

ボックスゾゴ[®]皮下注用 0.4mg
ボックスゾゴ[®]皮下注用 0.56mg
ボックスゾゴ[®]皮下注用 1.2mg

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.6.6	毒性試験の概要文.....	8
2.6.6.1	まとめ.....	8
2.6.6.2	単回投与毒性試験.....	14
2.6.6.2.1	BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける単回皮下/静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験 (試験番号[BMN111-11-015])	14
2.6.6.2.2	BMN 111 のカニクイザルにおける単回皮下/静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験 (試験番号[BMN111-11-006])	16
2.6.6.3	反復投与毒性試験.....	18
2.6.6.3.1	BMN 111 の7日齢ラットを用いたパイロット試験(試験番号[BMN111-11-053])	18
2.6.6.3.2	BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び7日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-029])	20
2.6.6.3.3	BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び28日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-036])	27
2.6.6.3.4	BMN 111 の幼若ラットにおける 26 週間皮下投与毒性試験及び6週間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-052])	32
2.6.6.3.5	BMN111-B3 のテレメトリーシステム装着サルにおける漸増用量設定試験、並びに7日間反復皮下投与血行動態、毒性及びトキシコキネティクス試験 (第I相及び第II相) (試験番号[BMN111-09-067])	40
2.6.6.3.6	BMN 111 のカニクイザルにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び7日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-019])	43
2.6.6.3.7	BMN 111 のカニクイザルにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び28日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-035])	47
2.6.6.3.8	BMN 111 のカニクイザルにおける 44 週間反復皮下投与 (連日) 毒性・トキシコキネティクス試験及び13週間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-043])	51
2.6.6.4	遺伝毒性試験.....	59
2.6.6.5	がん原性試験.....	59
2.6.6.6	生殖発生毒性試験.....	60
2.6.6.6.1	BMN 111 のラットにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験 (試験番号[BMN111-14-061])	60
2.6.6.6.2	BMN 111 のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験 (試験番号[BMN111-14-060])	62
2.6.6.6.3	BMN 111 のラットにおける、出生前及び出生後の発生、並びに、母体の機能に関する皮下投与試験 (試験番号[BMN111-18-103])	65
2.6.6.6.4	BMN 111 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験 (試験番号[BMN111-14-055])	69

2.6.6.6.5	BMN 111 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（試験番号 [BMN111-14-081]）	71
2.6.6.7	局所刺激性試験	73
2.6.6.8	その他の毒性試験	73
2.6.6.9	考察及び結論	73

表目次

表 2.6.6.1-1	NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列のヒト同一性	8
表 2.6.6.1-2	毒性試験一覧	10
表 2.6.6.2.1-1	ラットにおける単回投与毒性及び TK 試験の試験デザイン	14
表 2.6.6.2.2-1	サルにおける単回投与毒性及び TK 試験の試験デザイン	17
表 2.6.6.3.1-1	幼若ラットを用いたパイロット試験の試験デザイン	19
表 2.6.6.3.2-1	ラットの 28 日間反復投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン	21
表 2.6.6.3.2-2	投与期間終了時に認められた組織形態学的変化	24
表 2.6.6.3.2-3	投与期間における BMN 111 関連の病理組織学的変化の発現頻度及び重症度	25
表 2.6.6.3.2-4	回復期間における BMN 111 関連の病理組織学的変化の発現頻度及び重症度	26
表 2.6.6.3.3-1	ラットにおける 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン	28
表 2.6.6.3.3-2	投与期間（26 週間）における投与量／性別ごとの主な BMN 111 関連臨床症状の発現頻度	29
表 2.6.6.3.3-3	全剖検例における投与量／性別ごとの BMN 111 関連肉眼的所見の発現頻度	31
表 2.6.6.3.4-1	幼若ラットにおける 26 週間反復投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン	33
表 2.6.6.3.4-2	骨代謝のバイオマーカー測定用試料のサンプリング計画	35
表 2.6.6.3.5-1	BMN111-B3 のテレメトリーシステム装着サルにおける漸増用量設定試験、並びに 7 日間反復皮下投与血行動態、毒性及びトキシコキネティクス試験（第 I 相）の試験デザイン	41
表 2.6.6.3.5-2	BMN111-B3 のテレメトリーシステム装着サルにおける漸増用量設定試験、並びに 7 日間反復皮下投与血行動態、毒性及びトキシコキネティクス試験（第 II 相）の試験デザイン	42
表 2.6.6.3.6-1	カニクイザルの 28 日間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン	43
表 2.6.6.3.6-2	BMN 111 関連の病理組織学的所見の発現頻度及び重症度－投与期間	45
表 2.6.6.3.6-3	BMN 111 関連の病理組織学的所見の発現頻度及び重症度－回復期間	45

表 2.6.6.3.7-1	幼若サルの 26 週間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン	47
表 2.6.6.3.8-1	カニクイザルの 44 週間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン	52
表 2.6.6.3.8-2	投与期間終了時における BMN 111 関連の肉眼的所見の発現頻度	56
表 2.6.6.3.8-3	投与期間終了時における BMN 111 関連の病理組織学的所見の発現頻度	56
表 2.6.6.6.1-1	ラットの胚・胎児発生毒性試験の試験デザイン	60
表 2.6.6.6.2-1	雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験の試験デザイン	63
表 2.6.6.6.3-1	ラットの出生前及び出生後の発生に関する試験の試験デザイン	66
表 2.6.6.6.3-2	生後発達の観察時期	66
表 2.6.6.6.3-3	各群の離乳前死亡 F ₁ 動物数	68
表 2.6.6.6.4-1	ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン	70
表 2.6.6.6.5-1	ウサギの胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン	72

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ACH	achondroplasia	軟骨無形成症
ADA	Antidrug antibody	抗薬物抗体
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ANP	atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-t}	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration	0 時間から最終測定時点までの濃度-時間曲線下面積
BMC	bone mineral content	骨塩量
BMD	bone mineral density	骨密度
BMN	BioMarin	BioMarin 社
BNP	B-type/brain natriuretic peptide	B 型ナトリウム利尿ペプチド
BQL	below quantifiable limit	定量限界未満
BSAP	bone-specific alkaline phosphatase	骨型アルカリホスファターゼ
CL/F	apparent clearance/bioavailability	見かけのクリアランス
C _{max}	maximum observed concentration	最高濃度
CNP	C-type natriuretic peptide	C 型ナトリウム利尿ペプチド
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影
CTX-I	C-terminal telopeptide of type I collagen	I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CTX-II	C-terminal telopeptide of type II collagen	II 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CV	cardiovascular	心血管系
CV%	coefficient of variation	変動係数
DEXA	dual-energy X-ray absorptiometry	二重エネルギー X 線吸収測定法
ECLA	electrochemiluminescence assay	電気化学発光測定
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1 and 2	細胞外シグナル調節キナーゼ 1 及び 2
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FGFR3	fibroblast growth factor receptor-3	線維芽細胞増殖因子受容体 3
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
GD	gestational day	妊娠日齢
GGT	gamma glutamyl transferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
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
H&E	hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン・エオジン

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
HDO	high definition oscillometry	高解像度オシロメトリー
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IV	intravenous	静脈内
JET	jacketed external telemetry	ジャケット式テレメトリーシステム
KO	knock out	ノックアウト
MAPK	mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
NPR	natriuretic peptide receptor	ナトリウム利尿ペプチド受容体
NPR-A	natriuretic peptide receptor type A	ナトリウム利尿ペプチド受容体 A
NPR-B	natriuretic peptide receptor type B	ナトリウム利尿ペプチド受容体 B
NPR-C	natriuretic peptide receptor type C	ナトリウム利尿ペプチド受容体 C
NTx	cross linked N-telopeptide of type I collagen	I型コラーゲン架橋 N-テロペプチド
NZW	New Zealand White	—
OC	osteocalcin	オステオカルシン
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
P1NP	procollagen type 1 N-terminal propeptide	1型プロコラーゲン N 末端ペプチド
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法
PR	time from the beginning of the P-wave to the beginning of the next QRS complex	P波の始まりから QRS 波までの時間
QRS	deflections of the Q, R and S-waves that represent depolarization of the ventricles	心室の脱分極を示す Q、R 及び S 波の変動
QT	time from the start of the Q-wave and to the end of the T-wave.	Q波の始まりから T波の終わりまでの時間
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数で補正した QT 間隔
SC	subcutaneous	皮下
SD	Sprague Dawley	—
t _{1/2}	elimination phase half-life	半減期
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T _{max}	time to reach maximum observed concentration	最高濃度到達時間

