

## 審査報告書

平成 17 年 11 月 9 日

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

承認申請のあった下記の医薬品にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下のとおりである。

### 記

[販 売 名] ゴナール-f75 皮下注、同 150 皮下注（ゴナールエフ皮下注用 75、同 150 に変更予定）

[一 般 名] ホリトロピン アルファ（遺伝子組換え）

[申 請 者] セローノ・ジャパン株式会社

[申請年月日] 平成 16 年 1 月 30 日

[剤型・含量] 1 バイアル中、ホリトロピン アルファ（遺伝子組換え）を 6 $\mu$ g 又は 12 $\mu$ g 含有する凍結乾燥注射用製剤

[申請区分] 医療用医薬品（1）新有効成分含有医薬品

[化学構造]

構造式：総アミノ酸 92 個及び 111 個（ $\alpha$  及び  $\beta$ -サブユニット、図 1 及び図 2 参照）

分子式及び分子量：

$\alpha$ -サブユニット（C<sub>437</sub>H<sub>682</sub>N<sub>122</sub>O<sub>134</sub>S<sub>13</sub>：10,205.67）

$\beta$ -サブユニット（C<sub>538</sub>H<sub>833</sub>N<sub>145</sub>O<sub>171</sub>S<sub>13</sub>：12,485.08）

化学名：

（日本名）遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン

（英名）Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone（r-hFSH）

本質：

（日本名）ヒト肝細胞に由来する卵胞刺激ホルモンゲノム DNA の発現により、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される 203 個のアミノ酸残基（C<sub>975</sub>H<sub>1515</sub>N<sub>267</sub>O<sub>305</sub>S<sub>26</sub>；分子量：22,691.09）からなる糖たん白質（分子量：約 31,000）

（英名）glycoprotein(molecular weight:ca31,000.) consisting of 203 amino acid residues (C<sub>975</sub>H<sub>1515</sub>N<sub>267</sub>O<sub>305</sub>S<sub>26</sub>；molecular weight：22,691.09), produced in Chinese hamster ovary cells by expression of a human follicle-stimulating hormone-genomic DNA derived from human liver

[特記事項] 希少疾病用医薬品（平成 12 年 9 月 20 日指定）

[審査担当部] 新薬審査第二部

図1 ホリトロピン アルファ (遺伝子組換え) の $\alpha$ 及び $\beta$ -サブユニットのアミノ酸配列

$\alpha$ -サブユニット:

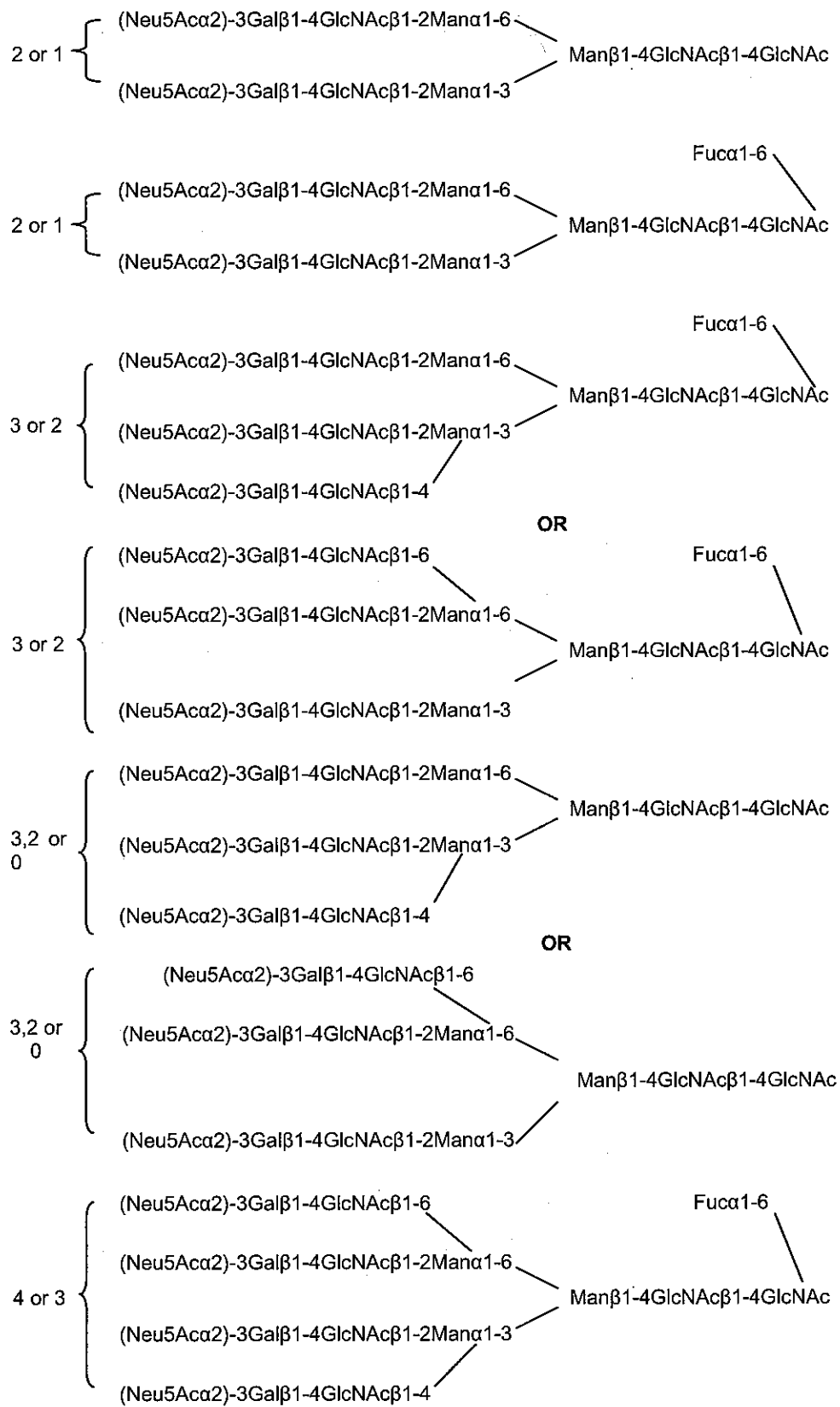
1 Ala-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-Cys-Pro-Glu-Cys-Thr-Leu-Gln-Glu-Asn-  
16 Pro-Phe-Phe-Ser-Gln-Pro-Gly-Ala-Pro-Ile-Leu-Gln-Cys-Met-Gly-  
31 Cys-Cys-Phe-Ser-Arg-Ala-Tyr-Pro-Thr-Pro-Leu-Arg-Ser-Lys-Lys-  
46 Thr-Met-Leu-Val-Gln-Lys-Asn-Val-Thr-Ser-Glu-Ser-Thr-Cys-Cys-  
61 Val-Ala-Lys-Ser-Tyr-Asn-Arg-Val-Thr-Val-Met-Gly-Gly-Phe-Lys-  
76 Val-Glu-Asn-His-Thr-Ala-Cys-His-Cys-Ser-Thr-Cys-Tyr-Tyr-His-  
91 Lys-Ser

$\beta$ -サブユニット:

1 Asn-Ser-Cys-Glu-Leu-Thr-Asn-Ile-Thr-Ile-Ala-Ile-Glu-Lys-Glu-  
16 Glu-Cys-Arg-Phe-Cys-Ile-Ser-Ile-Asn-Thr-Thr-Trp-Cys-Ala-Gly-  
31 Tyr-Cys-Tyr-Thr-Arg-Asp-Leu-Val-Tyr-Lys-Asp-Pro-Ala-Arg-Pro-  
46 Lys-Ile-Gln-Lys-Thr-Cys-Thr-Phe-Lys-Glu-Leu-Val-Tyr-Glu-Thr-  
61 Val-Arg-Val-Pro-Gly-Cys-Ala-His-His-Ala-Asp-Ser-Leu-Tyr-Thr-  
76 Tyr-Pro-Val-Ala-Thr-Gln-Cys-His-Cys-Gly-Lys-Cys-Asp-Ser-Asp-  
91 Ser-Thr-Asp-Cys-Thr-Val-Arg-Gly-Leu-Gly-Pro-Ser-Tyr-Cys-Ser-  
106 Phe-Gly-Glu-Met-Lys-Glu

◆ : N-グリコシド結合型糖鎖結合部位

図2 ホリトロピン アルファ (遺伝子組換え) の推定糖鎖構造



図左の2 or 1、3,2 or 0 等の記載は糖鎖末端のシアル酸 (Neu5Acα2) 数を示す。

## 審査結果

平成 17 年 11 月 9 日

- [販 売 名] ゴナール-f75 皮下注、同 150 皮下注（ゴナールエフ皮下注用 75、同 150 に変更予定）
- [一 般 名] ホリトロピン アルファ（遺伝子組換え）
- [申 請 者] セローノ・ジャパン株式会社
- [申請年月日] 平成 16 年 1 月 30 日（輸入承認申請）

### [審査結果]

本剤は、低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症における精子形成の誘導に対し、hCG製剤（胎盤性性腺刺激ホルモン、プロファシー注5000）と併用して投与されることから、プロファシー注5000と併せて審査を行った。

本剤の低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症における精子形成の誘導に対する有効性について、国内臨床試験の成績では、本剤とプロファシー注5000の併用投与により18例中16例で精子形成が認められ、同様に実施された海外臨床試験の成績を参考に評価を行い、当該疾患に対する本剤の有効性は確認されたと判断した。安全性について、临床上大きな問題となる有害事象は発現しておらず、国内治験例が極めて限られていることから、市販後にさらなる検討が必要ではあるが、承認の可否に影響するような重大な懸念は認められないと判断した。

