目次

2.4 非臨床試験の概括評価 3
2.4.1 緒言 3
2.4.2 非臨床試験計画概略 3
2.4.2.1 薬理試験 3
2.4.2.2 薬物動態試験 4
2.4.2.3 毒性試験 4
2.4.2.4 GLP 及びガイドライン適合性 5
2.4.2.5 製剤添加剤の安全性 5
2.4.3 薬理試験 5
2.4.3.1 ペルツズマブ及びトラスツズマブの *in vivo* 抗腫瘍効果 5
2.4.3.2 rHuPH20 の薬理学的特性 5
2.4.4 薬物動態試験 6
2.4.4.1 吸収 6
2.4.4.1.1 ペルツズマブ及びトラスツズマブ＋rHuPH20 6
2.4.4.1.2 トラスツズマブ＋rHuPH20 6
2.4.4.1.3 rHuPH20 6
2.4.4.2 分布（rHuPH20） 6
2.4.4.3 代謝 7
2.4.4.4 排泄 7
2.4.4.5 薬物動態学的薬物相互作用 7
2.4.5 毒性試験 7
2.4.5.1 rHuPH20 を含むトラスツズマブの毒性試験 7
2.4.5.2 rHuPH20 の毒性試験 7
2.4.5.2.1 急性毒性及び反復投与毒性 8
2.4.5.2.2 生殖発生毒性 8
2.4.5.2.3 局所刺激性 8
2.4.5.2.4 その他の毒性 9
2.4.5.3 PH FDC SC の安全性に関する考察 9
2.4.6 総括及び結論 12
2.4.7 参考文献一覧 14

表一覧

表 2.4.5.3-1 ペルツズマブ及びトラスツズマブの動物とヒトとの曝露量比較 11
表 2.4.5.3-2 rHuPH20の動物とヒトとの投与量比較 12

略語一覧

略語	英語名	和名
AUC	Area under the plasma/serum concentration-time curve	血漿（血清）中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}168h}$	AUC from time 0 to 168h	投与後0時間から168時間までのAUC
C_{max}	Maximum concentration in plasma/serum	最高血漿（血清）中濃度
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
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
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮増殖因子受容体2型
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
ID	intradermal	皮内
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IP	intraperitoneal	腹腔内
IV	intravenous	静脈内
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PH FDC SC	Pertuzumab and trastuzumab fixed dose combination for SC injection	ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤
PK	pharmacokinetics	薬物動態
rHuPH20	recombinant human hyaluronidase	ボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
SC	subcutaneous	皮下
TGI	tumor growth inhibitory ratio	腫瘍増殖抑制率
T_{max}	Time to maximum observed plasma/serum concentration	最高血漿（血清）中濃度到達時間
U	units of hyaluronidase activity	ヒアルロニダーゼ活性の単位

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 緒言

ペルツズマブ及びトラスツズマブはF. Hoffmann-La Roche, Ltd.（以下，ロシュ社）が開発したヒト上皮増殖因子受容体2型（HER2）を標的とした抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体である。これら両抗体は HER2分子上の結合部位が異なり，ペルツズマブがリガンド依存的なHER2シグナルを抑制するのに対して，トラスツズマブはリガンド非依存的な HER2シグナルを抑制する（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。両抗体はそれぞれ異なる作用機序を有し，HER2シグナルを相補的に抑制するため，両抗体の併用により相加／相乗的な抗腫瘍効果が得られる。

本邦において，ペルツズマブはトラスツズマブとの併用で，「HER2陽性の乳癌」及び「がん化学療法後に増悪した HER2陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を効能・効果として承認されている（2.5.1）。トラスツズマブは，本邦において「HER2過剰発現が確認された乳癌」，「HER2過剰発現が確認された治癒切除不能な進行・再発の胃癌」，「HER2陽性の根治切除不能な進行・再発の唾液腺癌」及び「がん化学療法後に増悪した HER2陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」を効能・効果として承認されている（2.5.1）。

近年，ペルツズマブ及びトラスツズマブをそれぞれ固定用量で配合し，さらに皮下注入液の浸透吸収促進を目的としてボルヒアルロニダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）（rHuPH20）を配合した調剤不要の皮下投与製剤（ペルツズマブ/トラスツズマブ配合皮下注射剤，PH FDC SC）が開発された。PH FDC SC では，静脈内（IV）投与による高い侵襲性，投与にかかる長い拘束時間等を回避することができ，今回，本剤の承認申請を行なうこととした。既に海外で承認・販売されているトラスツズマブ，リツキシマブ等の皮下投与抗体薬にも皮下注入液の浸透吸収促進を目的として rHuPH20が配合されている。

浸透吸収促進成分である rHuPH20は乳癌に対する直接的な薬効を期待するものではないが，ヒアルロン酸を分解するという生理活性を有しており，当該生理活性が発揮されることにより皮下注入可能な液体量の増加・浸透吸収促進という薬効が得られると考えられる。

2.4.2 非臨床試験計画概略

ペルツズマブ及びトラスツズマブの HER2陽性乳癌に対する非臨床における有効性及び安全性は，初回承認申請時に提出した主に静脈内（IV）投与試験成績に基づき評価されている。今回，新たに PH FDC SC の承認申請用に非臨床試験を追加実施した。ペルツズマブ及びトラスツズマブに関する一連の非臨床試験はロシュ社（ジェネンテック社を含む）で，rHuPH20の非臨床試験はハロザイム社で実施された。今回の非臨床申請データパッケージはこれらの試験資料を基に構成し，20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開催された[redacted]相談[redacted]の対面助言において，非臨床申請データパッケージとしての妥当性が確認されている。以下に，薬理，薬物動態及び毒性試験の概略を示す。

