は呼吸困難が、GAMMAGARD S/D 投与動物のみで観察された。IGI, 10%投与後 2 週間の体重増加量に生理食塩液投与群と比較して統計学的有意差は認められなかった。剖検により、いずれの投与群においても投与に関連した所見は認められなかった。肺出血が群間で等しく散見されたが、当該所見は炭酸ガス吸入で安楽殺した動物でしばしば観察され、投与とは関連しないと考えられた。同施設で実施した先行試験において生理食塩液を投与した対照群のラット 200 匹の 51.5%で同様の所見が観察された（未公表データ）。

以上より、IGI, 10%の NOAEL は 2000 mg/kg であった。

### 2.6.6.2.2 rHuPH20

rHuPH20 を用いた単回投与毒性試験は実施しなかった。雌雄カニクイザルに rHuPH20 5 mg/kg を 7 日間反復静脈内及び皮下投与した毒性試験において死亡は認められず、一般状態観察に rHuPH20 に関連した変化は認められなかった（2.6.6.3.2.1 項）。また、雌カニクイザルに rHuPH20 を最大 30 mg/kg まで単回皮下及び静脈内投与した薬物動態試験における忍容性は良好であり、一般状態、体重、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、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（2.6.4.3.2.2 項）。

## 2.6.6.3 反復投与毒性試験

### 2.6.6.3.1 IGI, 10%

IGI, 10%を用いた反復投与毒性試験は実施しなかった。ICH S6（R1）ガイドラインによると、外来性分子（即ち、細菌、ウイルスなど）を標的とするモノクローナル抗体や抗体様タンパク質については、適切な 1 種の動物種を用いた短期の安全性試験を実施することが考えられるとされている。これに従い、げっ歯類を用いて IGI, 10%の単回投与毒性試験を実施した（2.6.6.2.1 項）。また、動物にヒトタンパク質を反復投与する試験では、異種タンパク質に対する抗体産生リスク及びヒトでの反応を反映しない抗原抗体反応に基づく不適合反応のリスクがある。IGI, 10%は内因性ヒトタンパク質（IgG）製剤であり、補充療法として使用さ

れることから、臨床使用において反復投与による安全性の懸念は生じないと考えられる。IGI, 10%（海外）及び他の免疫グロブリン製剤の臨床使用経験から、長期使用時の安全性が示されている。

### 2.6.6.3.2 rHuPH20

#### 2.6.6.3.2.1 カニクイザルにおける rHuPH20 の 7 日間反復静脈内及び皮下投与毒性試験

（試験番号 R08056、添付資料番号 4.2.3.2-1、評価資料）

カニクイザル（雌雄各 2 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.0）又は 5 mg/kg（550000 U/kg 相当）の用量で 1 日 1 回 7 日間連日皮下又は静脈内投与した。試験デザインを表 2.6.6.3-1 に示す。

表 2.6.6.3-1　rHuPH20 のカニクイザル 7 日間反復投与毒性試験の試験デザイン

| 群 | 用量（mg/kg） | 投与容量（mL/kg） | 投与経路 | 動物数（雄／雌） |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0.47 | 皮下及び静脈内 | 2/2 |
| 2 | 5 | 0.47 | 静脈内 | 2/2 |
| 3 | 5 | 0.47 | 皮下 | 2/2 |

出典：R08056 試験報告書 Section 5.5.3 及び 5.5.4 の表

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査所見、血液学的検査値、血液生化学的検査値、凝固検査値、尿検査値及び TK を評価した。また、Day 8 に安楽殺し、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。TK の結果は 2.6.4.3.2.4 項に示した。

カニクイザルにおける 5 mg/kg の rHuPH20 の 1 日 1 回 7 日間連日静脈内又は皮下投与は、良好な忍容性を示し、rHuPH20 投与動物に、一般状態、摂餌量、体重、眼科学的検査、尿検査、血液生化学的検査、血液学的検査、凝固検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査のいずれに関しても、rHuPH20 に関連した変化は観察されなかった。

以上より、本試験における rHuPH20 の NOAEL は、皮下及び静脈内投与のいずれにおいても 5 mg/kg と判断した。

#### 2.6.6.3.2.2 カニクイザルにおける rHuPH20 の 39 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

（試験番号 R09050、添付資料番号 4.2.3.2-2、評価資料）

カニクイザル（雌雄各 6 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.0）、0.02、0.2 又は 2 mg/kg（2200、22000 及び 220000 U/kg 相当）の用量で週 1 回 39 週間皮下投与し、4 週間の回復期間を設定した。

試験デザインを表 2.6.6.3-2 に示す。

表 2.6.6.3-2 rHuPH20 のカニクイザル 39 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

| 群 | 用量（mg/kg） | 投与容量（mL/kg） | 動物数（雄／雌） | 剖検動物数（雄／雌） | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 投与期間終了時 | 回復期間終了時 |
| 1 | 0 | 2 | 6/6 | 4/4 | 2/2 |
| 2 | 0.02 | 0.02 | 6/6 | 4/4 | 2/2 |
| 3 | 0.2 | 0.2 | 6/6 | 4/4 | 2/2 |
| 4 | 2 | 2 | 6/6 | 4/4 | 2/2 |

出典：R09050 試験報告書 Section 5.5.5 及び 5.12.1.1 の表

一般状態、摂餌量、体重、心電図、心拍数、血圧、呼吸数、眼科学的検査所見、血液学的検査値、凝固検査値、血液生化学的検査値、尿検査値、TK 並びに抗 rHuPH20 抗体価及び中和抗体価を評価した。加えて、生殖能の指標として雌では月経周期、雄では精巣サイズ、精子検査所見（精子濃度、運動性及び形態）及び黄体形成ホルモン値を評価した。また、投与期間終了時及び回復期間終了時に剖検し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

さらに、免疫組織化学（IHC）染色によるカニクイザルの精巣及び腸管神経叢（ENP）に対する抗 rHuPH20 抗体の組織交差反応性、rHuPH20 投与カニクイザルの ENP、精巣及び精巣上体における IgG 沈着、中和抗体の内因性サル精子 PH20 との交差中和反応性並びに IHC 染色によるヒト及びサル精子 PH20 に対する抗 rHuPH20 抗体の結合性を評価した。

途中死亡は認められず、一般状態、摂餌量、体重、心電図、心拍数、血圧、呼吸数、眼科学的検査、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検及び器官重量に rHuPH20 に関連した所見は認められなかった。また、雌での月経周期、雄での精巣サイズ、精子検査所見及び黄体形成ホルモン値並びに雌雄生殖器の病理組織学的検査所見にも rHuPH20 に関連した影響は観察されなかった。病理組織学的検査では、投与期間終了時の 2 mg/kg 群の全動物並びに 0.2 mg/kg 群の雄 1/4 匹及び雌 1/4 匹の投与部位の皮下血管周囲に投与に関連した軽微なリンパ形質細胞浸潤が認められた。回復期間終了時には、2 mg/kg 群の雄 1/2 匹に軽微な皮下血管周囲のリンパ形質細胞浸潤が認められたのみであり、回復性が示された。ヒトタンパク質を皮下投与したカニクイザルでは、皮下血管周囲のリンパ形質細胞浸潤が観察されることがあるため[4]、本所見は、rHuPH20 に関連する特異的な毒性ではなく、非特異的な局所反応と考えられた。当該所見は軽微であり、カニクイザルにヒトタンパク質を投与したときの一般的な反応と考えられることから、毒性所見ではないと判断した。

血漿中ヒアルロニダーゼ活性は 2 mg/kg 群にのみ検出され、雌雄ともに Day 85 に試験期間を通して最高値に達した。その後、Day 267 では雄の値は定量下限未満となり、雌の値も Day 1 より低値であった。

抗 rHuPH20 抗体及び中和抗体の抗体価には用量反応性がみられ、いずれも投与期間を通して概ね上昇した。2 mg/kg の反復投与後の曝露量の減少は中和抗体価の上昇と相関していた。抗 rHuPH20 抗体及び中和抗体産生に関連した有害作用は認められなかった。TK 及び抗体産生の詳細な結果は 2.6.4.3.2.5 項に示した。

また、IHC 染色による評価により、抗 rHuPH20 抗体はサルの精巣と交差反応を示したが、ENP とは交差反応を示さなかった。ENP、精巣及び精巣上体への IgG 沈着の評価では、血液組織関門により、IgG はこれらの組織への分布が制限されていることが示唆された。中和抗体は、内因性サル精子 PH20 に対し交差中和反応を示した。IHC 染色による評価により、抗 rHuPH20 抗体のヒト及びサルの精子 PH20 への特異的結合が認められた。

以上より、本試験における rHuPH20 の NOAEL は最高用量の 2 mg/kg と判断した。

### 2.6.6.4 遺伝毒性試験

#### 2.6.6.4.1 IGI, 10%

IGI, 10%を用いた標準的な遺伝毒性試験は実施しなかった。ICH S6（R1）ガイドラインによると、医薬品について通常実施される遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオテクノロジー応用医薬品に対しては適切ではなく必要とされない。内因性ヒト免疫グロブリンの補充療法において遺伝毒性作用の発現は予想されない。しかし、残留溶媒及び添加物による潜在的影響を検討するため、IGI, 10%を用いて in vitro 復帰突然変異試験のみを実施した。

##### 2.6.6.4.1.1 IGI, 10%のネズミチフス菌株を用いた復帰突然変異試験

**（試験番号 [redacted]-UL-0159、添付資料番号 4.2.3.3.1-1、参考資料）**

ネズミチフス菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 及び TA1535 を用いて、1.2～100 µL/plate（0.12～10 mg/plate）の IGI, 10%を代謝活性化系（S9-mix）の存在下又は非存在下でプレート法により試験した。いずれの濃度においても毒性は認められず、被験物質の析出もみられなかった。100 µL/plate（10 mg/plate）の用量まで、閾値（対照群の変異コロニー数に対して、TA98 及び TA1535 株では 2.5 倍、TA97a、TA100 及び TA102 株では 1.67 倍）を超える突然変異頻度の増加は認められなかった。代謝活性化は試験結果に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、IGI, 10%は変異原性を示さないと考えられた。

#### 2.6.6.4.2 rHuPH20

ICH S6（R1）ガイドラインに従い、rHuPH20 を用いた遺伝毒性試験は実施しなかった。rHuPH20 などの遺伝子組換えヒトタンパク質の安全性評価では、標準的な遺伝毒性試験は一般的に必要とされない。

### 2.6.6.5 がん原性試験

#### 2.6.6.5.1 IGI, 10%

IGI, 10%を用いたがん原性試験は実施しなかった。ICH S6（R1）ガイドラインに従うと、バイオテクノロジー応用医薬品に標準的ながん原性バイオアッセイを適用することは一般的に適切ではない。IGI, 10%は内因性ヒトタンパク質（IgG）製剤であり、補充療法として使用される。IGI, 10%は細菌やウイルスなどの外来分子を標的とすることから、がん原性の懸念は生じない。ICH S6（R1）ガイドラインによると、がん原性の懸念が示唆されない場合は、がん原性試験の実施は推奨されない。また、「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について（令和 5 年 3 月 10 日薬生薬審発 0310 第 1 号）」に基づくと、内因性物質を補充療法として適用する場合、特に既に同様の医薬品で臨床経験があるような場合には、がん原性試験は一般に必要ではないとされている。免疫グロブリン製剤の臨床使用経験から、がん原性の懸念は示されていない。

#### 2.6.6.5.2 rHuPH20

rHuPH20 を用いたがん原性試験は実施しなかった。rHuPH20 は、天然型ヒアルロニダーゼの遺伝子組換えヒトタンパク質であり、間質間隙のヒアルロン酸に作用する。ICH S6（R1）ガイドラインに従うと、バイオテクノロジー応用医薬品に標準的ながん原性バイオアッセイを適用することは一般的に適切でなく、がん原性の懸念が示唆されない場合は、がん原性試験の実施は推奨されない。動物由来ヒアルロニダーゼは 60 年以上のヒトでの使用経験があるが、これまで科学的にも臨床的にもがん原性を示唆するエビデンスはない。予定臨床用量の rHuPH20 皮下投与ではヒトにおいて意味のある rHuPH20 の全身曝露を認めないと考えられること、非臨床試験で過形成、増殖又は腫瘍に関する所見が認められないこと、ヒアルロニダーゼの広範な臨床安全性プロファイルに懸念がないことから、rHuPH20 のがん原性試験の実施は必要とされない。

### 2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む）

#### 2.6.6.6.1 IGI, 10%

IGI, 10%を用いた生殖発生毒性試験及び幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。ICH S6（R1）ガイドラインに基づくと、細菌、ウイルス等の外来性分子を標的とするバイオ医薬品については、生殖発生毒性試験の実施は一般に想定されない。また、動物にヒトタンパク質を反復投与する試験では、異種タンパク質に対する抗体産生リスク及びヒトでの反応を反映しない抗原抗体反応に基づく不適合反応のリスクがある。IGI, 10%は内因性ヒトタンパク質（IgG）製剤であり、補充療法として使用され、細菌、ウイルス等の外来性分子を標的とすることから、生殖発生に影響を及ぼす懸念はないと考えられる。IGI, 10%（海外）及び他の免疫グロブリン製剤の臨床使用経験から、生殖能、妊娠又は胎児及び新生児に対する有害な影響は示唆されていない。

#### 2.6.6.6.2 rHuPH20

##### 2.6.6.6.2.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。rHuPH20 の雌雄受胎能に対する影響をカニクイザル 39 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.2 項）で検討した。月経周期、精巣サイズ、精子検査（精子濃度、運動性及び形態）、雄の黄体形成ホルモン値、剖検、器官重量（卵巣、子宮、前立腺／精嚢、精巣上体、精巣）、病理組織学的検査（卵巣、前立腺、精嚢、精巣上体、精巣、乳腺、子宮、膣）に rHuPH20 投与に関連した所見は確認されなかった。さらに、予定臨床用量において、rHuPH20 は局所に作用し、意味のある全身曝露は認められないと考えられる。したがって、予定臨床用量での rHuPH20 皮下投与がヒトの受胎能に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

##### 2.6.6.6.2.2 胚・胎児発生に関する試験

**（1）マウスにおける rHuPH20 の皮下投与胚・胎児発生用量設定試験**

**（試験番号 R07046、添付資料番号 4.2.3.5.2-1、参考資料）**

Crl:CD1(ICR)妊娠マウス（8 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液）、1、3、10 及び 30 mg/kg（110000、330000、1100000 及

び 3300000 U/kg 相当）の用量で、妊娠日（GD）6～15 に 1 日 1 回連日皮下投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。GD 18 に安楽殺した。

生死、一般状態、体重、体重増加量、剖検所見、子宮内検査所見及び胎児検査所見（体重、性別及び外表検査）を評価した。

途中死亡は認められず、一般状態に rHuPH20 に関連した所見は認められなかった。30 mg/kg 群において対照群と比較して体重増加抑制及び体重の低値が観察された。剖検では、10 及び 30 mg/kg 群のそれぞれ 1/8 及び 3/8 匹に脾臓腫大が、10 mg/kg 群では 1/8 匹の右卵巣に透明な液体で満たされた包性嚢胞が認められた。

30 mg/kg 群の母動物 4/8 匹（うち 3 匹は脾臓腫大を伴う）で胚の全吸収（吸収率 100%）が認められ、10 mg/kg 群の母動物 1/8 匹（脾臓腫大を伴う）の胚吸収率は 69%であった。対照群と比較して 30 mg/kg 群で生存胎児数及び胎児体重の低値が認められた。胎児の外表検査に rHuPH20 に関連した所見は認められなかった。1 又は 3 mg/kg 群では、母動物及び胎児に rHuPH20 投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、マウス胚・胎児発生毒性試験の用量は 0、3、9 及び 18 mg/kg が推奨された。

### （2）マウスにおける rHuPH20 の皮下投与胚・胎児発生毒性試験

**（試験番号 R08176、添付資料番号 4.2.3.5.2-2、評価資料）**

Crl:CD1(ICR)妊娠マウス（25 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）、3、9 及び 18 mg/kg（330000、990000 及び 1980000 U/kg 相当）の用量で、GD 6～15 に 1 日 1 回連日皮下投与した（主試験群）。投与容量は 5 mL/kg とした。GD 18 に安楽殺した。さらに、3、9 及び 18 mg/kg 群には TK 及び抗 rHuPH20 抗体価の評価のためサテライト群（36 匹／群）を設定した（TK 評価群）。

生死、一般状態、体重及び体重増加量、TK、抗 rHuPH20 抗体価、剖検所見、子宮内検査所見並びに胎児検査所見（体重、性別並びに外表、内臓及び骨格検査所見）を評価した。

18 mg/kg 群の主試験群及び TK 評価群の各 1 匹がそれぞれ GD 14 及び 15 に、9 mg/kg 群の主試験群の 2 匹が GD 9 及び 11 に死亡した。死亡動物に毒性所見（一般状態異常、体重増加抑制又は体重減少）は観察されず、用量依存性もなかったことから、これらの死亡は rHuPH20 投与に関連しないと考えられた。さらに、用量設定試験（2.6.6.6.2.2（1）項）では、最高用量の 30 mg/kg まで死亡は認められていない。

母動物の一般状態、体重、体重増加量及び剖検所見に rHuPH20 に関連した所見は認められなかった。

9 及び 18 mg/kg 群において、胎児体重（合算及び雌雄別）が対照群と比較して統計学的に有意に減少した。また、9 及び 18 mg/kg 群で、統計学的に有意ではないが後期吸収胚数の増加が認められ、rHuPH20 投与に関連すると考えられた。胎児の外表、内臓及び骨格検査に異常（奇形又は変異）は認められなかった。

全ての rHuPH20 投与群の GD 6 及び 15 の曝露量は用量及び時間依存的に増加した。抗 rHuPH20 抗体価測定では、GD 15 に測定した母動物（サテライト群 36 匹中 9 匹／群）の全動物で陽性であり、抗体価の範囲は類似した。抗体は主に IgG アイソタイプであった。IgG 抗体は胎盤を通過することが知られていることから[5]、胎児は抗 rHuPH20 抗体に曝露された可

能性が高い。したがって、本試験では、rHuPH20 の直接作用に加えて、母動物の抗 rHuPH20 抗体が胚・胎児発生に及ぼす影響も評価可能と判断した。TK 及び抗体産生の詳細な結果は 2.6.4.3.2.3 項に示した。

以上より、18 mg/kg までの投与で明らかな母動物毒性（一般状態、体重及び体重増加量の変化）は観察されなかったことから、母動物に対する NOAEL は 18 mg/kg と考えられた。胎児では、9 及び 18 mg/kg 群で胎児体重減少及び後期吸収胚数の増加が認められた。したがって、本試験における胚・胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。催奇形性は認められなかった。

### 2.6.6.6.2.3 出生前及び出生後の発生試験

#### （1）マウスにおける rHuPH20 の皮下投与出生前及び出生後の発生試験

**（試験番号 R09058、添付資料番号 4.2.3.5.3-1、評価資料）**

Crl:CD1(ICR)妊娠マウス（25 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）、3、6 及び 9 mg/kg（330000、660000 及び 990000 U/kg 相当）の用量で、GD 6～授乳日（LD）20 に 1 日 1 回連日皮下投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。マウスは自然分娩させた。離乳時（LD 21）に F1 出生児を 1 群雌雄各 25 匹に調整し、約 90 日齢で同群の雌雄を交配させた。

F0 母動物は、一般状態、流産、早産及び死亡、体重、妊娠期間、分娩観察所見、出産児数及び産児の生死並びに哺育行動を評価した。母動物は LD 21 に剖検した。出産しなかったマウスは GD 23 に剖検した。F1 出生児は生死、一般状態、体重、性成熟（膣開口及び包皮分離）、学習・記憶（受動的回避試験）、運動機能及び生殖能を評価した。F1 雌は GD 18 に帝王切開し、子宮内検査を実施した。F1 雄は交配後剖検し、精巣及び精巣上体重量を評価した。

F0 母動物では、6 及び 9 mg/kg 群の各 1 匹（それぞれ LD 4 及び GD 17）で死亡が認められ、9 mg/kg 群の 1 匹（GD 16）を早期安楽殺した。死亡の発現頻度は低く（1 群あたり 10%未満）、死亡は被験物質の直接の作用ではなく、異種タンパク質の反復投与に耐えられなかったためと考えられた。残るマウスは全て計画殺時まで生存した。妊娠期間及び授乳期間中の母動物の一般状態、体重及び体重増加量、分娩観察、出産児数及び産児の生死、哺育行動並びに剖検に、rHuPH20 は影響を及ぼさなかった。

F1 世代動物に、母動物への rHuPH20 投与に関連した死亡は認められなかった。死亡は対照群の雌 1 匹が生後日（PND）31 に観察されたのみであった。その他の F1 世代動物は全て計画殺時まで生存した。

F1 世代動物の一般状態、体重及び体重増加量、性成熟、学習・記憶、運動機能、剖検並びに器官重量（精巣及び精巣上体）に母動物への rHuPH20 投与に関連した所見は認められなかった。F1 世代の雌雄で評価した交配結果及び受胎能並びに子宮内検査に、統計学的又は生物学的に有意な影響は認められなかった。

以上のとおり、母動物毒性（一般毒性、分娩及び哺育）並びに F1 世代の生存及び発達（性成熟、学習・記憶、運動機能及び生殖能）に対する NOAEL はいずれも最高用量の 9 mg/kg であった。

### 2.6.6.6.2.4 幼若動物を用いた試験

#### （1）幼若マウスにおける rHuPH20 の 6 週間反復皮下投与用量設定試験

**（試験番号 13123、添付資料番号 4.2.3.5.4-1、参考資料）**

幼若 Crl:CD1(ICR)マウス（主試験群、雌雄各 8 匹／群）に rHuPH20 を PND 7～42 に 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）、1、3 及び 9 mg/kg（110000、330000 及び 990000 U/kg 相当）の用量で連日、あるいは 3 及び 9 mg/kg（330000 及び 990000 U/kg 相当）の用量で週 1 回皮下投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。さらに TK 及び抗 rHuPH20 抗体価を評価するために TK 評価群（対照群：雌雄各 9 匹、rHuPH20 連日投与群：雌雄各 39 匹／群、rHuPH20 週 1 回投与群：雌雄各 24 匹／群）及び抗体評価群（対照群：雌雄各 4 匹、rHuPH20 連日及び週 1 回投与群：雌雄各 8 匹／群）を設定した。