以上、医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目は、以下の効能・効果、用法・用量及び承認条件のもとで承認して差し支えないと判断し、医薬品第一部会で審議されることが妥当と判断した。

[効能・効果] 低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症における精子形成の誘導

[用法・用量] 本剤は hCG（胎盤性性腺刺激ホルモン）製剤と併用投与する。

hCG 製剤の投与により、血中テストステロン値が正常範囲内にあること及び無精子であることを確認した後に、ホリトロピン アルファ（遺伝子組換え）として 1 回 150IU を 1 週 3 回皮下投与する。精子形成の誘導が認められない場合には、本剤の用量を 1 回に最大 300IU、1 週 3 回を限度として適宜増量する。

[承認条件] 国内での治験症例が極めて限られていることから、市販後、一定数の症例に係るデータが集積されるまでの間は、全症例を対象に使用成績調査を実施することにより、本剤使用患者の背景情報を把握するとともに、本剤の安全性及び有効性に関するデータを早期に収集し、本剤の適正使用に必要な措置を講じること。

## 審査報告 (1)

平成 17 年 7 月 15 日作成

### I. 申請品目の概要

[販売名]	ゴナール-f 75 皮下注、同 150 皮下注
[一般名]	ホリトロピン アルファ (遺伝子組換え)
[申請者名]	セローノ・ジャパン株式会社
[申請年月日]	平成 16 年 1 月 30 日 (輸入承認申請)
[申請時効能・効果]	低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症
[申請時用法・用量]	本剤は hCG (胎盤性性腺刺激ホルモン) 製剤と併用して投与する。 本剤は、ホリトロピン アルファ (遺伝子組換え) として 1 回 150 IU を 1 週間に 3 回皮下投与する。 (用法・用量に関する使用上の注意) hCG 製剤の投与により、血中テストステロン値が正常範囲内にあること及び無精子であることを確認した後に、本剤と hCG 製剤の併用投与を開始する。hCG 製剤との併用投与により、精子形成誘導が認められない場合には、本剤の用量を 1 回に最大 300 IU、週 3 回を限度として適宜増量する。
[特記事項]	希少疾病用医薬品 (平成 12 年 9 月 20 日指定)

### II. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構における審査の概要

本審査報告においては、平成 16 年 4 月 1 日、国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター (以下、審査センター) と医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構等が統合され、医薬品医療機器総合機構 (以下、機構) が設立されたことに伴い、同日前に審査センターが行った照会・判断等も機構が行ったものとみなし以下の記載を行った。本申請において、申請者が提出した資料及び機構からの照会事項に対する申請者の回答の概略は、下記のようなものであった。なお、本剤は hCG 製剤 (胎盤性性腺刺激ホルモン) と併用して投与されることから、平成 16 年 4 月 16 日に輸入承認事項一部変更承認申請がなされたプロファシー注 5000 と併せて審査を行った。

#### 1. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等

ゴナール-f 75 皮下注、同 150 皮下注 (以下「本剤」) は、Serono 社 (スイス) において開発された、ホリトロピン アルファ (遺伝子組換え、以下「本薬」) を有効成分として含有する卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone : FSH) 製剤である。本剤は、従来のヒト閉経期婦人尿由来の下垂体性性腺刺激ホルモン (Human Menopausal Gonadotrophin : hMG) 製剤あるいは精製卵胞刺激ホルモン (Urinary Human Follicle Stimulating Hormone : u-hFSH) 製剤と異なり、チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary : CHO) 細胞株を用いて製造される遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン (Recombinant

Human Follicle Stimulating Hormone : r-hFSH) を含有し、比活性が高く、黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone : LH) を含有しないことから、LH により惹起される卵巢過剰刺激を回避できること及びヒト由来の夾雑蛋白を含まない均質で高純度の製剤の安定的な提供が可能となることが期待される。

低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症とは、視床下部・下垂体系の機能低下に起因する性腺機能障害の総称で、ゴナドトロピン放出ホルモン (Gonadotropin Releasing Hormone : GnRH) 及びゴナドトロピン (LH 及び FSH) の分泌低下により、二次性徴の発現不全に加え、精巣でのテストステロン分泌低下や精子形成障害が引き起こされる疾患である。治療法として、LH 作用を有する hCG 製剤、テストステロン製剤、GnRH 製剤並びに FSH 作用を有する hMG 製剤及び u-hFSH 製剤が用いられている。これらの治療法のうち、hCG 製剤とテストステロン製剤は二次性徴の発現・維持や骨粗鬆症の防止には有効であるが、妊孕能の獲得に対しては効果が期待できない。妊孕能の獲得にとって必須である精子形成には、FSH 及び LH が必要である。GnRH 製剤によって精子形成を含めた治療が可能であるが、内因性 GnRH の分泌と同様に 90~120 分間隔の投与が必須であり、自動間歇注入ポンプを要することから、長期間の投与には適さない。FSH 製剤及び hCG 製剤の併用療法は、間歇的投与が不要であり、GnRH 製剤による治療と同様の効果を示すことが確認され、海外では低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症に対する標準的な治療法となっている。しかしながら、国内では、hMG 製剤及び u-hFSH 製剤は男性の精子形成に対する適応はなく、女性の排卵誘発の効能のみに限定されている。

低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症は非常に稀な疾患であり、妊孕能の獲得を目的とした適切な代替薬がないことから、本剤は平成 12 年 9 月 20 日に「希少疾病用医薬品」の指定〔指定番号：(12 薬) 第 142 号〕を受けている。

本剤は、海外では女性不妊症の治療薬として、無排卵あるいはクロミフェン療法が無効である女性不妊症における卵胞発育及び排卵の刺激、生殖補助医療における複数卵胞発育刺激、重度の LH 及び FSH 欠乏症などの適応症で、平成 17 年 6 月現在、欧州、米国など世界 94 カ国で承認されている。また、男性に関しては、乏精子あるいは無精子を伴う性腺機能障害の治療薬 (適応症：低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症) として、平成 17 年 6 月現在、欧州、米国など世界 56 カ国で承認されている。

## 2. 品質に関する資料

本品は希少疾病用医薬品として申請されたが、提出された品質に関する資料には誤記が多数見られ内容の理解が不可能であったため、申請直後に資料見直し及び再提出を求めた。平成 16 年 4 月 7 日に改訂版が提出されたが、審査する上で必要な情報が盛り込まれておらず、また、提出された回答についても文意が不明な点が多数あり、審査に支障を来した。

### <提出された資料の概略 (物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等) >

本薬は、ヒト肝細胞に由来する卵胞刺激ホルモンゲノム DNA の発現によりチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) で生産される 203 個のアミノ酸残基 (C<sub>975</sub>H<sub>1515</sub>N<sub>267</sub>O<sub>305</sub>S<sub>26</sub> 分子量 22,691.09) からなる糖たん白質 (分子量: 約 31,000) である。92 個のアミノ酸残基 (C<sub>437</sub>H<sub>682</sub>N<sub>122</sub>O<sub>134</sub>S<sub>13</sub> 分子量 10,206.67) からなる α サブユニット及び

111 個のアミノ酸残基 (C<sub>538</sub>H<sub>833</sub>N<sub>145</sub>O<sub>171</sub>S<sub>13</sub> 分子量 12,485.08) からなる β サブユニットから構成されており、4 個の N-グリコシド結合型糖鎖がアスパラギン残基 (α サブユニット: 52 及び 78 位、β サブユニット: 7 及び 24 位) に結合し、これらは r-hFSH の全分子量の 26~37% を占めている。また、アミノ酸配列分析でセリン残基が回収されることから、O-グリコシド結合型糖鎖は存在しないと判断されている。

## (1) 製造方法

### 1) 構造遺伝子の構築及び組換え体の構築

hFSH α サブユニット発現プラスミドは、hFSH α サブユニット、[ ] プロモーター、[ ] ( [ ] ) 遺伝子等を有する。hFSH β サブユニット発現プラスミドは、[ ] を [ ] 遺伝子に置換した前述のプラスミドに、hFSH α サブユニット遺伝子の代わりに hFSH β サブユニット遺伝子が挿入されている。これら hFSH α 及び β サブユニット発現プラスミドは、リン酸カルシウム沈殿法により宿主細胞である CHO [ ] 細胞株に共導入され、[ ] ( [ ] ) 含有 [ ] 無添加培地中で形質転換細胞が選別された。単位細胞あたりの r-hFSH の生産性を指標として形質転換細胞株の選択を行ったのち、生産性の向上を図るため [ ] 濃度を段階的に上昇させることにより遺伝子増幅させた株が選別された。その後、限界希釈法による同細胞株のクローニングを行い、単位細胞あたりの r-hFSH の生産性、細胞形態の均一性及び継代の容易さを指標にマスターセルバンク (MCB) 作製用細胞株が樹立された。この MCB からワーキングセルバンク (WCB) が調製された。

### 2) セルバンクの性質及び管理

MCB、WCB、実製造での *in vitro* 細胞齢を超えて培養された(倍加レベル [ ]) 細胞 (CAL) について、特性解析及び安全性試験がなされている。

MCB の特性解析の結果、細胞形態は低密度では丸みを持つ紡錘形状を示し、高密度では紡錘形状で繊維芽細胞様又は小さな上皮細胞様に密着した。倍加時間は [ ] hr であり、r-hFSH 産生性は [ ] ~ [ ] IU/10<sup>6</sup> cells/24hr を示し、細胞生存率は [ ] ~ [ ] % であった。アイソザイムはチャイニーズハムスター由来細胞であった。α 及び β サブユニットの mRNA は 1kb 近傍で、単一バンドとして検出された。

