2.4 非臨床試験の概括評価

目次

2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 9
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 9
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 分析法 10
2.4.3.2 吸収 10
2.4.3.3 分布 12
2.4.3.4 代謝 12
2.4.3.5 排泄 12
2.4.4 薬物動態学的薬物相互作用 13
2.4.4.1 その他の薬物動態試験 13
2.4.5 毒性試験 13
2.4.5.1 単回投与毒性試験 13
2.4.5.2 反復投与毒性試験 14
2.4.5.2.1 ラット14日間反復投与用量設定試験［2.6.6.3.1］ 14
2.4.5.2.2 ラット4週間反復投与毒性試験［2.6.6.3.2］ 14
2.4.5.2.3 カニクイザルMTD試験［2.6.6.3.3］ 15
2.4.5.2.4 カニクイザル4週間反復投与毒性試験［2.6.6.3.4］ 16
2.4.5.3 遺伝毒性試験 16
2.4.5.4 がん原性試験 16
2.4.5.5 生殖発生毒性試験 17
2.4.5.5.1 ラット受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与用量設定試験［2.6.6.6.1］ 17
2.4.5.5.2 ラット雌受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与毒性試験［2.6.6.6.2］ 17
2.4.5.5.3 胚・胎児発生に関する試験 17
2.4.5.5.4 出生前及び出生後の発育並びに母体の機能に関する試験 18
2.4.5.5.5 幼若動物を用いた試験 18
2.4.5.6 局所刺激性試験 18
2.4.5.6.1 ウサギ亜急性及び亜慢性局所刺激性試験［2.6.6.7.1］ 18
2.4.5.7 新添加物硫酸ナトリウムの毒性 18
2.4.5.7.1 硫酸ナトリウムの単回投与毒性試験 20
2.4.5.7.2 硫酸ナトリウムの反復投与毒性試験 20
2.4.5.7.3 硫酸ナトリウムの遺伝毒性試験 20
2.4.5.7.4 硫酸ナトリウムのがん原性試験 21
2.4.5.7.5 硫酸ナトリウムの生殖発生毒性試験 21
2.4.5.7.6 硫酸ナトリウムの局所刺激性試験 21
2.4.5.7.7 硫酸ナトリウムのその他の毒性試験 21
2.4.6 考察及び結論 21

2.4.7　参考文献 27

表の目次

表 2.4- 1　サイエンティフィック・アドバイス会議の概略 5
表 2.4- 2　安全性薬理試験の概要：試験内容、主要成績、及び治療係数 9
表 2.4- 3　雌ラット単回静脈内投与後の PK パラメータ 11
表 2.4- 4　ラット 14 日間反復皮下投与用量設定試験のトキシコキネティクス 11
表 2.4- 5　カニクイザル皮下投与 MTD 試験の固定用量投与相（290 µg/kg/day、7 日間反復投与）のトキシコキネティクス 11
表 2.4- 6　カニクイザル 4 週間反復皮下投与毒性試験のトキシコキネティクス 12
表 2.4- 7　硫酸ナトリウムの毒性試験プログラム 18

略語一覧

略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	Anti-drug antibody	抗薬物抗体
ART	Assisted reproduction technologies	生殖補助医療
ASGP	Asialoglycoprotein	アシアロ糖タンパク質
AUC	Area under the curve	血清濃度時間曲線下面積
3ß-HSD	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	3β-水酸化ステロイド脱水素酵素
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン一リン酸
C_{max}	Maximum serum concentration	最高血清中濃度
[redacted]	[redacted]	[redacted]
CHL	Chinese hamster lung	チャイニーズ・ハムスター肺
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FSH	Follicle-stimulating hormone	卵胞刺激ホルモン
GC	Granulosa cells	顆粒膜細胞
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
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児由来腎臓
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子

略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ICSI	Intra cytoplasmatic sperm injection	卵細胞質内精子注入法
IVF	*In vitro* fertilisation	体外受精
LD_{50}	50% lethal dose	半数致死量
LOAEL	low-observed adverse effect level	最小毒性量
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No observed effect level	無影響量
PD	Pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
rFSH	Recombinant human follicle-stimulating hormone	遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
T_{max}	Time to maximum observed serum concentration	最高血清中濃度到達時間
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
V	Volume of distribution	分布容積

2.4.1　非臨床試験計画概略

FE 999049 は、ヒト由来の細胞株（ヒト胚性網膜芽細胞）で発現させた遺伝子組換えヒト卵胞刺激ホルモン（rFSH）である。FE 999049 はフェリング･ファーマ株式会社により *in vitro* 体外受精（IVF）又は卵細胞質内精子注入法（ICSI）などの生殖補助医療（ART）を受ける女性を対象とした「生殖補助医療における調節卵巣刺激」を効能・効果として開発されている。予定投与経路は皮下である。本申請における非臨床試験は FE 999049 の臨床開発及び製造販売承認をサポートすることを目的に計画した。本剤の投与量は刺激期間を通じて、1 日最大 12 µg 内で個別に設定される。海外では、2 回目以降の治療の最高用量は 24 µg/day まで増加可能である。本剤は注射液中 12、36、又は 72 µg を含有するカートリッジで供給され、注射液の濃度は全て 33.3 µg/mL である。

FE 999049 の非臨床試験の実施にあたり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下、機構）と医薬品[redacted]相談（[redacted]、平成[redacted]年[redacted]月[redacted]日実施）で、[redacted]の必要性について相談した。その結果、機構より「原則として、[redacted]があるが、[redacted]することは困難である旨の相談者の説明を踏まえると、現時点では、本薬の承認申請に当たり、[redacted]ことは受け入れ可能と考える。」との助言を得た。その後の毒性試験及び臨床試験の成績からも、[redacted]非臨床試験が必要となる安全性上の懸念はなかったことから、本申請では反復投与試験には 4 週間反復投与毒性試験の成績のみを含めた。

また、非臨床試験の戦略及びプログラムに関して、デンマーク、オランダ、及びイギリスの 3 当局、並びに欧州医薬品庁（EMA）とのサイエンティフィック・アドバイス会議を開催した（表 2.4- 1）。

表 2.4- 1　サイエンティフィック・アドバイス会議の概略

国又は地域	会議の種類	会議又は書面受領日
デンマーク／デンマーク海事局	Scientific advice meeting, national	2010 年 5 月 11 日
オランダ／医学評価委員会	Scientific advice meeting, national	2010 年 5 月 12 日
イギリス／医薬品・医療製品規制庁	Scientific advice meeting, national	2010 年 3 月 25 日
欧州／欧州医薬品庁	Scientific advice, central	2013 年 2 月 21 日

上記の全ての当局は、臨床開発及び製造承認のために 4 週間を超える反復投与毒性試験の実施は不要であることに合意した。非臨床試験の戦略及びプログラムも、臨床開発及び製造販売承認の要件を満たしていると考えられることから、各国の規制当局により 2010 年に合意された。EMA は FE 999049 の *in vitro* での薬物動態（PK）／薬力学（PD）に関してゴナールエフとの比較説明を求めた。この質問は、臨床試験での FE 999049 とゴナールエフの間で観察された体内動態の差異が引き金となっている(1)。そこで、FE 999049 とゴナールエフを用いた新たな薬理試験を実施した。複数の当局は、医薬品製造販売承認申請には FE 999049 の薬理作用に関する適切な文献が必要であるとした。以上のことから、非臨床プログラムは、ICH S6 (R1)に準じてグローバル開発及びグローバル製造販売承認をサポートしてはいるが、一部実施していない試験項目もある。以下、薬理試験、薬物動態試験、及び毒性試験の実施試験項目を説明する。

卵胞刺激ホルモン（FSH）の薬理作用は一般によく知られており、かつ、文献でも報告されていることから、効力を裏付ける試験については少数の試験のみを実施した。これらの試験では同族受容体への FE 999049 の親和性、FE 999049 のヒト受容体活性化能、及びヒト顆粒膜細胞（GC）上の FSH 受容体の機能的活性化について検討した。

FSH 受容体は性腺及び子宮に限局しているので FE 999049 の副次的薬理作用は予想されない。したがって、副次的薬理試験は実施しなかった。

安全性薬理試験として、ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（hERG）試験、ラットでの Irwin 試験、ラットでの呼吸試験、及びカニクイザルでの心血管試験を実施した。FSH は ART で数十年間使用され、十分報告されているので薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

PK は、主に毒性試験内でトキシコキネティクス（TK）として評価した。追加試験として、ラットでの静脈内 PK 試験を実施した。FSH の PK はよく知られ、文献でも報告されていることから(2)、低分子の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は、rFSH には必要ないと判断した。そのため、組織分布、代謝、排泄、及びタンパク結合試験は実施しなかった。

前述のように、ホリトロピン　アルファ〔ゴナールエフ、Merck Serono（現メルクバイオファーマ株式会社）〕と FE 999049 では、消失に違いがあることが臨床試験で観察された(1)。そこで、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で発現した組換え FSH であるゴナールエフとヒト由来細胞（ヒト胚性網膜芽細胞）で発現した FE 999049 の体内動態の違いを明らかにするため、二つの比較試験をその他の薬物動態試験として実施した。

マウス及びラット単回投与毒性試験は、静脈内及び皮下投与により実施した。ヒトと同じくサルでも月経周期が見られることから、非げっ歯類の反復投与毒性評価動物種としてカニクイザルを選択した。ラット及びカニクイザル 4 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復試験、並びに受胎能及び初期胚発生に関する雌ラットの試験を含むその他の毒性試験は、予定臨床投与経路である皮下投与で実施した。これら本試験に先駆け、ラットの投与用量設定試験、カニクイザル最大耐量（MTD）試験、及びラット受胎能及び初期胚発生に関する用量設定試験を実施した。投与局所の刺激性に対する至適処方を選択するために、ウサギ局所刺激性試験を実施した。また、中和抗体産生を調べるため、ラットの追加試験を実施した。FE 999049 は女性を対象とした効能・効果のみで開発している。しかし、雌での所見の解釈を助け、今後の男性での効能・効果の開発を支援できるように *in vivo* 安全性薬理試験では雄も含めた。