主試験群の動物は、抗 rHuPH20 抗体分析用試料採取前に rHuPH20 をウォッシュアウトするため rHuPH20 最終投与 2 日後（PND 44）に剖検した。抗体評価群の動物は PND 7～28 に投与した後、PND 30 に剖検した。

一般状態、体重、体重増加量、血液学的検査値、血液生化学的検査値、TK、剖検及び器官重量を評価した。また、抗 rHuPH20 抗体価、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性並びに rHuPH20 に対する中和活性を評価した。

主試験群の動物に死亡はみられなかった。抗体評価群の雄 1 匹（3 mg/kg の週 1 回投与）及び雌 1 匹（3 mg/kg の連日投与）がそれぞれ PND 7 及び PND 28 に死亡した。また、TK 評価群の雄 1 匹（3 mg/kg の連日投与）及び雌 1 匹（9 mg/kg の週 1 回投与）がそれぞれ PND 16 及び PND 21 に死亡した。発現頻度が低いこと、用量依存性がないこと及び施設の背景値の範囲内であることから、これらの死亡は rHuPH20 投与に関連しないと考えられた。rHuPH20 の連日及び週 1 回のいずれの投与でも、一般状態、血液生化学的検査、剖検及び器官重量に rHuPH20 に関連した所見は認められなかった。rHuPH20 連日投与群の雌で、用量依存的に、rHuPH20 投与に関連した体重及び体重増加量の高値が認められ、全ての用量群において対照群と比較して統計学的に有意であった。しかし、rHuPH20 連日投与群の雌における最終体重の高値は概して対照群の値と比較して 10%以内であったことから有害ではないと判断した。

溶媒対照と比較して、rHuPH20 の連日又は週 1 回投与で投与に関連した好酸球及び網状赤血球の増加が雌雄に認められたが、雌では統計学的有意差は認められず、これらの所見は有害ではないと判断した。

rHuPH20 の TK パラメータは、各群／性別／時点について 3 検体以上の定量値が得られなかったため、算出できなかった。

rHuPH20 連日投与群の PND 30 及び 44 のいずれの時点でも全例に抗 rHuPH20 抗体が産生された。週 1 回投与では、PND 30 の 3 mg/kg 群の 4/15 匹が陰性であった以外、いずれの時点でも全例に抗 rHuPH20 抗体が認められた。連日投与群の大多数の動物で、血漿 IgG の rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性が観察された。週 1 回投与群では、rMuPH20 反応性 IgG の発現率は 44～88%、rMuHyal5 反応性 IgG の発現率は 73～100%であり、rMuHyal5 反応性 IgG の発現率は rMuPH20 よりも高かった。rHuPH20 の中和活性の発現率は、週 1 回投与群よりも連日投与群で高かった。連日投与群の PND 44 の中和活性発現率は、88～94%であったのに対し、週 1 回投与群では 44～65%であった。

以上のとおり、幼若マウスに 9 mg/kg までの用量で rHuPH20 を 1 日 1 回又は週 1 回皮下投与したときの忍容性は良好であり、有害作用は認められなかった。

### （2）幼若マウスにおける rHuPH20 の 12 週間反復皮下投与忍容性試験

**（試験番号 13125、添付資料番号 4.2.3.5.4-2、参考資料）**

幼若 Crl:CD1(ICR)マウス（雌雄各 8 匹／群）に rHuPH20 を PND 7～90 に 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）、3 又は 9 mg/kg（330000 及び 990000 U/kg 相当）の用量で連日皮下投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。

体重及び一般状態を毎日観察し、PND 92 に剖検した。

群間で体重推移に差異は認められなかった。9 mg/kg 群の雄 2 匹が試験期間中に死亡した。死亡動物のうち 1 匹は PND 57 の死亡前に一般状態観察で努力性呼吸、チアノーゼ及び鼻部腫脹を認めた。もう 1 匹は PND 75 に死亡が認められるまで所見は認められなかった。一般状態観察において 9 mg/kg 群の雌 3 匹及び 3 mg/kg 群の雌 1 匹で PND 28 及び／又は 29 に活動性低下及びチアノーゼが認められたが、軽微であり、持続しなかった。剖検において明らかな所見は認められなかった。

以上のとおり、いずれの群においても rHuPH20 投与による持続性の有害作用は認められず、体重にも群間で顕著な差は認められなかった。

### （3）幼若マウスにおける rHuPH20 の 8 ヵ月間反復皮下投与毒性試験

**（試験番号 15028、添付資料番号 4.2.3.5.4-3、評価資料）**

幼若 Crl:CD1(ICR)マウスを生殖毒性評価群（雌雄各 30 匹／群）又は慢性毒性評価群（雌雄各 25 匹／群）に割り付け、それぞれ rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）又は 1 mg/kg（110000 U/kg 相当）の用量で PND 7～30 に連日皮下投与し、その後は PND 129（生殖毒性評価群）又は PND 241（慢性毒性評価群）の計画殺時まで週 1 回投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。生殖毒性評価群の動物は、PND 87 に交配を開始した。

両群の動物で、生死、一般状態、体重、体重増加量、器官重量、剖検及び病理組織学的検査所見を評価し、抗 rHuPH20 抗体価及び中和活性並びに rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性を確認した。さらに、生殖毒性評価群の動物では、離乳後の性成熟、神経行動学的検査所見、交配結果及び受胎能、卵巣及び子宮内検査所見、胎児検査所見（生死、体重及び性別並びに外表、内臓及び骨格異常）、精子検査所見（運動性、濃度及び形態）を評価した。慢性毒性評価群の動物では、眼科学的検査所見並びに血液学的検査値及び血液生化学的検査値を評価した。

生殖毒性評価群の動物では、雄は全動物が計画殺日の PND 129 まで生存した。雌では対照群の 2 匹に損傷によるとみられる片側又は両側の後肢障害が観察されたため PND 19 及び 20 に安楽殺した。また、1 mg/kg 群の雌 3 匹を死亡又は早期安楽殺した。うち雌 1 匹は一般状態悪化及び瀕死状態のため PND 60 に安楽殺した。当該動物の死因は脳に認められた空胞化と考えられた。別の雌 1 匹は PND 37 に死亡した（一般状態、体重への影響及び病理組織学的検査所見なし）。さらに 1 mg/kg 群の他の雌 1 匹は計画殺日（GD 18）に分娩した。これらの死亡及び早期分娩はいずれも rHuPH20 とは関連しないと判断した。1 mg/kg 群の一般状態、

体重／体重増加量、母動物の体重及び妊娠期間中の体重増加量に rHuPH20 に関連した影響は認められなかった。性成熟、神経行動学的検査、交配結果及び受胎能、精子検査並びに器官重量に rHuPH20 に関連した影響は認められず、卵巣又は子宮内検査、胎児検査への影響も認められなかった。また、rHuPH20 に関連した剖検及び病理組織学的検査所見は認められなかった。

慢性毒性評価群の動物では、5 匹（対照群の雌 3 匹及び 1 mg/kg 群の雄 2 匹）を死亡又は早期安楽殺した。対照群では雌 1 匹が一般状態の変化や体重への影響がなく PND 17 に死亡した。他の雌 2 匹は一般状態悪化及び瀕死状態のため安楽死させた。うち 1 匹には悪性リンパ腫が認められた。1 mg/kg 群の雄 1 匹は損傷によるとみられる後肢障害が認められたため PND 23 に安楽死させた。また、同群の雄 1 匹は一般状態悪化が観察されたため PND 113 に安楽死させた。当該動物では病理組織学的検査で悪性リンパ腫が観察され、これが死因と考えられた。これらの死亡又は早期安楽殺はいずれも rHuPH20 に関連しないと考えられた。一般状態、体重／体重増加量、眼科学的検査所見及び臨床検査値に rHuPH20 に関連した影響は認められなかった。器官重量測定では、1 mg/kg 群の雌で、統計学的に有意な脾臓重量の増加が認められ、病理組織学的検査において同群の雌で観察された脾臓造血亢進の発現頻度増加に関連していた。脾臓所見は、rHuPH20 投与部位の炎症に対する二次的反応であると考えられた[6][7][8]。雄では同様の所見は認められなかった。慢性毒性評価群の動物に他に被験物質に関連した器官重量変化は認められなかった。剖検では、rHuPH20 に関連した肉眼所見は認められなかった。病理組織学的検査では、1 mg/kg 群の雌雄で rHuPH20 に関連した軽微から中等度の投与部位反応が認められた。所見は主に皮下組織内の混合細胞浸潤であり、時折、混合細胞性炎症が観察された。細胞浸潤像は概して静止状態にあり、炎症性変化は低頻度であったこと及び表皮に所見は観察されなかったことから、これらの投与部位反応は rHuPH20 の毒性所見とはみなさなかった。

rHuPH20 を投与した全ての動物は、抗 rHuPH20 抗体を産生した。また、抗 rHuPH20 抗体の中和活性は PND 90 に 92～100%の発現頻度で認められた。rMuPH20 反応性 IgG の発現率は、生殖毒性評価群で 76～100%、慢性毒性評価群で 60～100%であった。rMuHyal5 反応性 IgG の発現率は、rMuPH20 よりも高く、生殖毒性評価群で 90～100%、慢性毒性評価群で 100%であった。

以上のとおり、雌雄幼若 Crl:CD1(ICR)マウスに rHuPH20 1 mg/kg を PND 7～30 に 1 日 1 回、その後週 1 回皮下投与した試験において、生殖毒性及び慢性毒性に関するいずれの評価項目に対しても、rHuPH20 に関連した有害所見は認められなかった。rHuPH20 を投与した全動物で抗 rHuPH20 抗体が産生され、rHuPH20 中和活性が高頻度で認められ、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性が認められた。

## 2.6.6.7 局所刺激性試験

### 2.6.6.7.1 IGI, 10%

#### 2.6.6.7.1.1 ウサギにおける IGI, 10%の静脈内、動脈内及び静脈周囲投与局所刺激性試験

（試験番号 PV0350101、添付資料番号 4.2.3.6-1、評価資料）

ニュージーランドホワイト（NZW）ウサギに 3 ロットの IGI, 10%を静脈内、動脈内又は静脈周囲投与し、局所刺激性を評価した。比較対照として各 1 ロットの GAMMAGARD S/D（注

射用水に溶解して 100 mg/mL 濃度で使用）及び Gamimune N 10%[2]（IGI, 10%と同程度に低い pH のヒト IgG 液体製剤）を同様に投与した。陰性対照群には IGI, 10%の製剤緩衝液（グリシン 0.25 mol/L 溶液）を投与した。ウサギ（雌雄各 2 匹／群）の右耳に各投与液を動脈内（10 mL）、静脈内（10 mL）又は静脈周囲（0.5 mL）投与した。また、同容量の生理食塩液を各動物の左耳に同様に投与した。

動物の行動及び投与部位について、投与後 30 分間及び投与 6 時間後までは間欠的に、その後は投与 24、48 及び 72 時間後に観察した。また、投与部位の病理組織学的検査を実施した。

観察期間中、動物の行動に異常はみられなかった。

検討した免疫グロブリン製剤は全て類似する結果を示した。一般状態観察において、静脈内投与では投与部位に所見はみられなかったが、動脈内及び静脈周囲投与では軽微な刺激性変化がみられた。病理組織学的検査において、血管内皮損傷及び／又は血管周囲の炎症が認められ、概して動脈内及び静脈周囲投与で認められた一般状態所見を反映していた。

以上より、静脈内、動脈内又は静脈周囲投与による IGI, 10%の局所忍容性は良好であり、GAMMAGARD S/D 及び Gamimune N 10%と少なくとも同程度と考えられた。

### 2.6.6.7.2 rHuPH20

rHuPH20 の局所刺激性を、カニクイザル 7 日間反復投与毒性試験の 5 mg/kg の連日静脈内及び皮下投与（2.6.6.3.2.1 項）並びに 39 週間反復投与毒性試験の 0.02、0.2 又は 2 mg/kg の週 1 回皮下投与（2.6.6.3.2.2 項）の結果に基づき評価した。カニクイザル 7 日間反復投与毒性試験では投与部位に rHuPH20 に関連した所見は認められなかった。カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験では、投与期間終了時の病理組織学的検査で投与部位の皮下血管周囲に投与に関連した軽微なリンパ形質細胞浸潤が認められた。細胞の大部分は形質細胞であり、少数のリンパ球も観察された。本所見は 2 mg/kg 群の全動物並びに 0.2 mg/kg 群の雄 1/4 匹及び雌 1/4 匹に認められた。回復期間終了時には 2 mg/kg 群の雄 1/2 匹に軽微な皮下血管周囲のリンパ形質細胞浸潤が認められたのみであり、回復性が示された。ヒトタンパク質を皮下投与したカニクイザルでは、皮下血管周囲のリンパ形質細胞浸潤が観察されることがあるため[4]、本所見は、rHuPH20 に関連する特異的な毒性ではなく、非特異的な局所反応と考えられた。当該所見は軽微であり、カニクイザルにヒトタンパク質を投与したときの一般的な反応であると考えられることから、毒性所見ではないと判断した。

マウス生殖発生毒性試験（2.6.6.6.2.2（1）、2.6.6.6.2.2（2）及び 2.6.6.6.2.3（1）項）の一般状態及び剖検所見より局所刺激性を評価した。これらの試験において 1～30 mg/kg の rHuPH20 を皮下投与した部位に、局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。

雄ウサギを用いて抗 rHuPH20 抗体の影響を検討した生殖発生毒性試験では、rHuPH20 0.76 mg/kg の反復皮下投与により投与部位の紅斑（皮膚スコア：グレード 1～3）が一過性に観察された。紅斑は 5 回目投与後に認められ、いずれの動物でも各投与後 4 日以内に消失したことから、毒性とは判断しなかった（2.6.6.8.1.1（2）項）。雌ウサギを用いて抗 rHuPH20

[2] 免疫グロブリン（ヒト）注射剤10%：Bayer Corporation USの商標であり、海外でのみ承認されている。

抗体の影響を検討した生殖発生毒性試験では、投与部位の皮膚スコアに rHuPH20 に関連した影響は認められなかった（2.6.6.8.1.1（3）項）。

### 2.6.6.7.3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用

#### 2.6.6.7.3.1 ウサギにおける IGI, 10%及び rHuPH20 の反復皮下投与局所刺激性試験

（試験番号 AU0206W01、添付資料番号 4.2.3.6-2、参考資料）

NZW ウサギに IGI, 10%を rHuPH20 との併用で反復皮下投与し、局所刺激性を検討した。

rHuPH20 を 500 U/kg（0.1 mL/kg）又は 5000 U/kg（1 mL/kg）の用量でウサギの右側腹部に皮下投与し、直後に IGI, 10%を 5 mL/kg（投与可能な最大投与容量）の投与容量で同じ針を介して投与した。7 日間間隔で 1、2 又は 3 回投与した。各投与レジメンに雌雄各 2 匹を使用した。対照群として生理食塩液（0.1 又は 1 mL/kg）を前投与し、続いて IGI, 10%（5 mL/kg）を投与する群を設定した（IGI, 10%単独群）。さらに、rHuPH20 5000 U/kg（1 mL/kg）及び生理食塩液（1 mL/kg）をそれぞれ右側腹部（rHuPH20 単独群）及び左側腹部（生理食塩液群）に投与し、直後にそれぞれ生理食塩液（5 mL/kg）を投与した。

一般状態観察では、いずれの動物にも行動に変化は認められず、投与部位に刺激性変化は認められなかった。剖検では、初回投与 24 時間後の動物に肉眼的異常は認められなかった。2 又は 3 回投与動物では、IGI, 10%単独並びに IGI, 10%及び rHuPH20 併用群の全ての動物で投与部位の皮下組織にゲル状化が観察された。これらの動物には局所リンパ節の著しい腫大も観察された。rHuPH20 単独群では、不確か（questionable）から軽度なリンパ節の腫大が認められた。病理組織学的検査では、IGI, 10%単独並びに IGI, 10%及び rHuPH20 併用群で投与部位の炎症反応（炎症性細胞浸潤）が認められた。炎症反応は反復投与により重症化した。rHuPH20 単独群では、反応は認められなかったか、軽微であった。

IGI, 10%単独並びに IGI, 10%及び rHuPH20 併用の反復投与後の炎症反応は、局所リンパ節の顕著な腫大を特徴とするヒト IgG に対するウサギの免疫応答の結果と考えられる。ヒト IgG 中にはガラクトース α1,3 残基に対する抗体が存在することから[9]、ウサギのガラクトシルエピトープに対する直接的な免疫反応及び炎症反応を生じさせた可能性がある[10]。なお、IGI, 10%製剤の低 pH（pH 4.6～5.1）による何らかの影響が炎症反応に関与している可能性が考えられたが、異なる pH（pH 4.7 及び pH 7.0）の免疫グロブリン（ヒト）注射剤 16%（IGI, 16%）を 1 週間間隔で 3 回ウサギに皮下投与した別の局所刺激性試験において、いずれの pH の IGI, 16%投与でも炎症反応が誘発されたことから[11]、pH の影響は否定されている。

#### 2.6.6.7.3.2 SCID マウスにおける IGI, 10%及び rHuPH20 の反復皮下投与局所刺激性試験

（試験番号 R09131、添付資料番号 4.2.3.6-3、参考資料）

SCID（SHO-*Prkdc*$^{scid}$*Hr*$^{hr}$）マウスに IGI, 10%を rHuPH20 と併用又は単独で反復皮下投与し、局所刺激性を検討した。SCID マウスは、外来タンパク質への免疫系の影響を除外するために選択した。

雄 SCID マウス（9 匹／群）に、（1）低 pH 緩衝液（0.1 mL/匹）投与後、直ちに生理食塩液（0.1 mL/匹）、（2）IGI, 10%（0.1 mL/匹）投与後、直ちに生理食塩液（0.1 mL/匹）、（3）100 U/匹の rHuPH20（0.1 mL/匹）投与後、直ちに生理食塩液（0.1 mL/匹）、（4）100 U/匹の rHuPH20（0.1 mL/匹）投与後、直ちに IGI, 10%（0.1 mL/匹）のいずれかを、左大腿部に Day 1、

8 及び 15 に皮下投与した。右大腿部には対照として生理食塩液（0.2 mL/匹）を皮下投与した。Day 2、9 及び 16 に 3 匹／群を安楽死させた。

投与部位の一般状態観察では、Day 2、9 及び 16 に軽微～軽度の変色が、全ての被験物質及び対照投与部位で同程度の頻度及び重症度で認められた。当該所見は投与手技に関連するものと考えられた。剖検では、投与部位又は針刺入部に、軽微から中等度の皮下の変色及び出血が、全ての群で被験物質又は対照投与部位に同様に認められた。病理組織学的検査では、Day 2、9 及び 16 の投与部位の所見は、全ての群の被験物質及び対照投与部位で概ね類似しており、明らかな所見の差は認められなかった。被験物質及び対照投与に関連した所見として、混合細胞性炎症、浮腫、皮下の出血、表皮の滲出性炎症、壊死及び潰瘍並びに皮下骨格筋の変性及び再生が認められた。鼠径リンパ節の病理組織学的検査で観察されたリンパ球低細胞性は、この系統のマウスの免疫不全状態を反映しており、群間に差は認められなかった。

以上より、被験物質に関連した有害作用は認められず、SCID マウスでは、rHuPH20 との併用の有無にかかわらず、IGI, 10%の反復皮下投与の忍容性は良好であった。

### 2.6.6.7.3.3 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下持続投与時の局所皮膚反応に対する rHuPH20 の作用

**（試験番号 11018、添付資料番号 4.2.3.6-4、参考資料）**

雌ユカタンミニブタ 9 匹にヒト IgG（10%）[3]の持続皮下投与時の局所皮膚反応に対する rHuPH20 皮下投与の作用を評価した。

溶媒対照（150 mmol/L アルギニン、20 mmol/L リン酸塩、50 mmol/L 塩化ナトリウム、0.05%ポリソルベート 80 水溶液、pH 6.5）又は rHuPH20（2240 U/匹）14 mL/匹を投与速度 2 mL/分でミニブタのそれぞれ左又は右腹部に皮下投与後、ヒト IgG（10%）300 mL/匹を投与速度 5 mL/分で同部位に持続皮下投与した。投与中の注入圧変化、局所皮膚粘弾性（柔軟性）の変化、皮膚表面温度の変化、腫脹容積及び面積、局所投与部位の皮膚スコア（紅斑、腫脹及び硬結）並びに投与部位の病理組織学的検査により、投与部位の局所皮膚反応を評価した。

圧トランスデューサーを用いて、溶媒又は rHuPH20 皮下投与時及びその後のヒト IgG（10%）持続皮下投与時の注入圧を連続的に測定した。ヒト IgG（10%）持続皮下投与時の注入圧は、溶媒投与群と比較して rHuPH20 投与群で有意に低下し（$p<0.01$）、全投与期間を通した注入圧は約 39%低下した（表 2.6.6.7-1）。

[3] Gamma Globulin Powder（BioMed Supply Inc.）10%溶液を使用した。

表 2.6.6.7-1 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下投与中の注入圧

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 溶媒又は rHuPH20 皮下投与期間(a)の注入圧（mmHg） | 33.5 ± 0.3 | 29.2 ± 0.1** |
| ヒト IgG（10%）持続皮下投与期間(b)の注入圧（mmHg） | 202.6 ± 0.5 | 123.2 ± 0.1** |
| 全投与期間(c)の注入圧（mmHg） | 184.9 ± 0.9 | 113.3 ± 0.5** |

出典：11018 試験報告書 Table 5
IgG：免疫グロブリン G、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=9
**p<0.01 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）
(a) 投与期間：0~7 分
(b) 投与期間：7~67 分
(c) 全投与期間：0~67 分

皮膚粘弾性測定装置を用いて、ヒト IgG（10%）投与前後の投与部位の皮膚粘弾性（柔軟性）を評価した。陰圧によりプローブ開口部内に吸引された皮膚の高さ（伸長）を測定し、皮膚粘弾性の指標とした。溶媒投与群と rHuPH20 投与群間で、針刺入前の皮膚粘弾性（ベースライン値）に差がないことを確認した（表 2.6.6.7-2）。ヒト IgG（10%）持続皮下投与完了後、rHuPH20 投与群の皮膚伸長は、溶媒投与群と比較して有意に高かった（p<0.05）。これらの結果から、事前の rHuPH20 皮下投与により、大量の IgG 持続皮下投与後も皮膚柔軟性が維持されることが示唆された。