MCB の安全性試験の結果、細菌、真菌及びマイコプラズマの混入は観察されなかった。また、ヒト胚細胞等を用いた *in vitro* ウイルス試験においてウイルス性変性効果は観察されず、成熟マウス、卵等を用いた *in vivo* ウイルス試験においても異常は認められなかった。さらに、マウス及びハムスター抗体産生試験においても Pneumonia Virus of Mice、Reovirus Type3 等に対する抗体は存在しなかった。透過型電子顕微鏡では、CHO 細胞で存在の知られている A 型及び C 型レトロウイルスが観察されたが、Mg<sup>2+</sup>又は Mn<sup>2+</sup>要求性の逆転写酵素活性は検出されなかった。XC プラークアッセイ、S<sup>+</sup>L<sup>+</sup>フォーカスアッセイの結果、感染性ウイルスの混入は認められなかった。ヌードマウス腫瘍形成性試験(被験細胞の組織学的検査)において、壊死の状態で退化することが明らかになった。核型分析/アイソザイム解析の結果、細胞は細胞遺伝学的試験とアイソザイム解析でハムスター由来と確認され、他種との交叉は認められなかった。また、形態上の染色体数 (19~20)、染

色体異常データ (>0.04%/細胞) 又は核型に変化はなく、細胞株の安定性が確認された。

WCB 及び CAL については、MCB と同様な試験が行われた。各種試験の結果、倍加時間、r-hFSH 生産性及び遺伝子のコピー数が MCB と比較して減少した (倍加時間 (hr): WCB ■■■、CAL ■■■、r-hFSH 生産性 (IU/10<sup>6</sup>cells/24hr): WCB ■■■~■■■、CAL ■■■~■■■、遺伝子のコピー数 (対 MCB): WCB ■■■%、CAL ■■■%) 以外、MCB、WCB 及び CAL で差は認められなかった。制限酵素断片パターンは MCB、WCB 及び CAL 間ですべて同様であった。

MCB の安定性は、r-hFSH 生産性及び細胞生存率について、新規 WCB 確立時、もしくは少なくとも ■■■年毎に確認し、WCB も細胞培養工程開始時に同様に確認する。これまでに実施された試験成績において、本細胞は安定であることが確認されている。

現行の MCB が無くなったときは、現行 MCB に由来する WCB から MCB を作製することとされている。新規 WCB の作製は、WCB の作製並びに特性解析及び安全性試験の実施に必要な時間を考慮して、現行 WCB の残りが向こう ■■■年間の原薬生産を可能とする量まで減少したとき、MCB の細菌、真菌及びマイコプラズマが検出されないことを確認した後に実施する。すべての新規 MCB 及び WCB の確立時には各セルバンクについて特性解析及び安全性試験が実施される。

### 3) 培養工程

培養工程は、種培養工程、増殖培養工程、生産培養工程及びハーベスト工程からなる。WCB を ■■■%ウシ胎児血清 (FBS) 添加した基本培地 (■■■) の ■■■ (v/v) 混合物に ■■■mmol/L ■■■、■■■mmol/L ■■■、■■■mmol/L ■■■を添加) で培養し (種培養工程)、次に ■■■%FBS を添加した基本培地でマイクロキャリアビーズを用いた連続灌流攪拌培養 (以降、培養容量 ■■■L) をする (増殖培養工程)。さらに、培地に ■■■%FBS を添加した基本培地で ■■■日間連続灌流攪拌培養した後、■■■%FBS を添加した基本培地で ■■■日間連続灌流攪拌培養をする (生産培養工程)。■■■日間の生産培養工程において、約 ■■■時間を 1 ハーベスト工程液単位とし上清を回収する (ハーベスト工程)。

なお、培養工程における工程内管理試験として、種培養においてマイコプラズマ否定試験及び無菌試験が、増殖培養において細胞密度が、生産培養において細胞生存率、■■■濃度、■■■濃度、マイコプラズマ否定試験、*in vitro* ウイルス試験、逆転写酵素及び無菌試験が、ハーベスト工程において収率、■■■の生産性、r-hFSH 比活性又は質量比、微生物限度試験及びアイソフォームパターンが設定されている。

### 4) 精製工程

培養上清をポアサイズ ■■■μm フィルター、■■■kDa 限外ろ過フィルター及びポアサイズ ■■■μm フィルターを用いて順にろ過及び濃縮した (精製工程 ■■) のち、■■■陰イオン交換クロマトグラフィ (精製工程 ■■)、抗ヒト FSH モノクローナル抗体 ■■■イムノアフィニティークロマトグラフィ、70kDa 膜ウイルス除去フィルター (精製工程 ■■)、■■■陰イオン交換クロマトグラフィ (精製工程 ■■)、■■■クロマトグラフィ (■■■) (精製工程 ■■) 及びサイズ排除クロマトグラフィ (■■■) で分画し、



ポアサイズ  $\blacksquare$   $\mu\text{m}$  フィルターでろ過後（精製工程  $\blacksquare$ ）、分注して原薬を製する。

各精製工程における工程管理項目として、各精製工程段階において、r-hFSH 含量が定められている他、精製工程  $\blacksquare$  において r-hFSH 比活性又は質量比、アイソフォームパターン、エンドトキシン試験及び微生物限度試験が、精製工程  $\blacksquare$  において、r-hFSH 比活性又は質量比が、精製工程  $\blacksquare$  において、r-hFSH 比活性又は質量比、アイソフォームパターン、抗ヒト FSH モノクローナル抗体含量、異種たん白質含量、エンドトキシン試験及び微生物限度試験が、精製工程  $\blacksquare$  において、たん白質濃度、エンドトキシン試験及び微生物限度試験が設定されている。

また、ハーベスト工程液、精製工程  $\blacksquare$  後の工程液及び精製工程  $\blacksquare$  後の工程液は長期間保存されることから、安定性の評価がなされている。ハーベスト工程液は  $\blacksquare \pm \blacksquare$  °C でハーベスト期間に加え最大  $\blacksquare$  日間、精製工程  $\blacksquare$  後の工程液は  $-\blacksquare$  °C で  $\blacksquare$  日間、精製工程  $\blacksquare$  後の工程液は  $-\blacksquare$  °C で  $\blacksquare$  日間安定であるとされた。

未加工/未精製バルクから全精製工程を通しての r-hFSH 活性の回収率は約  $\blacksquare$  %であった。また、マウス白血病ウイルス (MuLV)、ヒトポリオウイルス Sabin2 型、ヒト単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV) 及びヒトアデノウイルス 2 型を用いて各工程のウイルスクリアランスファクターが調べられており、その値は以下の通りであった。

#### ウイルスクリアランス試験結果

精製工程	ウイルスクリアランスファクター (Clearance Log factors)			
	MuLV	ポリオウイルス	HSV	アデノウイルス
モデルウイルス				
抗体アフィニティ クロマトグラフィ工程	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$	$\blacksquare$ $\blacksquare$	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$	$\blacksquare$ $\blacksquare$
メンブランろ過工程 (70kDa)	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$	$\blacksquare$ $\blacksquare$	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$	$\blacksquare$ $\blacksquare$
Qセファロース工程	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$	< $\blacksquare$ * < $\blacksquare$ *	> $\blacksquare$ $\blacksquare$	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$
セファクリル $\blacksquare$ 工程	> $\blacksquare$ > $\blacksquare$	< $\blacksquare$ * $\blacksquare$	$\blacksquare$ $\blacksquare$	$\blacksquare$ $\blacksquare$
総クリアランス率	>25.1 >25.1	8.8 9.6	>26.3 >23.4	>19.2 >18.7

\* 総クリアランス率計算に用いていない

## (2) 原薬

### 1) 構造・組成

特性解析として、性状、アミノ酸配列、N 末端及び C 末端の多様性、スルホヒドリル基、ジスルフィド結合、ペプチド分析によるアミノ酸配列確認、ペプチドマップ、分子量（レーザーイオン化質量分析計）、比吸光度、分光学的性質（UV スペクトル、CD スペクトル）、アイソフォームパターン（アガロースゲル等電点電気泳動法 (IEF)）、電気泳動パターン（SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)）、サブユニットの分離（RP-HPLC、SE-HPLC）、酵素免疫測定法（ELISA）、ウエスタンブロットティング（抗ヒト FSH モノクローナル抗体による酵素標識抗体で染色）、エストラジオール産生能、卵巣発育作用につ

いての検討がなされている。

糖鎖については糖鎖結合部位の検討、糖組成分析、糖鎖構造解析及び糖鎖マップが行われた。各検討項目の分析方法は以下の通りである。

糖鎖結合部位の検討：アミノ酸配列

糖組成分析：化学的加水分解により生成した糖を陰イオン交換クロマトグラフィ

糖鎖構造解析：①グアニジン塩酸及びジチオスレイトール存在下で原薬を変性させたのち、RP-HPLC でサブユニットに分離し、それぞれ [ ] 分解を行いその分解物を高速液体クロマトグラフィ質量分析 (LC-MS)  
②本薬の  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニット及びノイラミニダーゼ処理で糖鎖末端シアル酸を除いた  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットをエレクトロスプレー質量分析 (ES-MS)  
③本薬をフッ化水素で糖鎖部分を分解し、 $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットに分離し、陰イオン交換クロマトグラフィで糖鎖組成分析及び ES-MS 分析