2.4.2.1 薬理試験

ペルツズマブ及びトラスツズマブの「HER2陽性の乳癌」に対する非臨床における IV 投与時の有効性及び安全性は，初回申請時に提出した試験成績に基づき評価されている（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]，トラスツズマブ初回申請時資料[2)]）。今回「PH FDC SC 製剤の承認申請」のための効力を裏付ける試験として，「ヒト腫瘍細胞株 xenograft マウスにおいて，トラスツズマブ皮下（SC）投与時とトラスツズマブ IV 投与時の抗腫瘍効果を比較した試験（1試験）」及び「マウス色素拡散モデルを用いて，rHuPH20の薬理学的特性を検討した試験（6試験）」を新たに提出する。また，ヒト乳癌細胞株において，ペルツズマブとトラスツズマブ併用が抗腫瘍効果を増強することを裏付ける資料として，「ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにおけるペルツズマブとトラスツズマブの併用効果」の試験結果を初回申請時資料から再

掲した（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。

ヒト腫瘍細胞株 xenograft マウスにおいて，トラスツズマブ SC 投与時とトラスツズマブ IV 投与時の抗腫瘍効果を比較した試験では，ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）株 Calu-3 xenograft マウスを用いて，トラスツズマブ（SC） + rHuPH20（SC）併用投与時とトラスツズマブ IV 単独投与時の抗腫瘍効果を比較した。マウス色素拡散モデルを用いて rHuPH20の薬理学的特性を検討した試験では，マウス皮膚組織へ rHuPH20 + トレーサー色素（トリパンブルー）を投与した後のトリパンブルーの拡散領域の経時変化を指標にして，rHuPH20の生理活性を評価した。

ペルツズマブ及びトラスツズマブの安全性薬理試験成績は，各 IV 投与製剤の承認申請時に評価済みである（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]，トラスツズマブ初回申請時資料[2)]）。本申請にあたり，新たに実施した rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間 SC 投与毒性試験，及び rHuPH20のカニクイザルを用いた39週間 SC 投与毒性試験において，安全性薬理評価を行った。

2.4.2.2 薬物動態試験

ペルツズマブ及びトラスツズマブの薬物動態（PK）特性は，初回申請時に提出の IV 投与試験成績に基づき評価されている[1)，2)]。

今回，ペルツズマブ及びトラスツズマブに rHuPH20を併用した際の SC 投与での PK 特性を明らかにするために，ミニブタを用いてペルツズマブ＋rHuPH20の単回 SC 投与及びペルツズマブ＋トラスツズマブ＋rHuPH20の単回 SC 併用投与後の PK を評価した。バイオアベイラビリティ（F）算出のためペルツズマブ単独の IV 投与試験も実施した。

また，ペルツズマブ同様に HER2に結合し，類似の PK 特性を有する IgG1モノクローナル抗体であるトラスツズマブを rHuPH20と併用 SC 投与し，トラスツズマブの吸収への影響を評価した。トラスツズマブをマウス，ミニブタ及びカニクイザルに rHuPH20と併用 SC 投与したときの PK を評価し，同時にマウス及びミニブタにおいて，F 値算出のためトラスツズマブの IV 投与試験も実施した。マウス及びカニクイザルは薬理試験及び毒性試験で主に使用された動物種である。

rHuPH20の PK 特性を評価するため，マウス及びカニクイザルを用いて rHuPH20単独での SC 及び IV 投与による PK 試験を行った。rHuPH20の基質であるヒアルロン酸の構造は動物種間で保存されているため[3)-6)]，いずれの動物種も rHuPH20の薬物動態試験の動物種として適切と考えられた（2.6.2.2.2）。

rHuPH20の分布試験は雌ヌードマウスを用いて実施し，2000 U/mL の rHuPH20溶液40 µL を皮内（ID）投与し，rHuPH20の局所分布を調べた。マウスの皮内空間は，ヒトの皮下空間における薬物送達活性の点からヒアルロニダーゼの分散効果を評価するためにより適切な部位と考えられた。

ペルツズマブ，トラスツズマブ及び rHuPH20のいずれについても，代謝，排泄及び薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

2.4.2.3 毒性試験

PH FDC SC に関する独立した毒性試験は実施していない。ペルツズマブ及びトラスツズマブの毒性試験については，各静脈内投与製剤の初回承認申請時に評価済みである[1)，2)]。また，海外での rHuPH20を含むトラスツズマブ皮下投与製剤の開発のため，rHuPH20についての一連の毒性試験に加えて，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間反復皮下投与毒性試験及びウサギを用いた単回皮下投与局所刺激性試験を実施した。これらの試験において，rHuPH20の毒性プロファイルが明らかにされ，また，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル及びウサギにおける忍容性は良好であり，各有効成分の個別の試験結果と比較して，新たな毒性所見は認められなかった。これらの成績及び rHuPH20を含むペルツズマブ及

びトラスツズマブのミニブタを用いた薬物動態試験（2.4.4.1）の結果から，PH FDC SC に関する毒性試験は不要と判断した。

2.4.2.4 GLP 及びガイドライン適合性

PH FDC SC の承認申請のために追加実施した rHuPH20を含むトラスツズマブの毒性試験，並びに rHuPH20の主要な毒性試験は，ICH ガイドラインに準拠し，米国食品医薬品局（FDA）の GLP 規制（21 CFR Part 58）又は経済協力開発機構（OECD）の GLP 原則[C(97)186/最終]を遵守し，OECD のデータ相互受入制度のメンバー国において実施した。追加の補足的な毒性試験，並びに薬理及び薬物動態試験については，科学的かつ綿密な非 GLP 試験として実施した。