表 2.6.6.7-2 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下投与前後の局所皮膚粘弾性

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| ベースライン時の皮膚伸長（mm） | 1.5 ± 0.2 | 1.4 ± 0.2 |
| ヒト IgG(10%)持続皮下投与完了後の皮膚伸長(mm) | 1.2 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1* |
| 投与前後の皮膚伸長の変化（mm） | -0.3 ± 0.2 | 0.2 ± 0.2** |

出典：11018 試験報告書 Table 6
IgG：免疫グロブリン G、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=6
*p<0.05, **p<0.01 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

赤外線体温計を用いて、ヒト IgG（10%）持続皮下投与時の投与部位の皮膚表面温度を測定し、溶媒及び rHuPH20 投与群間で比較した。ヒト IgG（10%）持続皮下投与期間の中間時点（投与開始 30 分後）及び投与終了時点（投与開始 60 分後）の投与部位の皮膚表面温度は、いずれの時点でも溶媒投与群と比較して rHuPH20 投与群で有意に高く（p<0.05）、溶媒投与群で皮膚表面温度の低下が大きかった（表 2.6.6.7-3）。

表 2.6.6.7-3 ミニブタにヒト IgG（10%）皮下投与中の局所皮膚表面温度

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 投与開始 7 分前の皮膚表面温度（℃）<br>（ベースライン時点） | 34.0 ± 0.3 | 34.1 ± 0.3 |
| ヒト IgG(10%)投与開始 30 分後の皮膚表面温度(℃)<br>［持続皮下投与期間の中間時点］ | 27.0 ± 0.4 | 28.6 ± 0.8* |
| ヒト IgG(10%)投与開始 60 分後の皮膚表面温度(℃)<br>［持続皮下投与期間の終了時点］ | 26.3 ± 0.5 | 28.1 ± 0.9* |

出典：11018 試験報告書 Table 7
IgG：免疫グロブリン G、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=9
*p<0.05 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

デジタルキャリパーを用いて、ヒト IgG（10%）持続皮下投与後の局所腫脹容積及び面積を測定した。ヒト IgG（10%）持続皮下投与後、rHuPH20 投与群の投与部位の腫脹容積及び面積は、溶媒投与群と比較してそれぞれ約 82%及び約 54%低下し、有意差が認められた（$p<0.01$）（表 2.6.6.7-4）。この結果から、ヒト IgG（10%）持続皮下投与時の rHuPH20 による明らかな拡散促進作用が示唆された。

**表 2.6.6.7-4 ミニブタにヒト IgG（10%）持続皮下投与後の局所腫脹容積及び面積**

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 腫脹容積（$mm^3$） | 326.5 ± 16.5 | 60.3 ± 21.9** |
| 腫脹面積（$mm^2$） | 169.0 ± 3.3 | 77.3 ± 16.6** |

出典：11018 試験報告書 Table 8
IgG：免疫グロブリン G、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=9
**p<0.01 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

ヒト IgG（10%）持続皮下投与後、投与部位の紅斑、腫脹及び硬結の程度を 0～4（0＝変化なし～4＝重度の変化）の 5 段階に分類した定性的スコアを用いて評価した。一次刺激指数（PII）は紅斑及び腫脹の各スコアの合計を、腫脹／硬結指数（SII）は腫脹及び硬結の各スコアの合計をそれぞれ 2 で割って算出した。ヒト IgG（10%）持続皮下投与後、rHuPH20 投与群の腫脹、硬結及び SII スコアは、溶媒投与群と比較して有意に低下した（$p<0.01$、表 2.6.6.7-5）。一方、紅斑及び PII スコアは、溶媒投与群と rHuPH20 投与群で統計学的有意差は認められなかった。

**表 2.6.6.7-5 ミニブタにヒト IgG（10%）持続皮下投与後の局所皮膚反応性スコア**

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 紅斑 | 1.1 ± 0.4 | 1.5 ± 0.3 |
| 腫脹 | 4.0 ± 0.0 | 2.1 ± 0.3** |
| 硬結 | 3.7 ± 0.1 | 1.6 ± 0.3** |
| PII | 2.5 ± 0.2 | 1.8 ± 0.3 |
| SII | 3.9 ± 0.1 | 1.8 ± 0.3** |

出典：11018 試験報告書 Table 9
IgG：免疫グロブリン G、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、PII：一次刺激指数、SII：腫脹／硬結指数
平均 ± 標準誤差、n=9
**p<0.01 vs 溶媒投与群、Wilcoxon 検定（両側、対応あり、ノンパラメトリック）

病理組織学的検査では、ヒト IgG（10%）持続皮下投与 1、4 及び 8 日後に投与部位の皮膚から 5 箇所の試料をパンチングにより採取し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色及びマッソントリクローム染色を実施した（3 匹／時点）。

溶媒及び rHuPH20 投与群の両群で、リンパ管拡張、浮腫、好中球性炎症、混合細胞浸潤、単核細胞浸潤及び出血が認められた。溶媒投与群では、rHuPH20 投与群に比べて投与 1 及び 4 日後の重症度が高かった。投与 1 日後、rHuPH20 投与群では溶媒投与群と比較してリンパ管拡張が強く、浮腫が弱かった。rHuPH20 投与群での病理組織学的所見はいずれも投与 4 日後までに溶媒投与群よりも早く回復した。rHuPH20 投与群でみられたリンパ管拡張は、投与部位での IgG 拡散促進作用に起因していると考えられる。投与 8 日後、溶媒投与群と rHuPH20 投与群で病理組織学的に違いは認められなかった。

以上の結果から、ミニブタに rHuPH20 を事前に皮下投与することにより、大量のヒト IgG（10%）持続皮下投与に伴う局所皮膚反応（腫脹／硬結、注入圧、皮膚柔軟性、皮膚表面温度及び病理組織学的変化）が軽減されることが示された。

### 2.6.6.7.3.4 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の皮膚表面血流量変化に対する rHuPH20 の作用

**（試験番号 11028、添付資料番号 4.2.3.6-5、参考資料）**

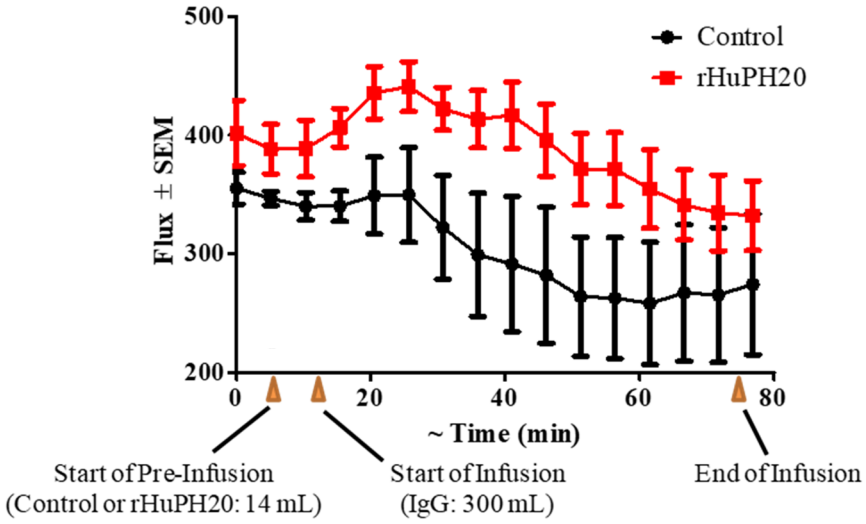
雌ユカタンミニブタ 5 匹に IGI, 10%持続皮下投与時の腫脹及び硬結による局所皮膚血流変化に対する rHuPH20 の作用を評価した。

溶媒対照（1.78 mg/mL リン酸二水素ナトリウム二水和物、0.17 mg/mL 水酸化ナトリウム、1.0 mg/mL 25%ヒトアルブミン、0.40 mg/mL 塩化カルシウム二水和物、8.5 mg/mL 塩化ナトリウム、1.0 mg/mL エデト酸二ナトリウム二水和物水溶液）又は rHuPH20（2240 U/匹）14 mL/匹を投与速度 2 mL/分でミニブタの左右腹部に皮下投与後、IGI, 10% 300 mL/匹を投与速度 5 mL/分で同部位に持続皮下投与した。IGI, 10%の大量持続投与に伴う腫脹／硬結による皮膚血流量の変化、注入圧、皮膚表面温度、腫脹容積及び面積、局所投与部位の皮膚スコア（紅斑、腫脹及び硬結）並びに病理組織学的検査所見について評価した。

皮膚微小循環血流量はレーザードップラー血流計を用いて連続的かつ非侵襲的に測定した。血流量は対象領域内の血液灌流単位（flux）として表され、flux 値が大きいほど皮膚の血液灌流量が多いことを意味する。溶媒又は rHuPH20 の投与前から IGI, 10%持続皮下投与終了までの全投与期間での投与部位の血流灌流量を 5 分ごとに測定した。

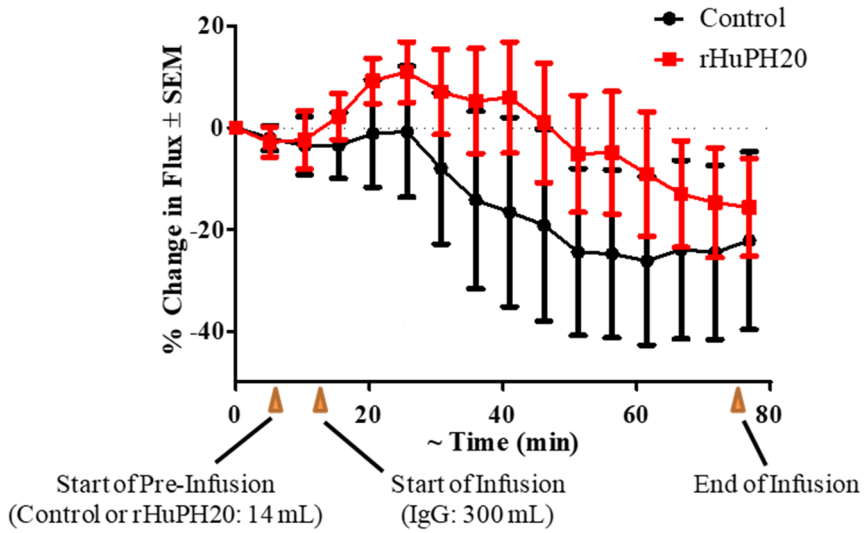
全投与期間での平均血流量は、溶媒投与群よりも rHuPH20 投与群で約 28%高値を示し（$p<0.0001$）、それぞれ 304.1 及び 388.4 flux であった（図 2.6.6.7-1）。全時点でのベースライン血流量からの変化率の平均値は、溶媒投与群と比較して rHuPH20 投与群で有意に小さく（$p<0.0001$）、それぞれ-13.42%及び-1.6%であった（図 2.6.6.7-2）。さらに、ヒストグラム解析を実施し、5 分ごとの各測定期間に測定された flux 値（0～1000）を 16 段階に区切り、最小血流灌流単位に相当する階級（0～62.5 flux）の発現数をピクセル数として算出し、経時的に示した（図 2.6.6.7-3）。全投与期間での最小血液灌流単位の平均発現数は、溶媒投与群と比較して rHuPH20 投与群で約 85%減少した（$p<0.0001$、それぞれ 269.8 及び 39.4 ピクセル）。これらの結果から、IGI, 10%の大量持続投与時の皮膚血流量の低下が rHuPH20 により軽減されたことが示唆される。

図 2.6.6.7-1　ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の皮膚血流量の変化



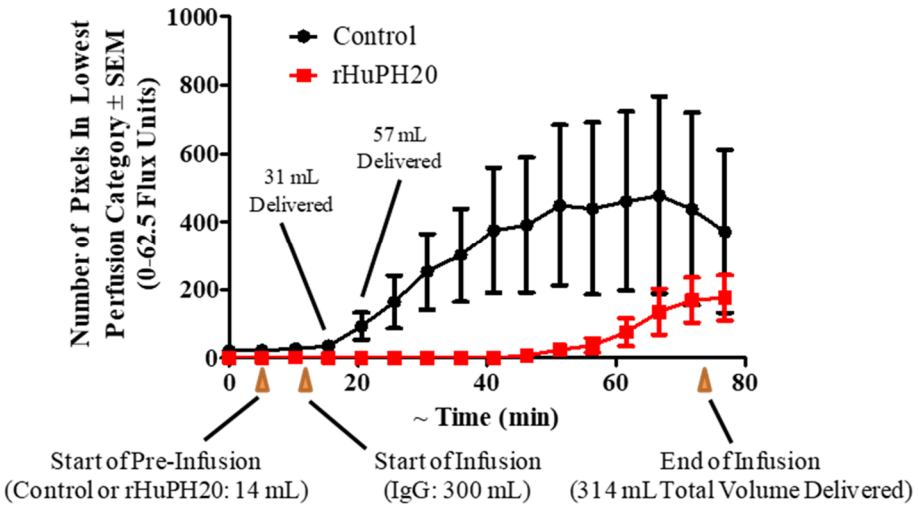

出典：11028 試験報告書 Figure 3
Flux：血液灌流単位、IgG：免疫グロブリン G、IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、SEM：標準誤差
平均 ± 標準誤差、n=5
p<0.0001、rHuPH20 投与群 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

図 2.6.6.7-2　ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の皮膚血流量の変化率




出典：11028 試験報告書 Figure 4
Flux：血液灌流単位、IgG：免疫グロブリン G、IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、SEM：標準誤差
平均 ± 標準誤差、n=5
p<0.0001、rHuPH20 投与群 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

図 2.6.6.7-3　ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与時の最小血流灌流単位の発現数




出典：11028 試験報告書 Figure 5
Flux：血液灌流単位、IgG：免疫グロブリン G、IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、SEM：標準誤差
平均 ± 標準誤差、n=5
p<0.0001、rHuPH20 投与群 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

赤外線体温計を用いて、IGI, 10%持続皮下投与時の投与部位の皮膚表面温度を測定し、溶媒及び rHuPH20 投与群間で比較した。IGI, 10%持続皮下投与期間の中間時点（投与開始 30 分後）及び投与終了時点（投与開始 60 分後）の投与部位の皮膚表面温度は、rHuPH20 投与群よりも溶媒投与群で低い傾向がみられたが、いずれの時点でも統計学的有意差は認められなかった（表 2.6.6.7-6）。

表 2.6.6.7-6　ミニブタに IGI, 10%皮下投与中の皮膚表面温度

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 投与開始 7 分前の皮膚表面温度（℃）<br>（ベースライン時点） | 34.7 ± 0.2 | 34.8 ± 0.3 |
| IGI, 10%投与開始 30 分後の皮膚表面温度（℃）<br>［持続皮下投与期間の中間時点］ | 26.7 ± 0.7 | 29.3 ± 1.3 |
| IGI, 10%投与開始 60 分後の皮膚表面温度（℃）<br>［持続皮下投与期間の終了時点］ | 27.0 ± 0.5 | 29.1 ± 1.1 |

出典：11028 試験報告書 Table 6
IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=5

圧トランスデューサーを用いて、溶媒又は rHuPH20 皮下投与及びその後の IGI, 10%持続皮下投与時の注入圧を連続的に測定した。IGI, 10%持続皮下投与時の注入圧は、溶媒投与群と比較して rHuPH20 投与群で有意に低下し（p<0.01）、全投与期間での平均注入圧は約 30%低下した（表 2.6.6.7-7）。

表 2.6.6.7-7 ミニブタに IGI, 10%皮下投与中の注入圧

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 溶媒又は rHuPH20 皮下投与期間(a)の注入圧（mmHg） | 62.0 ± 0.4 | 33.4 ± 0.2** |
| IGI, 10%持続皮下投与期間(b)の注入圧（mmHg） | 192.9 ± 0.2 | 136.2 ± 0.1** |
| 全投与期間(c)の注入圧（mmHg） | 179.2 ± 0.7 | 125.4 ± 0.5** |

出典：11028 試験報告書 Table 7
IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=5
**p<0.01 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）
(a) 投与期間：0~7 分
(b) 投与期間：7~67 分
(c) 全投与期間：0~67 分

デジタルキャリパーを用いて、IGI, 10%持続皮下投与後の局所腫脹容積及び面積を測定した。IGI, 10%持続皮下投与後、rHuPH20 投与群の投与部位の腫脹容積及び面積は、溶媒投与群と比較してそれぞれ約 90%及び約 70%低下し、有意な差が認められた（p<0.05、表 2.6.6.7-8）。

表 2.6.6.7-8 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与後の局所腫脹容積及び面積

| 評価項目 | 溶媒対照 | rHuPH20 |
|---|---|---|
| 腫脹容積（$mm^3$） | 112.3 ± 29.1 | 11.0 ± 7.1* |
| 腫脹面積（$mm^2$） | 115.9 ± 16.4 | 35.0 ± 16.9* |

出典：11028 試験報告書 Table 8
IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20
平均 ± 標準誤差、n=5
*p<0.05 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

IGI, 10%持続皮下投与後、投与部位の紅斑、腫脹及び硬結の程度を 0～4（0＝変化なし～4＝重度の変化）の 5 段階に分類した定性的スコアを用いて評価し、PII 及び SII スコアを算出した（2.6.6.7.3.3 項）。

11018 試験と同様に、IGI, 10%持続皮下投与後、rHuPH20 投与群の紅斑、腫脹、硬結、PII 及び SII スコアは、溶媒投与群と比較して明らかに低い傾向がみられたが、いずれも統計学的有意差は認められなかった（表 2.6.6.7-9）。

表 2.6.6.7-9 ミニブタに IGI, 10%持続皮下投与後の局所皮膚反応性スコアの比較

| 評価項目 | 溶媒対照(a) | rHuPH20(a) | p 値(b) |
|---|---|---|---|
| 紅斑 | 1.4 ± 0.4 | 0.4 ± 0.1 | 0.2785 |
| 腫脹 | 2.7 ± 0.3 | 0.8 ± 0.2 | 0.0625 |
| 硬結 | 2.7 ± 0.1 | 0.9 ± 0.2 | 0.0545 |
| PII | 2.1 ± 0.4 | 0.6 ± 0.2 | 0.1250 |
| SII | 2.7 ± 0.2 | 0.9 ± 0.2 | 0.0625 |

出典：11028 試験報告書 Table 9
IGI, 10%：免疫グロブリン（ヒト）注射剤 10%、PII：一次刺激指数、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、SII：腫脹／硬結指数
(a)平均 ± 標準誤差、n=5
(b) rHuPH20 vs 溶媒投与群、t 検定（両側、対応あり、パラメトリック）

病理組織学的検査では、IGI, 10%持続皮下投与 1 及び 4 日後に（それぞれ n=2 及び n=3）、投与部位の皮膚から 5 箇所の試料をパンチングにより採取し、HE 染色及びマッソントリクローム染色を実施した。

溶媒及び rHuPH20 投与群の両群で、リンパ管拡張、浮腫、好中球性炎症並びにマクロファージ及び／又は単核細胞浸潤が認められた。投与 1 日後、rHuPH20 投与群では溶媒投与群と比較してリンパ管拡張の発現頻度及び重症度が高かったが、浮腫の発現頻度及び重症度は両群間で同程度であった。投与 4 日後、両群でリンパ管拡張及び浮腫が認められたが、炎症は完全に消失した。溶媒及び rHuPH20 投与群の平均重症度スコア（各投与群での全所見の重症度の合算を n=5 で割って算出）は、投与 1 日後と比較して投与 4 日後でそれぞれ約 24%及び約 66%低下し、rHuPH20 投与群はより速やかな回復を示した。

以上の結果から、ミニブタに rHuPH20 を事前に皮下投与することにより、IGI, 10%の大量持続皮下投与に伴う局所皮膚反応（腫脹／硬結、注入圧及び病理組織学的変化）が軽減されることが示された。レーザードップラー血流解析では、rHuPH20 の事前皮下投与により、IGI, 10%の大量持続皮下投与時も皮膚血流量は維持されることが示された。また、rHuPH20 投与群と比較して、溶媒投与群の皮膚表面温度が低い傾向が認められたのは、IGI, 10%の拡散性及び血流量の低下に関係していると考えられた。

## 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抗 rHuPH20 抗体の評価

**（1）ウサギにおける 3 種類の免疫感作後の抗 rHuPH20 抗体反応の検討**

**（試験番号 12124、添付資料番号 4.2.3.7.7-1、参考資料）**

雌雄 NZW ウサギに rHuPH20 を皮下又は筋肉内投与し、血漿中抗 rHuPH20 抗体の発現率、経時変化及び抗体価を評価した。

NZW ウサギに、以下の 3 種類の投与レジメンで投与した。

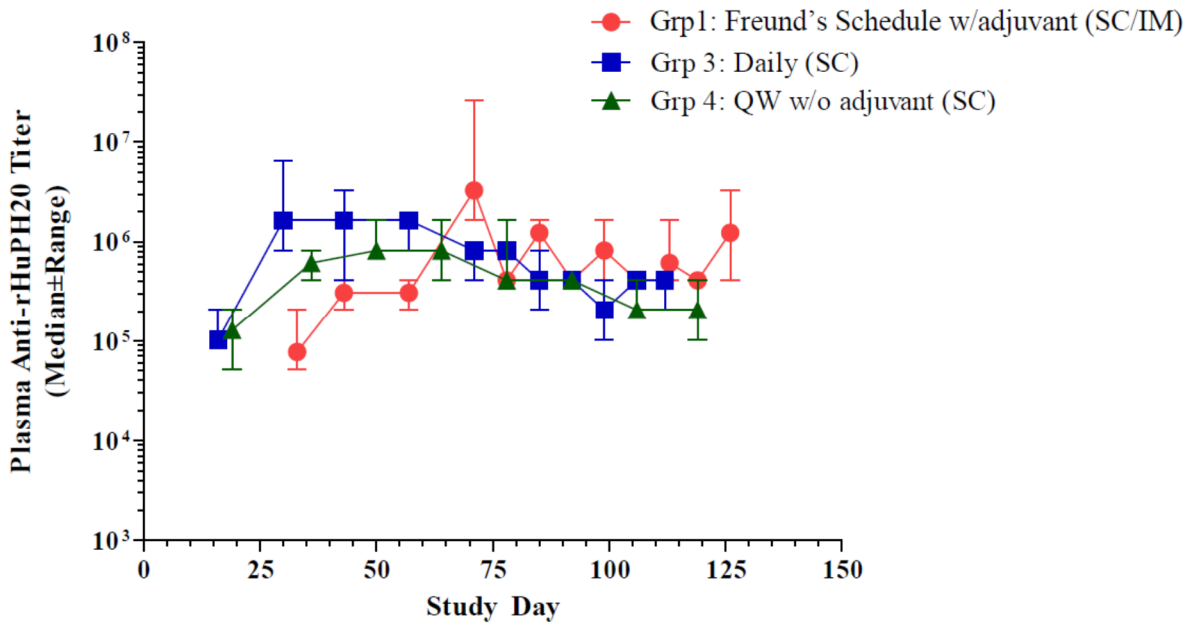
- ✓ 雌 4 匹に Day 1 に完全フロイントアジュバントと 1:1 で乳化させた rHuPH20（1 mg/mL）を 100 µL ずつ 4 カ所（計 0.2 mg、22000 U 相当）に皮下投与し、Day 8、22、36 及び 57 に不完全フロイントアジュバントと 1：1 で乳化させた rHuPH20 を 50 µL ずつ 4 カ所（計 0.1 mg、11000 U 相当）に筋肉内投与した（第 1 群）。
- ✓ 雌 5 匹にアジュバントを含まない rHuPH20 を 1 日 1 回 0.76 mg/kg の用量で 28 日間皮下投与し、Day 43 に追加投与した（Day 16 の血液採取前のウォッシュアウト期間確保のため Day 15 は投与せず）（第 3 群）。対照として、雌 2 匹に溶媒（10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）を同様に投与した（第 2 群）。
- ✓ 雌 5 匹にアジュバントを含まない rHuPH20 を週 1 回 0.76 mg/kg の用量で、5 週間皮下投与し、Day 50 に追加投与した（第 4 群）。さらに、雄 2 匹に同様に投与した（第 5 群）。