糖鎖マップ：ヒドラジン分解と陰イオン交換クロマトグラフィ

本薬の推定糖鎖構造はすべて u-hFSH の推定糖鎖構造に認められるものであった。また、主要な結合糖鎖はモノ、ジ及びトリシアリル化糖鎖であり、自家用標準物質の測定結果及び 19 [ ] 年から 20 [ ] 年製造 [ ] 原薬ロットのばらつきを本薬の結合糖鎖のシアリル化を示す計算値 Z 値で比較した結果、本薬に結合する糖鎖構造はロット間で均一であることが確認された。なお、Z 値は Hermentin らにより定義されたモノ、ジ、トリ及びテトラシアリル化された糖鎖の相対比率であり、*in vivo* での潜在活性が反映するよう重み付けられている (Glycobiology 6:217,1996)。

さらに、不純物として目的物質由来不純物 ( [ ] 不純物A(\*) 及び [ ] 不純物、類縁物質 ( [ ] 不純物、不純物D(\*) ))、製造工程由来不純物 (細胞基材由来不純物、培養工程由来異種たん白質 (FBS 由来のたん白質、コラーゲン) 及び精製工程由来不純物 (抗ヒト FSH モノクローナル抗体、 [ ] 不純物E(\*) ( [ ] )、不純物F(\*) ( [ ] )、不純物G(\*)、不純物H(\*)、不純物I(\*) )) について検討がなされた。

目的物質由来不純物について、[ ] 不純物 B(\*) はほとんど認められず、不純物A(\*) が [ ] ~ [ ] % 検出された。製剤化及び長期保存試験においても、[ ] 不純物 B(\*) 及び 不純物A(\*) 量の増加は認められなかった。

製造工程由来不純物について、細胞基材由来不純物である DNA は [ ] pg/[ ] IU 以下、CHO 細胞由来たん白質は [ ] ng/[ ] IU 以下であった。培養工程由来異種たん白質である、FBS 由来たん白質は [ ] ppm を示した。また、コラーゲンは検出限界 ( [ ] ppm) 以下であった。

精製工程由来不純物について、抗ヒト FSH モノクローナル抗体の混入量はパイロット生産スケールでは [ ] ppm 以下、実生産スケールでは [ ] ppm 以下であった。なお、抗ヒト FSH モノクローナル抗体混入量は原薬の規格に設定されている。[ ] 不純物 E(\*) は検出限界

( $\blacksquare$   $\mu\text{g/mL}$ ) 以下、不純物<sub>F(\*)</sub> は検出限界 ( $\blacksquare$  ppm) 以下、不純物G(\*) は許容限界 ( $\blacksquare$  ppm) 以下、不純物H(\*) は  $\blacksquare$  %未満から  $\blacksquare$  % (検出限界  $\blacksquare$  %)、不純物I(\*) は許容限界 ( $\blacksquare$   $\mu\text{g/mL}$ ) 以下であった。

## 2) 規格及び試験方法

性状、確認試験 (RP-HPLC、IEF、ペプチドマップ、糖鎖マップ)、電気伝導率、pH、純度試験 (類縁物質、不純物A(\*)、不純物<sub>B(\*)</sub>、異種たん白質、 $\blacksquare$ 、 $\blacksquare$ 、抗ヒト FSH モノクローナル抗体)、たん白質量及び定量法 (比活性) が規格及び試験方法として設定されている。なお、製造及び精製工程由来不純物 (製造工程由来 DNA、不純物<sub>E(\*)</sub>、不純物<sub>F(\*)</sub>、不純物G(\*)、不純物H(\*)、不純物I(\*) ) は約 20 ロットの陰性データの蓄積あるいは常に定量限界以下であったため、異常毒性試験、エンドトキシン試験、微生物限度試験、マイコプラズマ否定試験及び発熱性物質試験は工程内管理試験に設定されているため、並びにローリー法によるたん白質量定量及び r-hFSH の放射能標識免疫測定法はより正確な試験方法へ変更されたため、本品の規格試験項目から削除された。

## (3) 製剤

### 1) 製剤設計

製剤 (ゴナール-f 75 皮下注、同 150) は、1 バイアル中に原薬ホリトロピン アルファ (遺伝子組換え) を  $6\mu\text{g}$  又は  $12\mu\text{g}$  含有する濃度違いの製剤であり、精製白糖を  $\blacksquare$  剤及び  $\blacksquare$  剤、リン酸水素二ナトリウム・二水和物及びリン酸二水素ナトリウム・一水和物を  $\blacksquare$  剤、L-メチオニンを  $\blacksquare$  剤、ポリソルベート 20 を  $\blacksquare$  剤、リン酸及び水酸化ナトリウムを  $\blacksquare$  剤として添加した凍結乾燥注射用製剤である。なお、溶解液として注射用水 1mL が添付されている。

### 2) 規格及び試験方法

性状、確認試験 (ホリトロピン アルファ、 $\blacksquare$  ( $\blacksquare$ )), pH、純度試験 (溶状、類縁物質、不純物A(\*) 及び不純物<sub>B(\*)</sub>)、水分、不溶性異物検査、質量偏差試験、無菌試験、不溶性微粒子試験、エンドトキシン試験、溶解時間及び定量法 (たん白質量) が設定されている。なお、精製白糖の確認試験は、本剤の製造ラインが単一で他の添加剤の混入がないことが GMP 上確立されており、添加剤の量が製剤の品質に大きく影響しないことから、規格に設定されていない。また、①内容物重量は本剤の主薬含量のばらつきを正確に反映する日局製剤総則注射剤質量偏差試験が設定されていることから、②L-メチオニン含量は長期保存期間中に大きな減少は観察されず、処方設計上  $\blacksquare$  に必要な量に対して十分量処方されていることから、③FSH 生物活性確認試験は高純度で一定の品質の r-hFSH を安定して得ることが可能になり、SE-HPLC で定量する本薬の質量とその生物活性の間には一定の関係が確立し、質量を指標として充填することによりロット間差の非常に少ない製剤の供給が可能になったことから、④発熱性物質試験は本剤の規格においてエンドトキシン試験が設定されていることから、⑤異常毒性試験は陽性例が無いことを示す試験成績が蓄積されたことから、⑥リン酸含量は製造ロット数の蓄積から、処方

量に大きなばらつきが発生することがないことから設定されていない。

#### (4) 同等性／同質性

開発当初、本薬は細胞培養工程において ■■■L の培養が可能な ■■■L バイオリアクターを用いて生産された。非臨床試験、臨床試験及び初回自家標準物質は、この培養工程で製造された r-hFSH が用いられた。海外での上市後、生産能力の増強が必要となり ■■■L の培養が可能な ■■■L バイオリアクターに変更された。その他、生産培養期間が ■■■日間延期され、消泡剤が ■■■から ■■■に変更された。

同等性/同質性の結果、ペプチドマップ、糖鎖組成分析、N 末端の多様性、IEF、免疫学的活性及び生物活性は同等であったが、ES-MS による糖鎖構造解析の結果、検出された糖鎖構造は ■■■L と ■■■L で同一であったが、糖鎖の組合せは異なり ■■■L で検出されなかった β サブユニットの糖鎖結合部位 2 カ所に結合する糖鎖が、両方ともテトラアンテナ型構造であるものが ■■■L では検出され、その理由は、検出技術の進歩のためとされた。

培養工程のスケールアップ後、本剤の需要の増加に伴い精製工程についてクロマトグラフィカラムのカラム径が拡大されたことについて、バリデーション実施により精製工程の旧スケールと同等性が確認され、原薬品質規格及び安定性試験結果からスケール変更の妥当性が確認された。

製剤は、当初バイアル及びアンプルに、生物活性を指標とした量を充填した凍結乾燥製剤（旧処方）として開発された。国内第 I 相試験（IMP20493、IMP21228）は、この製剤を用いて実施された。その後、原薬中の r-hFSH は高純度であることと、その後 FSH 生物活性とたん白質量の間に正確な相関が確認されたことから、質量を指標とした充填方式が確立された。更に ■■■及び ■■■のためにそれぞれポリソルベート 20 及び L-メチオニンを添加した現在の申請処方（新処方）が開発された。この製剤が国内第 I 相試験（IMP24185、IMP24523）及び国内第 III 相試験（IMP22696）に用いられた。

#### (5) 標準物質

標準品として、u-hFSH 国際標準品及び r-hFSH 国際標準品の 2 つが存在し、r-hFSH 標準物質として、自家一次標準物質（物理化学試験用、バイオアッセイ用及びたん白質量試験用）及び自家用標準物質（ペプチドマップ用、物理化学試験用、バイオアッセイ及び製剤確認試験用並びにたん白質量試験用）が設定されている。なお、各自家一次標準物質は用途に応じて自家用標準物質の規格を設定するために用いられる。

自家一次標準物質の更新時には、物理化学試験用は原薬の規格及び試験方法に適合することに加えて、アミノ酸配列分析、翻訳後修飾、分子量、たん白質量試験用は原薬の規格及び試験方法に適合することに加えて、アミノ酸配列分析、バイオアッセイ用は原薬及び製剤の規格及び試験方法に適合することに加えて、アミノ酸配列分析及び生物活性が設定された。なお、生物活性は国際標準物質に対して評価される。

自家一次標準物質の管理項目として、物理化学試験用は類縁物質が、バイオアッセイ用は生物活性、不純物<sub>B(\*)</sub>及び溶状が、たん白質量試験用はたん白質量（SE-HPLC）が設定されており、少なくとも ■■■年の間隔でこれらを指標に品質確認を行うとされた。