略語・略号	略していない表現 (英語)	略していない表現 (日本語)
TRACP-5b	tartrate-resistant acid phosphatase-5b	酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ-5b
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
w/v	weight/volume	重量/容積

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

本承認申請資料に示す非臨床試験は、BMN 111（別名ボソリチド）を小児の軟骨無形成症（ACH）の治療に使用することを支持するものである。BMN 111 で実施した毒性試験の一覧を表 2.6.6.1-2 に示し、各試験の方法、結果及び結論を詳述する。

正常動物を用いて BMN 111 の非臨床安全性評価を実施した。ラット及びサルは、C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）及びナトリウム利尿ペプチド受容体（NPR）とヒト CNP 及び NPR とのアミノ酸配列相同性が高く、両動物種で薬理的な *in vivo* 活性が確認されたことから、ラット及びサルを非臨床安全性評価に重要なげっ歯類及び非げっ歯類の動物種として選択した。

BMN 111 の C 末端側 37 個のアミノ酸配列は、ヒト CNP-53 の C 末端側 37 個のアミノ酸配列と高度に類似しており、アカゲザル (*Macaca mulatta*) では 1 個のアミノ酸（Q37H）のみ、ラット及びマウスでは 2 個のアミノ酸（A26G 及び Q37H）が異なる。カニクイザル CNP-53 のアミノ酸配列は得られていない。NPR のアミノ酸配列は動物種間で高度に保存されており、ヒト NPR のアミノ酸配列との相同率を表 2.6.6.1-1 に示す。

表 2.6.6.1-1 NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列のヒト同一性

Natriuretic Peptide Receptor	Rat	Monkey
NPR-A	90%	99%
NPR-B	98%	99%
NPR-C	92%	98%

NPR; natriuretic peptide receptor.

また、安全性評価に最も重要な非げっ歯類動物種としてサルを選択した理由として、1) 大後頭孔の位置がヒトとサルで類似すること、2) サルの後肢はヒトと同様に体重の負荷があること、3) サルでは心血管系の反応がより予測可能であることが知られており、イヌでは反応が誇張されること（[Leishman 2011]）、並びに 4) BMN 111 製剤にはイヌに反応を引き起こすことが知られているポリソルベート 80（0.005%）が含まれており、心血管系データの解釈に影響を及ぼす可能性があること（[Marks 1971]、[Masini 1985]）が挙げられる。サルはテリパラチド（フォルテオ®）のような骨形成促進薬の開発にも広く用いられている。さらに、ラット及びウサギを用いて生殖・発生毒性試験を実施した。

全ての試験で投与経路は皮下注射とし、連日投与を実施した。皮下投与時のバイオアベイラビリティを検討するため、ラット及びサルの単回投与毒性及びトキシコキネティクス（TK）試験において、皮下投与に加えて静脈内投与時の曝露量を検討した。BMN 111 の毒性試験では、心血管系機能及び骨組織に対する過度の薬理活性の特徴を明らかにし、潜在的なオフターゲット作用を評価できる投与量を設定した。

BMN 111 を皮下投与した場合の非臨床における毒性学的特徴を、ラット及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験、成熟動物の反復投与毒性試験（ラット 26 週間まで、カニクイザル 44 週間まで）、並びに幼若動物を用いた反復投与毒性試験（ラット及びカニクイザルで 26 週間まで）で検討した。

全ての毒性試験は、米国食品医薬品局（FDA）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）”21 CFR Part 58”、厚生労働省の GLP 基準「厚生省令第 21 号」、及び経済協力開発機構（OECD）の GLP の原則”ENV/MC/CHEM(98)17”を遵守して実施した。ただし、カニクイザルを用いた漸増用量設定試験／7 日間反復投与血行動態、毒性及び TK 試験、並びに 7 日齢ラットを用いた 21 日間パイロット試験を除く。

表 2.6.6.1-2 毒性試験一覧

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Dosing Schedule	Doses (µg/kg)	NOAEL (µg/kg)	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location of Study Report
Single-Dose Toxicity										
Single-dose toxicity in rats	Rat, Crl:CD (SD)	8-9 weeks	Subcutaneous	Single dose, 7 days recovery	SC: 0, 80, 240, 800 IV: 0, 15, 50, 150	800 (SC), 150 (IV)	GLP ^a	[BMN111-11-015]	[2.6.7.5-1]	4.2.3.1
			Intravenous							
Single-dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2-3.5 years	Subcutaneous	Single dose, 7 days recovery	SC: 0, 20, 60, 200 IV: 0, 2, 6, 20	200 (SC), 20 (IV)	GLP ^a	[BMN111-11-006]	[2.6.7.5-1]	4.2.3.1
			Intravenous							
Repeat-Dose Toxicity										
21-day pilot feasibility study in juvenile rats	Rat, Crl:CD (SD)	7 days	Subcutaneous	Daily, 21 days	0, 90	NA	Non-GLP	[BMN111-11-053]	[2.6.7.6-1]	4.2.3.2
28-day repeat-dose toxicity in rats	Rat, Crl:CD (SD)	7-8 weeks	Subcutaneous	Daily, 28 days, 7 days recovery	0, 50, 150, 500	150	GLP ^a	[BMN111-11-029]	[2.6.7.7-1] [2.6.7.3-1]	4.2.3.2
26-week repeat-dose toxicity study in rats	Rat, Hsd:SD	8 months	Subcutaneous	Daily, 26 weeks, 28 days recovery	0, 50, 150, 500	50	GLP ^a	[BMN111-11-036]	[2.6.7.7-2] [2.6.7.3-1]	4.2.3.2
26-week repeat-dose toxicity study in juvenile rats	Rat, Crl:CD (SD)	7 days	Subcutaneous	Daily, 26 weeks, 6 weeks recovery	0, 10, 30, 90	10	GLP ^a	[BMN111-11-052]	[2.6.7.7-3] [2.6.7.3-1]	4.2.3.2

表 2.6.6.1-2 毒性試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Dosing Schedule	Doses (µg/kg)	NOAEL (µg/kg)	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location of Study Report
Repeat-Dose Toxicity										
CV safety pharmacology and dose range finding in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2-3 years	Subcutaneous	Phase I: Day 1, 3, 4, 7 (anesthetized) Day 9, 10 (conscious)	Phase I: 0, 1.4, 7, 14, 28, 70 (anesthetized) 0, 28, 49, 70, 140 (conscious)	NA	Non-GLP	[BMN111-09-067]	[2.6.7.6-1]	4.2.1.3
				Phase II: Once daily, 7 days	Phase II: 0, 28, 70 (conscious)					
28-day repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2-3 years	Subcutaneous	Daily, 28 days, 7 days recovery.	0, 20, 90, 300	300	GLP ^a	[BMN111-11-019]	[2.6.7.7-4] [2.6.7.3-1]	4.2.3.2
26-week repeat-dose toxicity study in juvenile cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2-3 years	Subcutaneous	Daily, 26 weeks, 28 days recovery	0, 20, 90, 300	90	GLP ^a	[BMN111-11-035]	[2.6.7.7-5] [2.6.7.3-1]	4.2.3.2
44-week repeat-dose toxicity study in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	4-5 years	Subcutaneous	Daily, 44 weeks, 13 weeks recovery	0, 25, 75, 250	25	GLP ^a	[BMN111-11-043]	[2.6.7.7-6] [2.6.7.3-1]	4.2.3.2