臨床試験を実施する上で上記以外の毒性試験は必要ないと考えた。FE 999049 のヒト FSH としての特徴及び効能・効果を考慮し、毒性プログラムには 4 週間を超える反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、胚胎児発生試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験、並びに新生児を用いた毒性試験は含めなかった。その理由として、強力な抗体／中和抗体産生が 4 週間反復投与試験での曝露に影響を及ぼしていることから、4 週間を超える反復投与毒性試験の実施は不適切と考えた。FE 999049 と対応するヒトの内因性ホルモンのアミノ酸配列は同一であることから、遺伝毒性及びがん原性試験は不要と判断した。さらに、妊婦には禁忌及び授乳婦への投与は治療上の有益性及び母乳栄養の有益性を考慮し、授乳の継続又は中止を検討することになっているため、胚胎児発生試

験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験、並びに新生児への投与及び／又は更なる評価は不要と考えられた。

FE 999049 は 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5；0.005 mg/mL ポリソルベート 20、0.5 mg/mL L-メチオニン、及び 8.3 mg/mL 塩化ナトリウム含有）中に約 5000 IU/mL を含有する静脈内又は皮下投与用の凍結溶液として、ウサギ局所刺激性試験以外の毒性及び安全性薬理試験に用いた。非臨床試験及び初期の臨床試験実施の際、被験物質の力価は IU/mL で表記し、動物試験の投与量には、単回投与試験では IU/kg、反復投与試験では IU/kg/day を用いた。その後、力価と投与量の記載は重量換算とし、タンパク質含量を µg で表示した。後期の臨床試験では、力価は µg/mL、投与量は µg/patient/day を用いた。このような背景から、概要表［2.6.3.1 薬理試験：一覧表］［2.6.7.1 毒性試験：一覧表］では投与量として両方の単位を併記した。一方、それ以外の 2.4 及び 2.6 項では力価と投与量は重量でのみ記載した。IU から µg への変換の際に用いた換算係数は、バッチ情報［添付資料 3.2.P.5.4］［添付資料 3.2.S.4.4］に記載された比活性に基づいてバッチごとに算出した。例えば毒性試験に用いたバッチの一つである Batch No. 1178-160 の比活性は 13785 IU/mg であった。したがって、このバッチの 1 IU は 1/13785 = 0.0725 µg に相当するため、これを換算係数として用いた。

安全性薬理試験及び毒性試験の本試験に用いたバッチは、臨床試験に用いたものと同様に現行の測定法に基づいて分析した。その結果、これらのバッチは同等であり、原薬及び製剤としての規格をサポートすると考えられた。

毒性試験で使用された被験物質中の賦形剤（クエン酸ナトリウム、ポリソルベート 20、L-メチオニン、及び塩化ナトリウム）は適用された臨床濃度では無毒性と考えられた。ただし、非臨床試験に用いた被験物質の賦形剤は、臨床試験用製剤及び市販予定製剤とは組成が異なる。

FE 999049 の全ての重要な毒性試験は、現行の GLP 基準に従って実施した。

FE 999049 の最終製剤には賦形剤として、フェノール 5 mg/mL、ポリソルベート 20 0.005 mg/mL、L-メチオニン 1.0 mg/mL、硫酸ナトリウム十水和物 14 mg/mL、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 1 mM、及び注射用水が含まれる。また、pH 調整剤としてリン酸及び／又は水酸化ナトリウムを用いた。硫酸ナトリウムは日本では経口剤の医薬品の添加物として使用実績があるものの（無水和物として一日最大 51.2 mg）(3)、レコベル皮下注ペン製剤の投与経路である皮下注を含む注射剤の添加物としての実績はない。今回、レコベル皮下注ペン製剤の投与経路である皮下投与における硫酸ナトリウムの安全性評価を行い、FE 999049 の製造販売承認申請と同時に医薬品新添加物の審査資料も併せて提出する［1.13.4.1.2］。硫酸ナトリウムの安全性評価は、文献あるいは公的機関からの報告などの毒性情報に基づき行った。ただし、皮下投与による毒性試験情報は限られていることから、静脈内投与試験情報及び必要に応じて経口投与を含む他の投与経路の毒性試験の情報も参照した。硫酸ナトリウムの毒性試験の詳細は 2.4.5.7 項に示す。その他の賦形剤はよく知られ、広く使用されており、今回の適用濃度での使用は安全と考えられている。

2.4.2　薬理試験

FE 999049 の薬効成分は rFSH である。FSH の薬理作用はよく知られており、かつ文献でも報告されているため、効力を裏付ける試験については少数の試験のみを実施した［2.6.3.2］。FE 999049 の副次的薬理試験は実施しなかった。

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

FE 999049 の同族受容体への特異的親和性をラジオレセプターアッセイで検討した。この試験に用いた膜受容体はヒト FSH 受容体が安定して発現しているヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞から調製した。この膜受容体に対する親和性をゴナールエフと同じ条件で比較した。両薬の K_i 値はほぼ一致し、FE 999049 の K_i 値と K_D 値は同等であった。親和性の値は生理的受容体リガンドの範囲内であった［2.6.2.2.1］。

FE 999049 のヒト受容体活性化能をヒト FSH 受容体を発現している遺伝子導入細胞（HEK293 細胞）を用い、環状アデノシン一リン酸（cAMP）産生を測定することによりホリトロピン　アルファ〔ゴナールエフ、Merck Serono（現メルクバイオファーマ株式会社）〕と比較検討した。HEK293 細胞の cAMP 反応は用量依存的であった。平行線検定を用いた比較において、FE 999049 とゴナールエフの比活性に差はなかった［2.6.2.2.2］。

FE 999049 及びゴナールエフのヒト GC の FSH 受容体の機能的活性化について IVF/ICSI 患者由来の細胞を用いて検討した。24 時間培養中のプロゲステロン、エストラジオール、インヒビン A、及びインヒビン B のホルモン分泌、並びに 3β-水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ（3β-HSD）、チトクローム P450 19A1、及びインヒビン A の遺伝子転写量を比較検討した。プロゲステロン及びインヒビン A 分泌は有意な FSH 濃度依存性を示し、3β-HSD 及びインヒビン A の遺伝子発現も濃度依存的であった。しかし、測定したいずれの項目でも FE 999049 とゴナールエフの間に統計学的有意差は認められなかった［2.6.2.2.3］。

FSH の薬理作用に関しては、成書(2)に概説されており、文献(4)では更に詳細が報告されている。ゴナドトロピンのオリゴ糖鎖に見られる不均一性のヒトでの生理学的役割については文献(5) (6) (7) (8)に記載されている。また、FSH 単一アイソフォームの受容体調節性の特異的作用が記載され、アイソフォーム組成の主にステロイドを介した微調整について考察されている。同時に各種哺乳類の FSH の糖鎖構造はお互い異なり、一定したパターンを取らないことから(9) (10)、単一の動物種に基づく限り一般的な結論は得られないと考えられる。ヒト FSH の糖鎖付加の違いが排泄に影響を及ぼすことは明らかであるが、受容体活性化に与える特異的な影響については明確にされていない。受容体結合、黄体化 GC の活性化、及び HEK293 細胞のヒト受容体の活性化について FE 999049 とゴナールエフを比較した結果では、両者間に差は認められなかった。ELONVA®のように強く修飾された化合物でもそのような差は報告されていない(11)。

糖鎖付加が異なるゴナドトロピンの存在の詳細は少数のグループから報告されている(12) (13)。異なった各糖鎖付加体が生理的条件下で選択的な生物学的作用を示すかどうか、及び生殖での特異的標的器官（例えば、卵管、子宮内膜）で調節作用を示すかどうかはまだ推測の域を出ていない。現在、関連性があるのは全体としての FSH イソホルモンプールであると考えられているが、全体の生物反応に対する各糖鎖付加体の特異的作用については検討する余地があると考えられている。

毒性試験で FE 999049 の予想された主薬理作用が見られた。ラットでは、卵胞の発育と成長、卵巣腫大、卵巣重量増加、雌でのインヒビン B 濃度増加、黄体数の著明な増加、雌でのエストラジオール濃度増加、及びそれらの続発所見が見られた。カニクイザルでは、卵胞の発育、卵巣腫大、精巣及び卵巣重量の増加、雌雄でのインヒビン B 濃度の増加、並びに雌でのエストラジオール濃度の増加及びそれらの続発所見が見られた。

2.4.2.2　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。FSH の特異的受容体は性腺に限局しているため、FE 999049 の薬理学的用量での副次的薬理作用は文献で報告されていなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験として、hERG 試験［2.6.2.4.1］、ラットでの Irwin 試験［2.6.2.4.2］、覚醒ラットでの呼吸試験［2.6.2.4.3］、及びテレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒カニクイザルでの心血管試験［2.6.2.4.4］を実施した（表 2.4- 2）。FE 999049 はこれら 4 試験で何ら作用を示さなかった。無影響量（NOEL）は全ての試験で最高用量／最高濃度であり、*in vivo* 試験では 52.2 µg/kg、hERG 試験では 0.313 µg/mL（名目濃度は 2.61 µg/mL）であり、*in vivo* 試験での治療係数は 48～74、hERG 試験での治療係数は 391 であった。FE 999049 の安全性薬理プロファイルは予定される用法・用量で問題ないと考えられる。

表 2.4- 2　安全性薬理試験の概要：試験内容、主要成績、及び治療係数

受託試験施設 資料番号	試験項目	試験系	無影響量	平均曝露量*	治療係数 の項目	最小治療 係数**
[redacted] ［4.2.1.3-1］	hERG 試験	HEK293 細胞	0.313 µg/mL	313 ng/mL	C_{max}	391
[redacted] ［4.2.1.3-2］	Irwin 試験	ラット	52.2 µg/kg	1013 ng·h/mL	AUC_{0-24}	48
[redacted] ［4.2.1.3-3］	呼吸試験	ラット	52.2 µg/kg	1013 ng·h/mL	AUC_{0-24}	48
[redacted] ［4.2.1.3-4］	心血管試験	カニクイザル	52.2 µg/kg	59 ng/mL	C_{max}	74

*：雌雄の平均値、**：治療用量を個体ごとで調節した最大 1 日用量 12 µg に関連した平均曝露量（AUC=20.9 ng·h/mL; C_{max}=0.8 ng/mL）を治療係数の計算に用いた。これが結果的に最小治療係数となる。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