自家用標準物質の更新時には、ペプチドマップ用及び物理化学試験用は原薬の規格及

び試験方法に適合すること、バイオアッセイ及び製剤確認試験用は原薬の規格及び試験方法に適合することに加えて、生物活性、たん白質量試験用は原薬及び製剤の規格及び試験方法に適合することに加えて、たん白質量定量が設定された。なお、生物活性は国際標準品、自家一次標準物質又は更新前の自家一次標準物質に対して評価される。

自家用標準物質の管理項目として、ペプチドマップ用はペプチドマップが、物理化学試験用は類縁物質、IEF 及び 不純物A(\*) が、バイオアッセイ及び製剤確認試験用は生物活性、類縁物質、 不純物A(\*) 、 不純物 B(\*)、pH、内容重量、たん白質量、水分、溶解時間、外観及び溶状が、たん白質量試験用はたん白質量 (SE-HPLC) が設定されており、少なくとも■年の間隔でこれらを指標に品質確認を行うとされた。

### <機構における審査の概略>

#### (1) 生物由来原材料について

機構は、本剤の製造工程で用いられる生物由来原材料について生物由来原料基準及び関連通知に基づいた対応がなされているか申請者に説明を求めた。

申請者は、本剤の製造工程には、FBS、ブタ由来トリプシン、ブタ由来コラーゲン及び [REDACTED] 株化細胞で産生された抗ヒト FSH モノクローナル抗体が用いられており、平成 15 年 5 月 22 日付け医薬発第 0522002 号通知等への対応が必要な生物由来原材料は現行の WCB を平成 5 年に作製したときに使用した FBS であったと説明し、WCB の作製時 (平成 5 年) に使用したカナダ産 FBS の原料となる動物の管理に関する書類として、以下の資料が提出された。

1. ウシ胎児血清 ([REDACTED]) の分析証明書
2. カナダ農務省からの当該 FBS ロットの輸出許可証
3. 当該 FBS ロットの出産地証明書

また、平成 15 年 8 月 1 日付け薬食審査発第 0801001 号別添に従った BSE リスク評価値は -9.6 であったと説明した。

機構は、本剤投与による BSE 感染リスクの程度について検討中である。

#### (2) 原薬及び製剤の規格が欧米と異なることについて

機構は、本邦での申請製剤と同一の製剤が欧米に出荷されているにもかかわらず、出荷規格が異なっていることから、国際的な規格管理体制について申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。米国では欧州より遅れて申請、承認されたため、米国の規格及び試験方法は、米国規制当局の要求事項を反映させて設定された結果である。その後、欧米において上市後に行われた製造方法一部変更時に各規制当局からの要求事項をそれぞれ反映させた結果、欧州と米国で規格及び試験方法が異なった。本邦への申請に関しては、欧州での規格及び試験方法を基に本邦において従来要求されている規格項目を選定し、その表記方法に関しては「日本薬局方」の各条の記載を参考にして設定した。したがって、本邦で申請する規格及び試験方法と欧米の規格及び試験方法との違いは、原薬及び出荷される製剤の品質の違いに由来するものではなく、各規制当局の品質管理に対する要求の違い、並びに各極の規格及び試験方法の表記方法の違いを反映させた結果によるものである。

機構は、本申請に関して慎重に審査を進め、マイコプラズマ否定試験、浸透圧、生物活性を規格及び試験方法に追加設定し、溶解時間、IEF、ペプチドマップ及び糖鎖は規格値を変更するよう指示した。

### (3) 原薬及び製剤の規格項目について

機構は、本薬は遺伝子組換え技術及び細胞培養技術を用い製造され、製造工程中に培地等によって工程外からマイコプラズマが混入する可能性があることから、マイコプラズマ否定試験を原薬の規格及び試験方法に規定するよう申請者に求めた。

申請者は、培養法及び指標細胞を用いた DNA 染色法によるマイコプラズマ否定試験を設定すると回答した。

機構は、製剤の規格及び試験方法として、本剤は注射剤であることから浸透圧を、本剤の表示は生物活性で示されていることから FSH 生物活性を追加設定するよう申請者に求めた。

申請者は、了解した。

機構は、これらの回答を了承した。

### (4) 原薬及び製剤の規格値について

機構は、製剤の不純物A(\*) (純度試験)の規格値は当初「■%以下」であったが、現行製造ロットの実測値は「■%以下」であることから、実測値を踏まえて設定するよう申請者に求めた。

申請者は以下のように回答した。本試験は■% 不純物A(\*) 溶液を標準溶液とする SDS-PAGE による限度試験であり、定量試験ではないが、定性的に評価した各 不純物A(\*) 量はすべて■%以下であることから本邦における製剤の不純物A(\*) の規格値を「■%以下」に変更する。

また、機構は、溶解時間の規格値は当初「■秒以内に完全に溶ける」であったが、規格の根拠となる数値が示されていないため、実測値及び実測値を踏まえ規格設定をするよう求めた。

申請者は、長期保存試験の 36 ヶ月間の試験成績を示し (最短 ■秒、最長 ■秒)、その上で長期保存試験期間中に他の評価項目で大きな変化はなく、品質に著しい変化が起きていないことが確認されており、長期保存試験の間の溶解時間の変化は本剤の品質に影響しないとしながらも、溶解時間の実測値を踏まえ本試験の規格を「■秒以内に完全に溶ける」に変更すると回答した。

さらに、機構は、原薬の確認試験 IEF の規格は、「試料溶液で得られる ■本の主バンドは標準溶液で得られる ■本のバンド (pH ■以上: ■バンド、pH ■~■: ■バンド、pH ■以下: ■バンド) のいずれかと同様の位置にある。」であったが、得られるすべてのバンドあるいは主要と考えられるすべてのバンドの泳動度が標準物質と一致するかたちの規格設定をするよう申請者に求めた。

申請者は、IEF の規格について、試料溶液のアイソフォームの等電点 (pI) を標準溶液

のものと比較することに加えて、各アイソフォームのバンドのシグナル強度を測定する。つまり、規格値を、「各バンドの濃さを測定するとき、試料溶液で得られる濃い■本から■本の主バンドは、標準溶液で得られるバンド■本のいずれかと同様の位置にあり、この主バンド■本から■本の濃さの合計は■%以上である。」と設定すると回答した。

しかしながら、既報 (Biologicals 25:269-281,1997) において r-hFSH の *in vivo* 生物活性は pI 値に大きく依存していると報告されているにもかかわらず、申請者は本剤の IEF の結果と生物活性の相関を確認していなかったことから、機構は、本薬の *in vivo* 生物活性と pI 値の相関性を検討したうえで、IEF の結果 (バンドの位置) を pI 値を用いて規定するよう申請者に求めたところ (詳細は (5) IEF について参照)、IEF の規格値が「試料溶液の主バンド■本の等電点は■、■、■、■、■、■及び■であるとした。」と変更された。

機構は、各種糖鎖の面積百分率が規格設定されたことより (詳細は (8) 糖鎖について参照)、i) IEF におけるシアル酸含量の違いによる各バンドの定量的な解析を補うことが可能と考えられること、ii) IEF で示されるバンドの定量値は、測定精度の問題から、誤差が大きくなる可能性が考えられたことから、申請者の回答は妥当であるとする。

以上、機構は、原薬及び製剤の規格値に関する申請者の説明を了承した。

#### (5) IEF について

申請者は、本剤の IEF の結果と生物活性の相関は確認されていないとしていることについて、機構は、Mulders らは r-hFSH の *in vivo* 生物活性は pI の値に大きく依存していると報告していることから (Biologicals 25:269-281,1997)、規格の頑健性を示すためにも、過去の製造ロットを用いて本薬の *in vivo* 生物活性と pI 値の相関性について検討を行うよう申請者に求めた。

申請者は以下のように回答した。IEF と *in vivo* 生物活性の相関は確認されていないとしていたが、製造工程の研究開発時にイオン交換クロマトグラフィを用いた精製により選択的に分画された pI ■以下のアイソフォーム画分は比活性 ■~■ IU/mg を、pI ■以上のアイソフォーム画分は比活性 ■~■ IU/mg を示すデータが得られており、原薬の IEF プロファイルは、*in vivo* 生物活性と相関関係が認められていた。実際の製造工程において製造される原薬は、製造方法の研究開発時に得られたようなアイソフォーム分布又は *in vivo* 生物活性のばらつきの極端に大きな原薬が製造されることはない。

機構は、申請者の提示した試験成績は pI 値と比活性の相関関係を十分に示すものではないが、pI ■以下で高い比活性が、pI ■以上で低い比活性が認められており、本薬の IEF と比活性の関係は Mulders らの報告と類似したものであるとの申請者の説明を了承した。

#### (6) ペプチドマップについて

機構は、ペプチドマップについて、ピークの保持時間のみならずピーク強度に関する規格も設定するよう申請者に求めた。

申請者は以下のように回答した。ペプチドマップは、原薬と自家標準物質をエンドペプチダーゼ ■消化し、それぞれの酵素切断断片を RP-HPLC で分析比較して、一次構造

から分子の同等性を確認する定性的試験として確認試験に位置付けており、ピーク強度に関する規格を設定することは不適切である。また、本試験法に関して、定量的観点からのバリデーションは実施していない。加えて、本法の再現性（相対標準偏差）はペプチドあるいはペプチドグループにより■■■～■■■%であったので、ピーク強度に関する規格を設定することは不適切と考える。