表 2.6.6.1-2 毒性試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Dosing Schedule	Doses (µg/kg)	NOAEL (µg/kg)	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location of Study Report
Reproductive and Developmental Toxicity										
Embryo-fetal developmental toxicity in rats	Rat, Crl:CD (SD)	9-10 weeks	Subcutaneous	Daily, GD 6-17	0, 90, 270, 540	540	GLP ^a	[BMN111-14-061]	[2.6.7.13-1]	4.2.3.5.2
Male and female fertility and early embryonic development in rats	Rat, Crl:CD (SD)	9-10 weeks	Subcutaneous	Males: Daily, from 28 days pre-cohabitation to mating confirmation Females: Daily, 15 days pre-cohabitation to GD 7	0, 90, 270, 540	paternal/maternal toxicity: 90 fertility and embryonic development: 540	GLP ^a	[BMN111-14-060]	[2.6.7.12-1]	4.2.3.5.1
Pre- and post-natal developmental toxicity study in rats	Rat, Crl:CD (SD)	11-13 weeks	Subcutaneous	Daily, GD 6 to LD 20	0, 90, 270, 540	540	GLP ^a	[BMN111-18-103]	[2.6.7.14-1]	4.2.3.5.3
Embryo-fetal developmental toxicity dose-range finding in rabbits	Rabbit, Hra:(NZW) SPF	6 months	Subcutaneous	Daily, GD 7-19	0, 45, 135, 240	NA	Non-GLP	[BMN111-14-055]	[2.6.7.11-1]	4.2.3.5.2
Embryo-fetal developmental toxicity in rabbits	Rabbit, Hra:(NZW) SPF	5-6 months	Subcutaneous	Daily, GD 7-19	0, 45, 135, 240	240	GLP ^a	[BMN111-14-081]	[2.6.7.13-2]	4.2.3.5.2

表 2.6.6.1-2 毒性試験一覧 (続き)

CV, cardiovascular; GLP, Good Laboratory Practice; GD, gestation Day; IV, intravenous; LD, lactation day; NA, not applicable; NOAEL, No-observed-adverse-effect level; NZW, New Zealand White; SC, subcutaneous; SD, Sprague Dawley.

- a) This study was compliant with United States Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations, Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare Good Laboratory Practice Standards Ordinance No. 21; Organisation for Economic Co-operation and Development Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17, as applicable.

2.6.6.2 単回投与毒性試験

非臨床毒性試験として、GLP 適用の単回投与毒性及び TK 試験を 2 試験（ラット 1 試験及びサル 1 試験）実施し、投与後 7 日間の観察期間を設定した。

2.6.6.2.1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける単回皮下／静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験（試験番号[BMN111-11-015]）

試験の目的：

本試験は、ラットに BMN 111 を単回皮下又は静脈内投与した場合の毒性を評価し、TK を測定することを目的として実施した。動物を投与後 7 日間観察し、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。

本試験は [REDACTED]（米国、[REDACTED] [REDACTED]）において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20 [REDACTED] 年 1 月 31 日～同年 10 月 14 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.5-1]に示し、試験デザインを表 2.6.6.2.1-1 に示す。

表 2.6.6.2.1-1 ラットにおける単回投与毒性及び TK 試験の試験デザイン

Animals	Group	Compound ^{a,b}	Dose (µg/kg) ^{c,d}	Dosing Frequency	Animal No. and Gender per Group
Toxicity animals ^e	1 SC (Control)	vehicle	0	Once	10M + 10F
	2 SC (Low)	BMN 111	80	Once	10M + 10F
	3 SC (Mid)	BMN 111	240	Once	10M + 10F
	4 SC (High)	BMN 111	800	Once	10M + 10F
	1 IV (Control)	vehicle	0	Once	10M + 10F
	2 IV (Low)	BMN 111	15	Once	10M + 10F
	3 IV (Mid)	BMN 111	50	Once	10M + 10F
	4 IV (High)	BMN 111	150	Once	10M + 10F
TK animals	5 SC (Control)	vehicle	0	Once	3M + 3F
	6 SC (Low)	BMN 111	80	Once	9M + 9F
	7 SC (Mid)	BMN 111	240	Once	9M + 9F
	8 SC (High)	BMN 111	800	Once	9M + 9F
	5 IV (Control)	vehicle	0	Once	3M + 3F
	6 IV (Low)	BMN 111	15	Once	9M + 9F
	7 IV (Mid)	BMN 111	50	Once	9M + 9F
	8 IV (High)	BMN 111	150	Once	9M + 9F

F, female; IV, intravenous; M, male; SC, subcutaneous; TK, toxicokinetics.

a) BMN 111 from Lot No. Tox 2 (CM112410) was used in this study.

b) Animals in Groups 1 and 5 (both dose routes) received vehicle control article only (0.005 mol/L citrate buffer [pH 5.5] solution containing 5.25% [w/v] sucrose, 1.5% [w/v] mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% [w/v] polysorbate 80 in Sterile Water for Injection, USP).

c) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg (SC) or 5 mL/kg (IV).

d) Dose concentrations were prepared based on the lot specific peptide content of the BMN 111 stock formulation (1.86 mg/mL).

e) Toxicity animals were dosed once followed by a 7 day observation period prior to scheduled termination.

材料と方法：

本試験には、雌雄の Crl:CD(SD)ラットを使用した。投与開始時に動物は約 8～10 週齢で、体重は雄 287～394 g、雌 187～253 g の範囲にあった。動物を 16 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 80、240 又は 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で背部に単回皮下投与（皮下投与、第 1～8 群）、あるいは溶媒又は BMN 111 を 15、50 又は 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で尾静脈から単回静脈内投与した（静脈内投与、第 1～8 群）。

毒性試験用動物（皮下及び静脈内投与、第 1～4 群）について、死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。1 日目の投与後 15～30 分に実施した特別の観察期間を含めて、毎日ケージサイドの観察を実施した。詳細な観察を毎日行った。摂餌量を毎日測定した。体重は投与開始前、1 日目の投与前、4 及び／又は 5 日目、並びに 7 日目に 1 日 1 回測定し、最終体重は剖検前の 8 日目に測定した。体温は、雌雄各 5 匹/群について投与開始前、投与 1～7 日目（投与後約 1～2 時間）まで 1 日 1 回測定した。8 日目に絶食した毒性試験用動物から、生化学的検査、血液学的検査、凝固検査及び尿検査用試料を採取した。TK 解析用の血液は、1 日目に非絶食 TK 試験用動物から採取した。第 5 群の全ての対照動物（皮下及び静脈内投与）について、投与約 30 分後に血液を採取した。BMN 111 の皮下投与群（第 6～8 群）は、雌雄各 3 匹/群から投与前、投与後約 5、15、30、60、90、120 及び 180 分に血液を採取した。BMN 111 の静脈内投与群（第 6～8 群）では、雌雄各 3 匹から投与前、投与後約 1、5、15、30、60、120 及び 180 分に血液を採取した。

予定日に動物を剖検し、特定の器官（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣、胸腺、及び副甲状腺を含む甲状腺）の重量を測定した。大腿骨から骨髓塗抹標本を作製した。対照群、低用量群及び高用量群の脳、心臓、投与部位、腎臓、肉眼的病変（存在する場合）、肝臓及び肺を病理組織学的検査に供した。

結果：

全ての動物が予定剖検日まで生存した。一般状態、摂餌量及び体重に BMN 111 に関連した変化は認められなかった。投与部位の反応も見られなかった。体温に変化はなかった。BMN 111 を 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与した雄の 10 例中 4 例で総アルカリホスファターゼ（ALP）活性の顕著な上昇が認められ、その結果、本群の ALP 平均値が有意に高値であった。この ALP 活性の上昇は、BMN 111 の作用機序（軟骨細胞活性の促進）から予想される軟骨細胞活性の上昇と関係している可能性が高く、有害所見とは判断されなかった。これ以外に臨床病理学的パラメーター、器官の絶対／相対重量、剖検所見又は病理組織学的所見に変化は認められなかった。

BMN 111 を 80、240 及び 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回皮下投与、15、50 及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回静脈内ボラス投与したラットの TK パラメーターを推定し、詳細を[2.6.4.3.1.2]項に示した。

BMN 111 を 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与した雌雄では、台形法で推定した 0 時間から最終測定時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（ AUC_{0-t} ）及び最高血漿中濃度（ C_{max} ）の平均値は、雌雄で同程度であった。240 及び 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の皮下投与では、雄の AUC_{0-t} 値は雌と比べて 2 倍以上高値であったが、 C_{max} 値は雌雄で同程度であった。15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈内投与では、BMN 111 の平均血