2.4.2.5 製剤添加剤の安全性

PH FDC SC 製剤に含まれる添加剤のうち，L-ヒスチジン塩酸塩水和物，トレハロース水和物，精製白糖及び L-メチオニンは，皮下注射による1日最大投与量が国内における医薬品添加物としての使用前例の範囲を超えているため，新添加剤に該当する。これら添加剤について，公表情報及び関連する非臨床試験成績に基づき評価した結果，いずれも皮下注射において安全性に関する懸念はないものと判断した（1.13.4.1.1-4）。

2.4.3 薬理試験

2.4.3.1 ペルツズマブ及びトラスツズマブの *in vivo* 抗腫瘍効果

ヒト腫瘍細胞株 xenograft マウス試験から得られた主な結果を以下に要約した。

- ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスにペルツズマブとトラスツズマブを腹腔内（IP）で併用投与したところ，抗腫瘍効果の増強／相乗効果が認められた（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。
- ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスを用いて，トラスツズマブ 3，10 mg/kg SC（トラスツズマブ + rHuPH20 の併用）投与時とトラスツズマブ 3，10 mg/kg IV 単独投与時の腫瘍増殖抑制率（TGI）ならびに血清トラフ濃度を比較したところ，3 mg/kg では SC 及び IV 両群において TGI とトラフ濃度は同程度であった。10 mg/kg では SC に比較して IV の方が，TGI 及びトラフ濃度ともに高い傾向を示した。SC 及び IV 両投与群ともに，TGI はトラフ濃度と概ね相関していた。本試験は，SC 投与でも有効トラフ濃度が達成される可能性を示唆しており，実際，臨床での SC のトラフ濃度は IV に比べて同等以上であった（2.5.3.3.2）。臨床における SC 投与時の有効性は IV 投与時と同等以上であることが期待される。

2.4.3.2 rHuPH20の薬理学的特性

マウス色素拡散モデル試験から得られた主な結果を以下に要約した。

- rHuPH20 の ID 投与は，トリパンブルーの浸透性を一過性かつ局所的に増強させた。
- rHuPH20（ID）投与の浸透増強作用及び持続作用は，濃度依存的かつ時間依存的であった。
- 臨床での SC 投与が約 8 分間であることを鑑みて，rHuPH20 + トリパンブルー逐次投与（rHuPH20 を ID 投与 5 分後にトリパンブルーID 投与）群の色素拡散の拡散活性を調べたところ，その拡散活性は rHuPH20 + トリパンブルー同時投与群の 5～50 倍に相当した。
- rHuPH20 の ID 投与は，投与 6 時間後までトリパンブルーの拡散を増加させたが，投与 6 時間後以降に有意な増加はみられなかった。皮膚組織は，rHuPH20 投与後 6～18 時間の間に再構成されると考えられた。
- rHuPH20 の局所 ID 投与は，1200 U/mouse の高用量においても遠隔皮膚部位に影響を与えず，rHuPH20 の浸透作用は局所部位においてのみ発揮された。
- 対照的に rHuPH20（10 U/mouse）の IV 投与は，皮膚組織での色素拡散を増加させた。

- rHuPH20（ID）と rHuPH20 中和抗体（IV）を投与した時に，中和抗体は，rHuPH20 の色素拡散作用に影響を与えなかった。

以上の rHuPH20の薬力学的特性を検討した一連の試験結果から，rHuPH20は ID 投与によりトリパンブルーの色素拡散を濃度依存的かつ時間依存的に増加させること，その浸透活性は一過性かつ局所的に発現することが示された。

2.4.4 薬物動態試験

2.4.4.1 吸収

2.4.4.1.1 ペルツズマブ及びトラスツズマブ＋rHuPH20

ミニブタを用いて，120 mg/動物 ペルツズマブ＋2000 U/動物 rHuPH20，又は120 mg/動物 ペルツズマブ＋120 mg/動物トラスツズマブ＋2000 U/動物 rHuPH20を単回 SC 投与後の PK を評価した。その結果，ペルツズマブは良好な吸収を示し，ペルツズマブ及びトラスツズマブのいずれの抗体の吸収においても，互いに影響を及ぼさなかった。ペルツズマブのバイオアベイラビリティ（F）は73.8%であり，ミニブタに rHuPH20含有トラスツズマブ製剤を単回 SC 投与時（2.4.4.1.2）のトラスツズマブの F（81.8%~87.2%）と同等であった。

2.4.4.1.2 トラスツズマブ＋rHuPH20

マウス及びカニクイザルに，それぞれ rHuPH20を含むトラスツズマブを10 mg/kg 又は25 mg/kg で単回 SC 投与した。トラスツズマブの吸収は比較的速やかであり，最高血清中濃度（C_{max}）はマウス及びカニクイザルにおいて，それぞれ投与後7及び24時間に認められた。マウスの F は83.4%であり，カニクイザルにおいてもトラスツズマブの高い全身曝露が認められた。

ミニブタに，2000及び6000 U/mL rHuPH20含有トラスツズマブ製剤を単回 SC 投与したとき，トラスツズマブの吸収は rHuPH20非含有製剤に比べてより速く，最高血清中濃度到達時間（T_{max}）は rHuPH20含有製剤の方が早かった。rHuPH20の含有量の違いによるトラスツズマブの吸収速度への影響は認められなかった。