機構は、標準溶液のペプチドマップで得られたチャートの中で代表的と思われる2つのピークを選び、それらのピーク比を示すよう申請者に求めた。

申請者は、機構が示した規格値ではなく、試料溶液と標準溶液から得られるピークの「保持時間の差」並びに「予想されるピークの合計面積（%）：予想されるペプチド断片のすべてが検出されることを確認する」及び「予想されないピークの面積（%）：アミノ酸配列に変化が生じ、予想されるピークに無いペプチド断片が検出されないことを確認する」に関する規格値を加えるとした。さらに、この規格は欧州及び米国で承認されている規格値と同一であり、本邦、欧州及び米国の規格及び試験方法を調和させるものであると説明した。

機構は、i) 改定された規格では複数のピークの総和を基に設定されているが、その場合各ピーク値のプラスマイナスが総和されるのでピークの形状及び大きさを反映しない可能性があること、ii) 規格及び試験方法は他極と調和させることが重要ではなく、品質を恒常的に担保するために重要であることから、第14改正日本薬局方第2追補の参考情報ペプチドマップを参照し、再度、ピークの保持時間及びピーク強度に関する規格を設定するよう申請者に求めた。

申請者は、品質管理試験で得られた原薬及び標準物質のデータを基に、原薬のペプチドを確認するための評価方法を再検討し、視覚的評価、ピーク保持時間及びピーク強度を設定すると回答した。

機構は、ペプチドマップについて適切に規格が改められたことから、以上の回答を了承した。

## (7) 糖鎖について

本薬の糖鎖構造について、同種同効薬として提示された天然物由来の u-hFSH と違いがないか申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。r-hFSH に結合している糖鎖構造は、すべて u-hFSH に結合する糖鎖構造に存在するものであり、シアリル化率に差はあるものの、r-hFSH の糖鎖構造は u-hFSH の糖鎖構造と相違はないとされた。（機構注：「シアリル化率以外に相違はなかった」とすべきと考える。）

シアル酸を含む糖鎖は FSH のクリアランスに重要な役割を果たすことが示されており（Life Sci. 46:927,1990）、本剤もシアル酸を含んでいることから、Hermentin らの提唱する Z 値を用いて評価がなされているが（Glycobiology 6:217,1996）、申請者が引用した Hermentin らの報告では Z 値は「Hypothetical N-glycan charge」を求める方法であるとされている。機構は、本剤のようなシアル酸含量が体内動態に影響する可能性のある医薬品の試験に hypothetical な値を用いるのは不適切であるので、糖鎖マップの規格は標準物質とのパターン比較にするよう申請者に求めた。



申請者は、hypothetical な値である Z 値に関する規格を削除し、米国における糖鎖マップの規格値に合わせ、各糖鎖種の面積百分率による規格を新たに設定することとすると回答した。

機構は、糖鎖マップに関する規格を Z 値ではなく各糖鎖種の面積百分率に改めるとの回答は了承したが、それらの根拠となるデータは提出されていないので、規格値についてはデータの提出を待ち適否を判断したい。

#### (8) 標準品及び標準物質について

機構は、標準品が u-hFSH 国際標準品及び r-hFSH 国際標準品の 2 種類設定された理由について申請者に説明を求めた。

申請者は、各標準品の使用用途を以下のように回答した。特性解析には r-hFSH 国際標準品が用いられた。バイオアッセイ用自家一次標準物質の規格及び試験方法に、r-hFSH 国際標準品及び u-hFSH 国際標準品が用いられた。また、たん白質量試験用自家常用標準物質の規格及び試験方法に u-hFSH 国際標準品が用いられた。

機構は、現在用いられている自家一次標準物質と開発当初確立された物理化学的品質試験に用いられた暫定的な自家標準物質（ロットA(\*)）との関係について申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。自家標準物質（ロットA(\*)）は、開発初期に確立された十分な特性解析が行われていない暫定的な自家標準物質である。原葉（ロットB(\*)）の物理化学的品質試験は、この自家標準物質を用いて行われた。現在用いられている物理化学試験用及びバイオアッセイ用自家一次標準物質は、原葉（ロットB(\*)）を使用して作製された。なお、原葉（ロットB(\*)）については、自家一次標準物質に使用する原葉として十分な特性解析が行われている。

機構は、自家一次標準物質を 3 種類（物理化学試験用、バイオアッセイ用及びたん白質量試験用）設定することの妥当性について申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。最初の自家一次標準物質として、バイオアッセイ用及び物理化学試験用が平成 ■ 年に作製された。平成 ■ 年に製剤の充填方法を生物活性充填から質量充填へ切り換えた。そのとき、SE-HPLC により r-hFSH をたん白質量定量で管理するため、たん白質量試験用自家一次標準物質を作製した。現時点では 3 種類の自家一次標準物質を用いるが、次回の更新時には物理化学試験用と SE-HPLC によるたん白質量試験用の 2 種類の自家一次標準物質の統合を検討する。

機構は、自家常用標準物質が 4 種類（ペプチドマップ用、物理化学試験用、バイオアッセイ及び製剤確認用並びにたん白質量試験用）設定された経緯について説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。最初の自家常用標準物質として、バイオアッセイ及び製剤確認用と物理化学試験用が平成 ■ 年に、ペプチドマップ用が平成 ■ 年に作製された。平成 ■ 年に、新たな物理化学試験用、バイオアッセイ及び製剤確認用、たん白質量試験用の 3 種類の自家常用標準物質が自家一次標準物質を参照して作製された。現時点では 4

種類の自家常用標準物質を用いるが、今回の自家常用標準物質の更新時には、合理化を図ることを検討する。

機構は、バイオアッセイ用自家一次標準物質は製剤と同一の処方であり、更新時に製剤の規格（75IU 製剤：■■■～■■■IU/vial、150IU 製剤：■■■～■■■IU/vial）に適合するとしているが、本標準物質は原薬の生物活性等にも用いられるため、本標準物質の規格が原薬の規格（■■■～■■■IU/mg）を満たしているか説明するよう申請者に求めた。

申請者は以下のように回答した。現行のバイオアッセイ用自家一次標準物質は、規格に適合した原薬から調製された製剤のうち標準物質として基準を満たすものが用いられている。また、国際標準品若しくは以前のバイオアッセイ用自家一次標準物質にて、その生物活性は評価されている。その際、バイオアッセイ用自家一次標準物質はアルブミン緩衝液にて 20 倍以上に希釈された後、試験動物に投与されるため、賦形剤の影響は除かれ、バイオアッセイ用自家一次標準物質（製剤）の原薬（有効成分）の活性のみが測定される。加えて、3×3 の平行線検定法を用いた統計手法により、生物活性の評価は実施される。このように評価されるバイオアッセイ用自家一次標準物質の生物活性は妥当であり、バイオアッセイ用自家一次標準物質の用途から考えて、バイオアッセイ用自家一次標準物質が原薬の規格に適合する必要はないと考える。

機構は、申請者の説明を了承した。

以上、標準品及び標準物質について、標準物質の更新方法及び管理項目は再度整理及び試験項目の検討が必要であるが、それ以外については申請者の説明を了承した。

## <安定性に関する資料及び機構における審査の概略>

### 1) 原薬

製造スケール検証用製造ロット（申請された精製工程のバリデーション用ロット）及び市販用実生産ロットで長期保存試験（ $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ /暗所/48 ヶ月）、加速試験（ $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ /暗所/6 ヶ月、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH}$ /暗所/6 ヶ月）が実施され、長期保存試験では、pH、たん白質量（ローリー法）、比活性、IEF、シアル酸、ガラクトース、不純物<sub>B(\*)</sub>、不純物A(\*)、r-hFSH モノマー及び不純物<sub>C(\*)</sub>について測定され、加速試験では pH、IEF、糖鎖マップ、不純物A(\*)及び不純物<sub>C(\*)</sub>について測定された。製造スケール検証用製造ロットの長期保存試験では 48 ヶ月間安定であった（3 ロット）。市販用実生産ロットの長期保存試験では、原薬（ロットC(\*)）は 36 ヶ月間保存で規格を満たしていることが確認されたが、原薬（ロットD(\*)）では 6 ヶ月目のみ比活性が規格を満たさなかった。また、原薬（ロットE(\*)）は試験開始時に既に比活性が低く（■■■IU/mg）、比活性が測定された保存期間 0、6、12、24 及び 36 ヶ月の中、6、24 及び 36 ヶ月で規格値以下となった。一方、加速試験では、6 ヶ月間の保存において安定であるとされた。

機構は、原薬の安定性試験で用いられた容器が不明であることから、申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。原薬の安定性試験ではポリエチレンボトルを用いたが、

実際の製造における原薬の保存容器はポリカーボネートボトルを用いている。現在までに得られた原薬に関する安定性試験（ポリエチレンボトル）の結果は、各試験項目の規格を満たしており、ポリカーボネートボトルで保存された原薬で製造された製剤は、現在までのところ各試験項目の規格を満たしていることから、本原薬の安定性試験にポリカーボネートボトルの代わりにポリエチレンボトルを使用することによる影響は無いと考える。なお、今後行うすべての安定性試験については、ポリカーボネートボトルを使用する。

機構は、実際に原薬を保存するポリカーボネートボトルの代わりにポリエチレンボトルを用いることについての妥当性について、申請者に説明を求めているところである。

さらに、機構は、原薬の市販用実生産ロットの長期保存試験の結果、比活性が一過性に規格値を満たさなかったことについて申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように回答した。比活性の算出には、たん白質量（SE-HPLC）及び生物活性の測定法におけるばらつきが重なることが想定される。規格外の値が認められたが、これは測定方法によるばらつきの範囲内であり、また規格外となった比活性の値であっても安定性試験を通して特定の傾向を示しておらず、本原薬が安定であることを示す結果であるとする。