第 5 群の雄から採取した血漿試料は分析せず、雌のみ評価した。

rHuPH20 を投与した全ての雌（第 1、3 及び 4 群）で、Day 33 までに抗 rHuPH20 抗体価の上昇が認められた（図 2.6.6.8-1）。対照群（第 2 群）に抗 rHuPH20 抗体価の上昇は認められなかった。第 3 群（rHuPH20 連日投与）では Day 30 に抗体価が最大値に達し、Day 57 まで

持続した。第 4 群（rHuPH20 週 1 回投与）は同様の経時変化を示し、抗 rHuPH20 抗体価は Day 50～64 に最大値を示した。アジュバントを使用した第 1 群の抗 rHuPH20 抗体価の上昇は遅延したが、Day 71 に認められた抗体価の最大値は第 3 群及び第 4 群と同程度であった。

図 2.6.6.8-1　第 1、3 及び 4 群の抗 rHuPH20 抗体価




出典：12124 試験報告書 Figure 2
Grp：群、IM：筋肉内、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、QW：週 1 回、SC：皮下

第 4 群の雌の血漿中抗体の結合特性評価により、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検討した。1 時点の 1 匹を除く全ての血漿試料が rRbPH20 交差反応性 IgG 陽性であり、in vitro 結合特性評価の結果は、抗 rHuPH20 抗体が高比率で rRbPH20 に対して交差反応することを示した。

以上より、本試験において、連日又は週 1 回のいずれの皮下投与でも雌 NZW ウサギに高い抗 rHuPH20 抗体価が持続的に認められた。また、抗 rHuPH20 抗体は in vitro で rRbPH20 に結合し、交差反応性の発現率が高かった（80%以上）ことから抗 rHuPH20 抗体の影響の検討に NZW ウサギを用いることの適切性が示された。

### （2）雄ウサギにおける rHuPH20 の受胎能試験での抗 rHuPH20 抗体の影響

**（試験番号 12208、添付資料番号 4.2.3.7.7-2、評価資料）**

雄 NZW ウサギに rHuPH20 を皮下投与し、抗 rHuPH20 抗体の受胎能への影響を検討した。

雄ウサギ（22 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）及び 0.76 mg/kg（83600 U/kg 相当）の用量で、Day 1、8、15、22、29 及び 43（交配前）並びに Day 57 に皮下投与し、Day 44 に非投与雌ウサギと交配させた。

生死、皮膚スコア（グレード 1～3）を含む一般状態観察、体重及び摂餌量測定、交尾行動評価、精子検査（運動性、精子数及び精子形態）並びに雄の抗体評価（抗 rHuPH20 抗体価、

rRbPH20 に対する交差反応性及び rHuPH20 に対する中和活性）を実施した。非投与雌は GD 18 に剖検し、子宮内検査を実施した。雄は Day 85 に剖検し、生殖器重量を測定した。

rHuPH20 投与雄の全動物で抗 rHuPH20 抗体が Day 8 までに陽性となり、剖検時（Day 85）まで維持された。抗体価は Day 8～29 にかけて上昇し、Day 29～85 では 819200（中央値）以上で維持された。抗 rHuPH20 抗体の rRbPH20 に対する交差反応性は、Day 15 で最初に認められ、その後 Day 29 までに 100%の発現率に達した。rRbPH20 に対する交差反応性の発現率は Day 29～85 まで 90%以上を維持した。rHuPH20 に対する中和活性も、交配前日の rHuPH20 投与雄の大多数（82%）で検出された。

rHuPH20 投与雄と交配させた非投与雌 1 匹が GD 8 に死亡した。死因は特定されていないが、雌に rHuPH20 を投与していないことから投与との関連性はないと判断した。

rHuPH20 投与雄における投与に関連した唯一の所見は、投与部位の紅斑であった。グレード 1、2 及び 3 の紅斑が rHuPH20 投与雄 22 匹中それぞれ 12、4 及び 1 匹に観察された。紅斑は 5 回目投与後に認められ、いずれの動物でも各投与後 4 日以内に消失したことから、毒性とは判断しなかった。一般状態観察でその他の所見は認められず、体重及び体重増加量並びに摂餌量に rHuPH20 に関連した変化は認められなかった。

rHuPH20 投与雄の精子検査、剖検時体重、生殖器重量及び生殖器を含むいずれの器官の剖検所見にも抗 rHuPH20 抗体の影響は認められなかった。

雄の交尾率は、対照群で 20/22（90.9%）、rHuPH20 投与群で 21/22（95.4%）であった。雄の受胎率は、対照及び rHuPH20 投与群でそれぞれ 17/20（85.0%）及び 21/21（100%）であった。これらの差は統計学的に有意ではなかった。黄体数、着床数、生存／死亡胎児数、着床前／着床後胚死亡率など、交配した雌の子宮内検査にも統計学的有意差は認められなかった。

以上のとおり、rHuPH20 投与雄では、交配前及び交配中に持続的な抗 rHuPH20 抗体価が認められ、剖検時まで維持された。抗 rHuPH20 抗体は rRbPH20 と交差反応を示したことから、雄の生殖能に対する抗 rHuPH20 抗体の潜在的影響が NZW ウサギモデルで適切に評価されていることが裏付けられた。抗 rHuPH20 抗体は rHuPH20 に対する中和活性を示した。精子検査及び交配した雌での子宮内検査に生物学的に意義ある影響が認められなかったことから、交配前の抗 rHuPH20 抗体への持続的曝露は、雄の生殖能、交尾行動及び受胎能に影響を及ぼさないと判断した。

### （3）雌ウサギにおける rHuPH20 の出生後の評価を含む受胎能及び胚・胎児発生毒性試験での抗 rHuPH20 抗体の影響

**（試験番号 12195、添付資料番号 4.2.3.7.7-3、評価資料）**

雌 NZW ウサギに rHuPH20 を皮下投与し、抗 rHuPH20 抗体の交配結果及び受胎能、胚・胎児発生並びに出生児の発達への影響を評価した。

雌ウサギ（44 匹／群）に rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）及び 0.76 mg/kg（83600 U/kg 相当）の用量で Day 1、8、15、22、29 及び 42（交配前）に皮下投与した。雌ウサギは Day 44 に非投与雄ウサギと交配させ、GD 15 に rHuPH20 を追加投与した。各群 44 匹の雌ウサギを帝王切開又は自然分娩コホートに均等に割り付けた。

試験期間中、母動物及び出生児の抗 rHuPH20 抗体価を経時的に測定した。また、各コホートあたり 3 匹／時点の雌ウサギを追加し、GD 20 及び PND 4 の母動物及び胎児／出生児の抗 rHuPH20 抗体価を測定した。さらに、rRbPH20 に対する交差反応性を評価した。母動物における rHuPH20 に対する中和活性を評価し、母動物並びに胎児及び出生児における rRbPH20 の中和活性を評価した。

帝王切開コホート（22 匹／コホート）のウサギについて、GD 29 に子宮内検査及び胎児検査を実施した。母動物の健康状態は、一般状態、体重及び体重増加量、摂餌量並びに皮膚スコアにより評価した。子宮内検査では、黄体数、着床数、生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数並びに着床前及び着床後胚死亡数を評価した。F1 胎児検査では、胎児の生死確認、体重測定、性別評価並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査を実施した。

自然分娩コホート（22 匹／コホート）のウサギについて、分娩、哺育行動並びに出生児の離乳時（PND 29）までの生存、成長及び発達を評価した。母動物の健康状態は、一般状態、体重及び体重増加量、摂餌量、皮膚スコア並びに分娩後の哺育行動により評価した。離乳前の F1 出生児は、生死、一般状態、体重及び発達検査（発毛、開眼、空中立ち直り反射、聴覚驚愕反射及び瞳孔反射）により評価した。離乳後、各同腹児から可能な限り雌雄各 1 匹を無作為に選択し、体重及び体重増加量、摂餌量、性成熟、神経行動学的検査所見並びに受胎能及び交配結果を評価した。

抗体評価では、rHuPH20 投与 F0 雌では、Day 15 までに全動物の全身循環血中に抗 rHuPH20 結合抗体が認められた。抗体価は、交配前の Day 8～29 にかけて上昇し、Day 29～GD 29 に高い抗体価（各測定時点の中央値：3276800）が維持された。母動物の抗体価はその後徐々に低下し、離乳時（LD 29）の中央値は 409600 であった。GD 20 の母動物の抗 rHuPH20 抗体価は 204800～3276800 の範囲であった。GD 20 の胎児の抗体価は 204800 であり、妊娠期間中の明らかな抗 rHuPH20 抗体の胎盤移行が示された。

F1 世代では、LD 4～PND 62 の抗 rHuPH20 抗体陽性の出生児の割合が 100%であり、抗 rHuPH20 抗体への曝露が示された。その後、陽性動物の発現頻度は徐々に低下し、交配日（PND 152 付近）には 58%となり、試験終了時まで継続して低下した。F1 世代の抗体価は出生直後の LD 4（中央値：3276800）に最高値が認められ、その後、試験終了時まで徐々に低下した。

抗 rHuPH20 抗体の rRbPH20 に対する交差反応性は、F0 母動物では Day 15 に初めて出現し、Day 22～GD 29 まで 80%以上の比率で認められ、Day 42（交配前）では 100%であった。F1 世代でも、rRbPH20 に対する交差反応性が認められ、LD 4 では 100%の発現率であった。

母動物では、大部分のウサギ（> 75%）に rHuPH20 に対する中和活性が認められた。同様に、大部分のウサギ（≥ 60%）に rRbPH20 に対する交差中和活性が認められた。F1 世代では、LD 4 で rRbPH20 に対する交差中和活性が少数（30%）で検出された。

帝王切開コホート及び自然分娩コホートのいずれにも、rHuPH20 に直接起因する死亡はなかった。対照群では、雌 1 匹を GD 22 に流産により早期安楽殺し、雌 1 匹が GD 31 に死亡した。rHuPH20 投与群では、自然分娩コホートの雌 1 匹が Day 9（投与期間中、交配前）に死亡した。当該動物の死亡は、観察された一般状態所見からヒトタンパク質投与による脱水又は過敏症に関連する可能性が高いと考えられた。

生存動物の一般状態、皮膚スコア、体重及び体重増加量並びに摂餌量に rHuPH20 投与の影響は認められなかった。F0 母動物の剖検所見に rHuPH20 投与の影響は認められなかった。

交尾行動及び受胎能は対照群及び rHuPH20 投与群で類似していた。

帝王切開コホートに割り付けられた雌の子宮内検査所見及び胎児検査所見に rHuPH20 投与の影響はみられなかった。

自然分娩コホートに割り付けられた雌の分娩、哺育行動及び離乳前の出生児の評価に rHuPH20 投与の影響はみられなかった。

離乳後の F1 世代では、rHuPH20 投与群の雌 1 匹で PND 69 に死亡が認められた以外、全ての動物が計画殺時まで生存した。明らかな死因は特定できなかったが、1 匹のみの死亡のため抗 rHuPH20 抗体との関連はないと判断した。抗 rHuPH20 抗体は、F1 世代の一般状態、体重及び体重増加量、摂餌量、性成熟、神経行動学的検査並びに受胎能及び交配結果に影響を及ぼさなかった。

以上のとおり、交配前及び妊娠期間を通じて母動物に抗 rHuPH20 抗体が認められたが、交配結果及び受胎能に抗 rHuPH20 抗体の影響はみられなかった。妊娠期間中に胎児に移行した母動物の抗 rHuPH20 抗体は少なくとも生後 3 ヵ月齢まで持続したが、胎児発生及び出生後の発達に影響を及ぼさなかった。

### （4）マウスにおける rHuPH20 の出生前及び出生後の発生試験での抗 rHuPH20 抗体の影響

**（試験番号 12096、添付資料番号 4.2.3.7.7-4、参考資料）**

本試験は、先に実施したマウス PPND 試験（2.6.6.6.2.3（1）項）における F0 母動物及び F1 世代の循環血中抗 rHuPH20 抗体の存在を確認するための補足試験として実施した。

Crl:CD1(ICR)妊娠マウスに rHuPH20 を 0（溶媒：10 mmol/L ヒスチジン、130 mmol/L 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.5）、3、6 及び 9 mg/kg（330000、660000 及び 990000 U/kg 相当）の用量で GD 6 から 1 日 1 回連日皮下投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。各群の動物をさらに 4 つのサブセットに分け、サブセット 2 の動物はさらに 3 つのサブグループに均等に割り付けた。群別動物数並びにサブセット／サブグループの投与期間及び抗 rHuPH20 抗体測定日をそれぞれ表 2.6.6.8-1 及び表 2.6.6.8-2 に示す。

**表 2.6.6.8-1　rHuPH20 のマウス PPND 試験（抗 rHuPH20 抗体の影響）の試験デザイン（用量及び動物数）**

| 群 | 用量 | 動物数 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | (mg/kg) | サブセット 1 | サブセット 2(a) | サブセット 3 | サブセット 4 |
| 1 | 0 | 6 | 9 | 3 | 3 |
| 2 | 3 | 12 | 18 | 6 | 6 |
| 3 | 6 | 12 | 18 | 6 | 6 |
| 4 | 9 | 12 | 18 | 6 | 6 |

出典：12096 試験報告書 Text Table 1
(a)サブセット 2 の動物は 3 つのサブグループに均等に割り付けた。

表 2.6.6.8-2　rHuPH20 のマウス PPND 試験（抗 rHuPH20 抗体の影響）の試験デザイン（投与期間及び抗 rHuPH20 抗体測定日）

| サブセット | サブグループ | 投与期間 | 抗 rHuPH20 抗体測定日 | |
|---|---|---|---|---|
| | | | 母動物 | F1 胎児／児動物 |
| 1 | NA | GD 6～GD 16 | GD 18 | GD 18 |
| 2 | A | GD 6～LD 4 | LD 6 | PND 6 |
| | B | GD 6～LD 13 | LD 15 | PND 15 |
| | C | GD 6～LD 21 | LD 23 | PND 23 |
| 3 | NA | GD 6～LD 21 | LD 23 | PND 30 又は PND 60 |
| 4 | NA | GD 6～GD 18 | NA | NA |

出典：12096 試験報告書 Text Table 4、Text Table 5 及び Text Table 6
GD：妊娠日、LD：授乳日、NA：該当なし、PND：生後日

サブセット 1、2 及び 3 の F0 母動物及び F1 世代の血漿試料を用いて、抗 rHuPH20 抗体を測定した。さらに、抗 rHuPH20 抗体陽性血漿試料について、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性を評価した。また、サブセット 4 では GD 18 の F0 母動物及び F1 胎児で、サブセット 3 では LD 21 の F0 母動物及び F1 児動物で、母動物への投与 2 時間後の血漿中ヒアルロニダーゼ活性を測定した。

その他、F0 母動物及び F1 世代の生死、一般状態、体重及び剖検所見並びに F0 母動物の分娩所見を評価した。

rHuPH20 を投与した全母動物で GD 18 までに抗 rHuPH20 抗体価が検出され、LD 23 まで抗体価は上昇した。母動物の抗 rHuPH20 抗体価と rHuPH20 の用量に有意な相関は認められなかった（ノンパラメトリックスピアマンの相関係数、$p = 0.3313$）ことから本試験の用量範囲での F0 母動物の抗体産生は同程度であることが示された。

GD 18 の rHuPH20 投与群の胎児のプール血漿に抗 rHuPH20 抗体価が認められ、妊娠後期における明らかな抗 rHuPH20 抗体の胎盤移行が示された。PND 6 の児動物のプール血漿の抗体価は上昇し、PND 15 の児動物で最高値を認めた。抗体価は離乳時（PND 23）まで高値を維持し、哺乳により乳汁中抗 rHuPH20 抗体が移行するという予測に一致した。

離乳（LD 23）後は母動物から児動物への更なる移行がないにもかかわらず、抗 rHuPH20 抗体価が PND 30 に検出され、PND 60 まで維持された。これは免疫グロブリンの全身循環からのクリアランスが遅いことと一致していた。

rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性の発現率は、母動物の GD 18 ではいずれも 65%を超え、LD 6～LD 23 では 100%であった。また、rMuPH20 及び rMuHyal5 に対する交差反応性の発現率は、GD 18 の胎児ではそれぞれ 10%及び 50%であり、PND 23 の出生児ではいずれも 100%に達し、その後 PND 60 まで一貫して検出された。

血漿中ヒアルロニダーゼ活性は、胎児又は児動物と比較して母動物で、また、9 mg/kg 群では、より低用量群と比較して高頻度に検出された。しかし、大部分は定量下限未満（< 0.625 U/mL）であった。

F0 母動物及び F1 世代の生死、一般状態、体重及び剖検所見、F0 母動物の分娩所見に rHuPH20 投与の影響はみられなかった。この結果は PPND 試験（2.6.6.6.2.3（1）項）の結果と類似していた。

以上より、本試験における抗 rHuPH20 抗体の分析結果と先の PPND 試験における神経学的及び生殖能の発達の評価結果を統合すると、母動物への rHuPH20 投与により妊娠後期から成

熟期までの全段階にわたり F1 世代は抗 rHuPH20 抗体に曝露されるが、抗 rHuPH20 抗体は F1 世代の成長、神経学的発達、性成熟、生殖能又は交配結果に有害な影響を及ぼさないと考えられる。

### 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抗 rHuPH20 抗体の正常ウサギ組織に対する交差反応性

**（試験番号 12124-SR、添付資料番号 4.2.3.7.7-5、参考資料）**

3 種類の免疫感作条件により産生されたウサギ抗 rHuPH20 抗体のウサギ正常組織に対する交差反応性を評価した。

雌 NZW ウサギに 3 種類の投与レジメンのいずれかで rHuPH20 を投与し（2.6.6.8.1.1（1）項）、産生された抗 rHuPH20 抗体をビオチン標識した。同標識抗体を用いて、正常ウサギ組織（雄 2 又は 3 匹）に対する結合特性を、免疫蛍光標識（精子、精巣及び結腸 ENP）及び IHC 染色（精巣及び結腸 ENP）により評価した。IHC 染色法については、異なる 2 つの手法（ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを用いた IHC 染色法 1 及びアビジン-ビオチン複合体を用いた IHC 染色法 2）を比較した。

免疫蛍光標識法では、いずれの投与レジメンでもウサギ抗 rHuPH20 抗体はウサギ精子及び精巣に結合したが、ENP に対する結合は弱かった。

精巣の IHC 染色では、IHC 染色法 1 及び 2 のいずれでも生殖細胞及び精細管内の精子に限局した染色が認められ、投与レジメンに関わらずウサギ抗 rHuPH20 抗体はウサギ精巣に結合することが確認された。

ENP の IHC 染色では、IHC 染色法 1 を用いた場合、アジュバントを用いた感作条件で産生されたウサギ抗 rHuPH20 抗体のみで染色が認められ、アジュバントを用いない感作条件で得られたウサギ抗 rHuPH20 抗体では染色が認められなかった。一方、IHC 染色法 2 を用いた場合、アジュバントの有無に関わらず、3 種類の投与レジメンで感作したウサギで産生された抗 rHuPH20 抗体では、いずれも ENP に弱い染色が認められたが、灰色で不明瞭であり、細胞質にびまん性に認められた。さらに、rHuPH20 又はウサギ IgG で吸着処理したウサギ抗 rHuPH20 抗体では部分的な染色が同様に認められたことから、ENP の染色は非特異的であることが示唆された。

以上の結果から、rHuPH20 投与レジメンに関わらず、ウサギ抗 rHuPH20 抗体は精子及び精巣組織のウサギ PH20 に特異的に結合することが示された。一方、ウサギ抗 rHuPH20 抗体のウサギ ENP に対する結合は、非特異的であると考えられた。

#### （2）ウサギ抗 rHuPH20 抗体の正常ヒト組織に対する交差反応性

**（試験番号 12058、添付資料番号 4.2.3.7.7-6、参考資料）**

ヒト組織での PH20 発現分布を評価するため、42 種類のヒト組織（各組織につき男女ドナー各 3 例）に対するアフィニティー精製ウサギ抗 rHuPH20 抗体の結合を IHC 染色法により評価した。

ウサギ抗 rHuPH20 抗体の特異的で強い染色が精巣の精細管のみで認められた。その染色は、精子形成後期の精上皮細胞の細胞質に特異的であり、細胞膜周辺で特に強かった。また、結

腸（男性 2/3 例、女性 1/3 例）及び食道（女性 1/3 例）の筋層内 ENP に特異的で弱い染色が認められた。これらの組織での染色は細胞質に限定的であり、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可能性は低く、ENP で認められた弱い染色に臨床的意義は低いと考えられる。女性生殖器を含むその他の組織ではいずれも特異的な染色は認められなかった。