漿中濃度並びに AUC_{0-t} 及び C_{max} は、雌雄で同程度であった。50 及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈内投与では、雄の AUC_{0-t} 及び C_{max} はいずれも雌の 2 倍以上であった。

BMN 111 の平均半減期 ($t_{1/2}$) は投与経路にかかわらず類似しており、80、240 及び 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の皮下投与で 19~23 分、15、50 及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈内投与では 8~19 分であった。BMN 111 の皮下投与によるバイオアベイラビリティは 80 及び 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で約 5%であり、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 7.23%に増加した。

投与量間の平均 AUC_{0-t} 及び C_{max} の比較では、80 及び 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の皮下投与時並びに 15 及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈内投与時の曝露量は、おおむね投与量に比例した上昇を示したが、静脈内投与時の C_{max} のみ投与量比を上回る上昇が見られた。

結論：

以上より、ラットに BMN 111 の 80、240 及び 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回皮下投与、並びに 15、50 及び 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回静脈内投与した結果、良好な忍容性を示した。毒性標的器官は認められなかった。ラットの皮下投与による BMN 111 の無毒性量は 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、雄の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 130,000 pg/mL 及び 6,367,250 $\text{pg}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、雌の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 77,367 pg/mL 及び 2,453,883 $\text{pg}\cdot\text{min}/\text{mL}$ であった。ラットに BMN 111 を静脈内投与したときの無毒性量は 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、雄の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 2,035,000 pg/mL 及び 16,695,267 $\text{pg}\cdot\text{min}/\text{mL}$ 、雌の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 891,000 pg/mL 及び 8,388,142 $\text{pg}\cdot\text{min}/\text{mL}$ であった。

2.6.6.2.2 BMN 111 のカニクイザルにおける単回皮下/静脈内投与毒性及びトキシコキネティクス試験 (試験番号[BMN111-11-006])

試験の目的：

本試験は、カニクイザルに BMN 111 を単回皮下又は静脈内投与した場合の毒性を評価し、TK を測定することを目的として実施した。動物を投与後 7 日間観察し、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。

本試験は [REDACTED] (米国、[REDACTED] [REDACTED]) において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20 [REDACTED] 年 1 月 14 日~同年 10 月 14 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.5-1]に示し、試験デザインを表 2.6.6.2.2-1 に示す。

表 2.6.6.2.2-1 サルにおける単回投与毒性及び TK 試験の試験デザイン

Group	Compound ^{a,b}	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^{c,d}	Dosing Frequency ^e	Animal No. and Gender per Group
1 (Control) – SC	vehicle	0	Once	3M + 3F
2 (Low) – SC	BMN 111	20	Once	3M + 3F
3 (Mid) – SC	BMN 111	60	Once	3M + 3F
4 (High) – SC	BMN 111	200	Once	3M + 3F
5 (Control) – IV	vehicle	0	Once	3M + 3F
6 (Low) – IV	BMN 111	2	Once	3M + 3F
7 (Mid) – IV	BMN 111	6	Once	3M + 3F
8 (High) – IV	BMN 111	20	Once	3M + 3F

F, female; IV, intravenous; M, male; SC, subcutaneous; TK, toxicokinetics.

a) BMN 111 from Lot No. Tox 2 (CM112410) was used in this study.

b) Animals in Groups 1 and 5 received vehicle control article only [0.005 mol/L citrate buffer (pH 5.5) solution containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 in Sterile Water for Injection, USP].

c) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg.

d) Dose concentrations were prepared based on the lot specific peptide content of the BMN 111 stock formulation (1.86 mg/mL).

e) All animals were dosed once followed by a 7 day observation period prior to scheduled termination.

材料と方法：

試験には未使用の雌雄カニクイザルを用い、投与開始時に約 2~3.5 歳齢で、体重は雄が 2.2~3.3 kg、雌は 2.3~3.2 kg の範囲にあった。動物を 8 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 20、60 又は 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で肩甲骨間の部位に単回皮下投与（第 1~4 群）、あるいは溶媒又は BMN 111 を 2、6 又は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で伏在静脈に単回静脈内投与した（第 5~8 群）。

動物の死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。1 日目の投与後 15~30 分に実施した特別の観察期間を含めて、毎日ケージサイドの観察を実施した。詳細な観察を投与開始前に毎週、1 日目の投与前及び剖検予定日に実施した。摂餌量を毎日定性的に測定した。体重は、投与開始前に週 1 回、1 日目の投与前、及び 8 日目の最終日まで 1 日 1 回測定した。体温、呼吸数、心拍数及び血圧は、全例について投与開始前に 1 回、投与後 7 日目まで 1 日 1 回測定した。血圧測定は、投与開始前、1 日目の投与約 4 時間後、その後 1 日目の測定時間 \pm 2 時間以内に Cardell[®]モニターを用いて 1 日 1 回実施した。生化学的検査、血液学的検査、凝固検査及び尿検査用試料は、投与開始前に 1 回（尿検査）又は 2 回（血液検査）及び最終剖検前の 8 日目に絶食した動物から採取した。

TK 解析用の血液は、1 日目に非絶食動物から採取した。皮下投与群（第 1~4 群）では、投与前、投与後約 5、15、30、60、120、240、360 及び 600 分に各動物から血液を採取した。静脈内投与群（第 5~8 群）では、投与前、投与後約 1、5、15、30、60、120、240 及び 360 分に各動物から血液を採取した。

予定日に動物を剖検し、特定の器官〔副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、胆嚢（胆汁）を含む肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣、胸腺、及び上皮小体を含む甲状腺〕の重量を測定した。胸骨から骨髓塗抹標本を作製した。全動物の脳、心臓、腎臓、肉眼的病変（存在する場合）、肝臓及び肺を病理組織学的検査に供した。

結果：

全ての動物が予定剖検日まで生存した。一般状態、摂餌量及び体重に BMN 111 に関連した変化は認められなかった。投与部位の反応も見られなかった。体温、呼吸数、心拍数及び血圧に変化はなかった。200 µg/kg を皮下投与した動物（雄 3 例中 1 例及び雌 3 例中 3 例）では、8 日目に軽度～中等度ではあるが統計学的に有意な尿量の増加が認められた。この変化は、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）活性の上昇を介した、BMN 111 の直接的又は間接的な作用の可能性が考えられる。しかし、この所見は BMN 111 が血中に存在しないと考えられる投与 8 日後に発現した変化であり、ANP の半減期が短いこと（約 2 分）、また、反復投与毒性試験で尿量に変化が認められなかったことから、この所見は偶発的な変化の可能性が高い。本所見の原因はいずれにしても、有害所見とは判断されなかった。他の尿検査パラメーターに影響はなかった。これ以外に臨床病理学的パラメーター、器官の絶対/相対重量、剖検所見又は病理組織学的所見に変化は認められなかった。

BMN 111 を 20、60 及び 200 µg/kg の用量で単回皮下投与、2、6 及び 20 µg/kg の用量で単回静脈内ボラス投与したサルの TK パラメーターを推定し、[2.6.4.3.1.7]項に示した。

AUC_{0-t} 平均値は、200 µg/kg を皮下投与した雌雄で同程度であり、20 及び 60 µg/kg の皮下投与では、雌の AUC_{0-t} 平均値が雄の 2 倍以上であった。BMN 111 を 20 µg/kg 皮下投与した雌の C_{max} が雄の 2 倍以上であった以外は、皮下投与による C_{max} の平均値は雌雄で同程度であった。静脈内投与では、雌の AUC_{0-t} 平均値が雄の 2 倍以上であった 6 µg/kg を除いて、AUC_{0-t} 及び C_{max} の平均値は雌雄で同程度であった。AUC_{0-t} 及び C_{max} の平均値を投与量間で比較した結果、BMN 111 の曝露量は 2～20 µg/kg の静脈内投与では投与量にほぼ比例して増加し、20～200 µg/kg の皮下投与では投与量比を上回る増加を示した。

BMN 111 の平均 t_{1/2} は、20、60 及び 200 µg/kg の皮下投与で 12～19 分、2、6 及び 20 µg/kg の静脈内投与では 9～22 分であった。BMN 111 を 20、60 及び 200 µg/kg の用量で単回皮下投与したときのバイオアベイラビリティは、それぞれ 1.23%、3.25%及び 11.04%であった。