機構は、長期保存試験の結果、原薬（ロットE\*）の比活性が一過性に規格値を満たさなかったことについては、さらに検討した上で申請者の説明の妥当性について判断したい。

## 2) 製剤

6 及び 12 $\mu$ g 製剤で長期保存試験（25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C/60 $\pm$ 5%RH/遮光/3mL 無色透明ガラスバイアル/正立/36 ヲ月）、6 及び 12 $\mu$ g 製剤で加速試験（40 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C/75 $\pm$ 5%RH/遮光/3mL 無色透明ガラスバイアル/正立/6 ヲ月）、3 及び 12 $\mu$ g 製剤で再溶解後の安定性（25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C/60 $\pm$ 5%RH/遮光/投与シリンジ/正立：プランジャーが上で針が下/24 時間）及び 12 $\mu$ g 製剤で光安定性試験（25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C/湿度規定せず/蛍光ランプ：波長 320 $\sim$ 400nm（最大エネルギー照射波長域 350 $\sim$ 370nm UV ランプ）総照度 120 万 lux $\cdot$ hr 以上及び総近紫外放射エネルギー 200W $\cdot$ h/m<sup>2</sup> 以上/3mL 無色透明ガラスバイアル/正立/28 日間）が実施された。長期保存試験では、容器確認試験、外観試験、溶解時間、溶状（濁り）、溶状（色）、不溶性異物検査、pH、水分、内容物重量、質量偏差試験、r-hFSH 確認試験、定量法（たん白質量）、不純物A\*、不純物B\*、不純物C\*、無菌試験及びエンドトキシン試験について測定された。加速試験では、外観試験、溶解時間、溶状（濁り）、溶状（色）、不溶性異物検査、pH、水分、内容物重量、r-hFSH 確認試験、定量法（たん白質量）、不純物A\*、不純物B\*及び不純物C\*について測定された。再溶解後の安定性では、生物活性（IU/シリンジ）、たん白質量（XXXXXXXXXX）、たん白質量（SE-HPLC）、溶状（濁り）、溶状（色）、pH、不溶性微粒子試験について測定された。光安定性試験では凍結乾燥ケーキの外観、不純物B\*（SDS-PAGE/銀染色）、不純物C\*、たん白質濃度（SE-HPLC）、不純物A\*（SDS-PAGE/銀染色）について測定された。

長期保存試験及び加速試験では、保存期間 36 ヲ月を通じてすべての試験項目で規格範囲内にあり、いかなる変化の傾向も認めなかった。再溶解後の安定性については、溶解後

24 時間品質に変化は見られなかった。また、ブラケット法を採用し、中間の含量である 6 $\mu$ g 製剤についても同様に安定であるとされた。しかしながら、これら製剤は微生物の増殖を抑える保存剤等は処方していないことから、添付文書の適用上の注意に「溶解後は直ちに投与し、溶解後に長時間放置しないこと」と注意喚起された。光安定性試験では、12 $\mu$ g 製剤を紙箱に包装した物を対照として、一次容器バイアル 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C で光チャンバーに 28 日間置きその品質の変化をみた。直接曝光させたとき、不純物<sub>C(\*)</sub>のみ  $\blacksquare$ % から  $\blacksquare$ % へ増加する傾向を示したが、規格範囲内 ( $\blacksquare$ % 以下) であった。一方、紙箱に包装した 12 $\mu$ g 製剤には不純物<sub>C(\*)</sub>に変化はなかった。本剤は曝光による不純物<sub>C(\*)</sub>の増加は紙箱で二次包装すれば妨ぐことができると判断された。

以上より、製剤の貯法は「室温、遮光保存」とし、有効期間を 36 ヶ月とする。

機構は、製剤の貯法並びに有効期間については妥当であると判断した。

### 3. 非臨床に関する資料

#### (1) 薬理試験成績の概要

##### <提出された資料の概略>

薬理試験においては、本剤がヒト下垂体性 FSH の国際標準品 (WHO 国際標準品 83/575: WHO 下垂体性 FSH 標準品、以下「WHO 83/575」) 及び米国標準品 (NIADDK-hFSH-I-3: 米国 NIH 下垂体性 hFSH 標準品、以下「I-3」)、並びに女性の不妊治療に対し長年使用されている u-hFSH 製剤 (卵胞刺激ホルモン及び精製卵胞刺激ホルモン: 販売名 u-hFSH(\*) 及び u-hFSH-HP(\*) ) と同様の生物学的活性を有することが検討された。

#### 1) 効力を裏付ける試験

##### i) 精巢の FSH 受容体に対する結合試験 (5281 試験)

本剤の FSH 受容体に対する *in vitro* 結合特性が WHO 83/575、I-3 及び u-hFSH 製剤と比較検討された。<sup>125</sup>I 標識した本剤及び I-3 (以下それぞれ「<sup>125</sup>I-r-hFSH」及び「<sup>125</sup>I-I-3」) と精製ウシ精巢 FSH 受容体との用量-反応曲線を作成した後、本剤、WHO 83/575、I-3 及び u-hFSH 製剤による <sup>125</sup>I-r-hFSH 及び <sup>125</sup>I-I-3 の FSH 受容体に対する競合結合試験をそれぞれ 2 回ずつ実施し、各 FSH の受容体結合定数 (以下「Ka」) を算出した。得られた Ka (平均 $\pm$ SEM、 $\times 10^9$ ) は、<sup>125</sup>I-r-hFSH を用いた場合には本剤で 5.30 $\pm$ 0.29 及び 6.05 $\pm$ 0.87 (それぞれ 1 回目及び 2 回目の試験により算出された値、以下同様。)、I-3 で 5.52 $\pm$ 0.62 及び 4.77 $\pm$ 0.37、WHO 83/575 で 6.69 $\pm$ 1.80 及び 4.64 $\pm$ 0.46、u-hFSH(\*) で 4.14 $\pm$ 0.37 及び 6.34 $\pm$ 1.11、u-hFSH-HP(\*) で 4.28 $\pm$ 0.43 及び 4.54 $\pm$ 0.38 であった。また、<sup>125</sup>I-I-3 を用いた場合には本剤で 11.1 $\pm$ 2.42 及び 17.1 $\pm$ 2.65、I-3 で 16.9 $\pm$ 3.79 及び 8.90 $\pm$ 2.48、WHO 83/575 で 13.7 $\pm$ 3.37 及び 20.0 $\pm$ 7.89、u-hFSH(\*) で 11.6 $\pm$ 0.94 及び 14.5 $\pm$ 0.41、u-hFSH-HP(\*) で 14.2 $\pm$ 3.30 及び 14.9 $\pm$ 3.25 であった。以上の結果より、精巢の FSH 受容体に対する結合に関して、本剤はヒト下垂体性 FSH の国際標準品及び米国標準品、並びに 2 種の u-hFSH 製剤と差がないことが示された。

##### ii) 文献調査

① GnRH 拮抗剤投与ラットにおける本剤の精子形成の維持に対する作用 (Endocrinology 136:253-261,1995)

GnRH拮抗剤の投与により LH 及び FSH を枯渇させた 60 日齢 SD 系雄性ラットでは、投与 1 週間後の精巣重量の減少及びステージⅦの精母細胞及び精子細胞数の有意な減少が認められたが、本剤 10IU と GnRH 拮抗剤を 1~4 週間皮下投与することにより、ステージⅦの精母細胞及び分化の進んだ精子細胞数の減少が完全に抑制された。パキテン期精母細胞及びステップ 7 精子細胞の減少も抑制され、減数分裂可能な B 型精祖細胞数が増加し、投与期間を通じてプレレプトテン期精母細胞数が維持された。これらの作用はライディヒ細胞機能の刺激を介した作用ではないことが示唆された。

②新生児期ラットにおける本剤のセルトリ細胞及び精子形成に対する作用 (Biology of Reproduction 54:36-44,1996)

生後 16 時間以内の SD 系雄性ラットを用い本剤 200IU/kg を生後 1 日目から 5、10、15 又は 20 日目まで皮下投与したところ、生後 10~20 日目の精巣重量、精細管上皮及び間質の絶対容積は有意に増加し、セルトリ細胞数、精祖細胞数及び精母細胞数が増加した。また、本剤を生後 10 又は 15 日間投与したところ、成熟期 (生後 90 日目) に精細管の容積及び長さの増大、並びにセルトリ細胞数及び生殖細胞数の増加が関与する精巣肥大が認められ、成熟期まで持続したことが示唆された。

③GnRH免疫ラットにおける本剤の精子形成の回復に対する作用 (Endocrinology 136:4035-4043,1995)

GnRH 免疫原の反復投与により、精子形成の重度の退行が認められた成熟 (90~100 日齢) SD 系雄性ラットに本剤 10 又は 50IU/kg/日を 7、14 又は 21 日間皮下投与したとき、血清インヒピンが投与前値まで回復したが、血清及び精巣アンドロゲン値に影響は認められなかった。本剤の 7 日間投与により精子形成能は回復し精祖細胞数が増加した。このとき円形精子細胞までの精子成熟数は増加していたが、伸長した精子細胞数の回復にはテストステロンなどの他のホルモンが必要であることが示唆された。

④新生児期及び性成熟前ラットにおける精巣の体細胞増殖に対するゴナドトロピンの作用 (J Physiol Biochem 53: 289-300,1997)