カニクイザルにトラスツズマブの rHuPH20含有製剤を週1回13週間 SC 反復投与したところ，12回投与後のトラスツズマブの C_{max} 及び投与後0時間から168時間までの血清中濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}168h}$）は初回投与に対して2.2 ~ 3.6倍高かった。曝露に雌雄の差は認められなかった。

2.4.4.1.3 rHuPH20

CD-1マウス及びカニクイザルに，それぞれ0.433 mg/kg 又は0.3 mg/kg の用量で rHuPH20を単独 IV 投与したときの全身クリアランスは大きく，rHuPH20の $t_{1/2}$はそれぞれ約2及び5分であった。

カニクイザルに3, 15,及び30 mg/kg の rHuPH20を単回 IV 投与したときの曝露は，用量比以上に増加し非線形性を示した。一方，カニクイザルに1, 3, 10及び 30 mg/kg の rHuPH20を単回 SC 投与したところ，1 mg/kg における rHuPH20の C_{max} は定量下限付近であったが，3~30 mg/kg の用量範囲では，曝露は低いがほぼ用量に比例して増加した。SC 投与後の F は1.5%～4.0%と低かった。

カニクイザルに5 mg/kg の rHuPH20を7日間反復 SC 投与，及び0.02, 0.2, 2.0 mg/kg の rHuPH20を週1回39週間反復 SC 投与したときのトキシコキネティクスでは，いずれの試験においても rHuPH20の全身曝露は低いことが示された。

2.4.4.2 分布（rHuPH20）

雌ヌードマウスを用い，2000 U/mL の rHuPH20溶液40 µL を ID 投与し，rHuPH20の局所での

分布を調べた。ID 投与後のヒアルロニダーゼ活性は，投与後60分まで局所の皮膚投与部位に検出され，その後定量下限未満（約 0.7 U/mL）に減少した。皮膚における rHuPH20活性の半減期は13–20分であった。rHuPH20の血漿中の曝露はほとんど認められなかった。本実験より，rHuPH20の投与部位におけるヒアルロニダーゼ活性は一時的及び局所的であり，全身曝露はほとんどないことが確認された。

2.4.4.3 代謝

代謝に関する試験は実施していない。

2.4.4.4 排泄

排泄に関する試験は実施していない

2.4.4.5 薬物動態学的薬物相互作用

薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

2.4.5 毒性試験

2.4.5.1 rHuPH20を含むトラスツズマブの毒性試験

rHuPH20を含むトラスツズマブの毒性試験として，カニクイザルを用いた13週間（週1回）反復皮下投与毒性試験及びウサギを用いた単回皮下投与局所刺激性試験を実施した。

rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験では，トラスツズマブの投与量を30 mg/kg/週としたが，このときの曝露量は，先に実施したトラスツズマブのカニクイザル26週間（週1回）静脈内投与試験の最高用量である25 mg/kg/週と同程度であった。この用量において，被験物質投与に関連した毒性所見は認められなかった。ウサギ局所刺激性試験及びカニクイザル13週間投与試験における投与部位の評価では，rHuPH20を含むトラスツズマブの皮下投与による影響は認められなかった。

2.4.5.2 rHuPH20の毒性試験

rHuPH20の主要な毒性試験として，カニクイザルを用いた7日間（1日1回）静脈内及び皮下投与試験，39週間（週1回）皮下投与試験，マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験，並びに出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。毒性試験の投与量は mg/kg を単位として表記したが，必要に応じてヒアルロニダーゼ活性としての投与量（U/kg）も併記した。なお，毒性試験で用いられた rHuPH20の比活性は，約100000～120000単位(U)/mg 蛋白であった。毒性試験の投与経路は，臨床適用経路に準じて皮下投与（一部，静脈内投与）とし，投与頻度は臨床適用よりも高頻度となるよう1日1回又は週1回とした。また，毒性試験におけるトキシコキネティクス評価として血漿中 rHuPH20濃度（ヒアルロニダーゼ活性）測定を実施し，抗 rHuPH20抗体の産生についても評価した。

rHuPH20の毒性評価に用いる動物種として，マウス，ウサギ及びカニクイザルを選択した。マウスは rHuPH20の最初の薬理試験で用いられた動物種であり，生殖発生毒性試験に使用した。反復投与毒性試験でカニクイザルを用いた理由は，ヒアルロニダーゼ PH20のヒトとの相同性が他の動物種よりも高く，免疫原性が低い可能性が想定されたためである。また，カニクイザルを選択したもう一つの理由は，トラスツズマブの毒性評価動物種として選択されていたためである。動物由来ヒアルロニダーゼが長年にわたり臨床で使用されてきたこと，並びに rHuPH20がヒト組換え蛋白であることから，動物実験における3Rs の観点も考慮し，反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験は，それぞれ1種類の動物種で実施した。更に，抗 rHuPH20抗体の生殖機能（雌雄受胎能，胚・胎児発生，並びに出生前及び出生後の発生）に及ぼす影響について評価するため，ウサギを用いた試験を実施した。

2.4.5.2.1 急性毒性及び反復投与毒性

rHuPH20の急性毒性試験は実施していないが，単回静脈内投与 PK 試験（2.4.4.1）において，マウス（0.433 mg/kg）及びカニクイザル（最高30 mg/kg）における忍容性が確認された。また，カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において，5 mg/kg の7日間（1日1回）静脈内又は皮下投与，及び2 mg/kg までの39週間（週1回）皮下投与において，安全性薬理評価項目を含め，明らかな毒性所見は認められなかった。