以上、効力を裏付ける試験と安全性薬理試験の結果から FSH としての薬理学的プロファイルが確認された。

2.4.3　薬物動態試験

FSH の PK はよく知られ、文献でも報告されていることから(2)、分布・代謝・排泄に関する追加試験は実施しなかった。皮下投与後の曝露データや PK パラメータは、ラット及びカニクイザルの毒性試験の TK データから得られ、また、ラット静脈内投与後の PK パラメータはラット PK 試験から収集した。

2.4.3.1　分析法

非臨床 GLP 試験をサポートするために、4 つの生物分析法をバリデートした［2.6.4.2 分析法］。

- ラット血清中 rFSH 測定のためのイムノアッセイ
- ラット血清中抗 rFSH 抗体測定のためのイムノアッセイ
- カニクイザル血清中 rFSH 測定のためのイムノアッセイ
- カニクイザル血清中抗 rFSH 抗体測定のためのイムノアッセイ

2.4.3.2　吸収

PK 試験として、ラット単回静脈内投与試験を実施した（表 2.4- 3、［2.6.4.3.1］）。TK 試験として、ラット 14 日間反復皮下投与用量設定試験、カニクイザルでの MTD 試験及び 4 週間反復皮下投与毒性試験を実施した（表 2.4- 4、表 2.4- 5、表 2.4- 6）。FE 999049 はヒトの糖タンパク質で、動物では免疫応答を惹起すると考えられるため、これら反復投与試験では抗薬物抗体（ADA）や中和抗体産生の有無も調べた。

ラット及びカニクイザルで、FE 999049 は少なくとも投与後 24 時間まで検出され、これは動物が試験期間を通して FE 999049 に継続的に曝露されていることを示している。その結果は消失半減期（$t_{1/2}$）に反映されており、ラットでは静脈内投与で 9.4 時間、皮下投与で 6.3～9.7 時間、カニクイザルでは皮下投与で雄 14.8～29.2 時間、雌 21.4～47.6 時間であった。ラットでは、2 週間反復投与後の蓄積はないか、あってもわずかであった。一方、カニクイザルでは FE 999049 の著しい蓄積が見られる個体があった。このことは、カニクイザルではラットに比べて $t_{1/2}$ が 2～8 倍長いことと一致している。

用量比以上の割合で曝露が増える傾向が見られた。この傾向は、カニクイザルよりラットで顕著で、主に高用量群で見られた。性差に一定の傾向は見られなかった。ラット及びカニクイザルでの FE 999049 の TK は、報告されている他の遺伝子組換えヒト FSH の結果と同等であった［2.6.4 表 2.6.4-1］(14) (15)。

ラットでの ADA は、適用した分析法では検出されなかった。これは、使われた分析法の感度がラットで種特異的に低いことに起因していた。FE 999049 の ADA 測定系への干渉を避けるために 4 週間の休薬期間終了時に採取した試料を細胞を用いた *in vitro* 法で追加分析したところ、中和抗体が中間用量及び高用量の雌（7.31 及び 52.2 µg/kg/day）と高用量の雄（52.2 µg/kg/day）で産生されていた。ADA は、カニクイザルの雄で 0.522 µg/kg/day から、雌で 5.22 µg/kg/day から検出された。ADA／中和抗体の存在は、曝露の減少や TK パラメータの個体間差の増加に関連していると考えられた。

表 2.4- 3　　雌ラット単回静脈内投与後の PK パラメータ

	平均	標準偏差
V_c (mL/kg)	40	3
V_{ss} (mL/kg)	82	9
$t_{1/2}$ (h)	9.4	0.3
CL (mL/h/kg)	11.3	0.6

N（動物数）= 3; V= 分布容積; Vc =セントラル V; Vss= 定常状態での V; $t_{1/2}$ = 消失半減期; CL= 全クリアランス

表 2.4- 4　　ラット 14 日間反復皮下投与用量設定試験のトキシコキネティクス

試験/種/投与経路及び資料番号	用量 (µg/kg)	性	Day 1			Day 14		
			C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ （時間）	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ （時間）
2 週間／ラット／皮下 ［4.2.3.2-1］	1.45	雄	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		雌	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	14.5	雄	46.3	456	9.7	7.8	120	NC
		雌	9.3	145	NC	9.3	131	NC
	145	雄	165.3	2494	7.4	222.6	2581	6.3
		雌	175.5	2494	7.1	169.7	1747	NC

N = 2/time point, NC=Not calculable.

表 2.4- 5　　カニクイザル皮下投与 MTD 試験の固定用量投与相（290 µg/kg/day、7 日間反復投与）のトキシコキネティクス

採血時点	性	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} （時間）	$t_{1/2}$ （時間）	RA_{AUC}	RA_{Cmax}
Day 1	雄	18053	NC	1030	8.0	NC	NA	NA
	雌	16675	NC	899	8.0	NC	NA	NA
Day 7	雄	27405	NA	1617	4.0	21.6	1.52	1.57
	雌	31030	NA	1573	4.0	21.4	1.86	1.75

N = 1/sex, NA = Not applicable. NC = Not calculable. t= 24 hours. RA=accumulation ratio,
RA_{AUC}=AUC_{0-24} Day 7/AUC_{0-24} Day 1, RA_{Cmax}=C_{max} Day 7/C_{max} Day 1

表 2.4- 6　　カニクイザル 4 週間反復皮下投与毒性試験のトキシコキネティクス

試験/種/投与経路及び資料番号	用量 (μg/kg)	性	Day 1			Day 28		
			C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ （時間）	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ （時間）
4 週間／カニクイザル／皮下［4.2.3.2-4］	0.522	雄	1.36	24.2	NC	2.95	65.3	NC
		雌	1.04	15.0	NC	2.91	53.8	26.3
	5.22	雄	18.0	295	14.8	21.5	434	29.2
		雌	12.2	218	47.6	30.6	564	40.0
	52.2	雄	144	2631	NC	344	6835	17.9
		雌	173	2751	22.6	480	8613	23.3

NC = Not calculable

2.4.3.3　　分布

FSH の分布に関する試験は実施しなかった。FSH の分布は文献に報告されている(11)。

2.4.3.4　　代謝

FSH の代謝に関する試験は実施しなかった。FSH の代謝は文献に報告されている(4)。

2.4.3.5　　排泄

排泄経路は検討しなかったが、文献では内因性及び外因性 FSH は腎臓と胆管経路により排泄されることが報告されている。ゴナドトロピンは、アシアロ糖タンパク質（ASGP）受容体などにより捕捉された後、肝臓で代謝されるか又は未変化体や α-及び β-サブユニットとして腎臓から排泄されることによって血流から消失する(4)。

ASGP 受容体及びマンノース受容体は、ゴナドトロピンの代謝クリアランスと $t_{1/2}$ を決める決定要因として重要な役割を果たしている。これら受容体発現の増減は、プロゲステロンの血漿レベルと相関しており、それによって雌の生殖系を機能的に制御している(16)。

ゴナドトロピンの糖鎖の末端へのシアル酸付加により、肝臓による速やかな分子捕捉が妨げられる(16)。最初に血清酵素によって糖鎖の脱グリコシル化されて、肝臓から消失されやすくなると考えられる。さらに、ノイラミン酸が多く高電荷を持つ分子は、全身循環に長く留まるため、限外濾過により腎臓から排泄されやすいと推察される。van Schanke らは、CHO 由来ゴナドトロピンが広範囲にグリコシル化されると半減期が長くなると考えている(11)。ただし、血清ノイラミニダーゼレベルの調節によるゴナドトロピン消失が制御されるかは確認できていない(17)。

ゴナドトロピンのイソホルモンが持っている構造的多様性は、個々のアイソフォームの生物活性と半減期に影響を与える(18) (25)。グリコシル化の構造、酵素の存在、及び肝臓受容体の数を調節している上記の全ての要因に基づいて、排泄の全ての過程は、糖鎖構造の異化代謝と肝臓の受容体数のバラン

スによって経時的に変化する可能性がある。一方、腎臓における限外濾過能はほぼ一定していることが示唆された。

以上、ゴナドトロピンの糖鎖修飾は、分子の消失速度を主に調節している(19)。ゴナドトロピンの別の器官・組織への分布は、主に性腺に限られる。

2.4.4　薬物動態学的薬物相互作用

FSH の PK はよく知られており、文献にも報告されているため(11)、薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.4.4.1　その他の薬物動態試験

臨床試験の結果(1)、FE 999049 の消失はゴナールエフの消失と異なっていた。ハムスター由来の CHO 細胞は、HEK293 細胞やヒト胚性網膜芽細胞［添付資料 3.2.S.3.1］のようなヒト由来細胞とは異なり、糖鎖に α2,6 結合でシアル酸を付加できない(4)。マウス及びラットでは、他の哺乳類とは異なり、α2,6 結合糖鎖を非常に速く消失させる。この消失での種差は、α2,6 結合した糖鎖が ASGP 受容体に対して特異的親和性を有するために起こると考えられる(21)。つまり、CHO 細胞由来のゴナールエフとヒト細胞由来の FE 999049 は糖鎖構造が異なり、ラット *in vivo* アッセイ系の Steelman-Pohley 法(20)では CHO 細胞由来の rFSH を標品としているために、IU 表記の見かけ上の生物活性が低くなると考えられた。そこで、この消失の違いの理由を確認するため、二つの追加試験を実施した。これらの試験では、Steelman-Pohley 法で算出した IU 表示で同一の用量の FE 999049 とゴナールエフの PK を比較した。

ASGP 受容体ノックアウトマウスと野生型マウスの比較実験で、野生型マウスでは、ゴナールエフと FE 999049 を同じ用量（IU）投与したときの血清中濃度は一致した。しかし、ノックアウトマウスでは、FE 999049 がより高い曝露を示した［2.6.4.8.2］。

さらに、雄ラットに大量のアシアロフェチン（ASF）を FE 999049 と同時に静脈内投与し、ASGP 受容体に対して競合させると、ASF の投与によって FE 999049 の曝露は増加した。しかし、ゴナールエフでは、曝露に差は見られなかった［2.6.4.8.1］。