結論：

サルに BMN 111 を単回皮下投与した場合は 200 µg/kg まで、単回静脈内投与した場合は 20 µg/kg まで忍容性が良好であった。毒性標的器官は認められなかった。サルの皮下投与による BMN 111 の無毒性量は 200 µg/kg であり、雄の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 52,483 pg/mL 及び 2,017,925 pg·min/mL、雌の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 49,817 pg/mL 及び 1,203,425 pg·min/mL であった。サルに BMN 111 を静脈内投与したときの無毒性量は 20 µg/kg であり、雄の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 215,500 pg/mL 及び 2,729,607 pg·min/mL、雌の C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ 202,500 pg/mL 及び 3,048,791 pg·min/mL であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

SD 系ラットの成獣及び幼若動物並びに幼若カニクイザルを用いて、BMN 111 の最長 26 週間の反復投与毒性試験を実施した。また、成熟カニクイザルを用いて 44 週間の長期反復投与毒性試験を実施した。

2.6.6.3.1 BMN 111 の 7 日齢ラットを用いたパイロット試験（試験番号[BMN111-11-053]）

試験の目的：

本試験は、幼若ラットを用いた長期反復投与毒性試験（2.6.6.3.4 項、試験番号 BMN111-11-052 参照）を実施するに当たり、生後 7 日齢のラットに BMN 111 を 90 µg/kg/日の用量で 1 日 1 回皮下投与して、忍容性及び試験の実施可能性を予備的に検討することを目的として実施した。

本試験は BioMarin Pharmaceutical Inc.（米国、カリフォルニア州 Novato）で実施した。試験期間は 2011 年 12 月 2 日～2012 年 12 月 4 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.6-1]に示す。

材料と方法：

試験には 7 日齢の雌雄 Crl:CD(SD)ラットを使用し、試験開始時の体重は雄が 15～17.9 g、雌は 13.7～16.8 g であった。動物を 2 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 90 µg/kg/日の用量で生後 7～28 日まで 21 日間、1 日 1 回皮下投与した。幼若動物は 1 腹ごとの同腹児として母動物と共に施設に入荷し、試験期間を通じて同腹児を母動物と共に飼育した。各腹の同腹児（雄 4 匹及び雌 4 匹）の全例を一群に割り付け、1 腹を溶媒対照群に、他の 1 腹を投与群に割り付けた。試験デザインを表 2.6.6.3.1-1 に示す。

表 2.6.6.3.1-1 幼若ラットを用いたパイロット試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Number of Litters per Group	Number and Gender per Group
1	Vehicle ^b	0	1	4M/4F
2	BMN 111 ^c	90	1	4M/4F

F, female; M, male.

a) The dose volume was 2 µL/g when the animal's body weight was < 50 g and 1 µL/g when the animal's body weight was > 50 g.

b) Clinical formulation buffer.

c) Lot P2204-11001.

動物は、後肢の運動、姿勢、尾の外観、足の外観及び関節の腫脹に関連する症状を 5 段階尺度を用いて毎日観察した。評点 0 は明らかな症状を示さず、評点 4 は後肢の完全麻痺、並びに関節、尾又は足の外観の著しい不整などの重度の影響を表す。

動物を麻酔し、鼻殿長及び尾長を週 1 回測定した。

最終投与後、血液試料を採取して血漿を分離し（検査は実施せず）、全動物を安楽死させた。各動物の両大腿骨長をノギスで計測した。大腿骨を切除し固定した後、コンピュータ断層撮影法（マイクロ CT）を用いて各大腿骨の長さを測定した。

結果：

いずれの観察時点においても、一般状態の変化は認められなかった。BMN 111 投与群では 15 日目までの測定時点で、雄の平均体重に溶媒対照群と比較して有意差が認められたが、その後は有意差は認められなかった。被験物質との関連性は否定できないが、体重に基づく無作為化が行われておらず、体重に偏った同腹効果の可能性のあることを考慮すると、これらの差の生物学的意義は乏しいと考えられた。雌では、BMN 111 投与群と溶媒対照群の間に差異は見られなかった。

試験終了時（投与 3 週目）には、BMN 111 投与群の雌雄で尾長が溶媒対照群よりも長かった（尾長平均値が雄及び雌で、それぞれ 0.7 及び 1.2 cm 長かった）。鼻殿長に有意差は観察されなかった。なお、ノギス又はマイクロ CT で測定した *ex vivo* 大腿骨長に差はなかった。

結論：

以上より、7日齢の幼若ラットに BMN 111 を 90 µg/kg/日の用量で3週間連日皮下投与した場合、忍容性が良好であった。動物の尾長に若干の差が認められ、本用量で薬理作用が発現する可能性が示された。その結果、幼若ラットを用いた GLP 反復投与毒性試験の高用量として本用量 (90 µg/kg/日) を設定した。

2.6.6.3.2 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-029])**試験の目的：**

本試験は、ラットに BMN 111 を 28 日間連日皮下投与した場合の毒性の評価及び TK 測定、並びに 7 日間回復後の影響の可逆性、持続性又は遅発性の影響を評価することを目的として実施した。

本試験は [REDACTED] (米国、[REDACTED]) において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20[REDACTED] 年 5 月 9 日～同年 10 月 21 日であった。骨分析報告書を改訂するため、2012 年 2 月 29 日に試験報告書改訂版が発行された。本試験の概要を[表 2.6.7.7-1]に示す。

材料と方法：

本試験では、雌雄の Cri:CD(SD)ラットを使用した。動物は投与開始時に 7～8 週齢で、体重は雄が 198～240 g、雌は 159～206 g の範囲にあった。動物を 8 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 50、150 又は 500 µg/kg/日の用量で、1 日 1 回 28 日間背部に皮下投与した。主試験 (毒性評価) の動物を第 1～4 群に、TK 試験用動物を第 5～8 群に割り付けた。主試験の雌雄各 5 匹/群については、投与期終了後に 7 日間の回復期間を設けた。試験デザインを表 2.6.6.3.2-1 に示す。

表 2.6.6.3.2-1 ラットの 28 日間反復投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

Animals	Group	Compound ^a	Dose (µg/kg) ^b	Dosing Frequency and Duration	Dosing Phase: No. and Gender per Group	Recovery Phase: No. and Gender per Group ^c
Toxicity animals	1	Vehicle ^d	0	Once daily for 28 days	20M/20F	5M+5F
	2	BMN 111	50	Once daily for 28 days	20M/20F	5M+5F
	3	BMN 111	150	Once daily for 28 days	20M/20F	5M+5F
	4	BMN 111	500	Once daily for 28 days	20M/20F	5M+5F
TK animals	5	Vehicle ^d	0	Once daily for 28 days	3M/3F	NA
	6	BMN 111	50	Once daily for 28 days	9M/9F	NA
	7	BMN 111	150	Once daily for 28 days	9M/9F	NA
	8	BMN 111	500	Once daily for 28 days	9M/9F	NA

F, female; M, male; SC, subcutaneous; TK, toxicokinetic.

a) BMN 111 lots CM041811-FBDS.

b) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg (SC).

c) Five animals/sex/group were selected from the toxicity animals for the recovery phase.

d) Animals in group 1 and 5 received vehicle only (0.005 mol/L citrate buffer solution [pH 5.5] in Sterile Water for Injection, USP containing 5.25% [w/v] sucrose, 1.5% [w/v] mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% [w/v] polysorbate 80).