**（3）ヒト抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体の正常ヒト組織に対する交差反応性**

**（試験番号 13086、添付資料番号 4.2.3.7.7-7、評価資料）**

ビオチン標識したヒト血漿由来抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体の正常ヒト組織に対する交差反応性を評価した。

ヒト抗 PH20 抗体は未治療の健康被験者 1 例（GP64PR12018 試験）の血漿から、rHuPH20 投与により生じたヒト抗 rHuPH20 抗体は PID 患者 2 例（第 III 相 160603／160902 試験）の血漿からそれぞれ精製し、ビオチン標識した。評価組織として、ヒト組織を用いた 12058 試験（2.6.6.8.1.2（2）項）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。正常ヒト組織（精巣：男性 3 例、結腸及び心臓：男女各 3 例）に対するビオチン標識ヒト抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体（いずれも 2.5 及び 5 µg/mL）の結合を IHC 染色法により評価した。

全てのビオチン標識ヒト抗体は、いずれの濃度でもヒト精巣内の精子形成細胞の細胞質に染色性を示した。結腸及び心臓でも全てのビオチン標識ヒト抗体による染色が認められたが、その染色性は弱く、不明瞭であり、低濃度では染色されなかっ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。

以上より、ヒト抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体はヒト精巣の精子形成細胞に特異的に結合することが示された。

### 2.6.6.8.1.3 遺伝子発現解析

**（1）マウスの胎児、幼若動物及び成体組織での Spam1/PH20 及び Hyal5 発現（RT-qPCR 法）**

**（試験番号 12196、添付資料番号 4.2.3.7.7-8、参考資料）**

マウス Spam1/PH20 及びヒアルロニダーゼ 5（Hyal5）は、ヒアルロニダーゼをコードする遺伝子であり、主に精巣及び精巣上体で mRNA が発現している[12][13][14]。本試験では、遺伝的背景が異なる 3 系統（C57Bl/6、CD-1 及び ICR balb/c）のマウス胎児（胎生 7～18 日）及び幼若マウス（生後 1 日～3 週齢）の精巣及び脳、成体マウス（1～6 ヵ月齢）の各組織並びに初代マウス培養細胞（オリゴデンドロサイト前駆細胞）を用いて、マウス Spam1/PH20 及び Hyal5 の発現プロファイルを RT-qPCR 法により評価した。

成体マウスの精巣及び精巣上体では、Spam1/PH20 及び Hyal5 の発現が認められ、両遺伝子とも精巣の方が約 250～350 倍高い発現を示した。雌性生殖器では、卵巣で Spam1/PH20 の発現が認められたが（精巣の約 1/2000）、子宮頸部、子宮及び膣では認められなかった。Hyal5 の発現はいずれの雌性生殖器でも認められなかった。ヒトで低い発現が認められている骨格筋（2.6.6.8.1.3（6）項）を含むその他の組織では、いずれも Spam1/PH20 の発現は認められ

なかった。Hyal5 は皮膚の 1/4 例でのみ低い発現が認められた。脳皮質及び脳梁ではいずれの遺伝子とも発現は認められなかった。

胚発生期（胎生 7～18 日）での Spam1/PH20 の発現は、成体マウスとは対照的にいずれの発生段階でも認められなかった。一方、Hyal5 の発現は胎生 16 日以降、胎生 18 日まで顕著に増加した。精巣発生期（生後 1 日～3 週齢）での Spam1/PH20 及び Hyal5 の発現は生後 7 日では認められなかったが、生後 14 日では 1/2 例で低い発現が認められ、その発現は生後 3 週までに顕著に増加した。生後 1～7 日での脳梁の Spam1/PH20 発現を検討した結果、いずれの時点でも Spam1/PH20 の発現は認められなかった。また、マウス初代培養オリゴデンドロサイト前駆細胞でも Spam1/PH20 の発現は検出されなかった。

以上より、マウス Spam1/PH20 及び Hyal5 は主に精巣で生後 2～3 週から発現し、両遺伝子は精巣上体でも発現した。卵巣では Spam1/PH20 の低い発現が認められ、皮膚では Hyal5 の低い発現が認められた。これまでの報告[15][16]とは異なり、子宮、膣及び脳梁ではマウス Spam1/PH20 の発現は認められなかった。

### （2）マウス脳梁での Spam1/PH20 発現（RT-PCR 法）

**（試験番号 12210、添付資料番号 4.2.3.7.7-9、参考資料）**

マウス脳梁で Spam1/PH20 の発現が報告されているため[15]、マウスの脳梁及び脳皮質での Spam1/PH20 の発現を検討した。

遺伝的背景が異なる 3 系統（C57Bl/6、NU/NU 及び SCID）のマウス（17～19 週齢、各系統雄 1 匹）の脳梁、脳皮質及び精巣での Spam1/PH20 の発現を RT-PCR 法により評価した。

いずれの系統のマウスでも、精巣で Spam1/PH20 の発現が認められたが、脳梁及び脳皮質では Spam1/PH20 の発現は認められなかった。

### （3）ウサギ組織での Spam1/PH20 発現（RT-qPCR 法）

**（試験番号 13091、添付資料番号 4.2.3.7.7-10、参考資料）**

NZW ウサギ（5 ヵ月齢、雌雄各 3 匹）の結腸の ENP、脳梁、脳皮質及び精巣（雄のみ）での Spam1/PH20 の発現を RT-qPCR 法により評価した。

全ての動物の精巣で Spam1/PH20 の高い発現が認められたが、ENP、脳梁及び脳皮質ではいずれも発現は認められなかった。

### （4）ウサギの胎児、幼若動物及び成体組織での Spam1/PH20 発現（RT-qPCR 法）

**（試験番号 13116、添付資料番号 4.2.3.7.7-11、参考資料）**

NZW ウサギの胎児、幼若動物及び成体組織での Spam1/PH20 発現プロファイルを RT-qPCR 法により評価した。

成体ウサギ（5 ヵ月～1 歳齢）の各組織を用いて検討した結果、Spam1/PH20 の発現は精巣のみで認められた。

幼若ウサギ（1～4 ヵ月齢）での Spam1/PH20 発現を検討した。精巣及び精巣上体での Spam1/PH20 発現は、1 及び 2 ヵ月齢では検出されなかったが、精巣では 3 ヵ月齢から、精巣上体では 4 ヵ月齢からそれぞれ発現が認められた。精巣での Spam1/PH20 発現は、3 ヵ月齢では低かったが、4 ヵ月齢までには 5 ヵ月齢の成体ウサギでの発現と同程度にまで増加した。

精巣上体での Spam1/PH20 発現は、4 ヵ月齢から検出されたが、成体ウサギの精巣での発現と比較して著しく低かった。また、1～4 ヵ月齢のいずれでも脳梁及び脳皮質では Spam1/PH20 発現は認められなかった。

ウサギ胎児（GD 11～29）及び胎盤での Spam1/PH20 発現を検討した。GD 14～23 の胎盤で Spam1/PH20 の低い発現が認められたが、GD 11 及び GD 26 以降では検出されなかった。一方、胎児ではいずれも Spam1/PH20 発現は認められなかった。

以上の結果から、ウサギでの Spam1/PH20 は主に成体の精巣及び精巣上体に発現することが示された。

### （5）ヒト ENP での SPAM1/PH20 発現（RT-qPCR 法）

**（試験番号 12147、添付資料番号 4.2.3.7.7-12、参考資料）**

ENP を含むヒト結腸（男性 3 例及び女性 4 例）での SPAM1/PH20 発現を RT-qPCR 法により評価した。

いずれのヒト結腸検体でも SPAM1/PH20 の発現は認められなかった。

### （6）ヒト成人及び胎児組織での SPAM1/PH20 発現（RT-qPCR 法）

**（試験番号 12197、添付資料番号 4.2.3.7.7-13、参考資料）**

ヒト成人及び胎児組織での SPAM1/PH20 発現プロファイルを RT-qPCR 法により評価した。ヒト組織 cDNA を用いたスクリーニングで SPAM1/PH20 の発現が検出された（定量下限未満を示した複数の組織も含む）成人（14 種類）及び胎児（9 種類）組織並びに初代ヒト培養細胞（神経細胞、星状膠細胞及びオリゴデンドロサイト前駆細胞）を用いた。各組織から単離した総 RNA を用いて、SPAM1/PH20 の発現量を評価した。

成人組織では、精巣で SPAM1/PH20 の発現が最も高く、骨／軟骨、精巣上体、腎臓、胎盤、骨格筋及び滑膜で 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、胃及び精巣で SPAM1/PH20 の低い発現が認められた。初代ヒト培養細胞（神経細胞、星状膠細胞及びオリゴデンドロサイト前駆細胞）では、いずれも SPAM1/PH20 の発現は検出されなかった。

### （7）マウス、ウサギ及びヒトの成体／成人及び幼若動物又は胎児組織での SPAM1/PH20 及びその他のヒアルロニダーゼ遺伝子発現（RNA-Seq 法）

**（試験番号 14077、添付資料番号 4.2.3.7.7-14、参考資料）**

マウス、ウサギ及びヒト組織での SPAM1/PH20 及びヒアルロニダーゼをコードする他の遺伝子の発現プロファイルを解析した。

これまでに実施した RT-(q)PCR 法による遺伝子発現解析（2.6.6.8.1.3（1）、2.6.6.8.1.3（2）、2.6.6.8.1.3（3）、2.6.6.8.1.3（4）、2.6.6.8.1.3（5）及び 2.6.6.8.1.3（6）項）で使用した成体／成人（マウス、ウサギ、ヒト）、幼若動物（ウサギ）及び胎児組織（マウス、ウサギ、ヒト）並びに初代培養細胞（マウス、ヒト）を用いた。これらの検体での SPAM1/PH20、HYAL1、HYAL2、HYAL3 及び HYAL4 の発現量を RNA-Seq 法により解析した。

SPAM1/PH20 の発現は、マウス及びヒトでは成体／成人の精巣のみで、ウサギでは成体の精巣及び精巣上体のみで認められ、神経組織（脳、脳梁及び ENP）及び初代培養細胞（神経

細胞、星状膠細胞及びオリゴデンドロサイト前駆細胞）ではいずれも検出されなかった。HYAL1、HYAL2 及び HYAL3 の発現は、成体／成人、幼若動物及び胎児組織並びに初代培養細胞で広範に認められた。HYAL4 の発現レベルは低く、限られた組織でのみ認められた。

以上より、RNA-Seq 法及びこれまでの RT-(q)PCR 法を用いた解析結果から、SPAM1/PH20 の発現は成体／成人の雄性生殖器に限定的であり、成体／成人、幼若動物及び胎児の神経由来組織では認められないことが示された。

### 2.6.6.9 考察及び結論

#### 2.6.6.9.1 IGI, 10%

IGI, 10%の適切な高用量（投与可能最大容量まで）を用いてマウス及びラット単回投与毒性試験を実施した。マウス及びラットに IGI, 10%を静脈内投与した単回投与毒性試験において、IGI, 10%に関連した一般状態の変化及び病理組織学的所見は認められなかった。IGI, 10% の NOAEL はマウスで 5000 mg/kg、ラットで 2000 mg/kg であった。

細菌を用いた復帰突然変異試験において、IGI, 10%に遺伝毒性の懸念は示されなかった。

IGI, 10%に含まれる IgG は内因性ヒトタンパク質であり、補充療法として使用され、細菌、ウイルス等の外来性分子を標的としているため、IGI, 10%の作用機序から反復投与による安全性の懸念はなく、がん原性又は生殖発生に影響を及ぼす懸念もないと考えられる。

ウサギを用いた IGI, 10%の静脈内、動脈内及び静脈周囲投与局所刺激性試験において良好な忍容性が示された。

以上のとおり、非臨床安全性評価に基づき、IGI, 10%の臨床使用において安全性の懸念は特段ないと考えられる。

#### 2.6.6.9.2 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、試験した最高用量まで被験物質に関連した毒性は認められなかった。NOAEL は、7 日間反復投与毒性試験では 1 日 1 回静脈内及び皮下投与で、いずれも 5 mg/kg であり、39 週間反復投与毒性試験では週 1 回皮下投与で、2 mg/kg であった。

生殖発生毒性については、rHuPH20 の受胎能に及ぼす影響は、カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験の成績に基づき評価した。最高用量の 2 mg/kg まで雌雄受胎能への影響を示唆する所見はみられなかった。マウス胚・胎児発生毒性試験では、18 mg/kg までの投与で明らかな母動物毒性は観察されず、母動物に対する NOAEL は 18 mg/kg と判断した。胎児では 9 及び 18 mg/kg 群で胎児体重減少及び後期吸収胚数の増加が認められた。したがって、胚・胎児に対する NOAEL は 3 mg/kg と判断した。催奇形性は認められなかった。マウス PPND 試験では、母動物及び F1 世代の NOAEL はいずれも最高用量の 9 mg/kg であった。幼若マウスを用いた 8 ヵ月間反復投与毒性試験では、生殖毒性及び慢性毒性に関するいずれの評価項目に対しても、rHuPH20 に関連した有害所見は認められなかった。

全般的に、これらの試験では、試験した最高用量まで忍容性が良好であった。皮下投与による rHuPH20 の曝露量は概して低く、カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験における血漿中ヒアルロニダーゼ活性は最高用量の 2 mg/kg のみで検出され、雌雄ともに Day 85 に試験期間を通して最高値に達した。その後、Day 267 では雄の値は定量下限未満となり、雌の値も

Day 1 より低値であった。本試験の抗 rHuPH20 抗体及び中和抗体の抗体価には用量反応性が認められ、いずれも投与期間を通して概ね上昇した。反復投与後の曝露量の減少は中和抗体価の上昇と相関していた。

ヒトにおいて皮下投与による rHuPH20 の曝露量は定量下限未満であると考えられたことから、TAK-771 の臨床試験では血漿中ヒアルロニダーゼ活性は測定していない。そのため rHuPH20 の安全域は、毒性試験での NOAEL に基づくヒト等価用量（HED）及び予定臨床用量に基づいて算出した。算出した安全域を表 2.6.6.9-1 に示す。

カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験における週 1 回の皮下投与は、ヒトで予定される用法（3 週間又は 4 週間に 1 回投与）を最も反映している。カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験での NOAEL（2 mg/kg）は、予定臨床用量の約 4587 倍である。体表面積（換算係数 3.1）[17]に基づく HED は 0.645 mg/kg であり、安全域は少なくとも 1479 倍である。

表 2.6.6.9-1　rHuPH20 の毒性試験における NOAEL に基づき算出された安全域

| 試験の種類<br>（試験番号） | 動物種 | NOAEL<br>（mg/kg） | HED(a)<br>（mg/kg） | 安全域(b) |
|---|---|---|---|---|
| 反復投与毒性 | | | | |
| 7 日間（R08056） | カニクイザル | 5 | 1.613 | 3700 |
| 39 週間（R09050） | カニクイザル | 2 | 0.645 | 1479 |
| 生殖発生毒性 | | | | |
| 胚・胎児発生毒性（R08176） | マウス | 母動物：18<br>胎児：3 | 1.463<br>0.244 | 3356<br>560 |
| PPND（R09058） | マウス | 9 | 0.732 | 1679 |
| 幼若動物を用いた試験 | | | | |
| 8 ヵ月間（15028） | マウス | 1 | 0.08 | 183 |

HED：ヒト等価用量、IgG：免疫グロブリン G、NOAEL：無毒性量、PPND：出生前及び出生後の発生、rHuPH20：遺伝子組換えヒトヒアルロニダーゼ PH20、U：単位
(a)カニクイザル及びマウスの換算係数はそれぞれ 3.1 及び 12.3 [17]
(b)ヒトの予定最高用量 0.000436 mg/kg（1 日当たりの予定最高用量 600 mg IgG/kg 及び 80 U rHuPH20/g IgG 並びに rHuPH20 の比活性 110000 U/mg に基づく）

rHuPH20 の局所刺激性は、皮下投与によるカニクイザル反復投与毒性試験並びにマウス及びウサギ生殖発生毒性試験に基づき評価した。いずれの試験でも投与部位における局所刺激性を示す毒性所見は認められなかった。

抗 rHuPH20 抗体が主に精巣に発現する PH20 に作用する可能性が考えられたため、その他の毒性試験として、雌雄ウサギの受胎能、胚・胎児発生及び出生児の発達並びにマウスの PPND に対する抗 rHuPH20 抗体の影響を評価した。雄ウサギを用いた受胎能試験並びに雌ウサギを用いた出生後の評価を含む受胎能及び胚・胎児発生毒性試験において、抗 rHuPH20 抗体は、交配前から試験終了まで、成熟ウサギで高い抗体価を示した。雌ウサギ試験では、母動物から移行した抗 rHuPH20 抗体が胎児及び出生児から検出された。しかし、雌雄受胎能、胚･胎児発生並びに出生児の発達に抗 rHuPH20 抗体の影響は認められなかった。マウス PPND 試験での F0 母動物及び F1 世代の循環血中抗 rHuPH20 抗体の存在を確認するために実施した補足試験では、母動物並びに妊娠後期から成熟期までの胎児及び出生児に抗 rHuPH20 抗体が認められたが、F1 世代の成長、機能発達及び生殖能に影響はみられなかった。

ヒト抗 PH20 抗体及び抗 rHuPH20 抗体のヒト組織に対する結合性を評価した組織交差反応性試験において、精巣に特異的な結合が認められた。また、マウス、ウサギ及びヒトの成体

／成人及び幼若動物又は胎児組織を用いた遺伝子発現解析において、SPAM1/PH20 は主として成体／成人の雄性生殖器に発現することが確認された。

以上のとおり、マウス、ウサギ及びカニクイザルを用いた rHuPH20 の毒性試験の結果は、rHuPH20 の非臨床安全性プロファイルを十分に特徴付けている。これらの結果は、IGI, 10%の皮下注用製剤との併用において、局所的に作用し、一過性に活性を有する浸透促進剤としての rHuPH20 の使用を裏付けている。

### 2.6.6.9.3 IGI, 10%及び rHuPH20 併用

ウサギに IGI, 10%を rHuPH20 との併用で反復皮下投与し、局所刺激性を検討した。投与部位の病理組織学的検査では、rHuPH20 及び IGI, 10%の併用並びに IGI, 10%単独投与のいずれにも炎症反応が認められた。これはヒト IgG に対するウサギの免疫応答の結果と考えられた。

異種タンパク質への免疫系の影響を除外するために SCID マウスに IGI, 10%を rHuPH20 との併用で反復皮下投与し、局所刺激性を評価した。IGI, 10%の反復皮下投与は、rHuPH20 との併用又は単独のいずれについても有害作用を認めず、良好な忍容性を示した。

ミニブタを用いて、IGI, 10%［又はヒト IgG（10%）］大量皮下投与時の局所皮膚反応に対する rHuPH20 の影響を検討した。rHuPH20 を事前皮下投与することにより、IGI, 10%の大量皮下投与に伴う局所皮膚反応（腫脹／硬結、皮膚血流量低下、注入圧上昇、病理組織学的変化等）が軽減されることが示された。

以上のとおり、ウサギ及び SCID マウスにおいて、rHuPH20 と IGI, 10%との併用反復皮下投与により、局所忍容性に関して毒性学的に意味のある有害作用は認められなかった。ミニブタにおいて、IGI, 10%の大量皮下投与に伴う組織の変化及び有害作用が、rHuPH20 の皮下投与により軽減されることが示された。

### 2.6.6.10 図表

本文中の適切な箇所に示した。

### 2.6.6.11 参考文献一覧

[1] Hascall V, Esko JD. Hyaluronan. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. Essentials of Glycobiology. Chapter 16 Hyaluronan. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY). Published online: 2017; doi: 10.1101/glycobiology.3e.016.

[2] Mahl JA, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, Nogués V. The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. Exp Tox Pathol. 2006;57(5-6):341-5.

[3] Nunoya T, Shibuya K, Saitoh T, Yazawa H, Nakamura K, Baba Y, et al. Use of Miniature Pig for Biomedical Research, with Reference to Toxicologic Studies. J Toxicol Pathol. 2007;20(3):125-32.

[4] Carbonatto M, Yu P, Bertolino M, Vigna E, Steidler S, Fava L, et al. Nonclinical safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of atacicept. Toxicol Sci. 2008;105(1):200-10.

[5] DeSesso JM, Williams AL, Ahuja A, Bowman CJ, Hurtt ME. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. Crit Rev Toxicol. 2012;42(3):185-210.

[6] Chiu SC, Liu HH, Chen CL, Chen PR, Liu MC, Lin SZ, et al. Extramedullary hematopoiesis (EMH) in laboratory animals: offering an insight into stem cell research. Cell Transplant. 2015;24(3):349-66.

[7] Johns JL, Christopher MM. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. Vet Pathol. 2012;49(3):508-23.

[8] Oda A, Tezuka T, Ueno Y, Hosoda S, Amemiya Y, Notsu C, et al. Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor Tlx1. Sci Rep. 2018;8(1):8308.

[9] Hamadeh RM, Jarvis GA, Galili U, Mandrell RE, Zhou P, Griffiss JM. Human natural anti-Gal IgG regulates alternative complement pathway activation on bacterial surfaces. J Clin Invest. 1992;89(4):1223-35.

[10] Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB. Human natural anti-α-galactosyl IgG. II. The specific recognition of α (1→3)-linked galactose residues. J Exp Med. 1985;162(2):573-82.

[11] Nonclinical Study AU0206W02: Investigation on Local Tolerance of Gammagard Liquid (16%) preparations after subcutaneous application in rabbits: Influence of the formulation pH on Local Tolerance after repeated bolus administration. [redacted]. 20[redacted]

[12] Deng X, He Y, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20): Evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes. J Androl. 2000;21(6):822-32.

[13] El Hajjaji H, Cole AA, Manicourt DH. Chondrocytes, synoviocytes and dermal fibroblasts all express PH-20, a hyaluronidase active at neutral pH. Arthritis Res Ther. 2005;7(4):R756-68.

[14] Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(50):18028-33.

[15] Preston M, Gong X, Su W, Matsumoto SG, Banine F, Winkler C, et al. Digestion products of the PH20 hyaluronidase inhibit remyelination. Ann Neurol. 2013;73(2):266-80.

[16] Zhang H, Martin-DeLeon PA. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. Biol Reprod. 2003;69(2):446-54.

[17] FDA CDER. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. July 2005.