2.4.5.2.2 生殖発生毒性

rHuPH20の雌雄受胎能への影響は，カニクイザルを用いた39週間投与試験において評価した。最高用量の2 mg/kg まで，rHuPH20の投与に関連した検査項目（雌の月経周期，雄の精巣容積，精子検査〔精子濃度，運動能及び形態〕，雄の血清黄体形成ホルモン濃度，雌雄生殖器の重量及び病理学的検査〔剖検及び組織学的検査〕）の異常は認められなかった。

マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験において，rHuPH20を妊娠6～15日目に1日1回皮下投与したとき，9 mg/kg 以上の用量で胚・胎児毒性（胚吸収の増加，軽度の出生児数減少及び胎児体重減少）が認められた。rHuPH20の投与に起因するその他の変化（形態異常及び変異）は認められなかった。rHuPH20の胎児における NOAEL は3 mg/kg であり，母動物における NOAEL は18 mg/kg と判断された。本試験では，投与量に関連した rHuPH20の全身曝露が母動物において確認された。rHuPH20はヒアルロン酸を低分子化させるが，ヒアルロン酸は主要なグリコサミノグリカンの一つであり，胚における心臓の形成を誘導する心ゼリーの構成成分である。また，ヒアルロン酸合成酵素欠損マウスを用いた研究[7)] 及びヒアルロン酸を分解した全胚を用いた研究[8)] において，正常な心臓の発生におけるヒアルロン酸の重要性が示されている。これらの知見から，妊娠マウスへの9 mg/kg 以上の投与で認められた胚損失は，rHuPH20が分化発達中の胚のおそらく心臓において，ヒアルロン酸を分解した結果生じたものと考えられた。なお，低用量の3及び1 mg/kg では，胚・胎児発生への影響は認められなかった。

マウスを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験において，rHuPH20を妊娠6～授乳20日目まで1日1回皮下投与したとき，最高用量の9 mg/kg まで母動物及び出生児の生存及び発育（性成熟，学習及び記憶，生殖能を含む）に影響は認められず，この用量を母動物及び出生児における NOAEL と判断した。

2.4.5.2.3 局所刺激性

全体として，rHuPH20を動物に皮下投与したときの投与局所における忍容性は良好であった。rHuPH20の皮下投与による唯一の作用は，カニクイザル39週間投与試験で2 mg/kg/週を投与した雌雄及び0.2 mg/kg/週を投与した雌雄の各1/4例に認められた投与部位における可逆的かつ有害でない，軽微な血管周囲のリンパ形質細胞浸潤であった。4週間の休薬期間終了時において，2 mg/kg/週の雄1例のみで軽微な所見が認められ，この所見は回復性を有することが示された。この投与局所における軽微なリンパ形質細胞浸潤は予想されたものであり，ヒト蛋白をカニクイザルに皮下投与した際に時々認められることが報告されている[9)]。したがって，この変化は非特異的な組織反応を示唆するものであり，所見の程度が軽微で回復性を有することから，有害な変化ではないと考えられた。

ミニブタを用いた試験において。rHuPH20は大量の IgG 溶液（濃度10%，300 mL）を皮下投与したときの投与局所の変化及び有害作用を軽減させた。具体的には，投与局所の腫脹及び硬結が生じる頻度を低下させ，また，皮膚の間質圧を低下させて皮膚局所の柔軟性を維持させた。更に，皮下に大量の IgG 溶液が存在する期間の皮下の血流を改善させた。これらの結果は，rHuPH20の薬理作用を支持するものであり，毒性試験における局所刺激性評価の結果も踏まえると，rHuPH20の局所忍容性は良好であると考えられた。

2.4.5.2.4 その他の毒性

ヒアルロニダーゼ PH20の組織発現プロファイルについて確認するため，複数の動物種の多様な組織における遺伝子発現解析を行った。その結果，PH20が成体の雄性生殖器に選択的に発現していることが，ヒト，マウス及びウサギの種々の発育期の組織を用いた逆転写–定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）解析により示された。また，ヒトの成人及び胎児組織について，RNA シークエンシング（RNA-seq）に基づく PH20の発現プロファイルのヒートマップから，PH20の発現は，ヒト，マウス及びウサギ成体の雄性生殖器に限定されていることが確認された。この結果は，抗 rHuPH20抗体を用いたヒト組織交差反応性試験の結果と一致していた。

抗 rHuPH20抗体が雄の授胎能，並びに雌の受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響（出生後の評価を含む）について検討するため，ウサギを用いた GLP 下での2つの試験を実施した。具体的には，rHuPH20を投与することにより高い抗 rHuPH20抗体価を維持した性成熟ウサギを用いて，雌雄の受胎能及び胚・胎児発生の評価を行った。雌ウサギを用いた試験では，母動物由来の抗 rHuPH20抗体の胎児への移行についても評価した。雄の精子検査及び雄の授胎能評価のための帝王切開検査において，抗 rHuPH20抗体の存在による影響は認められなかった。また，雌の試験における帝王切開パラメータ，胎児所見（胎児生存率，胎児重量，性比，胎児の外表，内臓及び骨格検査），出産，並びに出生児の成長及び発達（生殖器の発達，行動及び運動機能，並びに受胎能〔交配成績及び精子検査〕）のいずれにおいても，抗 rHuPH20抗体の存在による影響は認められなかった。