動物の死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を1日2回観察した。投与後15～30分間の特別の観察期間を含むケージサイド観察を毎日実施した。詳細な観察を試験開始前に少なくとも1回、投与期間中は週1回実施した。週単位の摂餌量を毎週測定した。体重は試験開始前に1回、1日目の投与前、その後少なくとも週1回測定した。体温は試験開始前に1回、投与1日目、その後は回復期間も含めて週1回測定した。投与後1～2時間の間に体温を測定した。

投与29日目及び回復期間7日目に、絶食した主試験用動物から臨床検査（血液学的検査、凝固検査及び血液生化学的検査）用の血液試料、並びに尿（尿検査及び尿化学的検査）を採取した。非絶食のTK試験用動物から1、8、15及び28日目の投与前、投与後5、15、30、60、90、120及び180分に、TK解析用の血漿を採取した。バイオマーカー [II型コラーゲン架橋C-テロペプチド (CTX-II)] 分析用の血清は、主試験用動物から剖検予定日に採取した。抗体分析用の血清は、試験開始前、投与29日目及び回復期間7日目にそれぞれ1回、主試験用動物から採取した。

予定日に動物を剖検し、特定の器官（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣、胸腺及び上皮小体を含む甲状腺）の重量を測定した。大腿骨から骨髓塗抹標本作製した。対照群及び高用量群の各動物から採取した保存組織、並びに肉眼的病変を病理組織学的検査に供した。さらに、全用量群について（標的組織と推定される）胸骨、左足根関節及び投与部位を病理組織学的検査に供した。また、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色（全用量群）及びサフランin O 染色（対照群及び高用量群）による組織学的検査、並びに成長板の静止軟骨、増殖及び肥大帯の組織学的計測による形態学的評価など、大腿骨の詳細な分析を実施した。対照群及び高用量群の肺組織にコッサ染色を施し、無機質の沈着を検討した。

結果：

投与5日目に150 µg/kgを投与した雄1例（動物番号 B05246）の死亡が判明した以外は、全例が予定剖検日まで生存した。死亡例で一般状態の変化は観察されなかった。死亡例は中用量

群の孤発的な事象であったことから偶発的な死亡と考えられ、BMN 111 投与との関連はないと判断された。

臨床所見として、BMN 111 の 150 及び 500 µg/kg を投与した雄及び 500 µg/kg を投与した雌で足根関節の腫脹、並びに 500 µg/kg を投与した雌雄で後肢の可動性の低下が認められた。これらの観察所見は 4 週目に初めて認められ、回復期間終了時まで継続した。500 µg/kg を投与した雄（20 例中 18 例）では、500 µg/kg の雌（20 例中 9 例）と比較して、足根関節腫脹の発現頻度が高かった。これらの所見は、足根骨の形態異常並びに成長板の組織性欠如及び血管形成低下などの、肉眼的及び病理組織学的変化と関連が見られた。これらの変化は、軟骨内骨化に対する BMN 111 の過度の薬理作用を反映している。1) 500 µg/kg を投与した動物では後肢の可動性が低下したこと、2) これらの動物のうち 40 例中 32 例で中等度～重度の成長板肥厚が認められたこと、及び 3) これらの所見が不可逆であったことから、500 µg/kg で観察された変化は有害所見と判断された。

雌雄ラットの摂餌量に BMN 111 に関連した変化は認められなかった。500 µg/kg 投与群の雌では、体長の伸長（大腿骨長及び脛骨長の伸長で評価）との関連が考えられる体重増加が認められた。雄では BMN 111 に関連した体重の変化は認められなかった。本薬に関連する一貫した体温の変化もなかった。

溶媒対照群及び BMN 111 投与群の動物では、投与期間終了時に病理組織学的所見と相関する投与部位の肉眼的変色が認められたが、回復期間終了時には観察されず回復性が認められた。投与部位の変化は 500 µg/kg 群の雌雄及び 50 µg/kg 群の雄で発現頻度の増加が見られたが、用量相関性がないこと、及び溶媒対照群で同様の変化が認められたことから、投与手法に起因する外傷に関連した所見の可能性が高いと考えられた。

臨床病理学的検査及び尿検査では、BMN 111 に関連した変化は認められなかった。500 µg/kg 群の雄では回復期間の 7 日目に、尿中クレアチニン、総タンパク、リン及びカリウム濃度が対照群と比較して軽度に増加した。しかし、電解質排泄量及び尿中タンパク/クレアチニン比は対照群の値と同程度の範囲にあった。これらの変化は BMN 111 の曝露が考えられない回復期間の 7 日目に発現したことから、本薬投与と直接関連する可能性は低いと考える。BMN 111 の非存在下では ANP 濃度の上昇は考えられず、ANP 濃度が上昇すると電解質排泄も増加が予測されることから、ANP を介した BMN 111 の間接的影響も考えにくかった。変化の原因はいずれにしても、尿化学的検査におけるこれらの変化の毒性学的意義は乏しいと考えられた。尿化学的検査では他にも統計学的有意差が認められたが、変化の程度が小さいこと、用量依存性が見られないこと、及び/又は対照群の範囲と差がないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

BMN 111 に関連した器官重量の変化は見られなかった。50 及び 500 µg/kg 群の雌で、肝臓の平均絶対重量及び脳相対重量の増加が観察されたが、用量反応性がないこと、雄に同様の変化が見られないこと、及び病理組織学的に相関する変化が認められないことから、本薬とは関連がないと考えられた。

大腿骨、脛骨及び足根関節に肉眼的変化を認めた。500 µg/kg 群の雄では、大腿骨及び足根関節の形態に異常が認められた。足根関節では、回復期間後の剖検時にもこの所見が継続してい

た。高用量群の雌 1 例で回復期間に足根関節の異常が認められたが、投与期間中の雌では足根関節の異常は認められなかった。この所見は、投与期間終了時に存在した足根骨の病理組織学的変化が持続し、肉眼的に発現したことに起因するものであった。BMN 111 を 150 µg/kg 以上を投与した雄で脛骨長及び大腿骨長の伸長、500 µg/kg を投与した雌で大腿骨長の伸長が認められた。回復期間終了時には骨長の差は観察されなかった。骨形状の変化は、病理組織学的に相関する成長板の拡張が確認されたように、軟骨内骨化に対する BMN 111 の過度の薬理作用による可能性が最も高かった。

全体として、病理組織学的変化は一部の骨格組織及び投与部位に限定されていた。大腿骨、胸骨及び足根骨の病理組織学的検査では、成長板及び周囲骨組織の構造に投与と関連する変化が認められた。大腿骨の組織学的解析では、50 µg/kg 群の雄を除く全ての動物で肥厚帯の厚みの軽微な増加、150 及び 500 µg/kg 群の多くの雄で無秩序な軟骨細胞の配列を伴う肥厚・石灰化帯の軽微な肥厚が認められた。500 µg/kg 群の雄では、一次海綿骨の肥厚（雄 14 例中 3 例）及び組織性欠如（雄 14 例中 2 例）も認められた。胸骨にも同様の病理組織学的所見を認めた。投与期間終了時に観察されたこれらの BMN 111 に関連した組織学的所見は、胸骨を除き、7 日間の回復期間終了時まで完全に消失した。大腿骨及び胸骨に認められた病理組織学的変化は、いずれも有害所見とは判断されなかった。足根関節の形態的变化（肉眼的観察）を組織学的に分析した結果、足根骨及び中足骨で類似するがより重篤な成長板の変化が明らかとなった。成長板は不規則な輪郭で肥厚し、時に無細胞性基質で隔てられた、種々のサイズの楕円形ないし円形の軟骨細胞群で構成されていた。成長板の肥厚は、増殖、成熟及び肥大領域における軟骨細胞層の増加を特徴としていた。溶媒を投与した動物の一部では、成長板が部分的又は完全に癒合していたが、BMN 111 を投与した動物の成長板は開いたままであったことから、BMN 111 の投与は成長板の癒合を促進せず、むしろ閉鎖を遅延させた可能性が示唆された。BMN 111 を 150 µg/kg 以上の用量で投与した動物で成長板の軽微な変性/出血が見られ、濃縮核、細胞残屑を含む嚢胞及び赤血球が存在する、様々なサイズの超好酸性軟骨細胞の領域が特徴であった。これらの病変は、軟骨細胞の活性と血管形成の間の微調整に関与する軟骨内骨化の促進に伴う二次的变化と考えられた。多数の骨芽細胞を伴った不規則な形の骨梁の増加が観察され、軟骨内骨化の促進が確認された。最後に、500 µg/kg 群の動物では、関節の周囲で線維腫性/粘液腫性組織の軽微～軽度増加が見られ、この組織では膠原線維性又は淡色の好塩基性基質内に星状細胞及び線維芽細胞が認められた。7 日間の回復期間終了後の剖検では、BMN 111 に関連する足根骨の所見は、雄では変性/出血がほぼ消失したが、おおむね継続して認められた。

投与期間終了時に軟骨の様々な領域でその高さ及び面積の増加が認められたため、その結果を表 2.6.6.3.2-2 に要約する。

表 2.6.6.3.2-2 投与期間終了時に認められた組織形態学的変化

Dose levels ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Males			Females		
	50	150	500	50	150	500
Reserve cartilage	-	Increased height	-	-	Increased height	Increased area and height
Multiplication zone	-	Increased height	Increased height	Increased area	Increased height	Increased area and height
Hypertrophic zone	-	-	Increased height	-	Increased area and height	Increased area and height

-, No change.