目次

2.6.7 毒性試験概要表 ....2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表....2
2.6.7.1.1 毒性試験の一覧表　被験物質：IGI, 10% ....2
2.6.7.1.2 毒性試験の一覧表　被験物質：rHuPH20....3
2.6.7.1.3 毒性試験の一覧表　被験物質：IGI, 10%及び rHuPH20 併用 ....7
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験：一覧表....8
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験：成績の一覧表 ....9
2.6.7.4 毒性試験：使用ロットの一覧 .... 11
2.6.7.4.1 毒性試験：使用ロットの一覧 － IGI, 10% .... 11
2.6.7.4.2 毒性試験：使用ロットの一覧 － rHuPH20 .... 12
2.6.7.5 単回投与毒性試験 .... 13
2.6.7.6 反復投与毒性試験：用量設定試験 .... 14
2.6.7.7 反復投与毒性試験 .... 15
2.6.7.7.1 反復投与毒性試験 .... 15
2.6.7.7.2 反復投与毒性試験 .... 17
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 .... 19
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 .... 22
2.6.7.10 がん原性試験 .... 23
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：予備試験 .... 24
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 .... 25
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 .... 26
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生試験 .... 28
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 .... 31
2.6.7.16 局所刺激性試験 .... 35
2.6.7.16.1 局所刺激性試験 － IGI, 10% .... 35
2.6.7.16.2 局所刺激性試験 － IGI, 10%及び rHuPH20 併用 .... 36
2.6.7.17 その他の毒性試験 .... 37

## 2.6.7 毒性試験概要表

### 2.6.7.1 毒性試験：一覧表

#### 2.6.7.1.1 毒性試験の一覧表　被験物質：IGI, 10%

Test Article: IGI, 10%

| Type of Study | Test Article | Species/ Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) [a] | GLP [b] | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Single-Dose Toxicity | | | | | | | | | |
| | IGI, 10% | Mouse/ NMRI | IV | single dose | 2500, 5000, 10000 | Yes | [redacted] [c] | PV0330101 | 4.2.3.1-1 |
| | IGI, 10% | Rat/ Sprague Dawley | IV | single dose | 2000 | Yes | [redacted] [c] | PV0340101 | 4.2.3.1-2 |
| Repeat-Dose Toxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Genotoxicity | | | | | | | | | |
| | IGI, 10% | S. typhimurium | in vitro | single dose | 1.2, 3.7, 11, 33, 100 µL per plate | Yes | [redacted] [d] | [redacted]- UL-0159 | 4.2.3.3.1-1 |
| Carcinogenicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Reproductive and Developmental Toxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Local Tolerance | | | | | | | | | |
| | IGI, 10% | Rabbit/ NZW | IV<br>intraarterial<br>paravenous | single dose | 10 mL per animal<br>10 mL per animal<br>0.5 mL per animal | Yes | [redacted] [c] | PV0350101 | 4.2.3.6-1 |
| Other Toxicity Studies | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; IgG = Immunoglobulin G; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution; IV = intravenous; NMRI = Naval Medical Research Institute; NOAEL = No observed adverse effect level; NZW = New Zealand White

a. Unless otherwise specified, as the dose of IgG. For single-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

b. An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

c. [redacted] Austria

d. [redacted] Austria

## 2.6.7.1.2 毒性試験の一覧表　被験物質：rHuPH20

Test Article: rHuPH20

| Type of Study | Test Article | Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) [a] | GLP [b] | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Single-Dose Toxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Repeat-Dose Toxicity | | | | | | | | | |
| | rHuPH20 (HZ202) | Monkey/ Cynomolgus | IV and SC, once daily | 7 days | 5 | Yes | [redacted] [c] | R08056 | 4.2.3.2-1 |
| | rHuPH20 (HZ202) | Monkey/ Cynomolgus | SC, once weekly | 39 weeks | 0.02, 0.2, 2.0 | Yes | [redacted] [c] | R09050 | 4.2.3.2-2 |
| Genotoxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Carcinogenicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Reproductive and Developmental Toxicity | | | | | | | | | |
| Embryo-fetal Development | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily | GD 6-15 | 1, 3, 10, 30 | No | [redacted] [d] | R07046 | 4.2.3.5.2-1 |
| Embryo-fetal Development | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily | GD 6-15 | 3, 9, 18 | Yes | [redacted] [d] | R08176 | 4.2.3.5.2-2 |
| Pre/postnatal Development | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily | GD 6-LD 20 | 3, 6, 9 | Yes | [redacted] [d] | R09058 | 4.2.3.5.3-1 |
| Juvenile toxicity | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily or weekly | PND 7-42 | Once daily: 1, 3, 9<br>Once weekly: 3, 9 | No | [redacted] [d] | 13123 | 4.2.3.5.4-1 |
| Juvenile toxicity | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily | PND 7-90 | 3, 9 | No | [redacted] [e] | 13125 | 4.2.3.5.4-2 |

## 2.6.7.1.2 毒性試験の一覧表　被験物質：rHuPH20（続き）

Test Article: rHuPH20

| Type of Study | Test Article | Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) [a] | GLP [b] | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Juvenile and Chronic Toxicity | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily + once weekly | Once daily: PND 7-30 Once weekly: PND 30-129 (juvenile subset) or PND 30-241 (chronic subset) | 1 | Yes | [redacted] [d] | 15028 | 4.2.3.5.4-3 |
| Local Tolerance | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Other Toxicity Studies | | | | | | | | | |
| Antibody response against rHuPH20 in rabbits | rHuPH20 (HZ202) | Rabbit/ NZW | SC / IM | Day 1 / Days 8, 22, 36, 57 | 0.1 - 0.2 mg/animal | No | [redacted] [e] | 12124 | 4.2.3.7.7-1 |
| | | | SC | Days 1-14, 16-28, 43 | 0.76 | | | | |
| | | | SC | Days 1, 8, 15, 22, 29, 50 | 0.76 | | | | |
| Effects of anti-rHuPH20 antibodies in fertility study in male rabbits | rHuPH20 (HZ202) | Rabbit/ NZW | SC | Days 1, 8, 15, 22, 29, 43 (prior to mating) and 57 (post mating) | 0.76 | Yes | [redacted] [d] | 12208 | 4.2.3.7.7-2 |
| Effects of anti-rHuPH20 antibodies on fertility and embryo-fetal development study, including postnatal assessments in female rabbits | rHuPH20 (HZ202) | Rabbit/ NZW | SC | Days 1, 8, 15, 22, 29, 42 (prior to mating) and GD 15 | 0.76 | Yes | [redacted] [d] | 12195 | 4.2.3.7.7-3 |

## 2.6.7.1.2 毒性試験の一覧表　被験物質：rHuPH20（続き）

Test Article: rHuPH20

| Type of Study | Test Article | Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) [a] | GLP [b] | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Effects of anti-rHuPH20 antibodies in pre- and postnatal developmental toxicity study in mice | rHuPH20 (HZ202) | Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC, once daily | GD 6 - LD 21 | 3, 6, 9 | No | [redacted] d | 12096 | 4.2.3.7.7-4 |
| Tissue cross-reactivity of rabbit anti-rHuPH20 antibodies to selected normal rabbit tissues | NA | Rabbit/ NZW | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 12124-SR | 4.2.3.7.7-5 |
| Tissue cross-reactivity of rabbit anti-rHuPH20 antibodies to selected normal human tissues | NA | Human | NA | NA | NA | No | [redacted] f | 12058 | 4.2.3.7.7-6 |
| Tissue cross-reactivity of human PH20-reactive antibodies and human anti-rHuPH20 antibodies to selected normal human tissues | NA | Human | NA | NA | NA | Yes | [redacted] g | 13086 | 4.2.3.7.7-7 |
| Gene expression in fetal, juvenile and adult tissues of mouse (RT-qPCR) | NA | Mouse/ C57Bl/6, CD-1, ICR balb/c | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 12196 | 4.2.3.7.7-8 |
| Gene expression in mouse corpus callosum of brain (RT-PCR) | NA | Mouse/ C57Bl/6, Nu/Nu, SCID | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 12210 | 4.2.3.7.7-9 |

## 2.6.7.1.2 毒性試験の一覧表　被験物質：rHuPH20（続き）

Test Article: rHuPH20

| Type of Study | Test Article | Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) [a] | GLP [b] | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gene expression in specific rabbit tissues including testis and colon ENP (RT-qPCR) | NA | Rabbit/ NZW | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 13091 | 4.2.3.7.7-10 |
| Gene expression in fetal, juvenile and adult tissues of rabbit (RT-qPCR) | NA | Rabbit/ NZW | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 13116 | 4.2.3.7.7-11 |
| Gene expression in human colon ENP (RT-qPCR) | NA | Human | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 12147 | 4.2.3.7.7-12 |
| Gene expression in human adult and fetal tissues (RT-qPCR) | NA | Human | NA | NA | NA | No | [redacted] e | 12197 | 4.2.3.7.7-13 |
| Gene expression in various adult, juvenile and fetal tissues from human, mouse and rabbit (RNA-Seq) | NA | Human, Mouse/CD-1; ICR balb/c; C57Bl/6; Webster, Rabbit/NZW | NA | NA | NA | No | [redacted] h | 14077 | 4.2.3.7.7-14 |

CTD = Common Technical Document; ENP = enteric nerve plexus; GLP = Good Laboratory Practice; GD = gestation day; LD = lactation day; HZ202 = second generation product; IM = intramuscular; IV = intravenous; NA = not applicable; NOAEL = No observed adverse effect level; NZW = New Zealand White; PH20 = Sperm adhesion molecule 1 (aka SPAM1); PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; RNA-Seq = RNA sequencing; RT-(q)PCR = (quantitative) reverse transcriptase polymerase chain reaction; SC = subcutaneous; SCID = severe combined immunodeficiency;

a. Unless otherwise specified. The NOAEL is underlined for repeat-dose toxicity.

b. An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

c. [redacted] USA

d. [redacted] USA

e. [redacted] USA

f. [redacted] UK

g. [redacted] USA

h. [redacted] USA

## 2.6.7.1.3 毒性試験の一覧表　被験物質：IGI, 10%及び rHuPH20 併用

Test Article: IGI, 10% with rHuPH20

| Type of Study | Test Article | Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Doses | GLP [a] | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Single-dose Toxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Repeat-dose Toxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Genotoxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Carcinogenicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Reproductive and Developmental Toxicity | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |
| Local Tolerance | | | | | | | | | |
| | IGI, 10% rHuPH20 (HZ201) | Rabbit/NZW | SC | Repeated dose | rHuPH20 500 or 5000 U/kg (0.1 or 1 mL/kg) + IGI, 10% 5 mL/kg | No | [redacted] [b] | AU0206W01 | 4.2.3.6-2 |
| | IGI, 10% rHuPH20 (HZ201) | Mouse/ SCID | SC | Repeated dose | rHuPH20 100 U/ animal (0.1 mL/animal) + IGI, 10% 0.1 mL/animal | No | [redacted] [c] | R09131 | 4.2.3.6-3 |
| | IgG (10%) [d] rHuPH20 (HZ201) | Minipig /Yucatan | SC | Single dose | rHuPH20 2240 U (14 mL/injection site) +IgG (10%)[d] 300 mL/injection site | No | [redacted] [c] | 11018 | 4.2.3.6-4 |
| | IGI, 10% rHuPH20 (HZ201) | Minipig/ Yucatan | SC | Single dose | rHuPH20 2240 U (14 mL/injection site)+IGI, 10% 300 mL/injection site | No | [redacted] [c] | 11028 | 4.2.3.6-5 |
| Other Toxicity Studies | | | | | | | | | |
| not conducted | | | | | | | | | |

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; HZ201 = first generation product; IgG = Immunoglobulin G; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; NZW = New Zealand White; SC = subcutaneous; SCID = severe combined immunodeficiency; U = units

a. An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

b. [redacted] Austria

c. [redacted] USA

d. Test article was Gamma Globulin Powder; BioMed Supply Inc., reconstituted to a 10% solution.

## 2.6.7.2 トキシコキネティクス試験：一覧表

Test Article: rHuPH20

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Doses (mg/kg) | GLP Compliance | Study No. |
|---|---|---|---|---|---|
| Repeat-Dose Toxicity: 7-day | Monkey/Cynomolgus | IV and SC (Once daily) | IV: 5<br>SC: 5 | Yes | R08056 |
| Repeat-Dose Toxicity: 39-week | Monkey/Cynomolgus | SC (Weekly) | 0.02, 0.2, 2 | Yes | R09050 |
| Embryo-fetal Development | Mouse/Crl:CD1(ICR) | SC (Once daily) | 3, 9, 18 | Yes | R08176 |

GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous

## 2.6.7.3 トキシコキネティクス試験：成績の一覧表

Test Article: rHuPH20

| Name | Dose / Route | Parameter | Monkey, Cynomolgus | | Study Duration | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Day 1[a] | Day 7[a] | | | |
| rHuPH20 | 5 mg/kg/ IV or SC | IV: $AUC_{0\text{-}t}$ (U·min/mL) | 708000 | 524000 | 7 days | Yes | R08056 |
| | | SC: $AUC_{0\text{-}t}$ (U·min/mL) | 38500 | 30100 | | | |
| Name | Dose / Route | Parameter | Monkey, Cynomolgus | | Study Duration | GLP Compliance | Study Number |
| | | | Male | Female | | | |
| rHuPH20 | 0.02 mg/kg/ SC | Below the quantifiable limit during the course of the study | NC | NC | 39 weeks | Yes | R09050 |
| rHuPH20 | 0.2 mg/kg/ SC | Below the quantifiable limit during the course of the study | NC | NC | | | |
| rHuPH20 | 2 mg/kg/ SC | Day 1 $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | 20.5 | 47.8 | | | |
| | | Day 1 $C_{max}$ (U/mL) | 12.5 | 20.8 | | | |
| | | Day 85 $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | 177 | 395 | | | |
| | | Day 85 $C_{max}$ (U/mL) | 28.8 | 64.7 | | | |
| | | Day 183 $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | 89.6 | 467 | | | |
| | | Day 183 $C_{max}$ (U/mL) | 12.0 | 64.2 | | | |
| | | Day 267 $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | NC | 56.2 | | | |
| | | Day 267 $C_{max}$ (U/mL) | NC | 10.0 | | | |

## 2.6.7.3 トキシコキネティクス試験：成績の一覧表（続き）

Test Article: rHuPH20

| Name | Dose / Route | Parameter | | Mice, Crl:CD1(ICR) | Study Duration | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| rHuPH20 | 3 mg/kg/ SC | GD 6 | $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | 5.45 | GD 6-15 | Yes | R08176 |
| | | GD 15 | $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | 55.1 | | | |
| | 9 mg/kg/ SC | GD 6 | $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | 45.3 | | | |
| | | GD 15 | $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | 79.0 | | | |
| | 18 mg/kg/ SC | GD 6 | $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | 120 | | | |
| | | GD 15 | $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | 363 | | | |

$AUC_{0-t}$ = area under the concentration-time curve from dosing until the last quantifiable concentration; $AUC_{0-24}$ = area under the concentration-time curve from dosing until 24 hours; $C_{max}$ = maximum concentration; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; NC = not calculable due to below the quantifiable limit; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; U = units

a. Combined genders (2M and 2F)

## 2.6.7.4 毒性試験：使用ロットの一覧

### 2.6.7.4.1 毒性試験：使用ロットの一覧 － IGI, 10%

Test Article: IGI, 10%

| Batch No. | Purity (%) | Study Number | Type of Study |
|---|---|---|---|
| Proposed Specification | IgG [redacted] | - | - |
| [redacted] ([redacted]) [a] | [redacted] | PV0330101<br>PV0340101<br>PV0350101<br>[redacted]-UL-0159 | Single-Dose Toxicity in Mice<br>Single-Dose Toxicity in Rats<br>Local Tolerance in Rabbit<br>Ames Test |
| [redacted] ([redacted]) [a] | [redacted] | PV0330101<br>PV0340101<br>PV0350101 | Single-Dose Toxicity in Mice<br>Single-Dose Toxicity in Rats<br>Local Tolerance in Rabbit |
| [redacted] ([redacted]) [a] | [redacted] | PV0330101<br>PV0340101<br>PV0350101 | Single-Dose Toxicity in Mice<br>Single-Dose Toxicity in Rats<br>Local Tolerance in Rabbit |

IgG = Immunoglobulin G; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution

a. These are the lot numbers for [redacted]

## 2.6.7.4.2 毒性試験：使用ロットの一覧 － rHuPH20

Test Article: rHuPH20

| Batch No. | Purity (%) | Specified Impurities (%) | | Study Number | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | R08056 | 7-Day Repeat Dose IV and SC Toxicity Study of rHuPH20 in Monkeys |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | R09050 | 39-Week Repeat-Dose Toxicity Study in Monkeys with a 4-Week Recovery Period |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | R08176 | Embryo-Fetal Development Study in Mice |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | R09058 | Pre/postnatal Development Study in Mice |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | 12208 | Other Toxicity Studies: Effects of anti-rHuPH20 antibodies in fertility study in male rabbits |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | 12195 | Other Toxicity Studies: Effects of anti-rHuPH20 antibodies on fertility and embryo-fetal development study, including postnatal assessments in female rabbits |
| [redacted] | [redacted] | [redacted] | [redacted] | 15028 | Juvenile and Chronic Toxicity in Mice |

- information not available; IV = intravenous; LOQ = limit of quantification; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous;

## 2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: IGI, 10%

| Species / Strain | Method of Administration | Doses (mg/kg) [a] | Gender and No. per Group | No Observed Adverse Effect Level (mg/kg) | Approximate Lethal Dose (mg/kg) | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ NMRI | IV | 2500, 5000, 10000 | M5/F5 [b] | 5000 | 10000 | Behavioral depression, dyspnea, mortality (M2) related to the injection of high volumes of test item as a bolus into mice whose cardiac functions are failing were observed at the highest dose. | PV0330101/ 4.2.3.1-1 |
| Rat/ Sprague Dawley | IV | 2000 | M5/F5 | 2000 | > 2000 | none | PV0340101/ 4.2.3.1-2 |

CTD = Common Technical Document; F = Female; IgG = Immunoglobulin G; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution; IV = intravenous; M = Male; NMRI = Naval Medical Research Institute

a. As the dose of IgG

b. 1/5 female in the 5000 mg/kg group died from a mechanical injury on day 6.

### 2.6.7.6 反復投与毒性試験：用量設定試験

試験は実施しなかった。

## 2.6.7.7 反復投与毒性試験

### 2.6.7.7.1 反復投与毒性試験

Test Article: rHuPH20

| | | |
|---|---|---|
| Title: A 7-Day Repeat Dose Intravenous and Subcutaneous Toxicity Study of rHuPH20 in Cynomolgus Monkeys | | |
| Species/Strain: Cynomolgus Monkey | Duration of Dosing: 1 week | Study Number: R08056 |
| Initial Age: Approx. 3 years | Duration of Post Dose: None | Location in CTD: Section 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, USP | |
| Special Features: None | No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg (IV, SC) | |

| Dose (mg/kg/day) | 0 (Control; IV and SC) | | 5 (IV) | | 5 (SC) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sex | M | F | M | F | M | F |
| Number of Animals | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Toxicokinetics (Combined Sexes) | | | | | | |
| $C_{max}$ (U/mL) | | | | | | |
| Day 1 | NC | | NC | | 200 | |
| Day 7 | NC | | NC | | 115 | |
| $AUC_{0-t}$ (U·min/mL) | | | | | | |
| Day 1 | NC | | 708000 | | 38500 | |
| Day 7 | NC | | 524000 | | 30100 | |
| $AUC_{0-\infty}$ (U·min/mL) | | | | | | |
| Day 1 | NC | | 713000 | | NC | |
| Day 7 | NC | | 528000 | | NC | |

## 2.6.7.7.1 反復投与毒性試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg/day) | 0 (Control; IV and SC) | | 5 (IV) | | 5 (SC) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sex | M | F | M | F | M | F |
| Number of Animals | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Noteworthy Findings: | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Clinical Observation | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption | - | - | - | - | - | - |
| Body weights | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - | - | - |
| Hematology | - | - | - | - | - | - |
| Coagulation | - | - | - | - | - | - |
| Serum chemistry | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmology | - | - | - | - | - | - |
| Organ weight | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology | - | - | - | - | - | - |

- = No noteworthy finding; $AUC_{0-\infty}$= Area under the concentration-time curve from dosing until infinity; $AUC_{0-t}$ = Area under the concentration-time curve from dosing until last quantifiable concentration; $C_{max}$ = Maximum concentration; CTD = Common Technical Document; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NaCl = sodium chloride; NC = Not calculated; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; U = units; USP = United States Pharmacopeia

## 2.6.7.7.2 反復投与毒性試験

Test Article: rHuPH20

| | | |
|---|---|---|
| Report Title: A 39-Week Toxicity Study of rHuPH20 Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys with a Recovery Phase | | |
| Species/Strain: Cynomolgus Monkey | Duration of Dosing: 39 weeks | Study Number: R09050 |
| Initial Age: Approx. 4 to 7 years | Duration of Post Dose: 4 weeks | Location in CTD: Section 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, USP | |
| Special Features: Exploratory (non-GLP) additional anti-rHuPH20 antibody evaluations were conducted [a] | | |
| No Observed Adverse Effect Level: 2 mg/kg | | |

| Dose (mg/kg) | 0 (Control) | | 0.02 | | 0.2 | | 2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals: Main | 4M | 4F | 4M | 4F | 4M | 4F | 4M | 4F |
| Number of Animals: Recovery | 2M | 2F | 2M | 2F | 2M | 2F | 2M | 2F |
| Toxicokinetics: | | | | | | | | |
| Day 1 | | | | | | | | |
| $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 20.5 | 47.8 |
| $C_{max}$ (U/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 12.5 | 20.8 |
| Day 85 | | | | | | | | |
| $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 177 | 395 |
| $C_{max}$ (U/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 28.8 | 64.7 |
| Day 183 | | | | | | | | |
| $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 89.6 | 467 |
| $C_{max}$ (U/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 12.0 | 64.2 |
| Day 267 | | | | | | | | |
| $AUC_{0\text{-}t}$ (U·hr/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 56.2 |
| $C_{max}$ (U/mL) | NC | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 10.0 |
| Noteworthy Findings: | | | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| Clinical Observation | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Menstrual monitoring | - | - | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.7.2 反復投与毒性試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) | 0 (Control) | | 0.02 | | 0.2 | | 2 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals: Main | 4M | 4F | 4M | 4F | 4M | 4F | 4M | 4F |
| Number of Animals: Recovery | 2M | 2F | 2M | 2F | 2M | 2F | 2M | 2F |
| Food consumption | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Body weights | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Electrocardiography | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Blood pressure | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Respiratory rate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Testicular volume | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Semen analysis (sperm concentration, motility and morphology) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Coagulation | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serum chemistry | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Luteinizing hormone | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Injection site<br>minimal perivascular<br>lymphoplasmacytic infiltration | 0/4 (main)<br>0/2 (recovery) | 0/4 (main)<br>0/2 (recovery) | 0/4 (main)<br>0/2 (recovery) | 0/4 (main)<br>0/2 (recovery) | 1/4 (main)<br>0/2 (recovery) | 1/4 (main)<br>0/2 (recovery) | 4/4 (main)<br>1/2 (recovery) | 4/4 (main)<br>0/2 (recovery) |
| Additional Evaluations [a,b] | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings; $AUC_{0-t}$ = area under the concentration-time curve from dosing until the last quantifiable concentration; $C_{max}$ = maximum concentration; CTD = Common Technical Document; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NaCl = sodium chloride; NC = not calculable due to below the quantifiable limit; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; U = units; USP = United States Pharmacopeia

a. The following exploratory (non-GLP) evaluations of the tissues and anti-rHuPH20 antibodies from monkeys in this 39-week study were performed: cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies from cynomolgus monkey to endogenous cynomolgus monkey and human sperm PH20; cross-neutralization of monkey PH20 by anti-rHuPH20 neutralizing antibodies; immunohistochemical analysis of cross-reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to monkey testis and colon enteric plexus; and evaluation of potential IgG deposition in the enteric nerve plexus, testis and epididymis.

b. The additional evaluations had no impact on the interpretation of the 39-week monkey study.