2.4.5.3 PH FDC SC の安全性に関する考察

ペルツズマブ及びトラスツズマブは HER2を標的とした抗 HER2ヒト化モノクローナル抗体である。ペルツズマブはリガンド依存的な HER2シグナルを抑制するのに対して，トラスツズマブはリガンド非依存的な HER2シグナルを抑制することから，両抗体の併用により HER2シグナルを相補的に抑制することができ，相加／相乗的な抗腫瘍効果が発揮される（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。一方，ペルツズマブ及びトラスツズマブの標的分子は同じ HER2であることから，両剤の毒性プロファイルは概ね類似していると考えられた。ペルツズマブ及びトラスツズマブの初回承認申請時に評価済みの毒性試験結果の概要は以下の通りである。また，臨床において，両剤の併用投与による安全性プロファイルは確立している。

ペルツズマブの毒性試験結果の概要

- ペルツズマブをカニクイザルに 250 mg/kg の用量を週 1 回，4 週間皮下投与したときの忍容性は良好であった。
- ペルツズマブをカニクイザルに 150 mg/kg までの用量を週 1 回，最長 26 週間静脈内投与したときの忍容性は概ね良好であり，心毒性を含め，安全性薬理関連の所見も認められなかった。
- ペルツズマブに関連した所見として，7 週間及び 26 週間静脈内投与試験の全群で組織学的変化を伴わない下痢の発現頻度上昇が認められた。ペルツズマブによる下痢の発現メカニズムは十分に解明されていないが，ペルツズマブによる EGFR/HER2 ヘテロダイマー形成阻害を介した EGFR 経路の抑制が関係している可能性が示唆されている[10)，11)]。
- 妊娠カニクイザルを用いた胚・胎児発生に関する試験において，ペルツズマブを器官形成期（妊娠 19～50 日目）に反復静脈内投与したとき，羊水量減少及び組織学的な腎臓発育不全が認められた。母動物及び胎児において，臨床用量と関連するペルツズマブの全身曝露が確認された。
- カニクイザルを用いた毒性試験において，ペルツズマブを静脈内又は皮下投与したとき，投与部位における肉眼的所見（静脈内及び皮下投与）又は病理組織学的所見（静脈内投与のみ）は認められなかった。

トラスツズマブの毒性試験結果の概要

- トラスツズマブをマウス（200 mg/kg まで）及びアカゲザル（200 mg/kg まで）に単回静脈内投与したときの忍容性は良好であった。
- トラスツズマブをカニクイザルに 25 mg/kg までの用量を週 2 回，3 カ月間，又は週 1 回，6 カ月静脈内投与したときの忍容性は良好であり，心毒性を含め，安全性薬理関連の所見も認められなかった。
- 雌性カニクイザルを用いた受胎能，胚・胎児発生及び妊娠後期／胎盤移行試験において，トラスツズマブの投与による明らかな母動物毒性及び出生児毒性は認められなかった。なお，非臨床試験ではトラスツズマブによる胚・胎児への影響は認められなかったものの，臨床においては妊婦に羊水過少が起きたとの報告があり，また，羊水過少を発現した症例で，胎児・新生児の腎不全、胎児発育遅延、新生児呼吸窮迫症候群、胎児の肺形成不全等が認められ死亡に至った例も報告されている（ハーセプチン添付文書）。

rHuPH20の投与により認められた毒性所見は，マウスにおいて大量投与した際の胚・胎児毒性に限定していた。また，rHuPH20の投与局所における忍容性は良好であり，薬理作用である投与局所からの投与液の拡散促進作用を除き，有害な所見は認められなかった。

rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験の30 mg/kg/週おけるトラスツズマブの曝露量は，先に実施したトラスツズマブのカニクイザル26週間静脈内投与試験の最高用量（25 mg/kg/週）における曝露量と同程度であり，被験物質投与に関連した毒性所見は認められなかった。また，rHuPH20を含むトラスツズマブをカニクイザル及びウサギに皮下投与したときの投与局所における忍容性は良好であった。更に，ミニブタを用いた薬物動態試験において，rHuPH20を含むペルツズマブ及びトラスツズマブを併用投与したときの全身的な忍容性は良好であった。これらの結果及び rHuPH20の臨床投与量が非常に少ない（0.00625 mg/kg）ことを考慮すると，ヒトにおいて，ペルツズマブ及びトラスツズマブと rHuPH20との併用投与よる既知の毒性の増強，又は新規の毒性発現の可能性は極めて低いと考えられた。

ペルツズマブ及びトラスツズマブの動物とヒトとの曝露量比較を表 2.4.5.3-1に示した。また，rHuPH20の動物とヒトとの投与量比較を表 2.4.5.3-2に示した。PH FDC SC のいずれの構成成分についても，臨床推奨用量投与時の曝露量を十分に上回る用量範囲で毒性評価が行われている。

表 2.4.5.3-1 ペルツズマブ及びトラスツズマブの動物とヒトとの曝露量比較

動物種・試験の種類	用量 (mg/kg) [a]	C_{max} (μg/mL)	3週当たりの AUC (μg•day/mL)	曝露量比（動物／ヒト）	
				C_{max}	AUC
ペルツズマブ					
カニクイザル 4週間 (週1回), 皮下	250 [b]	3400	62100 [c]	18.7	21.8
カニクイザル 26週間 (週1回), 静脈内	15 [d]	862	3810 [e]	4.7	1.3
カニクイザル 胚・胎児発生, 静脈内	10 [30] [f]	644 [g]	NA	3.5	NA
臨床推奨用量 3週に1回, 皮下	1200/600 mg [h]	182 [i]	2850 [i]	–	–
トラスツズマブ					
カニクイザル 13週間 (週1回), 皮下	30	1160 [j]	20750 [k]	8.3	10.0
カニクイザル 胚・胎児発生, 静脈内	25	1606 [l]	NA	11.6	NA
臨床推奨用量 3週に1回, 皮下	600 mg	139 [m]	2070 [m]	–	–