回復性試験の動物に関しては、BMN 111 の 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 28 日間投与した後、7 日間の回復期間を置くと、同性の対照動物と比較した場合、雌雄ラットで増殖領域及び肥大領域の面積・高さが減少した。

全体として、軟骨及び骨の組織学的変化は、高用量の BMN 111 を投与した正常動物における BMN 111 の過度の薬理作用に起因していた。これらの組織学的変化は、(線維芽細胞増殖因子受容体 3) *Fgfr3* ノックアウト (KO) マウス、及び分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) の細胞外シグナル調節キナーゼ 1 及び 2 (ERK1/2) の、シグナル伝達を不活性化したマウスの表現型と一致した。

変色した皮下投与部位の病理組織学的検査では、主に皮膚の筋層下及び血管周囲にマクロファージ、リンパ球及び形質細胞を含む単核細胞浸潤が認められた。この所見は 7 日間の回復期間後に回復が見られ、皮下注射後の傷害に起因するものであった。

BMN 111 を投与した動物では、コッサ染色により肺に無機質の沈着は観察されなかった。

投与期間及び回復期間終了後の剖検時に認められた、BMN 111 に関連した病理組織学的変化の発現頻度及び重症度を、表 2.6.6.3.2-3 及び表 2.6.6.3.2-4 にそれぞれ示した。

表 2.6.6.3.2-3 投与期間における BMN 111 関連の病理組織学的変化の発現頻度及び重症度

Sex	Males				Females			
	Dose Level (µg/kg)							
	0	50	150	500	0	50	150	500
Sternum Bone								
No. Examined	15	15	14	15	15	15	15	15
Increased Growth Plate Thickness								
Not Present	15	9	7	8	15	12	8	9
Minimal	0	6	7	7	0	3	7	6
Left Tarsal Joint								
No. Examined	15	15	14	15	14	15	14	15
Increased Growth Plate Thickness								
Not Present	15	0	0	0	14	5	0	0
Minimal	0	10	3	0	0	9	10	0
Slight	0	5	10	3	0	1	4	3
Moderate	0	0	1	11	0	0	0	12
Marked	0	0	0	1	0	0	0	0
Endochondral Ossification, Increased								
Not Present	15	7	2	4	14	9	3	5
Minimal	0	8	7	3	0	6	11	8
Slight	0	0	5	8	0	0	0	2
Degeneration/Hemorrhage, Growth Plate								
Not Present	15	15	13	9	14	14	10	10
Minimal	0	0	1	6	0	1	4	5
Periarticular Fibromatous/Myxomatous Tissue, Increased								
Not Present	15	15	14	8	14	15	14	11
Minimal	0	0	0	4	0	0	0	3
Slight	0	0	0	3	0	0	0	1
Subcutaneous Injection Site								
No. Examined	15	15	14	15	15	15	15	15
Infiltrate, Mononuclear Cell								
Not Present	4	0	0	2	2	0	0	0
Minimal	11	4	4	3	12	2	3	3
Slight	0	7	5	8	1	8	8	7
Moderate	0	4	5	2	0	5	4	5
Average Severity Score ^a	0.7	2.0	2.1	1.7	0.9	2.2	2.1	2.1
Hemorrhage ^b								
Not Present	12	6	9	8	10	10	11	6
Minimal	3	2	2	3	3	3	2	5
Slight	0	7	3	3	2	2	2	4
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Average Severity Score ^a	0.2	1.1	0.6	0.8	0.5	0.5	0.4	0.9

a) Severity score sum/number examined. Not present = 0, minimal = 1, slight = 2, moderate = 3.

b) Not test article related.

表 2.6.6.3.2-4 回復期間における BMN 111 関連の病理組織学的変化の発現頻度及び重症度

Sex	Males				Females			
	Dose Level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							
	0	50	150	500	0	50	150	500
Sternum Bone								
No. Examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Increased Growth Plate Thickness								
Not Present	5	5	2	5	5	3	4	2
Minimal	0	0	3	0	0	2	1	3
Left Tarsal Joint								
No. Examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Increased Growth Plate Thickness								
Not Present	5	1	0	0	5	3	0	0
Minimal	0	4	1	0	0	2	2	0
Slight	0	0	3	1	0	0	3	4
Moderate	0	0	1	4	0	0	0	1
Endochondral Ossification, Increased								
Not Present	5	4	0	1	5	5	1	1
Minimal	0	1	4	1	0	0	4	2
Slight	0	0	1	3	0	0	0	2
Degeneration/Hemorrhage, Growth Plate								
Not Present	5	5	3	5	5	5	1	4
Minimal	0	0	2	0	0	0	4	1
Periarticular Fibromatous/Myxomatous Tissue, Increased								
Not Present	5	5	5	2	5	5	5	1
Minimal	0	0	0	3	0	0	0	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Subcutaneous Injection Site								
No. Examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Infiltrate, Mononuclear Cell								
Not Present	3	4	3	3	3	0	0	5
Minimal	2	1	2	2	2	3	2	0
Slight	0	0	0	0	0	2	3	0
Average Severity Score ^a	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	1.4	1.6	0.0
Hemorrhage ^b								
Not Present	5	5	5	5	5	5	5	5

a) Severity score sum/number examined. -, Not present, 0; minimal, 1; slight, 2.

b) Not test article related.

ラットの単回投与毒性・TK試験で観察されたように、BMN 111は皮下投与後速やかに吸収され、その後循環血中から消失した。雄は一般に雌と比べてBMN 111曝露量が高値であったが、28日目のみ雄/雌比がほぼ2倍を超えた。1日目と比較して28日目では、 C_{max} 及び $AUC_{0-180\text{m}}$ 値が高かった。反復投与後の曝露量の増加は、投与間隔と比較して終末相の $t_{1/2}$ が比較的短く、28日目の投与前の血漿中濃度が定量下限を下回っていたことから、蓄積のためとは考えにくい。本試験におけるBMN 111のTKの詳細は、[2.6.4.3.2.2]項に記載した。

投与期間終了時及び回復期間終了時にBMN 111投与群で抗BMN 111抗体が測定され、雌で発現率が高かった。この原因はいずれにしても、これらの抗体は関連する臨床徴候や臨床病理

学的パラメーターの変化が観察されず、曝露量が減少しなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

剖検時に雌雄で CTX-II 濃度の増加が観察された。軟骨内骨化プロセスの一環として、II 型コラーゲンのリモデリングが予想された。

結論：

以上より、BMN 111 に関連する所見として、1) 過度の薬理作用を反映した骨格関連の変化につながる軟骨内骨化の促進、及び 2) 毒性学的意義はないと考えられる抗 BMN 111 抗体の産生が認められた。一部の組織学的変化は、雌よりも雄の方が重度であると考えられた。これは、雌と比較して雄でおおむね曝露量が高値であったことに起因すると考えられた。BMN 111 を 500 µg/kg/日投与した動物で認められた、後肢の可動性の低下、足根関節の腫脹及びそれに関連した肉眼的及び病理組織学的変化を除いて、各所見はおおむね可逆的であった。500 µg/kg/日の用量で足根関節に後肢の可動性が低下する肉眼的及び病理組織学的変化が持続的に認められたことから、本試験における BMN 111 の無毒性量は 150 µg/kg/日と判断された。ラットに BMN 111 を 150 µg/kg/日の用量で 28 日間連日皮下投与した結果、雄の平均 C_{max} は 73,333 pg/mL、 AUC_{0-t} は 3,381,317 pg·min/mL、雌の平均 C_{max} は 36,633 pg/mL、 AUC_{0-t} は 1,043,417 pg·min/mL であった。