これらの結果は、rFSH のげっ歯類での代謝的消失が、rFSH の由来細胞によって異なることを示している。ヒト PK で観察された FE 999049 とゴナールエフの違いにも同じ理由が当てはまると考えられる。

2.4.5　毒性試験

2.4.5.1　単回投与毒性試験

FE 999049 の単回投与毒性試験はマウス及びラットを用い、両種ともに静脈内及び皮下投与により実施した［2.6.6.2］。全ての試験の動物にはヒト臨床予想最大用量（0.2 µg/kg、体重 60 kg で FE 999049 を 12 µg 投与した場合）の 1450 倍に相当する 290 µg/kg を投与した。FE 999049 投与に起因する変化は見られず、概略の致死量は全試験で 290 µg/kg より大であった。単回投与試験では曝露データは得られなかった。

2.4.5.2　反復投与毒性試験

FE 999049 の反復投与毒性試験はラット及びカニクイザル 4 週間試験で評価した。本試験の投与量を設定するため、ラットでは 14 日間投与量設定試験及びカニクイザルでは MTD 試験を行った。全試験とも皮下投与で行った。試験の範囲、各試験の識別、及び主な結果を［2.6.6.3］に示す。曝露に対する干渉のため、全ての反復投与試験での FE 999049 に対する抗体及び中和抗体の産生が重要な問題になると予想された。したがって、全ての試験で試料を採取して、抗体検査を実施した。

ヒトでの投与期間は約 20 日間で、4 週間以上の毒性試験では中和抗体が産生され曝露の確保ができなくなると考えられたことから、4 週間以上の反復投与毒性試験は実施しなかった。

2.4.5.2.1　ラット 14 日間反復投与用量設定試験［2.6.6.3.1］

ラット 14 日間反復投与用量設定試験では，各群雌雄各 5 例に 0、1.45、14.5、及び 145 µg/kg/day を 2 週間皮下投与し、投与期間終了時に屠殺・剖検した。投与開始時及び投与終了時に血中薬物濃度測定、TK 評価、及び抗体産生検査用に雌雄のサテライト群を設定した。

TK では、低用量群の曝露量は測定できなかったが、14.5 µg/kg/day の最高血清中濃度（C_{max}）は 7.8～46.3 ng/mL、145 µg/kg/day の C_{max} は 165.3～222.6 ng/mL の範囲であった。血清濃度時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24}$）は 14.5 µg/kg/day で 120.4～456.0 ng·h/mL、145 µg/kg/day で 1747.3～2581.0 ng·h/mL の範囲であった。最高血清中濃度到達時間（T_{max}）は 4～12 時間であった。

死亡及び毒性所見は見られなかった。雌では 1.45 µg/kg/day 以上で卵巣重量の増加が見られた。卵巣重量の増加は卵巣の腫大、病理組織学的には卵胞嚢胞及び黄体の突出と対応しており、定量下限未満ではあるが FE 999049 の曝露が示された。その他、病理組織学的には 14.5 µg/kg/day 以上で膣及び子宮頸部で上皮の粘液分泌、高用量で子宮内膜増殖／褶曲が見られ、乳腺組織では雄で乳腺雌性化、雌で腺房増殖が見られた。インヒビン B は 14.5 µg/kg/day 以上の雌で増加した。全ての予想に反して、抗体産生分析法では雌雄共に ADA は見られなかった。これは分析法の感度不足によるものであった。有害作用やオフターゲット作用は見られず、全ての所見は FE 999049 の FSH としての薬理又は過剰な薬理作用によると考えられた。以上の結果より、無毒性量（NOAEL）は高用量の 145 µg/kg/day と考えられた。この用量では C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ の治療係数がそれぞれ 245 及び 104 であった［2.6.6 表 2.6.6- 2］。

2.4.5.2.2　ラット 4 週間反復投与毒性試験［2.6.6.3.2］

ラット 4 週間反復投与毒性試験では、各群雌雄各 10 例のラットに 0、1.04、7.31、及び 52.2 µg/kg/day を 28 日間皮下投与し、屠殺・剖検した。対照群と高用量群には回復性を調べるため雌雄各 5 例を追加した。これらの動物は本試験と同様に投与したが、屠殺・剖検までに 4 週間の休薬期間を設けた。血中薬物濃度測定及び TK 評価のためサテライト群を設定した。

初回投与後 24 時間のトラフ値での曝露データは 7.31 µg/kg/day で 1.38（雄）～1.77（雌）ng/mL、52.2 µg/kg/day では 15.5（雄）～10.1（雌）ng/mL の範囲であった。対照群及び 1.04 µg/kg/day では曝露は見られなかった。二つの高用量では 4 週間にわたって曝露がおおむね増加した。

予想に反して、用いた ADA 分析法では抗体は検出されなかった。これは検出に用いた分析法の動物種特異的な感度不足によるものであった。FE 999049 の干渉を避けるために 4 週間の休薬期間終了時に採

取した試料を細胞を用いた *in vitro* 法により追加分析した結果、雌の中及び高用量（それぞれ 7.31 及び 52.2 µg/kg/day）、雄の高用量（52.2 µg/kg/day）で中和抗体の産生が見られた。

投与に起因する死亡はなく、一般状態観察、眼科的検査、及び尿検査では影響は見られなかった。体重増加量及び摂餌量の増加が高用量（52.2 µg/kg/day）で見られた。赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）及び活性化部分トロンボプラスチン時間の減少が高用量群の雌で見られた。血液生化学的検査ではグルコース濃度の増加が 1.04 µg/kg/day 以上の雄で、アルカリホスファターゼの低下が高用量群の雌で、アラニンアミノトランスフェラーゼのわずかな増加が 1.04 µg/kg/day 以上の雌で見られた。これら血液学的検査及び血液生化学的検査での変動は、用量依存性が見られず、毒性学的意義に乏しい又は偶発的な変化と考えられた。下垂体及び副腎重量の増加は高用量群の雌で見られた。性腺重量の増加が高用量群の雄及び 1.04 µg/kg/day 以上の雌で見られた。雌の性腺重量の増加は 1.04 µg/kg/day 以上の肉眼的な卵巣の腫大と嚢胞の存在と一致しており、定量下限未満ではあるが FE 999049 の曝露が示された。エストラジオールの測定結果は不明確であった。インヒビン B 濃度は雄では影響を受けなかったが、FE 999049 を投与された雌では対照群の約 15 倍に増加した。以下の病理組織学的所見が雌で見られた。すなわち、卵巣での卵胞嚢胞、黄体の突出、及び卵胞出血、膣及び子宮頸部での粘液分泌、子宮の上皮肥大、並びに乳腺の腺房増殖の増加が見られた。雄では病理組織学的な変化はなかった。体重増加、摂餌量、赤血球数、血清インヒビン B レベル、並びに子宮、子宮頸部、及び膣の病理組織学的な変化には回復性が見られた。卵巣重量及び卵巣の病理組織学的な所見には部分的な回復傾向が見られた。ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血漿グルコース、及び肉眼的な卵巣の大型化が見られた雌の頻度については回復性が見られなかった。これらパラメータの性質上、長期の休薬期間を設けることで全ての変化に回復性があると考えられた。内分泌系及び生殖臓器の反応は被験物質の薬理学的な FSH 作用に起因すると考えられた。オフターゲットの毒性反応は見られなかった。以上の結果より、NOAEL は高用量の 52.2 µg/kg/day と考えられた。NOAEL での治療係数（C_{max} に対する平均トラフ値）は 48 であった。

2.4.5.2.3　　カニクイザル MTD 試験［2.6.6.3.3］

カニクイザル MTD 試験で、用量漸増相では雌雄各 1 例に FE 999049 の 36.3、72.5、145、及び 290 µg/kg をそれぞれ 1、5、9、及び 15 日目に単回皮下投与した。動物は血中薬物消失期間中に採血するため、最終投与の 10 日後に剖検した。固定用量相では別の雌雄各 1 例に 290 µg/kg/day を 7 日間反復皮下投与し、最終投与翌日に屠殺・剖検した。

用量漸増相の 36.3 µg/kg 投与での C_{max} は 131～136 ng/mL であり、投与量の増加に伴い曝露は徐々に増加し、290 µg/kg 投与後では 724～1849 ng/mL であった。36.3 µg/kg 投与の AUC_{0-24} は 2211～2342 ng·h/mL であり、290 µg/kg 投与では 12615～23925 ng·h/mL に増加した。固定用量相の 290 µg/kg/day 投与では、投与 1 日目の C_{max} は 899～1030 ng/mL であり、投与 7 日目には 1573～1617 ng/mL に増加した。同様に、投与 1 日目の AUC_{0-24} は 16675～18053 ng·h/mL であり、投与 7 日目には 27405～31030 ng·h/mL に増加し、ある程度の蓄積性が見られた。T_{max} は 4～8 時間であった。

投与による死亡、一般状態、及び体重への影響はなく、FE 999049 投与による毒性反応は全く見られなかった。FE 999049 の薬理作用は卵巣重量の増加、雌でのエストラジオール及びプロゲステロン濃度の増加、雌雄でのインヒビン B 濃度の増加として見られた。これらの作用は肉眼的な卵巣の両側性腫大と、病理組織学的に軽度／中等度の卵胞内出血を伴う胞状卵胞の中等度～重度の嚢胞性拡張を伴うことを特徴とした。漸増投与 1 及び 14 日目（145 µg/kg 投与の 5 日後）には見られなかったが、漸増投与

相終了時（25 日目に採取）には雌雄共に抗体が見られた。以上の結果より、MTD は求められなかったが、NOAEL は高用量の 290 µg/kg/day と考えられた。290 µg/kg での治療係数は 1000 を超えるものであった［2.6.6 表 2.6.6- 2］。

2.4.5.2.4　　カニクイザル 4 週間反復投与毒性試験［2.6.6.3.4］

カニクイザル 4 週間反復投与毒性試験では、各群雌雄各 3 例のカニクイザルに FE 999049 の 0（媒体対照）、0.522、5.22、及び 52.2 µg/kg/day を皮下投与した。28 日間の投与期間終了時に動物を屠殺・剖検した。対照群と高用量群には雌雄各 1 例を追加し、回復性を評価するために 4 週間休薬し，その後に屠殺・剖検した。