NA: データなし

a：毒性試験の用量は，特に記載がない限り，NOAEL を示した。

b：病理組織学的検査は実施していない。

c：3 回目投与後の $AUC_{14\text{-}21d}$ = 20700 (μg•day/mL)の 3 倍値

d：試験の最低用量（150 mg/kg までの全ての用量で組織学的変化を伴わない下痢の発現頻度上昇が認められた。）

e：初回投与後の $AUC_{0\text{-}7d}$ = 1270 (μg•day/mL)の 3 倍値

f：試験の最低用量（2 回目以降の用量 [初回用量]）。100 [150] mg/kg までのすべての用量で流産及び胚・胎児死亡が認められた。

g：妊娠 50 日目の C_{max}

h：初回 1200 mg，2 回目以降 600 mg

i：第 III 相臨床試験（WO40324 試験）における日本人患者のペルツズマブ曝露量（PH FDC SC 反復投与時のサイクル 7 における C_{max} 及び AUC_{tau} の平均値）〔2.7.2.3.8.1〕

j：Day 78 の C_{max}

k：$AUC_{0\text{-}168h}$ = 166000 (μg•h/mL)を $AUC_{0\text{-}7d}$ (μg•day/mL)に変換し，3 倍した値

l：妊娠 48 日目（投与 24 時間後）の血中濃度

m：第 III 相臨床試験（WO40324 試験）における日本人患者のトラスツズマブ曝露量（PH FDC SC 反復投与時のサイクル 7 における C_{max} 及び AUC_{tau} の平均値）〔2.7.2.3.8.2〕

表 2.4.5.3-2　rHuPH20の動物とヒトとの投与量比較

動物種・試験の種類	用量 (mg/kg) [a]	用量比（動物／ヒト）	
		mg/kg 換算	HED 換算 [b]
カニクイザル 7日間 (1日1回), 静脈内/皮下	5 (静脈内)/ 5 (皮下)	800	258
カニクイザル 39週間 (週1回), 皮下	2	320	103
マウス 胚・胎児発生, 皮下	18 (母動物) 3 (胎児)	2880 480	234 39
マウス 出生前・出生後の発生, 皮下	9 (母動物) 9 (出生児)	1440	117
臨床推奨用量 3週に1回, 皮下	0.00625 [c]	–	–

a：毒性試験の用量は，NOAEL を示した。なお，毒性試験で用いた rHuPH20 の比活性は，100970～120200 U/mg であった。

b：動物におけるヒト等価用量（HED）との比。HED の算出においては，マウス–ヒトの変換係数として 12.3，カニクイザル–ヒトの変換係数として 3.1 を用いた [12)]。

c：PH FDC SC における rHuPH20 の用量は，30000 U/ヒト(初回投与)又は 20000 U/ヒト(2 回目投与以降)であり，ヒト体重を 60 kg としたときの最大投与量は 500 U/kg である。また，PH FDC SC 製剤に含まれる rHuPH20 の比活性は 80000～140000 U/mg（2.3.S.4.1〔rHuPH20〕）であることから，比活性を 80000 U/mg としたときの最大用量は，蛋白量として 0.00625 mg/kg と算出される。

注：第 III 相臨床試験（WO40324 試験）において，血漿中 rHuPH20 濃度は測定していない。第 I 相臨床試験（BO30185 試験）において，PH FDC SC 投与後の rHuPH20 濃度は，すべての採血時点において定量下限値未満であった（2.7.2.2.3.1.3）。

なお，PH FDC SC の臨床試験において，rHuPH20の投与による全身曝露は確認されていない（2.7.2.2.3.1.3）。臨床推奨用量において rHuPH20の全身曝露が起こらないことは，以下の非臨床情報からも支持される：①rHuPH20をカニクイザルに皮下投与したときのバイオアベイラビリティは5%未満であり（2.4.4.1），0.2 mg/kg の用量では検出可能な全身的（血管内）曝露は認められなかった。②マウスを用いた PK（分布）試験において，rHuPH20は投与された皮内部位及び血管コンパートメントから急速に消失（皮内部位の半減期：13～20分，血管コンパートメントの半減期：2.5分未満）した（2.4.4.2）。これらのことから，一連の毒性試験結果は，rHuPH20の毒性プロファイルが適切に評価されたことを示し，PH FDC SC において局所的かつ一時的に作用する，ペルツズマブ及びトラスツズマブの皮下吸収促進剤としての rHuPH20の使用をサポートするものと考えられた。

2.4.6　総括及び結論

薬理試験

In vivo での抗腫瘍効果試験において，ヒト乳癌細胞株 KPL-4 xenograft マウスでは，ペルツズマブ（IP）とトラスツズマブ（IP）併用による抗腫瘍効果の増強が認められている（ペルツズマブ初回申請時資料[1)]）。今回，ヒト NSCLC 株 Calu-3 xenograft マウスを用いて，トラスツズマブ 3，10 mg/kg SC（トラスツズマブ + rHuPH20の併用）投与時とトラスツズマブ 3，10 mg/kg IV 単独投与時の TGI ならびに血清トラフ濃度を比較した試験おいて，3 mg/kg 投与群では，SC 及び IV 両群で TGI とトラフ濃度は同程度であった。10 mg/kg では，SC に比較して IV の方が，TGI 及びトラフ濃度ともに高い傾向を示した。SC 及び IV 両投与群ともに，TGI はトラフ濃度と概ね相関していた。本 Calu-3 xenograft マウス試験の結果は，SC 投与でも有効トラフ濃度が達成される可能性を示唆しており，実際，臨床での SC のトラフ濃度は IV に比べて同等以上であった（2.5.3.3.2）。臨床における SC 投与時の有効性は IV 投与時と同等以上であ