新生児期 (5~9 日齢) 又は性成熟前 (15~19 日齢) の Wistar 系雄性ラットに、r-hFSH (1IU/日又は 3IU/日) 又は hCG (10IU/日) を投与し、最終投与の翌日 (10 日齢又は 20 日齢) の 5-ブロモデオキシウリジンの DNA への取り込みを指標に細胞増殖を検討した結果、hCG 投与群の新生児期ラットの胎児性ライディヒ細胞においてのみ有意な取り込みが観察された。r-hFSH 投与群の性成熟前ラットでは、精巣重量、精細管径、成熟型ライディヒ細胞の大きさ及びマクロファージで標識細胞指数の増加が認められた。本試験において精巣体細胞のゴナドトロピンに対する感受性が細胞の種類及びそれらの分化時期に関係していることが示唆された。

## 2) 副次的薬理試験

### i) r-hFSH 及び u-hFSH 製剤の卵巣に対する作用

性成熟前 (21~22 日齢) SD 系雌性ラットの卵巣由来の顆粒膜細胞において、顆粒膜細胞アロマターゼバイオアッセイ法により、r-hFSH の生物活性を 2 種の u-hFSH 製剤 (u-hFSH(\*) 及び u-hFSH-HP(\*)), hMG 社内標準品 (以下「RHST-90-hMG」)、I-3 及び WHO 83/575 と比較したところ、r-hFSH は用量依存的なエストラジオール産生刺激作用を示し、その反応性は u-hFSH 製剤、RHST-90-hMG、I-3 及び WHO 83/575 と同様であった。

MAIAclone イムノラジオメトリックアッセイにより本剤を含む各薬理試験に使用した FSH の免疫学的定量値とこれまでに *in vivo* 生物検定法により測定した各 FSH 活性との比 (IB 比) を検討した結果、生物検定法で使用した RHST-90-hMG の活性に換算して示した本剤、I-3、WHO 83/575、u-hFSH(\*) 及び u-hFSH-HP(\*) の IB 比は 30~160IU/L の範囲ではほぼ一定であった。

雌性ラットに RHST 90-hMG、r-hFSH 及び u-hFSH 製剤を 0.75~12IU (1日2回3日間投与の合計) 皮下投与し、初回投与72時間後に卵巣を摘出して重量を測定した。また、雌性ラットに3IUを1日2回皮下投与し、初回投与後24、48、72及び96時間に卵巣を摘出し、卵巣重量の時間的推移を検討した。卵巣重量の用量反応性及び卵巣重量の時間的推移に関し、r-hFSH 及び u-hFSH と RHST 90-hMG との間に差は認められなかった。

各 FSH 製剤の排卵に対する作用の比較について、性成熟前 (27日齢) ラットに r-hFSH 及び u-hFSH 製剤 0.5~8.0IU を hCG (2.5IU) 併用下で1日2回3日間皮下投与し、投与3~5日目の卵管中の卵母細胞数を測定したところ、排卵された卵母細胞数に関する用量反応性は同様であり、1.0IU 投与群で作用のピークが認められ、それより高用量 (2.0、4.0 及び 8.0IU 投与群) では、排卵される卵母細胞が減少した。u-hFSH では r-hFSH に比して作用のピークがやや早くみられたが (投与4日目午前)、排卵数に関しては r-hFSH と u-hFSH は類似していた。

r-hFSH、u-hFSH 及び hMG の排卵に及ぼす影響について、性成熟前の SD 系雌性ラット (28日齢) を用いて検討された。r-hFSH、u-hFSH 又は hMG それぞれ 26、80 又は 240IU/kg/日を1日2回3日間反復投与し、最終投与翌日に hCG (75IU/kg) を投与して排卵を誘発させた。hCG 投与24時間後の卵子数の測定より、r-hFSH と u-hFSH の作用はいずれもほぼ同様であると考えられた。

正常性周期雌性サルに本剤 37.5IU 及び hCG (Profasi®) 1,000IU を投与した際の卵巣の反応について検討され、また、Metrodin® についての報告 (Fertility and Sterility 42:116-126, 1984) との比較もされた。体重 2.2~4.5kg の正常周期雌性カニクイザルに r-hFSH 37.5IU (20匹) 又は注射用水 (対照群: 5匹) を性周期 2~10日に連日投与し、hCG 1,000IU を11日目に投与した。血清エストラジオール濃度が初めて 300pg/mL に到達する時期により、Fast-Responder (6日目以前)、Slow-Responder (7~9日目)、Non-Responder (9日目までに目標値に達しない) に分類した結果、本剤を投与したサルの半数 (10匹) は Fast-Responder、3匹は Slow-Responder、残りの7匹は Non-Responder であり、この反応性の分布は Metrodin® の報告と差がみられなかった ( $p > 0.05$ 、Fisher's 正確確率検定)。しかし、対照群とは異なり、r-hFSH 投与群の Non-Responder においてはエストラジオールの上昇がみられ、卵胞の発育が示唆された。以上の結果より、37.5IU の r-hFSH 投与は正常周期サルにおいて、卵胞発育、ステロイド合成及び黄体機能を促進すると考えられ、本剤は天然型 FSH と同様の生物学的活性であることが示された。

LH 欠乏により卵胞発育の刺激を抑制されたサルにおいて、本剤単独及び本剤+遺伝子組換え型ヒト LH (r-hLH) 併用投与時の有効性が検討された。体重 4.2~7.1kg の成熟雌性アカゲザルに GnRH 拮抗剤 (■: 下垂体切除動物のレベルまで LH 値を低下させる。) を約 90日間皮下投与後、GnRH 拮抗剤と共に本剤 30IU 又は本剤 30IU+r-hLH 30IU を1日2回筋肉内投与した。少なくとも6個の卵胞の直径が 4mm 以上発育した翌日に hCG

(Profasi<sup>®</sup>) を投与して卵母細胞を採取し核の成熟度を検討した後、体外受精により受精率を検討した。本剤単独群及び本剤+r-hLH 併用群の両群ともに LH 欠乏サルにおける卵胞発育が促進された。本剤+r-hLH 併用群では血清中エストラジオール濃度は卵胞刺激の最終3日間で高値を示し、卵胞発育に必要なゴナドトロピン投与期間が短かった。黄体期の血清中プロゲステロン濃度、卵胞総数及び卵胞の大きさには単独及び併用群間で有意差は認められなかった。また、本剤単独群の卵母細胞は、併用群より分裂中期Ⅱ型(受精能力あり)が多く、分裂中期Ⅱ型で受精した卵母細胞の平均受精率は、本剤単独群(89±5%)が併用群(52±12%)を上回った。

## ii) 文献調査

①ヒト顆粒膜細胞における遺伝子組換えヒトゴナドトロピンのステロイド及びインヒビン産生に対する作用 (Eur J Endocrinol 136:617-623, 1997)

r-hFSH (0.1~100ng/mL)、r-hLH (0.01~100ng/mL) 又は Metrodin<sup>®</sup>HP (1~100ng/mL) の添加又は無添加でヒト顆粒膜細胞を4~8日間培養し、ステロイド(エストラジオール及びプロゲステロン)及びインヒビン濃度を測定した結果、自然周期の排卵から得た顆粒膜細胞は r-hFSH に対する反応性が高く、培地中のエストラジオール及びプロゲステロンの蓄積が r-hFSH の濃度に比例して増大し、卵胞刺激期の卵胞から得た顆粒細胞はプロゲステロンの蓄積に関して r-hLH に対する反応性が高かった。Metrodin<sup>®</sup>HP と r-hFSH のエストラジオール産生に対する作用はほぼ同様であり、r-hFSH のプロゲステロン産生作用は Metrodin<sup>®</sup>HP よりわずかに上回っていた。また、インヒビン産生は r-hFSH 及び r-hLH により促進された。

②性成熟前ラットより得た卵胞における r-hFSH の卵母細胞減数分裂及びステロイド合成に対する作用 (Mol Human Reproduction, vol 1, Human Reproduction 10:1619-1622,1995)

性成熟前(26日齢)SD系雌性ラットに妊娠ウマ由来の血清性ゴナドトロピンを投与し、卵胞を採取し、r-hFSH (10~1,000ng/mL) 又は r-hLH (0.1~1,000ng/mL) を添加してインキュベートし、卵母細胞減数分裂及びステロイド合成に対する作用が検討された。卵胞数は、対照群 105 個、r-hLH 群 261 個、r-hFSH 群 102 個であった。対照群の卵胞は第一減数分裂の前期のままであったが、r-hFSH 又は r-hLH に添加により、卵胞は卵核胞崩壊(GVB)の頻度が増加した。GVBに至る卵母細胞の割合は、本剤より r-hLH 製剤がやや上回った。卵胞エストラジオールの蓄積は r-hFSH 又は r-hLH により同様に促進された。卵胞プロゲステロン及びテストステロン蓄積は r-hLH により促進されたが、r-hFSH の作用は弱かった。卵核胞崩壊(GVB)を伴う卵母細胞の割合において有意( $p<0.05$ 、対照群との比較)な増加を示した最低濃度は、r-hLH が 50ng/mL、r-hFSH が 100ng/mL であった。

その他、広く文献検索を行ったが、精巣のセルトリ細胞と卵巣の顆粒膜細胞の受容体への FSH の結合に差異があるとの報告は見出せず、いくつかの論文 (Oxford Review of Reproductive Biology 14:141-168,1992、Nature Genetics 15:201-204,1997、Journal of Endocrinology 158:127-136,1998) では、両結合様式を区別する必要はないとされている。FSH の FSH 受容体への結合には種特異性又は性差はなく、下流のシグナル伝達においても種差は認められていないと報告している総説 (Endocrine Reviews 18: 739-773,1994) も含め、r-hFSH は u-hFSH 製剤と同様な作用を持つ FSH であると推察されたとしている。