平均 C_{max}（投与 1 日目／28 日目）は、低用量から順に、雄で 1.36/2.95、18.0/21.5、及び 144/344 ng/mL、雌で 1.04/2.91、12.2/30.6、及び 173/480 ng/mL に増加した。ちなみに、臨床予想最大投与量（体重 60 kg で 0.2 µg/kg）に近い 0.195 µg/kg を投与された健康成人女性の C_{max} は 0.418 ng/mL であった［2.6.7.3］。平均 AUC_{0-24}（投与 1 日目／28 日目）は、低用量から順に、雄で 24.2/65.3、295/434、及び 2631/6838 ng·h/mL、雌では 15.0/53.8、218/564、及び 2751/8613 ng·h/mL であった。T_{max} の中央値は 2～8 時間であった。28 日間投与後にはほとんど全ての動物で高いレベルの抗体が見られた。ADA 産生は用量の増加に伴い増加し、雌と比較して雄で高かったが、FE 999049 の全身曝露には明らかな性差はなかった。反復投与による動物の個体間の曝露の大きなばらつきと 5 例の動物の継続的な全身曝露の低下は中和抗体産生を示唆している。

死亡率、一般状態、体重推移、心血管系パラメータ、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、及び尿検査では投与に起因する所見は見られなかった。精巣及び卵巣重量は全ての群で顕著に増加し、特に卵巣では 5.22 µg/kg/day 群で約 9 倍まで増加した。この変化には剖検で卵管及び卵巣の大型化、並びに卵巣嚢胞を伴っていた。病理組織学的には全群の雌で卵管腔の拡張と卵胞の嚢胞性拡張が見られ、卵胞内出血を伴うこともあった。子宮／子宮頸部で間質の硝子化及び嚢胞形成が見られた。下垂体の好酸性細胞の肥大／過形成が雌で見られた。雄のインヒビン B は事前値から 2～4 倍に増加し、雌ではエストラジオールとインヒビン B が全ての投与群で事前値から数倍に増加した。子宮内膜間質の硝子化と子宮内の嚢胞形成を除き、全ての変化は休薬により完全に回復した。局所刺激性以外の全ての所見は FE 999049 の FSH としての直接又は間接的な薬理作用に起因すると考えられた。以上の結果より、NOAEL は高用量の 52.2 µg/kg/day と考えられた。初回投与時の C_{max} 及び AUC_{0-24} に基づく治療係数はそれぞれ 515 及び 370 であった［2.6.6 表 2.6.6- 2］。

2.4.5.3　　遺伝毒性試験

FE 999049 は、内因性のタンパクホルモンと同一の一次構造を有するため、遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.4.5.4　　がん原性試験

FE 999049 は、内因性のタンパクと同一の一次構造を有するため、がん原性試験は実施しなかった。

2.4.5.5　生殖発生毒性試験

2.4.5.5.1　ラット受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与用量設定試験［2.6.6.6.1］

ラット受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与用量設定試験では、各群雌雄各 6 例のラットに 0（媒体対照）、0.363、3.63、及び 36.3 µg/kg/day を皮下注射した。雄には交配前 14 日間、交配期間中、及び交配終了から屠殺・剖検までの少なくとも 14 日間投与した。雌には交配前 14 日間、交配期間中及び妊娠 6 日目まで投与した。FE 999049 測定用の血液試料はサテライト群の雌から交配前期間の 14 日目の 24 時間後及び妊娠 6 日の 24 時間後に採取した。雌は妊娠 13 日に屠殺・剖検して子宮内容物を検査した。

血中薬物濃度には大きなばらつきがあり、高用量群の雌の 4 例中 3 例で 2 回、また、中及び低用量群でそれぞれ雌 1 例に 1 回、曝露が確認された。高用量群の雌では交配前 14 日に比べて約 50%の濃度増加が妊娠 6 日に見られ、蓄積性が示された。今回の測定方法では低濃度は検出できなかったが、薬理学的反応は全ての群で認められた。なお、対照動物で曝露はなかった。

FE 999049 は本試験の 36.3 µg/kg/day 群の 6 例中 2 例の雌に持続的な発情休止期を誘発し、性周期に影響を与えた。その結果、性周期数は減少した。妊娠した雌は 6 例中 3 例のみであった。1 例あたりの黄体数は用量に依存して増加した。36.3 µg/kg/day 群の平均着床数は増加した。群平均着床前死亡は 3.63 及び 36.3 µg/kg/day 群で増加し、1 腹あたりの生存胚数は 36.3 µg/kg/day 群で増加した。36.3 µg/kg/day 群の雄では精子濃度はやや低下し、頭部屈曲度が減った精子数は増加した。これらの雄の精巣の絶対及び相対重量の群平均値は増加した。これらの全ての変化は FE 999049 の薬理又は過剰な薬理作用に起因すると考えられた。次の受胎能の本試験の高用量群は、投与用量設定試験の 3.63 µg/kg/day と力価表示で同等の 50 IU/kg に相当する 2.61 µg/kg/day が推奨量と考えられた。0.363 µg/kg/day 群には有害作用は見られなかった。ADA はいずれのラットにも検出されなかった。

2.4.5.5.2　ラット雌受胎能及び初期胚発生に関する皮下投与毒性試験［2.6.6.6.2］

ラット雌受胎能及び初期胚発生に関する試験で、各群雌雄各 20 例のラットを用い、雌のみに 0（媒体対照）、0.261、0.835、及び 2.61 µg/kg/day を皮下投与した。雄には投与しなかった。交配の 14 日前から投与を開始し、交配期間中及び妊娠 6 日まで投与した。妊娠 13 日に雌を屠殺・剖検し、子宮内容物を検査した。

中間用量（0.835 µg/kg/day）以上の群で交尾までの平均日数は増加し、平均交尾栓数は減少した。2.61 µg/kg/day 群で平均性周期数が減少した。全例の雌が交尾したが、0、0.261、0.835、及び 2.61 µg/kg/day 群で妊娠したのはそれぞれ 18、17、13、及び 14 例で、0.835 µg/kg/day 以上の群で受胎率が低下した。0.835 及び 2.61 µg/kg/day 群の平均黄体数は対照群の約 2 倍であり、被験物質の薬理作用が示された。高用量群の着床前死亡率は対照群の約 2 倍（対照群の 25%に対して約 50%）であった。流産／全胚吸収、平均着床数、平均生存胎児数、平均吸収胚数、死亡胎児数、及び平均着床後死亡率には有害作用は見られなかった。以上の結果より、NOAEL は 0.261 µg/kg/day と考えられた。

2.4.5.5.3　胚・胎児発生に関する試験

FE 999049 は、妊婦には禁忌及び授乳婦への投与は治療上の有益性及び母乳栄養の有益性を考慮し、授乳の継続又は中止を検討することになっているため、胚胎児発生に関する試験は実施しなかった。

2.4.5.5.4　出生前及び出生後の発育並びに母体の機能に関する試験

FE 999049 は、妊婦及び授乳婦に対し禁忌のため、出生前及び出生後の発育並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

2.4.5.5.5　幼若動物を用いた試験

FE 999049 は、当該年齢層に適応されないため、幼若動物を用いた試験は実施しなかった。

2.4.5.6　局所刺激性試験

2.4.5.6.1　ウサギ亜急性及び亜慢性局所刺激性試験［2.6.6.7.1］

全ての安全性試験の結果、FE 999049 の予定臨床投与で局所刺激が示唆されるような肉眼的及び病理組織学的変化が投与部位に観察されなかったことから、被験物質の局所刺激性は低いと判断された。これを確認するために、FE 999049 の 5 種の異なる処方（最終処方を含む）を各群 6 例の雌ウサギの背部右側（陰性対照として生理食塩液を背部左側）の剃毛皮膚に皮下注射して局所刺激性試験を行った。投与液量は 0.75 mL/site、FE 999049 の投与濃度は 37 µg/mL とした。投与 2 及び 5 日後に、各群 3 例を屠殺・剖検し、投与部位を肉眼的及び病理組織学的に観察した。

FE 999049 の 5 種の異なる処方を雌ウサギに単回皮下投与しても、生理食塩液投与対照群と比較して投与 2 及び 5 日後には一般状態、局所反応、並びに肉眼的及び病理組織学的所見には明らかな違いは見られなかった。

2.4.5.7　新添加物硫酸ナトリウムの毒性

硫酸ナトリウムの医薬品新添加物の審査資料に使用した毒性試験を表 2.4- 7 に示す。

表 2.4- 7　硫酸ナトリウムの毒性試験プログラム

試験の種類	試験系	投与経路	投与期間	GLP
単回投与毒性	マウス	経口（強制）	単回	不適
	マウス	静脈内	単回	不適
	雌ラット	経口（強制）	単回	適
	ラット	腹腔内	単回	不適
反復投与毒性	ラット	経口（強制）	雄：4 週間 雌：約 7 週間	適
	雄ラット	経口（混餌）	4 週間	不適
	雄ラット	経口（混餌）	27 及び 41 週間	不適
	ウサギ	経皮	91 日間のうち 65 回	不適

試験の種類	試験系	投与経路	投与期間	GLP
遺伝毒性				
復帰突然変異	ネズミチフス菌	*in vitro*	該当なし	適
遺伝子突然異変	マウスリンパ腫 L5178Y 細胞	*in vitro*	該当なし	適
染色体異常	CHL 線維芽 V79 細胞	*in vitro*	該当なし	適
骨髄小核	雌マウス	腹腔内	2 日間	不適
がん原性	マウス	皮下	週 1 回、26 週間	不適
	雄ラット	経口（混餌）	27 及び 41 週間	不適
生殖発生毒性				
受胎能及び初期胚発生	ラット	経口（強制）	雄：4 週間 雌：約 7 週間	適
胚・胎児発生	マウス	皮下	単回（妊娠 8 又は 9 日目）	不適
胚・胎児発生	マウス	経口（強制）	妊娠 8～12 日目	不適
出生前発生	ラット	経口（強制）	妊娠 6～12 日あるいは 6～15 日目	不適
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	マウス	経口（飲水）	妊娠 7～21 日目及び授乳 0～14 日目	不適
局所刺激性	ウサギ	経皮	単回（4 時間）	適
	ウサギ	点眼	単回	適
	雌ウサギ	皮下	単回	適
その他の毒性試験				
標識体の体内動態	ラット	経口（強制）	単回	不適
内因性血中濃度	ヒト	該当なし	該当なし	不適