## 2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Test Article: IGI, 10%

| | | |
|---|---|---|
| Report Title: Immune Globulin Intravenous (Human), 10% Triple Virally Reduced Solution: Salmonella Typhimurium Reverse Mutation Test | | Study No. [redacted]-UL-0159 |
| Test for Induction of: Reverse Mutations in Bacterial Cells | No. of Independent Assays: 2 | Location in CTD: Section 4.2.3.3.1-1 |
| Strains: S. typhimurium TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535 | No. of Replicate Cultures: 3 (test substance/positive control), 6 (5% glucose) | GLP Compliance: yes |
| Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9 | No. of Cells Analyzed/Cultured: - | |
| Vehicle for Test Article: 5% Glucose | Vehicle for Positive Controls: DMSO and/or water | |
| Treatment: Plate incorporation for 48 hr | | Date of Treatment: [redacted] |
| Cytotoxic Effects: None | | |
| Genotoxic Effects: None | | |

## 2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験（続き）

Test Article: IGI, 10%

| Metabolic Activation | Test Article | Dose Level or Concentration (µL/plate) | Assay No. 1: Revertant Colony Counts (means ± SD) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TA97a | TA98 | TA100 | TA102 | TA1535 |
| Without Activation | 5% Glucose | 100 | 102.8 ± 11.8 | 7.7 ± 2.3 | 100.5 ± 13.5 | 158.8 ± 9.1 | 10.3 ± 2.5 |
| | IGI, 10% | 100 | 90.7 ± 18.0 | 7.0 ± 1.7 | 63.7 ± 2.3 | 146.3 ± 4.6 | 9.0 ± 1.7 |
| | | 33 | 81.7 ± 7.5 | 9.7 ± 2.9 | 55.0 ± 9.2 | 154.3 ± 14.4 | 8.7 ± 1.2 |
| | | 11 | 96.0 ± 18.5 | 9.0 ± 1.7 | 65.0 ± 3.6 | 145.7 ± 14.8 | 7.0 ± 1.7 |
| | | 3.7 | 87.0 ± 2.6 | 11.3 ± 3.8 | 81.0 ± 4.6 | 167.0 ± 6.6 | 9.0 ± 2.0 |
| | | 1.2 | 93.0 ± 6.2 | 9.7 ± 2.1 | 63.7 ± 11.6 | 169.3 ± 12.1 | 10.7 ± 2.5 |
| | 4NOPD | 10 µg/plate | 501.0 ± 95.1* | - | - | - | - |
| | 2NF | 2 µg/plate | - | 183.3 ± 12.3* | - | - | - |
| | SA | 2 µg/plate | - | - | 521.3 ± 74.4* | - | - |
| | | 1 µg/plate | - | - | - | - | 206.3 ± 22.5* |
| | t-BHPO | 50 µg/plate | - | - | - | 431.3 ± 16.0* | - |
| With Activation | 5% Glucose | 100 | 123.7 ± 7.0 | 13.2 ± 3.3 | 104.5 ± 8.2 | 237.3 ± 10.9 | 13.3 ± 3.2 |
| | IGI, 10% | 100 | 135.7 ± 17.2 | 14.7 ± 1.2 | 103.3 ± 5.9 | 214.3 ± 11.6 | 7.0 ± 0.0 |
| | | 33 | 132.7 ± 6.5 | 13.3 ± 3.5 | 92.3 ± 11.2 | 229.7 ± 26.6 | 9.7 ± 4.7 |
| | | 11 | 119.3 ± 4.0 | 16.0 ± 4.0 | 84.7 ± 20.8 | 218.0 ± 15.1 | 10.0 ± 1.7 |
| | | 3.7 | 130.7 ± 4.0 | 16.0 ± 3.6 | 96.0 ± 15.6 | 226.7 ± 17.6 | 11.3 ± 2.1 |
| | | 1.2 | 119.3 ± 12.1 | 13.0 ± 3.6 | 95.7 ± 3.1 | 234.7 ± 13.6 | 13.3 ± 2.3 |
| | DMBA | 10 µg/plate | 549.0 ± 58.4* | - | - | - | - |
| | 2AA | 1 µg/plate | - | 393.7 ± 41.3* | - | - | - |
| | | 2 µg/plate | - | - | 1600.7 ± 74.3* | - | 189.3 ± 15.5* |
| | DHA | 50 µg/plate | - | - | - | 822.0 ± 40.7* | - |

## 2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験（続き）

Test Article: IGI, 10%

| Metabolic Activation | Test Article | Dose Level or Concentration (µL/plate) | Assay No 2: Revertant Colony Counts (means ± SD) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TA97a | TA98 | TA100 | TA102 | TA1535 |
| Without Activation | 5% Glucose | 100 | 95.2 ± 17.8 | 9.2 ± 1.5 | 77.0 ± 12.9 | 112.3 ± 25.1 | 17.5 ± 2.9 |
| | IGI, 10% | 100 | 99.7 ± 17.7 | 8.7 ± 1.5 | 64.0 ± 1.7 | 122.7 ± 24.7 | 18.0 ±3.0 |
| | | 33 | 99.0 ± 7.2 | 6.7 ± 4.0 | 48.3 ± 6.4 | 97.3 ± 43.7 | 21.0 ± 2.0 |
| | | 11 | 82.0 ± 1.7 | 9.7 ± 2.5 | 52.3 ± 2.1 | 141.3 ± 2.1 | 17.0 ± 2.6 |
| | | 3.7 | 80.7 ± 20.8 | 9.3 ± 4.9 | 65.3 ± 15.0 | 108.7 ± 6.0 | 12.3 ± 2.5 |
| | | 1.2 | 93.7 ± 12.7 | 6.7 ± 3.1 | 56.3 ± 11.7 | 134.7 ± 29.8 | 11.7 ± 2.1 |
| | 4NOPD | 10 µg/plate | 592.3 ± 62.1* | - | - | - | - |
| | 2NF | 2 µg/plate | - | 232.7 ± 19.6* | - | - | - |
| | SA | 2 µg/plate | - | - | 246.0 ± 28.6* | - | - |
| | | 1 µg/plate | - | - | - | - | 143.3 ± 54.3* |
| | t-BHPO | 50 µg/plate | - | - | - | 288.0 ± 33.6* | - |
| With Activation | 5% Glucose | 100 | 103.2 ± 9.0 | 12.3 ± 2.5 | 80.0 ± 13.5 | 233.2 ± 23.9 | 16.7 ± 5.0 |
| | IGI, 10% | 100 | 88.3 ± 12.7 | 15.3 ± 3.5 | 74.7 ± 4.6 | 204.7 ± 26.6 | 14.7 ± 4.5 |
| | | 33 | 119.0 ± 15.0 | 14.0 ± 2.0 | 83.3 ± 11.9 | 229.0 ± 25.9 | 21.3 ± 2.1 |
| | | 11 | 110.0 ± 20.0 | 14.7 ± 3.2 | 71.3 ± 11.2 | 232.3 ± 4.6 | 15.3 ± 5.9 |
| | | 3.7 | 120.0 ± 12.5 | 11.3 ± 2.5 | 65.7 ± 5.9 | 231.7 ± 5.0 | 15.3 ± 0.6 |
| | | 1.2 | 95.0 ± 14.0 | 13.0 ± 1.7 | 69.0 ± 10.6 | 207.3 ± 32.9 | 17.0 ± 5.0 |
| | DMBA | 10 µg/plate | 844.0 ± 5.6* | - | - | - | - |
| | 2AA | 1 µg/plate | - | 388.3 ± 72.8* | - | - | - |
| | | 2 µg/plate | - | - | 2050.7 ± 66.0* | - | 166.3 ± 45.0* |
| | DHA | 50 µg/plate | - | - | - | 810.0 ± 85.4* | - |

2AA = 2-Amino-anthracene; 4NOPD = 4-Nitro-o-phenylene-diamine; CTD = Common Technical Document; DHA = 1,8-Dihydroxy-anthraquinone; DMBA = 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene; DMSO = Dimethylsulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution; 2NF = 2-Nitro-fluorene; SA = Sodium azide; SD =standard deviation; t-BHPO = t-Butyl-hydroxyperoxide

* positive result; i.e. at least 2.5-fold of the amount of the spontaneous revertants for the strains TA98 and TA1535, and at least 1.67-fold for the strains TA97a, TA100 and TA102

-: not applicable

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

試験は実施しなかった。

2.6.7.10 がん原性試験

試験は実施しなかった。

## 2.6.7.11 生殖発生毒性試験：予備試験

Test Article: rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Dosing Period | Doses (mg/kg) | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC (10 mmol/L Histidine, 130 mmol/L NaCl) | GD 6-15 | 1, 3, 10, 30 | F8 | All mice survived to scheduled sacrifice on GD 18. All clinical observations were considered unrelated to rHuPH20 administration. Body weights and body weight gains were unaffected by rHuPH20 administration up to 10 mg/kg/day. At necropsy, 1/8 and 3/8 mice in the 10 and 30 mg/kg/day groups, respectively, had enlarged spleens. One of 8 mice in the 10 mg/kg/day group had a clear fluid-filled bursal cyst on the right ovary. Pregnancy occurred in 8/8, 6/8, 6/8, 7/8 and 8/8 mice in the 0, 1, 3, 10 and 30 mg/kg/day groups, respectively. Four of 8 dams (3 of which had enlarged spleens) in the 30 mg/kg/day dose group had litters consisting of resorbed conceptuses only. One dam (with an enlarged spleen) in the 10 mg/kg/day dose group had a litter that consisted of 69% resorptions. The litter size (live fetuses) of the 30 mg/kg/day dose group was reduced compared to controls. Fetal body weights (total, male and female) were reduced in the 30 mg/kg/day dosage group. There were no rHuPH20-related fetal gross alterations. There were no rHuPH20-related effects on the dams or their litters in the 1 or 3 mg/kg/day dose groups. | R07046/ 4.2.3.5.2-1 |
| Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC (10 mmol/L Histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5) | PND 7-42 (main study) PND 7-28 (antibody subset) | Daily Dosing: 1, 3, 9 Weekly Dosing: 3, 9 | Main study: M8/F8 Antibody subset: M8/F8 | Subcutaneous administration of rHuPH20 either daily or once weekly was well tolerated at levels up to 9.0 mg/kg. There were no adverse effects observed at doses up to 9.0 mg/kg. Anti-rHuPH20 antibodies were detected in all rHuPH20-dosed groups by PND 30 and were cross-reactive to rMuPH20 and rMuHyal5. | 13123/ 4.2.3.5.4-1 |
| Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC (10 mmol/L Histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5) | PND 7 through PND 90 | 3, 9 | M8/F8 | No persistent adverse effects were noted in any dosed groups as a result of rHuPH20 administration, and no marked differences in average body weights were observed across groups. | 13125/ 4.2.3.5.4-2 |

CTD = Common Technical Document; F = female; GD = gestation day; M = male; NaCl = sodium chloride; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rMuHyal5 = recombinant murine hyaluronidase 5; rMuPH20 = recombinant murine hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous

## 2.6.7.12 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

試験は実施しなかった。

## 2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Test Article: rHuPH20

| | | |
|---|---|---|
| Report Title: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of rHuPH20 in Mice | | |
| Design similar to ICH 4.1.3? Yes | Duration of Dosing: Once daily on GDs 6-15 (10 doses) | Study Number: R08176 |
| Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR) | Day of Mating: GD 0 | Location in CTD: Section 4.2.3.5.2-2 |
| Initial Age: 63 days | Day of C-Section: GD 18 | GLP Compliance: Yes |
| Date of First Dose: [redacted] | Method of Administration: SC | |
| | Vehicle/Formulation: 10 mmol/L Histidine, 130 mmol/L NaCl, pH6.5 in Sterile Water for Injection, USP | |
| Special Features: The level of anti-rHuPH20 and the isotype(s) of these antibodies were measured (non-GLP). | | |
| No Observed Adverse Effect Level: $F_0$ Females: 18 mg/kg/day, $F_1$ Litters: 3 mg/kg/day | | |

| Dose (mg/kg) | 0 (Control) | 3 | 9 | 18 |
|---|---|---|---|---|
| Dams: | | | | |
| Toxicokinetics (n=3/timepoint): | | | | |
| GD 6: $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | NA | 5.45 | 45.3 | 120 |
| GD 15: $AUC_{0-24}$ (U·hr/mL) | NA | 55.1 | 79.0 | 363 |
| No. Pregnant | 24 | 24 | 23 | 23 |
| No. Died or Sacrificed Moribund | 0 | 0 | 2 | 1 |
| No. Aborted or with Total Resorption of Litter | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Clinical Observations | - | - | - | - |
| Necropsy Observations | - | - | - | - |
| Body Weight (%) [a] | 49.8 g | 101.4 | 97.6 | 101.6 |
| Mean No. Corpora Lutea | 13.8 | 13.4 | 13.4 | 13.7 |
| Mean No. Implantations | 13.6 | 13.0 | 13.0 | 13.4 |
| Additional Examinations [b] | | | | |
| Anti-rHuPH20 Binding Antibody Titers (n=9) | | | | |
| GD 6 (predose) | NA | < 1:50 | < 1:50 | < 1:50 |
| GD 15 | NA | 1:200 - 1:1,600,000 | 1:2500 - 1:1,600,000 | 1:2500 - ≥1:3,200,000 |
| Additional Examinations [b] | | | | |
| Anti-rHuPH20 Antibody Isotype Determination [c] | | | | |
| $IgG_1$, $IgG_{2a}$, $IgG_{2b}$, $IgG_3$ | NA | +, +, +, + | +, +, +, + | +, +, +, + |
| IgM | NA | +/- | +/- | +/- |
| IgA | NA | negative | negative | negative |

## 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）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) | 0 (Control) | 3 | 9 | 18 |
|---|---|---|---|---|
| Litters: | | | | |
| No. Litters Evaluated | 24 | 24 | 21 | 22 |
| Mean Litter Size (Live Fetuses) | 12.4 | 11.9 | 11.0 | 11.6 |
| Mean No. Resorptions | 1.2 | 1.1 | 2.0 | 1.7 |
| Early Resorptions | 1.1 | 0.9 | 1.0 | 0.5 |
| Late Resorptions | 0.1 | 0.2 | 1.0 | 1.2 |
| No. of Litters with Dead Fetuses | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Mean % Postimplantation Loss | 8.6 | 8.5 | 15.4 | 13.6 |
| Mean Fetal Body Weight (g) | 1.36 | 1.36 | 1.30 [d] | 1.30 [d] |
| Fetal Sex Ratios (% males) | 46.2 | 51.7 | 52.3 | 51.9 |
| Fetal Anomalies | - | - | - | - |
| Litters with Fetuses with Any Alteration Observed (%) | 91.7 | 91.7 | 90.5 | 86.4 |

- = no noteworthy findings; + = sample was positive for the indicated isotype; +/- = low level of isotype was detected in sample; $AUC_{0\text{-}24}$ = area under the concentration-time curve from dosing until 24 hours; CTD = Common Technical Document; C-Section = Caesarean section; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Ig = immunoglobulin; NaCl = sodium chloride; NA = not applicable; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; U = units; USP = United States Pharmacopeia

a. At end of dosing period (GD 16). For controls, group means are shown. For treated groups, percent of control is shown.

b. The level of anti-rHuPH20 (expressed as titer) and the isotype(s) of these antibodies were measured in toxicokinetics plasma samples.

c. Isotype analyses were performed on five GD 15 samples with high anti-rHuPH20 antibody titers (titers >1:50,000).

d. $p \leq 0.05$

## 2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生試験

Test Article: rHuPH20

| | | | |
|---|---|---|---|
| Report Title: Subcutaneous Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Toxicity Study of rHuPH20 in Mice, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation | | | |
| Design similar to ICH 4.1.2? Yes | | Duration of Dosing: GD 6 through LD 20 | Study Number: R09058 |
| Species/Strain: | Mouse/Crl:CD1(ICR) | Day of Mating: GD 0 | Location in CTD: Section 4.2.3.5.3-1 |
| Initial Age: | 63 days | Method of Administration: SC | GLP Compliance: Yes |
| Date of First Dose: | [redacted] | Vehicle: 10mmol/L Histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5 in Sterile Water for Injection, USP | |
| Special Features: | None | Litters Not Culled | |
| No Observed Adverse Effect Level: $F_0$ Females: 9 mg/kg/day<br>$F_1$ Generation: 9 mg/kg/day | | | |

| Dose (mg/kg) | | 0 (Vehicle) | 3 | 6 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|
| $F_0$ Females: | | | | | |
| No. Pregnant | | 22 | 20 | 21 | 20 |
| No. Died or Sacrificed Moribund | | 0 | 0 | 1 | 2 |
| No. with Total Resorption of Litter | | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Clinical Observations | | - | - | - | - |
| Necropsy Observations | | - | - | - | - |
| Gestation Body Weight (%) [a] | | 55.2 g | -1.8% | -3.3% | -1.4% |
| Lactation Body Weight (%) [a] | | 43.3 g | -2.8% | +0.5% | +4.2% |
| Mean Duration of Gestation (days) | | 19.9 | 19.8 | 19.8 | 20.0 |
| Abnormal Parturition | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $F_1$ Litters (Preweaning) | No. Litters Evaluated | 22 | 19 [g] | 20 | 18 |
| | Mean No. of Implantations | 12.2 | 12.2 | 12.8 | 12.5 |
| | Mean No. Pups/Delivered Litter | 11.5 | 11.6 | 11.7 | 12.2 |
| | Mean No. Liveborn Pups/Litter | 11.5 | 11.6 | 11.7 | 12.0 |
| | No. of Litters with Stillborn Pups | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Postnatal Survival to Day 4 | 96.1% | 99.5% [b] | 93.9% | 100.0% [b] |

## 2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) | | 0 (Vehicle) | 3 | 6 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|
| $F_1$ Litters (Preweaning) (continued) | Postnatal Survival from Day 4 to Weaning | 99.6% | 99.5% | 100.0% | 97.6% [c] |
| | No. of Total Litter Losses | 1 | 1 | 3 | 1 |
| | Change in Pup Body Weights [d] | +9.1 g | +9.0 g | +8.6 g | +7.9 g |
| | Pup Sex Ratios at Birth (% Male) | 52.8 | 43.8 | 51.6 | 48.4 |
| | Pup Clinical Signs | - | - | - | - |
| | Pup Necropsy Observations | - | - | - | - |
| $F_1$ Males (Postweaning) | No. Evaluated Postweaning | 25 | 25 | 25 | 24 |
| | No. Died or Sacrificed Moribund | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical Observations | - | - | - | - |
| | Necropsy Observations | - | - | - | - |
| | Body Weight Change [e] | +24.6 g | +24.8 g | +25.3 g | +24.7 g |
| | Preputial Separation (Mean age) | 29.8 days | 29.8 days | 30.0 days | 30.4 days |
| | Motor Activity | - | - | - | - |
| | Learning and Memory | - | - | - | - |
| | Mean No. Days Prior to Mating | 2.0 | 2.8 | 2.0 | 1.8 |
| | No. of Males that Mated | 23 | 25 | 25 | 24 |
| | No. of Fertile Males | 18 | 23 | 24 | 21 |
| | Organ Weights (Testes and Epididymides) | - | - | - | - |
| $F_1$ Females (Postweaning) | No. Evaluated Postweaning | 24 | 25 | 25 | 25 |
| | No. Died | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical Observations | - | - | - | - |
| | Necropsy Observations | - | - | - | - |
| | Premating Body Weight Change [e] | +17.2 g | +16.9 g | +17.3 g | +17.9 g |
| | Gestation Body Weight Change [f] | +26.6 g | +29.6 g | +29.0 g | +29.4 g |
| | Vaginal Patency (Mean Age) | 31.1 days | 31.9 days | 30.8 days | 31.8 days |
| | Motor Activity | - | - | - | - |
| | Learning and Memory | - | - | - | - |

## 2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) | | 0 (Vehicle) | 3 | 6 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|
| $F_1$ Females (Postweaning) (continued) | Mean No. Days Prior to Mating | 2.0 | 2.8 | 2.0 | 1.8 |
| | No. of Females Sperm-Positive | 23 | 25 | 25 | 25 |
| | No. of Pregnant Females | 18 | 23 | 24 | 22 |
| | Mean No. Corpora Lutea | 12.1 | 13.3 | 13.6 | 13.5 |
| | Mean No. Implantations | 11.4 | 13.0 | 13.4 | 13.2 |
| | Mean % Preimplantation Loss | 8.9 | 3.7 | 2.7 | 2.3 |
| $F_2$ Litters | Mean No. Live Conceptuses/Litter | 10.4 | 11.6 | 11.2 | 12.0 |
| | Mean No. Resorptions | 0.9 | 1.3 | 2.2 | 1.2 |
| | No. of Litter with Dead Conceptuses | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | No. Dead Conceptuses | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | Mean % Postimplantation Loss | 7.9 | 11.5 | 17.0 | 9.1 |
| | Fetal Body Weights | 1.33 g | 1.34 g | 1.35 g | 1.31 g |
| | Fetal Sex Ratios (% males) | 50.7 | 57.2 | 48.2 | 48.0 |
| | Fetal External Anomalies | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings; CTD = Common Technical Document; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; ICH = International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; NaCl = sodium chloride; LD = lactation day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; USP = United States Pharmacopeia

a. At GD 18 or LD21. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b. Significantly different from the vehicle control group value ($p \leq 0.05$)

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

d. From birth to weaning

e. From weaning to mating

f. From GDs 0 to 18

g. Excludes values for mouse 6136, which sacrificed on day 1 of lactation due to no surviving pups.