ることが期待される。

マウス色素拡散モデルを用いて rHuPH20の薬力学的特性を検討した試験結果から，rHuPH20は ID 投与によりトリパンブルーの色素拡散を濃度依存的かつ時間依存的に増加させること，その浸透活性は一過性かつ局所的に発現することが示された。皮膚組織における rHuPH20の浸透活性は，rHuPH20投与後6時間まで発現したが，投与後6～18時間の間に皮膚組織は再構成された。rHuPH20の局所 ID 投与は，高用量（1200 U/mouse）でも，遠隔部位のトリパンブルーの色素拡散を増加させなかったが，10 U/mouse の用量での IV 投与は色素拡散を増加させた。一連のマウス色素拡散モデルの試験結果から，rHuPH20をヒト皮膚に局所で SC 投与した場合に，マウスへの 局所 ID 投与時と同様に，rHuPH20の浸透活性は一過性かつ局所的に発現すると考えられた。

PH FDC SC の安全性薬理試験は実施していないが，rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザルを用いた13週間 SC 投与毒性試験における心血管系評価，並びに rHuPH20のカニクイザルを用いた39週間 SC 投与毒性試験における心血管系，呼吸系及び中枢神経系評価おいて，有害な影響は認められなかった。

薬物動態試験

ミニブタにおいて，ペルツズマブ＋トラスツズマブ＋rHuPH20の SC 投与後のペルツズマブの F は良好であり，臨床においても同様に良好な F が確認されている（2.7.2.3.2.1）。

マウス，カニクイザル及びミニブタにおける，トラスツズマブ＋rHuPH20の SC 投与後のトラスツズマブの全身曝露は高く，ミニブタでは rHuPH20の含量を変えてもトラスツズマブの F は同様であった。コンパートメント PK 解析の結果、rHuPH20含有製剤の吸収速度定数は rHuPH20非含有製剤に比べて約2倍大きく，T_{max} は rHuPH20含有製剤の方が早かった。rHuPH20の添加濃度の違いによる吸収速度への影響は認められなかった。

rHuPH20は，マウス及びカニクイザルに IV 投与後急速に消失した。カニクイザルに SC 投与後の rHuPH20の曝露は非常に低く，限定的な吸収であることが確認された。マウス分布試験では，ID 投与後の皮膚投与部位におけるヒアルロニダーゼ活性の残存は一時的及び局所的であり，全身曝露はほとんどないことが確認された。

毒性試験

rHuPH20の投与により認められた毒性所見は，マウスにおいて大量投与した際の胚・胎児毒性に限定していた。また，rHuPH20の投与局所における忍容性は良好であり，薬理作用である投与局所からの投与液の拡散促進作用を除き，有害な所見は認められなかった。

rHuPH20を含むトラスツズマブのカニクイザル13週間皮下投与試験において，被験物質投与に関連した毒性所見は認められなかった。また，rHuPH20を含むトラスツズマブをカニクイザル及びウサギに皮下投与したときの投与局所における忍容性は良好であった。更に，ミニブタを用いた薬物動態試験において，rHuPH20を含むペルツズマブ及びトラスツズマブを併用投与したときの全身的な忍容性は良好であった。これらの結果及び rHuPH20の臨床投与量が非常に少ないことを考慮すると，ヒトにおいて，ペルツズマブ及びトラスツズマブと rHuPH20との併用投与による既知の毒性の増強，又は新規の毒性発現の可能性は極めて低いと考えられた。

総合的な結論

以上の薬理，薬物動態及び毒性試験の結果から，rHuPH20を含むペルツズマブとトラスツズマブの SC での併用が HER2陽性乳癌に対して抗腫瘍効果を示すこと，臨床において許容可能な PK，ADME 及び毒性プロファイルを有することが推定された。臨床の HER2陽性の乳癌において，PH FDC SC 製剤は有効性及び安全性に優れた治療薬となることが期待される。

2.4.7 参考文献一覧

1) ペルツズマブ初回申請時資料 CTD
2) トラスツズマブ初回申請時資料 CTD
3) Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. Wound Repair Regen 1999;7:79-89.
4) Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydrate Res 2005;340:791-809.
5) Day AJ, Sheehan JK. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organization. Curr Opin Struct Biol 2001;11:617-22.
6) Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2007;60:1110-9.
7) Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro Jr. A, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest. 2000;106:349-60.
8) Baldwin HS, Lloyd TR, Solursh M. Hyaluronate degradation affects ventricular function of the early postlooped embryonic rat heart in situ. Circ Res. 1994;74:244-52.
9) Carbonatto M, Yu P, Bertolino M, Vigna E, Steidler S, Fava L, et al. Nonclinical safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of atacicept. Toxicol Sci. 2008;105:200-10.
10) Keely SJ, Uribe JM, Barrett KE. Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T_{84} cells. Implications for carbachol-stimulated chloride secretion. J Biol Chem. 1998;273:27111-7.
11) Keely SJ, Halverson MJ, Barrett KE. Colonic epithelial ErbB2 receptors: a possible role in diversification of inhibitory signaling via the EGF receptor. Gastroenterology 1998;114:A385.
12) U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. July 2005, Available at: https://www.fda.gov/media/72309/download.