レコベル皮下注ペン製剤中の硫酸ナトリウムは十水和物（Na_2SO_4 $10H_2O$、分子量 322.19）であるが、本製剤は溶液の注射剤で、またほとんどの試験は無水和物（Na_2SO_4、分子量 142.04）として表記されていることから、この申請資料でも特に断りのない場合は試験成績は無水和物の投与量、濃度として表記した。また、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）準拠で実施された試験は GLP 試験として表示したが、不明な場合は表示していない。

文献あるいは公表資料の情報は限られており、特に検査値などの数値はほとんど情報がない。そのため、Module 2.6.7 毒性試験概要表は作成せず、必要な情報は Module 2.6.6 毒性試験概要文に記載した。

皮下注製剤中の添加物として硫酸ナトリウムの毒性を評価するために、経口投与の毒性試験の成績も使用した。経口投与毒性試験の成績を皮下注製剤の毒性評価に用いる場合はトキシコキネティクス（TK）の情報が重要であるが、この申請資料で用いたラット反復経口投与試験では硫酸ナトリウムの TK の情報が得られていない。これは、硫酸ナトリウムは内因性の物質であり、投与された非標識体の硫酸ナトリウムとの分離測定を簡易的に行うことは難しいことが理由の一つと考えられた。一方、体内動態を検討した標識体を用いたラット薬物動態試験では、経口投与された硫酸ナトリウムの大部分は急速に循環血液中に取り込まれた。これより、硫酸ナトリウムの経口投与試験の毒性結果は、皮下注製剤の毒性評価に適応可能であると考えられた。

2.4.5.7.1　　硫酸ナトリウムの単回投与毒性試験

単回投与毒性試験はマウスの経口及び静脈内投与並びにラットの強制経口投与及び腹腔内投与で検討した。その結果、マウスの経口投与の半数致死量（LD_{50}）値は 5989 mg/kg、静脈内投与の概略の致死量は 50 mg/kg より大、ラットの経口投与の LD_{50} 値は 2000 mg/kg より大、腹腔内投与の LD_{50} 値が 3000～4100 mg/kg であった。死亡動物の症状の詳細は報告されていないが、ラット経口投与試験で観察された鎮静、円背位、及び軽度粗毛はいずれも翌日までに回復し、剖検では変化は認められていない。以上のことから、単回投与時の LD_{50} 値はいずれの投与経路でも 2000 mg/kg より大きく、この用量では重度の毒性は報告されていない。

2.4.5.7.2　　硫酸ナトリウムの反復投与毒性試験

反復投与毒性試験はラットの強制経口及び混餌投与並びにウサギ経皮投与で検討した。その結果、ラット強制経口投与試験（雄 4 週間、雌約 7 週間投与）で、投薬に関連した毒性は認められず、NOEL は最大投与量の 1000 mg/kg/day であった。また、ラット 4 週間混餌投与試験でも軽度の下痢以外には投薬に関連した毒性は認められず、NOAEL は 2000 mg/kg/day であった。ラット 27 あるいは 41 週間混餌投与試験でも投薬に関連した毒性は認められず、NOAEL は 320 mg/kg/day であった。これらから、ラットへの経口投与では軽度の下痢以外に毒性は認められず、反復投与毒性は弱いことが示された。ウサギ経皮 91 日間投与試験では、2 mL/kg/day で亜急性皮膚炎の軽度増強が認められ、硫酸ナトリウム溶液は軽度の局所刺激性を有していたが、全身性の毒性は認められなかった。

2.4.5.7.3　　硫酸ナトリウムの遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は、*in vitro* 試験として細菌復帰突然変異試験、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞遺伝子突然変異試験、及びチャイニーズ・ハムスター肺（CHL）線維芽 V79 細胞染色体異常試験、*in vivo* 試験と

してマウス腹腔内投与骨髄小核試験を実施した。いずれの試験も陰性で、硫酸ナトリウムは遺伝毒性の懸念はないと判断された。

2.4.5.7.4　　硫酸ナトリウムのがん原性試験

がん原性試験は、マウス 26 週間皮下投与がん原性試験と雄ラット 27 あるいは 41 週間反復混餌投与がん原性試験を実施した。いずれの試験でも硫酸ナトリウム投与群の腫瘍発生は背景値の範囲内で、硫酸ナトリウムに発がん性作用はないと判断された。

2.4.5.7.5　　硫酸ナトリウムの生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は、ラット経口投与受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、マウス皮下投与胚・胎児発生に関する試験、マウス経口投与胚・胎児発生に関する試験、ラット経口投与出生前発生に関する試験、及びマウス飲水投与出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験で評価した。いずれの試験でも親動物、胚・胎児、及び出生児に投薬の影響は認められず、NOEL あるいは NOAEL は各試験の最高用量であった。これらより、硫酸ナトリウムは生殖発生に対する毒性はないと判断された。

2.4.5.7.6　　硫酸ナトリウムの局所刺激性試験

局所刺激性試験は、ウサギの急性皮膚刺激性試験及び眼刺激性試験で評価した。皮膚刺激性は陰性であったが、眼には軽度の刺激性が観察された。ウサギ反復経皮投与試験では軽度の皮膚炎が見られた。しかし、硫酸ナトリウム十水和物 14 mg/mL を添加剤として含むレコベル皮下注ペン製剤を皮下投与しても皮膚に刺激性は認められなかった。

2.4.5.7.7　　硫酸ナトリウムのその他の毒性試験

その他の毒性試験として、ラット経口投与時の薬物動態試験を行った。硫酸ナトリウムをラットに経口投与すると投与 2 時間後までに血漿中硫酸ナトリウム濃度は最大値に達し、24 時間までに投与された放射活性の 90%近くが尿中に排泄された。硫酸ナトリウムを経口投与しても皮下投与と同様に大部分の薬物は急速に循環血液中に取り込まれた。

また、レコベル皮下注ペン製剤として投与される硫酸ナトリウムと、内因性硫酸ナトリウムの量的関係を検討する目的で、ヒトでの内因性血清中硫酸ナトリウム濃度を検討した。健康成人の平均濃度は硫酸ナトリウム十水和物換算で 132.1 μg/mL であった。

2.4.6　　考察及び結論

FE 999049 は、ヒト由来の細胞株（ヒト胚性網膜芽細胞）で発現させた rFSH である。FSH の薬理作用は一般によく知られており、かつ文献でも報告されていることから、効力を裏付ける試験は少数の試験のみを実施した。副次的薬理試験は実施しなかった。

FE 999049 の同族受容体への親和性を評価したところ、K_D 値は 0.4 nM と推定された。ゴナールエフと同時に評価した競合的結合実験で、K_i 値は、FE 999049 で 0.0966 nM、ゴナールエフで 0.101 nM であった。ヒト FSH 受容体を安定して発現する HEK293 細胞を用いた細胞アッセイ法では、両ゴナドトロピンの力価を平行線定量法による cAMP 産生に基づき推測した。その結果、両ゴナドトロピンの間に力価の差は認められなかった。さらに、両ゴナドトロピンに対する黄体化 GC の反応性を比較した。プ

ロゲステロン及びインヒビン A の分泌若しくは 3ß-HSD 及びインヒビン A に関連した mRNA 産生のいずれも、両ゴナドトロピンの様々な用量で有意な差は認められなかった。以上より、両ゴナドトロピンをタンパク質量が同一になる用量で比較した場合の薬理学的有効性に差は認められなかった。

細胞を用いた *in vitro* アッセイでは、タンパク質量が同じであれば標的となるレセプターに同じ刺激を与えることが示された。細胞を用いた *in vitro* アッセイは起源が異なる薬物の全身クリアランスの違いによる PK の違いを検出できない。したがって、初期臨床試験で観察された違いは、以下で述べるようにクリアランスによる違いと考えるのが妥当と思われる。

ラットでの静脈内あるいは皮下投与時の PK を検討した結果、$t_{1/2}$ はそれぞれ 9.4 時間あるいは 6.3～9.7 時間であり、静脈内投与後のクリアランスは 11.3 mL/h/kg であった。カニクイザルの $t_{1/2}$ は雄 14.8～29.2 時間、雌 21.4～47.6 時間であった。ラットでは 14 日間反復投与まで、蓄積がないか、あってもわずかであったのに対し、カニクイザルでは FE 999049 の明らかな蓄積が見られた。これは、カニクイザルでの $t_{1/2}$ がラットに比べて 2～8 倍になっていることと一致する。

低分子の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は、内因性の組換え FSH には不要と判断し、分布、代謝、排泄、及び血漿タンパク結合に関する試験は実施しなかった。現在の薬理や動態に関する理解は、上の各項で議論されており、現在の FE 999049 の薬理に関する理解を変えるような知見は得られていない。

健康成人女性を用いた第 I 相反復投与試験［CS02 試験：添付資料 5.3.4.1］で、ラット *in vivo* バイオアッセイ結果(20)に基づいた同一力価の FE 999049 とゴナールエフを投与した時、クリアランスに違いが見られた。血清 FSH の AUC や C_{max} は、ゴナールエフ投与に比べて FE 999049 投与で有意に高かった。この結果は、それぞれの薬物を女性被験者に単回皮下及び静脈内投与した絶対バイオアベイラビリティ試験でも確認された［000020 試験：添付資料 5.3.1.2］。

これらの臨床試験の結果を解明するため、二つの薬物動態試験を実施した。まず、ASGP 受容体ノックアウトマウスと野生型マウスの比較試験で、同一用量を投与された二つの化合物の血清中濃度推移は、野生型マウスでは一致したが、ノックアウトマウスでは FE 999049 がゴナールエフよりも高い曝露を示した［2.6.4.8.2］。さらに、ASGP 受容体に対して大量の ASF を投与すると競合することを利用し、雄 SD ラットに ASF を FE 999049 と同時に静脈内投与した。FE 999049 の静脈内投与後の曝露は ASF の併用投与により増加したが、ゴナールエフでは変化は認められなかった［2.6.4.8.1］。