## 2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

Test Article: rHuPH20

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Report Title: Life-time Toxicity Study of Subcutaneous rHuPH20 and Anti-rHuPH20 Antibodies in the Mouse | | | | |
| Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR) | Duration of Dosing: PND 7 through PND 129/241 [a] | | Study Number: 15028 | |
| Initial Age: 7 days | Day of Littering: PND 1<br>Day of Weaning: PND 21<br>Day of Initiation of Cohabitation: At least PND 87 | | Location in CTD: Section 4.2.3.5.4-3 | |
| Date of First Dose: [redacted] | Method of Administration: Subcutaneous | | GLP Compliance: Yes | |
| | Vehicle: 10mmol/L Histidine, 130 mmol/L NaCl, pH 6.5 in Sterile Water for Injection, USP | | | |
| Special Features: neurobehavioral assessments, reproductive capacity and fetal evaluations, chronic toxicity, antibody assessment | | | | |
| Dose (mg/kg) [b] | 0 (Vehicle) | | 1 | |
| | Juvenile Subset | Chronic Subset | Juvenile Subset | Chronic Subset |
| No. of Animals | 30M/30F | 25M/25F | 30M/30F | 25M/25F |
| Noteworthy Findings: | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund | 2F | 3F | 3F | 2M |
| Clinical Observations | - | - | - | - |
| Body Weights | - | - | - | - |
| Opthalmic Examinations | NA | - | NA | - |
| Sexual Maturation | - | NA | - | NA |
| Behavior Assessment | - | NA | - | NA |
| Mating and Fertility | - | NA | - | NA |
| Clinical Pathology | NA | - | NA | - |
| Gross Pathology | - | - | - | - |
| Organ Weights<br>Spleen (PND 241)<br>Number Examined<br>Absolute Weight (g)<br>Relative to Body Weight (%)<br>Relative to Brain Weight (%) | - | <br><br>25M/22F<br>-/0.133<br>-/0.386<br>-/23.8 | - | <br><br>23M/25F<br>-/0.163*<br>-/0.456*<br>-/28.8* |

## 2.6.7.15 幼若動物を用いた試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) [b] | 0 (Vehicle) | | 1 | |
|---|---|---|---|---|
| | Juvenile Subset | Chronic Subset | Juvenile Subset | Chronic Subset |
| No. of Animals | 30M/30F | 25M/25F | 30M/30F | 25M/25F |
| Histopathology | - | | - | |
| Spleen | | | | |
| Number Examined | NA | 25M/22F | NA | 23M/25F |
| Increased Hematopoiesis | | -/12 | | -/17 |
| Injection Sites 1 [c] | | | | |
| Number Examined | NA | 25M/22F | NA | 21M/25F |
| Inflammation, mixed cell; subcutaneous tissue | | 1/00/1 | | 2/2 |
| Infiltration, mixed cell; subcutaneous tissue | | | | 14/20 |
| Injection Sites 2 [c] | | | | |
| Number Examined | NA | 25M/22F | NA | 21M/25F |
| Inflammation, mixed cell; subcutaneous tissue | | 0/0 | | 2/0 |
| Infiltration, mixed cell; subcutaneous tissue | | 0/5 | | 9/20 |
| Injection Sites 3 [c] | | | | |
| Number Examined | NA | 25M/22F | NA | 21M/25F |
| Inflammation, mixed cell; subcutaneous tissue | | 0/0 | | 1/6 |
| Infiltration, mixed cell; subcutaneous tissue | | 0/2 | | 13/23 |
| Injection Sites 4 [c] | | | | |
| Number Examined | NA | 25M/22F | NA | 21M/25F |
| Infiltration, mixed cell; subcutaneous tissue | | 0/3 | | 12/20 |
| Sperm evaluation | - | NA | - | NA |
| Ovarian and Uterine Examinations and Litter Observations | - | NA | - | NA |
| Fetal examinations | - | NA | - | NA |

## 2.6.7.15 幼若動物を用いた試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) [b] | 0 (Vehicle) | | 1 | |
|---|---|---|---|---|
| | Juvenile Subset | Chronic Subset | Juvenile Subset | Chronic Subset |
| No. of Animals | 30M/30F | 25M/25F | 30M/30F | 25M/25F |
| Anti-Drug Antibodies (the number of anti-drug antibody positive samples/the number of samples that were analyzed) | | | | |
| PND 30 [d] | 0/24 | 0/20 | 24/24 | 20/20 |
| PND 60 [d] | 2/24 | NA | 24/24 | NA |
| PND 90 [d] | 4/24 | 0/20 | 24/24 | 20/20 |
| GD 18 | 1/22 | NA | 22/22 | NA |
| PND 129 | 5/36 | NA | 36/36 | NA |
| PND 180 | NA | 0/47 | NA | 48/48 |
| PND 241 | NA | 1/47 | NA | 49/49 |
| Cross-Reactivity to rMuPH20 (the number of rMuPH20 reactive murine IgG samples/the number of samples that were analyzed) | | | | |
| PND 30 [d] | NA | NA | 16/21 | 12/20 |
| PND 60 [d] | 1/2 | NA | 17/18 | NA |
| PND 90 [d] | 0/2 | NA | 24/24 | 17/17 |
| GD 18 | 0/1 | NA | 20/22 | NA |
| PND 129 | 2/5 | NA | 34/36 | NA |
| PND 180 | NA | NA | NA | 44/46 |
| PND 241 | NA | 0/1 | NA | 48/48 |
| Cross-Reactivity to rMuHyal5 (the number of rMuHyal5 reactive murine IgG samples/the number of samples that were analyzed) | | | | |
| PND 30 [d] | NA | NA | 19/21 | 20/20 |
| PND 60 [d] | 1/2 | NA | 18/18 | NA |
| PND 90 [d] | 0/2 | NA | 24/24 | 17/17 |
| GD 18 | 0/1 | NA | 22/22 | NA |
| PND 129 | 5/5 | NA | 36/36 | NA |
| PND 180 | NA | NA | NA | 46/46 |
| PND 241 | NA | 0/1 | NA | 48/48 |

## 2.6.7.15 幼若動物を用いた試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Dose (mg/kg) [b] | 0 (Vehicle) | | 1 | |
|---|---|---|---|---|
| | Juvenile Subset | Chronic Subset | Juvenile Subset | Chronic Subset |
| No. of Animals | 30M/30F | 25M/25F | 30M/30F | 25M/25F |
| Plasma Hyaluronidase Neutralizing Activity (the number of positive samples for rHuPH20-neutralizing antibodies/the number of samples that were analyzed) | | | | |
| PND 30 [d] | NA | NA | 12/16 | 14/18 |
| PND 60 [d] | NA | NA | 15/19 | NA |
| PND 90 [d] | NA | NA | 24/26 | 17/17 |
| GD 18 | 0/1 | NA | 22/22 | NA |
| PND 129 | 0/5 | NA | 35/36 | NA |
| PND 180 | NA | 0/17 | NA | 33/34 |
| PND 241 | NA | 0/1 | NA | 47/48 |

- = no noteworthy findings; CTD = Common Technical Document; 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; USP = United States Pharmacopeia

a. PND 129 for juvenile subset, PND 241 for chronic subset

b. daily from PND 7 to PND 30 and thereafter administered weekly until PND 129 (after reproductive assessments for the juvenile subset) or PND 241 (chronic subset)

c. Administration of test article or control article subcutaneously were rotated daily across four dose sites to each pup/mouse.

d. Blood samples were collected from 2 or 3 animals per sample per sex per group on PNDs 30, 60, and 90 and pooled to ensure adequate sample volume.

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

## 2.6.7.16 局所刺激性試験

### 2.6.7.16.1 局所刺激性試験 － IGI, 10%

Test Article: IGI, 10%

| Species/ Strain | Method of Administration | Doses | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Rabbit/ NZW | intraarterial<br>intravenous<br>paravenous | 10 mL per animal<br>10 mL per animal<br>0.5 mL per animal | M2/F2 | Well tolerated after intravenous application, slight irritation after intraarterial or paravenous administration | PV0350101/ 4.2.3.6-1 |

CTD = Common Technical Document; F = female; M = male; NZW = New Zealand White; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution

## 2.6.7.16.2 局所刺激性試験 － IGI, 10%及び rHuPH20 併用

Test Article: IGI, 10% with rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration | Doses | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Rabbit/ NZW | SC, repeated dose (one, two or three doses with 7 days intervals) | rHuPH20: 500 or 5000 U/kg (0.1 or 1 mL/kg) + IGI, 10% 5 mL/kg | 4 (M2/F2)/dose regimen | Questionable to moderate subcutaneous inflammatory reaction after single or repeated application of IGI, 10% with and without rHuPH20 | AU0206W01/ 4.2.3.6-2 |
| Mice/ SCID | SC, repeated dose (one, two or three doses with 7 days intervals) | rHuPH20: 100 U/ animal (0.1 mL/animal) + IGI, 10% 0.1 mL/animal | M3/dose regimen | No test-item-related adverse effect after repeated subcutaneous administration of IGI, 10% with and without rHuPH20 | R09131/ 4.2.3.6-3 |
| Minipig/ Yucatan | SC | rHuPH20 2240 U (14 mL/injection site)+IgG (10%) [a] 300 mL/injection site | F9 | It was demonstrated that pre-administration of rHuPH20 mitigates alteration of tissue and adverse tissue effects (local swelling/induration, changes of in-line pressure, skin pliability and skin surface temperature, and histpathological findings) with administration of large volumes of IgG in a porcine model. | 11018/ 4.2.3.6-4 |
| Minipig/ Yucatan | SC | rHuPH20 2240 U (14 mL/injection site) + IGI, 10% 300 mL/injection site | F5 | It was demonstrated that pre-administration of rHuPH20 mitigates alteration of tissue and adverse tissue effects (local swelling/induration, changes of in-line pressure, and histpathological findings) with administration of large volumes of IGI, 10% in a porcine model. Cutaneous blood perfusion is improved in the presence of rHuPH20 during large volume infusions of IGI, 10%. | 11028/ 4.2.3.6-5 |

CTD = Common Technical Document; F = female; IgG = Immunoglobulin G; IGI, 10% = Immune Globulin Infusion (Human), 10% Solution; M = male; NZW = New Zealand White; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; SC = subcutaneous; SCID = severe combined immunodeficiency; U = units

a Test article was Gamma Globulin Powder; BioMed Supply Inc., reconstituted to a 10% solution.

## 2.6.7.17 その他の毒性試験

Test Article: rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration/ Experimental Method | Dose Regimen | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Evaluation of anti-rHuPH20 antibodies in reproductive and developmental toxicity study | | | | | |
| Rabbit/ NZW | SC or IM [a] | Three different dosing regimens shown in the footnote [a] | Regimen 1: F4<br>Regimen 2: Treatment group - F5<br>Control group – F2<br>Regimen 3: F4 | All rHuPH20 dosed females, but not buffer treated control animals, generated elevated anti-rHuPH20 antibody titers by Day 33.<br>The in vitro characterization demonstrated that anti-rHuPH20 antibodies cross-react to rRbPH20 at a high incidence (≥80%). | 12124/ 4.2.3.7.7-1 |
| Rabbit/ NZW | SC | 0, 0.76 mg/kg<br>Day 1, 8, 15, 22, 29, 43 (prior to mating) and 57 (post mating) | M22 | In antibody analysis, by Day 8, all rHuPH20 treated males were positive for anti-rHuPH20 binding antibodies which were maintained through terminal necropsy (Day 85).<br>Cross reactivity of anti-rHuPH20 antibodies to rRbPH20 was first observed at Day 15, and then increased to 100% incidence by Day 29. Greater than 90% incidence of cross reactivity was maintained from Day 29 through 85. Neutralizing activity of anti-rHuPH20 antibodies was also observed in the majority (82%) of males received rHuPH20 one day prior to mating.<br>In the absence of any biologically meaningful effects on sperm parameters or Cesarean-section evaluations in the mated females, it is concluded that persistent exposure to anti-rHuPH20 antibodies prior to mating had no effect on male reproductive functions, mating behavior or fertility. | 12208/ 4.2.3.7.7-2 |

## 2.6.7.17 その他の毒性試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration/ Experimental Method | Dose Regimen | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Evaluation of anti-rHuPH20 antibodies in reproductive and developmental toxicity study (continued) | | | | | |
| Rabbit/ NZW | SC | 0, 0.76 mg/kg Day 1, 8, 15, 22, 29, 42 (prior to mating) and GD 15 | Cesarean-sectioning cohort: F22 Natural delivery cohort: F22 | All F0 females dosed with rHuPH20 generated anti-rHuPH20 binding antibodies in systemic circulation by Day 15. Maternal titers were maintained at the end of weaning (LD 29). In the F1 generation, 100% incidence (percent offspring positive for anti-rHuPH20 antibodies) of exposure to anti-rHuPH20 binding antibodies was observed from LD 4 through PND 62. Thereafter, the incidence of exposure gradually declined through the end of the study.<br>The incidence of cross reactivity to rRbPH20 in F0 plasma was 100% at Day 42 (prior to mating), while 100% incidence only at LD 4 in F1 generation.<br>In the majority of F0 female rabbits (> 75%), rHuPH20 neutralizing activity was observed. In the majority of F0 female rabbits (≥ 60%), rRbPH20 neutralizing activity was observed. Cross neutralization of rRbPH20 was detected in a minority of the F1 generation plasma samples evaluated at LD 4 (30% incidence).<br>Maternal exposure to elevated titers of anti-rHuPH20 antibodies prior to mating and throughout gestation had no effect on mating and fertility.<br>Maternal anti-rHuPH20 antibodies transferred to their offspring during gestation, persisted through at least 3 months of age and had no effect on embryo fetal or postnatal development of offspring. | 12195/ 4.2.3.7.7-3 |

## 2.6.7.17 その他の毒性試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration /Experimental Method | Dose Regimen | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Evaluation of anti-rHuPH20 antibodies in reproductive and developmental toxicity study (continued) | | | | | |
| Mouse/ Crl:CD1(ICR) | SC | 0, 3, 6, 9 mg/kg Once daily from GD 6 through LD 21 | Control group: F21 3, 6 and 9 mg/kg groups: F42 [b] | In plasma from maternal mice dosed with rHuPH20, anti-rHuPH20 antibody titers were detected in all animals on GD 18, and titers continued to rise through the end of lactation on LD 23. Anti-rHuPH20 antibody titers were observed in pooled litters (GD 18) and pups (PND 23) in rHuPH20 treated pregnant mice. Postweaning, despite no additional exposure through maternal transfer, anti-rHuPH20 antibodies persisted in individual pups through adulthood, PND 60 (last time point sampled).<br>Cross-reactivity for rMuPH20 and rMuHyal5 was observed both in maternals and offsprings.<br>Exposure of offspring to anti-rHuPH20 antibodies throughout all stages of development from late gestation through adulthood does not result in adverse effects on overall growth, neurological development, sexual maturation, reproductive function or mating outcome in offspring of rHuPH20 treated mice. | 12096/ 4.2.3.7.7-4 |
| Tissue Cross-Reactivity Studies | | | | | |
| Rabbit/ NZW | Rabbit anti-rHuPH20 antibody, selected normal rabbit tissues | NA | M2 or 3 | All three anti-rHuPH20 antibodies bound rabbit PH20 in spermatozoa and testis tissue, where PH20 is expressed, irrespective of dosing regimen. The staining observed in ganglion (neural) cells of rabbit colon containing ENP by anti-rHuPH20 antibodies was determined to be nonspecific. | 12124-SR/ 4.2.3.7.7-5 |
| Human | Rabbit anti-rHuPH20 antibody, selected normal human tissues | NA | M3/F3 | Specific anti-rHuPH20 antibody immunoreactivity was limited to germinal epithelium of the testes in the central portion of the seminiferous tubules (late stages of spermatogenesis). Staining in 4 of 12 ENP of esophagus and colon was considered weak specific staining. | 12058/ 4.2.3.7.7-6 |

## 2.6.7.17 その他の毒性試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration /Experimental Method | Dose Regimen | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Tissue Cross-Reactivity Studies (continued) | | | | | |
| Human | Human PH20-reactive antibody and human anti-rHuPH20 antibody, selected normal human tissues | NA | M3/F3 | All human antibodies, the positive control antibodies, biotinylated rabbit anti-rHuPH20 and the mouse monoclonal antibody cocktail containing biotinylated mouse anti-rHuPH20s, positively stained spermatogenic cells within the testes. Staining observed in other tissues was interpreted as nonspecific based on smudgy, diffuse character, and rapid titration or coincidence with pigment granules. | 13086/ 4.2.3.7.7-7 |
| Gene Expression Studies related to Spam1/PH20 | | | | | |
| Mouse/ C57Bl/6, CD-1, ICR balb/c | Fetal, juvenile and adult tissues of mouse, RT-qPCR | NA | NA | The expression of murine Spam1 and Hyal5 occurs predominantly in the testes and begins 2~3 weeks after birth. In addition, both genes are also expressed in the epididymis although at 250~350 fold lower levels than in the testes. There is also low expression of Spam1 in the ovaries (~2000 fold lower than in the testes). Hyal5 was only detected in the skin from one of four samples.<br>There does not appear to be expression of murine Spam1 in tissues of the female reproductive tract (i.e., cervix, uterus, vagina) or the cortex and corpus callosum of the brain. | 12196/ 4.2.3.7.7-8 |
| Mouse/ C57Bl/6, Nu/Nu, SCID | Mouse corpus callosum, cortex and testis, RT-PCR | NA | M1 | PH20/SPAM1 was not expressed in the corpus callosum and cortex. | 12210/ 4.2.3.7.7-9 |
| Rabbit/ NZW | Rabbit colon ENP, corpus callosum, cortex and testis, RT-qPCR | NA | M3/F3 | Spam1 expression was only detected in the testes and not in any of the other tissues assessed. | 13091/ 4.2.3.7.7-10 |

## 2.6.7.17 その他の毒性試験（続き）

Test Article: rHuPH20

| Species/ Strain | Method of Administration /Experimental Method | Dose Regimen | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings | Study Number/ Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Gene Expression Studies related to Spam1/PH20 (continued) | | | | | |
| Rabbit/ NZW | Fetal, juvenile and adult tissues of rabbit, RT-qPCR | NA | NA | Spam1/PH20 is expressed in the juvenile testis starting at 3 months of age, and at high levels in the mature testis. There was low level expression in juvenile epididymis at 4 months of age, but at much lower levels relative to the adult testis, and no expression in the brain. In the embryonic tissues examined, Spam1 was detected only in the placenta and at low levels. | 13116/ 4.2.3.7.7-11 |
| Human | Human colon ENP, RT-qPCR | NA | M3/F4 | The data suggest that there was no expression of SPAM1 mRNA in human colon. | 12147/ 4.2.3.7.7-12 |
| Human | Human fetal and adult tissues, RT-qPCR | NA | NA | Results indicate that SPAM1 expression was highest in adult testes but could be detected at lower levels in a few other adult tissues including bone/ cartilage, epididymis, kidney, placenta, skeletal muscle and synoviocytes. In fetal tissues, low levels of SPAM1 expression were observed in the colon, ovaries, pancreas, small intestine, stomach and testes. | 12197/ 4.2.3.7.7-13 |
| Human, Mouse/ CD-1; ICR balb/c; C57Bl/6; Webster, Rabbit/NZW | Various adult, juvenile and fetal tissues from human, mouse, and rabbit, RNA-Seq | NA | NA | SPAM1 was not expressed in any human, murine or rabbit tissue other than that of the adult male reproductive tract (i.e., testis and epididymis). SPAM1/PH20 was not expressed in developing or adult mouse or human brain or ENP, based on the lack of measurable levels of steady-state mRNA transcripts. | 14077/ 4.2.3.7.7-14 |

CTD = Common Technical Document; ENP = enteric nerve plexus; F = female; GD = gestation day; Hyal5 = hyaluronidase 5; IM = intramuscular; LD = lactation day; M = male; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; PND = postnatal day; rHuPH20 = recombinant human hyaluronidase PH20; rMuHyal5 = recombinant murine hyaluronidase 5; rMuPH20 = recombinant murine hyaluronidase PH20; rRbPH20 = recombinant rabbit hyaluronidase PH20; RT-qPCR = (Quantitative) reverse transcriptase polymerase chain reaction; SC = subcutaneous; SCID = severe combined immunodeficiency; SPAM1/Spam1 = Sperm adhesion molecule 1 (aka PH20)

a. (1) Animals were subcutaneously given 0.2 mg/animal of rHuPH20 on Day 1. Subsequently 0.1 mg/animal in total of rHuPH20 was intramuscularly administered at 4 sites on Day 8, 22, 36 and 57 intermittently; (2) SC at a dose level of 0.76 mg/kg once daily for 28 days (note: dosing was not performed on Day 15 to allow for a drug washout period prior to blood collection on Day 16), with a booster injection on SD 43; or (3) SC once weekly for five weeks, with a boost on SD 50

b. 42 mice (6 mice in control group and 12 mice in each treatment group) were assigned to Subset 1, 63 mice were assigned to Subset 2 (9 mice in control group and 18 mice in each treatment group), 21 mice were assigned to Subset 3 (3 mice in control group and 6 mice in each treatment group). Mice in Subset 2 were equally divided into 3 subgroups (A, B and C) for blood sample collection (anti-rHuPH20 antibody analysis). An additional 21 mice (3 mice in control group and 6 mice in each treatment group) were assigned for use in rHuPH20 plasma concentration sample collection.