これらの結果は、FE 999049 とゴナールエフの糖鎖構造の違いは、ヒト FSH 受容体との結合には影響しないが、肝臓の ASGP 受容体によるクリアランスには影響することを示している。この受容体の結合特性は哺乳類間で種差が大きく(22)、ラット肝臓の ASGP 受容体の Siaα2,6 GalNAc に対する結合が、ヒト受容体に比べて非常に高いことが示されている(23) (24)。組換えタンパク質の糖鎖構造プロファイルは発現した細胞や培養条件に依存し、FE 999049 は α2,3 と α2,6 結合したシアル酸を持っているが、CHO 細胞由来組換え FSH であるゴナールエフは α2,3 結合したシアル酸しか持たない［添付資料 3.2.S.3.1］。このため、ラットの *in vivo* アッセイ系で求めた力価（IU）を基準に算出した IU 換算の投与量で、ヒトの PK を FE 999049 とゴナールエフを比較したとき、FE 999049 のヒトでの真の曝露を低く評価していることになる。その結果、IU で表された力価とゴナドトロピンの臨床効果の標準相互相

関性は、FE 999049 には適応できない。このゴナドトロピンとの薬物動態の違いを踏まえて、FE 999049 の臨床試験を実施した。

安全性薬理試験の結果、FE 999049 は、hERG テール電流、カニクイザルの心血管系、並びにラットの中枢神経系及び呼吸系に影響を及ぼさないことが示された。これらの結果より、ヒトでも QTc に影響を及ぼさないと推測された。NOEL は、*in vivo* 試験では高用量の 52.2 µg/kg であり、*in vitro* での hERG 試験における無影響濃度は、薬物濃度を測定した結果、0.313 µg/mL（名目濃度は 2.61 µg/mL）であった。

結論として、*in vitro* での受容体結合試験、機能アッセイ、及び文献に基づく主要な薬理学的プロファイルから、非臨床データは FE 999049 の予定される効能・効果での使用を適切にサポートしている。また、安全性薬理試験の結果、FE 999049 による二次的な好ましくない作用の可能性は示されていない。

ラット及びカニクイザルの両動物種で、少なくとも投与 24 時間後まで FE 999049 の曝露が見られており、試験に使用した動物が FE 999049 に継続的に曝露されていたことが示されている。ラットでの $t_{1/2}$ は静脈内投与で 9.4 時間、皮下投与で 6.3～9.7 時間であったが、カニクイザルの $t_{1/2}$ は皮下投与で雄 14.8～29.2 時間、雌 21.4～47.6 時間であった。14 日間反復投与してもラットでの蓄積性は見られないかわずかであった。一方、カニクイザルでは、著しい蓄積性が認める個体があった。このことは、カニクイザルの半減期がラットに比べて 2～8 倍長いことと一致している。ラットでは、カニクイザルより曝露レベルが用量比以上に増加する傾向が見られ、その傾向は高用量で顕著であった。性差に一定の傾向は見られなかった。全体として、ラット及びカニクイザルでの FE 999049 の TK は、他の遺伝子組換え及び精製ヒト FSH で報告されている値と同等であった［2.6.4 表 2.6.4- 1］(14) (15)。

ラット及びカニクイザルのいずれでも、投与 1 日目の PK パラメータの個体間変動はおおむね小さかったが、2 週目以降では増加した。このパターンは ADA の存在を示すものであった。カニクイザルで抗体が観察されたのとは対照的に、ラットのサンプルでは検出されなかった。この結果は、ラットの ADA 検出アッセイに用いたプロテイン G の種特異的な低親和性に起因していると考えられた。そこで、FE 999049 の干渉を避けるために、4 週間の休薬期間終了時に採取した細胞を用いた *in vitro* 法により追加分析した結果、7.31 µg/kg/day 投与以上の雌ラット及び 52.2 µg/kg/day 投与の雄ラットで中和抗体の産生が示された。さらに、ラットの中和抗体産生を調べた別試験でも、用量に関係なくほとんど全ての動物（18 例中 15 例）で 2～4 週間の間に中和抗体が産生され、投与 6 及び 8 週後でも依然として抗体が存在していることが示された。中和抗体は、長期試験で全ての投与薬物を中和することが可能な量が産生されると考えられた。

単回投与毒性試験では、290 µg/kg を最高用量としてマウス及びラットに単回静脈内又は皮下投与しても投薬に関連した毒性が見られなかったため、FE 999049 は急性毒性作用を持たないことが示された。概略の致死量は、いずれの動物種・投与経路でも 290 µg/kg より大であり、臨床予定最大投与量 12 µg/patient（0.2 µg/kg、体重 60 kg で FE 999049 を 12 µg 投与した場合）の 1450 倍相当であったことから、予期し得ぬ臨床過量投与に伴うリスクは最小限であることが示された［2.6.6 表 2.6.6- 2］。反復投与毒性試験は、予定臨床投与経路である皮下投与で、ラット及びカニクイザルを用いて 4 週間の投与期間で実施した。これらの試験に先行してラット投与用量設定試験及びカニクイザル MTD 試験を実施した。これらの試験で認められた毒性所見は、雌雄に対する FSH としての FE 999049 の薬理学的作

用と関連するものであった。FE 999049 に曝露された雌は、卵胞の病理組織学レベルでの発達を伴う卵巣重量増加と腫大を示した。また、エストラジオール濃度が増加し、結果としてエストラジオール感受性組織（子宮、子宮頸部、乳腺組織など）が刺激された。ラットの雌及びカニクイザルの雌雄でインヒビン B 濃度が数倍増加したのは、視床下部−下垂体−性腺軸との負のフィードバックを示している。ラットで見られた下垂体重量の増加などは、これらホルモン変化の二次反応と考えられた。すなわち、下垂体好酸性細胞の肥大／過形成がインヒビン B 及び／又はエストラジオールのフィードバック作用に起因して発現したと考えられた(21)。雌ラットの赤血球系パラメータの低下は、エストラジオールレベルの上昇の結果と考えられた。全ての試験で、死亡やオフターゲットな毒性を示す所見は見られなかった。全ての反復投与試験の治療係数は AUC ベースで 104〜1398 であった［2.6.6 表 2.6.6-2］。

ICH S6 (R1)に準じ、FE 999049 が内因性タンパクとアミノ酸配列が同一であることから、遺伝毒性及びがん原性試験は実施しなかった。

FE 999049 の生殖発生毒性試験はラットの受胎能及び初期胚発生試験の用量設定試験及び本試験で構成されている。FE 999049 の 2.61 µg/kg/day 以上を投与した場合、受胎能及び初期胚発生への変化（着床前死亡の増加）が見られた。これらの所見は過量ホルモン投与による過剰な薬理作用に起因しており、女性への治療量とは関連性がない反応と考えられた。

妊婦や授乳婦への FE 999049 投与は禁忌のため、胚胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

上述の安全性試験の結果から、被験物質の局所刺激性は低いと判断した。FE 999049 の予定臨床投与スケジュールでの局所刺激を示唆するような肉眼的及び病理組織学的変化は、投与部位で観察されなかった。また、FE 999049 の 5 種の異なる処方を雌ウサギに単回皮下注射した場合でも、生理食塩液投与群と比較して投与 2 及び 5 日後に一般状態、局所反応、並びに肉眼的及び病理組織学的な変化は見られなかった。FE 999049 処方の局所刺激性に関する良好な結果は第Ⅲ相試験［000273：添付資料 2.5.5.4］でも確認された。

予定臨床最大投与量の 261 倍以上に相当する 52.2 µg/kg/day を最高用量として実施した 4 週間試験で毒性所見は見られなかった。このことから、FE 999049 が、遺伝子組換え技術により得られ、既に承認されている FSH 製剤と類似反応を示すと考えられた。長期投与試験は、抗体産生により抗体自体の潜在的に制御不能な効果及び曝露の影響から適切な試験実施が妨げられる可能性が非常に高いと考えられる。ラットの中和抗体産生試験結果より抗体反応は非常に強く、FE 999049 投与の 6〜8 週後にラットの大部分で全投与量が中和されると考えられた。結論として、ヒト女性での治療スケジュールは最大 20 日投与であり、4 週間試験はこの治療スケジュールを適切にサポートすると考えられた。

非臨床及び臨床開発中に使用した原薬及び製剤バッチの分析方法及びその結果は［添付資料 3.2.S.4.4］及び［添付資料 3.2.P.5.4］項に記載した。重要な安全性薬理及び毒性試験に用いた毒性バッチである 1178-160 及び 2192-122 は、FE 999049 の代表バッチとして分析が行われ、非臨床及び臨床試験に用いたバッチの同等性が確認された。全ての不純物は、FE 999049 の酸化型、高分子量型、及び低分子量型［添付資料 3.2.S.4.1］［添付資料 3.2.P.5.1］といった既知の誘導体であり、原薬及び製剤の推奨規格としての妥当性を裏付ける良好な安全性プロファイルを有していた。

今回、製造販売承認申請を行うレコベル皮下注ペン製剤には添加物として硫酸ナトリウム十水和物が含まれている。製剤に含まれる硫酸ナトリウム以外の添加物は安全性の懸念はないと考えられる。硫酸ナトリウムの毒性評価を以下に示す。

硫酸ナトリウムは、日本では経口剤の医薬品の添加物として使用実績がある（無水和物として一日最大 51.2 mg）（医薬品添加物事典）。しかし、レコベル皮下注ペン製剤の投与経路である皮下注や静注などの注射剤の添加物としての実績はない。硫酸ナトリウムは無機化合物で、化粧品(26)や家庭用洗浄剤(27)の添加剤と使われており、また食品添加剤(28)としても使用されている。さらに、米国では医薬品の添加物として、硫酸ナトリウム無水和物が眼科用薬として 1.2%まで、吸入剤として 0.03%まで、経口剤として 96 mg、及び静注剤として 1.14%までの使用が認められている(29)。

皮下注製剤中の添加物として硫酸ナトリウムの毒性を評価するために、この申請では経口投与の毒性試験の成績も使用した。経口投与毒性試験の成績を皮下注製剤の毒性評価に用いる場合は、トキシコキネティクスの情報が重要であるが、この申請で用いたラット反復経口投与試験ではトキシコキネティクスの情報が得られていない。これは、硫酸ナトリウムは内因性の物質であり、投与された非標識体の硫酸ナトリウムとの分離測定を簡易的に行うことは難しいことが理由の一つと考えられた。経口投与後の吸収性を検討するために、標識体の体内動態をラットで検討した。その結果、硫酸ナトリウムを経口投与しても皮下投与と同様に大部分の薬物は急速に循環血液中に取り込まれた。これより、硫酸ナトリウムの経口投与試験が皮下注製剤の毒性評価に適応可能であると考えられた。

レコベル皮下注ペン製剤として投与される硫酸ナトリウムと、内因性硫酸ナトリウムの血清中の量的関係を検討する目的で、ヒトでの内因性血清中硫酸ナトリウム濃度を検討した。健康成人の平均血清濃度は硫酸ナトリウム十水和物換算で 132.1 μg/mL であった。レコベル皮下注ペン製剤の一日最大使用量 12 μg 中の硫酸ナトリウムは 11.4 mg であり、体重 60 kg のヒトの循環血液量 60/13＝4.6 L 中の濃度は 2.48 μg/mL（＝11400 μg/4600 mL）であった。これは内因性硫酸ナトリウム十水和物の約 1/50 であり、レコベル皮下注ペン製剤中の硫酸ナトリウムがヒトの生体内反応に対する影響はほとんどないと推測された。

経口投与を含めた硫酸ナトリウムの毒性試験の成績から、反復経口投与したラットの軽度の下痢、並びに経皮投与及び点眼投与のウサギでの局所刺激性が見られた。しかし、重篤な全身性の毒性は認められなかった。単回投与時の LD_{50} 値はいずれの投与経路でも 2000 mg/kg より大きく、反復投与毒性試験、がん原性試験、及び生殖発生毒性の NOEL あるいは NOAEL はいずれも最大投与量で、遺伝毒性は陰性であった。レコベル皮下注ペン製剤の一日最大使用量 12 μg 中の硫酸ナトリウムは 11.4 mg で体重 60 kg では 0.19 mg/kg である。毒性試験の成績を考慮すると、レコベル皮下注ペン製剤の添加剤である硫酸ナトリウムは十分な安全域を有し、安全性の懸念はないと考えられる。

宿主細胞タンパク質不純物（血液学的及び神経学的発現 1）は、非臨床毒性試験、並びに臨床安全性、有効性、及び免疫原性試験に使用された原薬バッチ中に存在していた。第 I 相臨床試験で使用された臨床バッチの最高濃度は [redacted] ng/μg FSH である。安全性評価の結果、原薬中の宿主細胞タンパク質不純物の含有量として [redacted] %あるいは [redacted] ng/μg FSH には安全性の懸念がないと結論された［添付資料 4.2.3.7.7-2］。製剤の不純物の一つにフェノールとメチオニンの反応に由来する [redacted] がある。[redacted] の最悪のケースでの最大一日摂取量である

[redacted] µg は、安全性評価で全く懸念の無いことが結論づけられている［添付資料 3.2.P.5.5］［添付資料 4.2.3.7.7 -3］。その他の不純物である[redacted]の最高濃度は[redacted] µg/mL であり、その最高用量は[redacted] µg/day である。この用量は、[redacted] µg/mL 溶液の皮下投与により投与される用量であり、安全性の懸念はないと考えられる［添付資料 3.2.S.3.2］。

抽出物試験は、容器施栓系のゴム部分由来の抽出物を調べるために実施した。毒性学的懸念の閾値である 1.5 µg/day を試験結果の評価に用いた。1.5 µg/day に対応する濃度を超える全ての抽出物の毒性評価を実施した。毒性学的懸念の閾値を超える濃度で存在する全ての化合物の本試験で見られたレベルで毒性学的懸念は認められなかった［添付資料 3.2.P.2.4.1］。

FE 999049 製剤の溶出物濃度を調べるために溶解性スクリーニング試験を実施した。保存温度は 5、25、及び 30℃、保存期間は最長 36 ヵ月であった。現時点で、毒性学的懸念の閾値を上回るレベルで同定された抽出物はなく、安全性の懸念のあるものもない［添付資料 3.2.P.2.4.2］［添付資料 4.2.3.7.7-3］。

非臨床プログラムに基づき、予定用法・用量範囲の FE 999049 を女性に皮下投与した際に、予想された薬理又は過剰な薬理作用以外にオフターゲットな有害作用及び局所刺激を引き起こす可能性はないと考えられ、FE 999049 は予定用法・用量範囲で安全に使用可能であると考えられた。

2.4.7　参考文献

(1) Olsson H, Sandström R, Grundemar L. Different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) derived from a human cell line compared with rFSH from a non-human cell line. J Clin Pharmacol. 2014 Nov;54(11):1299-307.

(2) Moyle W, Campbell R. Gonadotropins. In DeGroot L, ed. Endocrinology. 3 ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1995, 230-41.

(3) 日本医薬品添加剤協会. 無水硫酸ナトリウム. 医薬品添加物事典. 東京: 医薬品添加剤協会; 2016. 550-1.

(4) Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. Reprod Biomed Online. 2000;1(2):48-62.

(5) Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Méndez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gondatrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. A matter of fact. Hum Reprod. 2001 Apr;16(4):599-604.

(6) Andersen CY, Ezcurra D. What is the clinical relevance of follicle-stimulating hormone isoforms in fertility treatment? Reprod Biol Insights 2011, 4,1-10.

(7) Bousfield GR, Dias JA. Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. Rev Endocr Metab Disord. 2011 Dec;12(4):289-302.

(8) Santi D, Simoni M. Biosimilar recombinant follicle stimulating hormones in infertility treatment. Expert Opin Biol Ther. 2014 Oct;14(10):1399-409.

(9) Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Oct;91(10):4064-9.

(10) Yding Andersen C, Leonardsen L, Ulloa-Aguirre A, Barrios-De-Tomasi J, Moore L, Byskov AG. FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. Mol Hum Reprod. 1999 Aug;5(8):726-31.

(11) van Schanke A, van de Wetering-Krebbers SF, Bos E, Sloot WN. Absorption, distribution, metabolism and excretion of corifollitropin alfa, a recombinant hormone with a sustained follicle-stimulating activity. Pharmacology. 2010;85(2):77-87.

(12) Wide L, Eriksson K. Dynamic changes in glycosylation and glycan composition of serum FSH and LH during natural ovarian stimulation. Ups J Med Sci. 2013 Aug;118(3):153-64.

(13) Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY, Hiromasa Y, Harvey DJ, May JV. Hypo-glycosylated human follicle-stimulating hormone (hFSH(21/18)) is much more active in vitro than fully-glycosylated hFSH (hFSH^{24}). Mol Cell Endocrinol. 2014 Feb 15;382(2):989-97.

(14) Porchet HC, Le Cotonnec JY, Canali S, Zanolo G. Pharmacokinetics of recombinant human follicle stimulating hormone after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration in monkeys, and

comparison with intravenous administration of urinary follicle stimulating hormone. Drug Metab Dispos. 1993 Jan-Feb;21(1):144-50.

(15) de Leeuw R, Mulders J, Voortman G, Rombout F, Damm J, Kloosterboer L. Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). Mol Hum Reprod. 1996 May;2(5):361-9.

(16) Mi Y, Lin A, Fiete D, Steirer L, Baenziger JU. Modulation of mannose and asialoglycoprotein receptor expression determines glycoprotein hormone half-life at critical points in the reproductive cycle. J Biol Chem. 2014 Apr 25;289(17):12157-67.

(17) Merat A, Arabsolghar R, Zamani J, Roozitalab MH. Serum levels of sialic acid and neuraminidase activity in cardiovascular, diabetic and diabetic retinopathy patients. IJMS 2003 Sep,28(3), 123-6.

(18) Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. Mol Cell Endocrinol. 2001 Mar 28;174(1-2):41-9.

(19) Mullen M, Cooke D, Crow M. Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. In Vizcarra Jorge, ed. Gonadotropin. Intech Open Sci, 2013, 155-80.

(20) Steelman SL, Pohley FM. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. Endocrinology 1953 Dec;53(6):604-16.

(21) Steirer LM, Park EI, Townsend RR, Baenziger JU. The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid alpha2,6-galactose. J Biol Chem. 2009 Feb 6;284(6):3777-83.

(22) Park EI, Baenziger JU. Closely related mammals have distinct asialoglycoprotein receptor carbohydrate specificities. J Biol Chem. 2004 Sep 24;279(39):40954-9.

(23) Park EI, Mi Y, Unverzagt C, Gabius HJ, Baenziger JU. The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 22;102(47):17125-9.

(24) Park EI, Manzella SM, Baenziger JU. Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor. J Biol Chem. 2003 Feb 14;278(7):4597-602.

(25) Poulin P. A single-species approach considering additional physiological information for prediction of hepatic clearance of glycoprotein derivate therapeutics. Clin Pharmacokinet. 2011 Oct;50(10):665-74.

(26) Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG Jr, et al. Final amended safety assessment of sodium sulfate as used in cosmetics: The 2016 Cosmetic Ingredient Review. Washington: 2016 June29 [cited 2019 Nov 18]. Avairable from: https://www.cir-safety.org/sites/default/files/SODSUL062016FR.pdf

(27) Human and Environmental Risk Assessment team. Human and environmental risk assessment on ingredients of household cleaning products. Substance: Sodium sulfate (CAS# 7757-82-6) Edition 1.0: 2006 January [cited 2019 Nov 18]. Avairable from https://www.heraproject.com/files/39-F-06_Sodium_Sulfate_Human_and_Environmental_Risk_Assessment_V2.pdf

(28) World Health Organization. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additive series: 44. Sodium Sulfate: [cited 2019 Nov 27]. Avairable from: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec07.htm

(29) Food and Drug Administration (FDA). Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products: Sodium Sulfate: [updated 2019 October 23; cited 2019 Nov 18]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm?event=BasicSearch.page