2.6.6.3.3 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 28 日間回復性試験（試験番号[BMN111-11-036]）

試験の目的：

本試験は、性成熟したラットに被験物質の BMN 111 を 26 週間連日皮下投与した場合の毒性評価及び TK 測定、並びに 28 日間回復後に影響の可逆性、持続性又は遅発性の影響を評価することを目的として実施した。本試験は、試験の開始前又は初期に成長板の閉鎖が予想される年齢の高い（生後 8~9 ヶ月齢）ラットを使用して実施した。この月齢のラットを使用することにより、BMN 111 の薬理作用の重篤度を最小限に抑えることが期待され、長期投与による器官系に対する毒性作用の評価が可能である。

本試験は [REDACTED]（米国、[REDACTED] [REDACTED]）において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20 [REDACTED] 年 5 月 26 日~20 [REDACTED] 年 2 月 7 日であった。本試験の概要を [表 2.6.7.7-2] に示す。

材料と方法：

本試験では雌雄の Hsd:SD ラットを使用し、試験開始時に雄は 35~39 週齢、雌が 39 週齢で、体重は雄が 443~626 g、雌は 255~338 g であった。動物を 8 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 50、150 及び 500 µg/kg/日の用量で、1 日 1 回 26 週間背部に皮下投与した。試験デザインを表 2.6.6.3.3-1 に示す。

表 2.6.6.3.3-1 ラットにおける 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

Animals	Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Dosing Frequency	Dosing Phase: No. and Gender per Group	Recovery Phase: No. and Gender per Group
Toxicity animals	1	Vehicle ^b	0	Once daily for 26 weeks	15M/15F	5M/5F
	2	BMN 111 ^c	50		15M/15F	NA
	3		150		15M/15F	NA
	4		500		15M/15F	5M/5F
TK animals ^d	5	Vehicle ^b	0	Once daily for 26 weeks	6M/6F	NA
	6	BMN 111 ^c	50		9M/9F	NA
	7		150		9M/9F	NA
	8		500		9M/9F	NA

F, female; M, male; NA, not applicable; TK, toxicokinetic.

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle composition: 0.005 mol/L citrate buffer solution, pH 5.5, containing 5.8% (w/v) trehalose dihydrate, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 prepared in Sterile Water for Injection, USP.

c) BMN 111 lots CM052711-FBDS, CM050611-FBDS, 2011-111-11-101711.

d) Toxicokinetic animals were included solely for the purpose of blood sample collections.

動物の死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。投与後 15~30 分間のケージサイド観察を毎日実施した。詳細な観察を試験開始前に少なくとも 1 回、1 日目の投与前、投与期間中は週 1 回、及び剖検予定日に実施した。「曲尾」又は「外反足」の臨床所見が観察された場合は、記録のために代表的な動物のデジタル写真を撮影した。

体重は投与開始前に少なくとも 1 回、1 日目の投与前、その後は毎週測定した。摂餌量は毎週測定した。

各群の動物番号の後 10 例について、全身及び局所（右大腿骨）の骨塩量（BMC、g）及び骨密度（BMD、g/cm²）を、二重エネルギー X 線吸収測定法（DEXA）で測定した。Hologic Discovery™ 骨密度測定装置を使用して、投与開始前に 1 回及び投与期間の 13 週目に 1 回実施した。

各群雌の動物番号の後 10 例について、投与開始前に少なくとも 14 日間、投与期間の 12 週目及び 24 週目から少なくとも 14 日間、並びに回復期間の 2 週目から少なくとも 14 日間、膣細胞診を実施し発情周期を評価した。

一晚絶食した動物から頸静脈を介して、血液学的検査、凝固検査及び血液生化学的検査用の血液試料を採取した。一晚絶食した動物から採血の前に、一晚冷却状態で尿試料を採取し尿検査及び尿化学的検査を行った。投与期間の 13 及び 26 週目にそれぞれ 1 回、並びに回復期間の 28 日目に検体を採取した。

26 週間連日投与後、毒性評価用の生存動物は各群の雌雄で最大 15 匹を安楽死させ剖検した。28 日間の回復期間後に、毒性評価用の全生存動物（第 1 及び 4 群の雌雄各 5 匹まで）を安楽死させ剖検した。以下の器官を摘出し重量を測定した。副腎、脳、精巣上体（雄）、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣（雌）、脾臓、精巣（雄）、胸腺及び上皮小体を含む甲状腺（対器官は両側を合わせて測定）。骨髓塗抹標本作製したが検査は実施しなかった。

精子の形態、運動性及び総精子数を評価するために、各剖検時に一部の雄から右精巣上体及び精管を採取した。精巣容積についても、左右精巣を別々に測定した。対照群（第 1 群）及び

高用量群（第4群）の雄全例について、精子形成ステージの定性的評価を実施した。全群について、肉眼的病変が認められた組織の病理組織学的検査を実施した。

TK試験用動物（第5～8群）から、1、85及び176日目にTK測定用血液試料を採取した。対照群（第5群）の動物番号が若い雌雄各3例から、投与後30分に検体を採取した。第6～8群は、投与前、投与後5、15、30、60、90、120及び180分の試料が得られるよう、各測定時点について雌雄各3匹から血液を採取した。酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により、血漿を分析した。

血清中の抗薬物抗体（ADA）測定用試料は、投与開始前、176日目の投与前、及び回復期間の28日目に採取した。血清試料をブリッジング電気化学発光測定法（ECLA）で分析した。

骨バイオマーカー測定用試料を投与開始前及び投与期間の13週目に1回採取したが、この試料は分析しなかった。

TK試験用動物について、対照群（第5群）の雌雄各3匹から、1及び85日目の投与前及び投与後30分に、ANP及びB型ナトリウム利尿ペプチド（BNP）測定用の血液試料を採取した。第6～8群は、投与前、投与後30及び60分の各時点で、雌雄各3匹から試料を採取した。試料はELISA法を用いて分析した。

なお、体重、摂餌量、BMC、BMD、発情周期、凝固パラメーター、精巣容積、精子形成ステージ分析、ANP及びBNP濃度には、BMN 111に関連した明らかな影響は認められなかった。

結果：

試験期間中にBMN 111に関連した死亡例はなかった。雄8例及び雌9例は、投与期間終了時の予定剖検日までに死亡又は切迫屠殺した。死亡原因が不明であった溶媒投与群の雄1例、第8群の雄1例及び第4群の雌1例を除いて、死亡原因の多くは採血、外傷及び腫瘍/疾患の進行が関連していた。

過度の薬理作用（軟骨内骨化）と関連する臨床症状が用量依存的に観察され、四肢不自由、外反足、歩行異常及び曲尾などの所見が認められた（表 2.6.6.3.3-2）。これらの観察所見は回復期間まで継続し、手根関節や膝関節、大腿骨及び尾椎の形状異常などの骨の肉眼的所見と相関していた。各群の動物で腫瘍が認められたが、これらの腫瘍の発生頻度は用量依存的ではなく、この動物種及び系統の背景データと一致していた。

表 2.6.6.3.3-2 投与期間（26週間）における投与量/性別ごとの主なBMN 111関連臨床症状の発現頻度

Observation	Number of Animals with Observed Sign by Dose Level and Sex							
	1 (0 µg/kg)		2 (50 µg/kg)		3 (150 µg/kg)		4 (500 µg/kg)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Limited use, limbs (combined)	0	0	0	0	5	1	11	4
Kinking, tail	0	0	14	0	13	9	19	18
Altered ambulation (combined)	0	0	0	0	11	5	20	21
Valgus (combined)	0	0	0	0	4	0	26	34

BMN 111 を 500 µg/kg/日の用量を投与した雌で、投与 86 及び 177 日に白血球及びリンパ球の絶対数の軽度増加が認められた。これらの変化は回復期間中に可逆性を示した。500 µg/kg 群の雌で 86 及び 177 日目にクレアチニンの軽微な低下、500 µg/kg 群の雄で 177 日目にコレステロールの軽度低下、及び 150 µg/kg 以上の投与群の雄で 87 及び 177 日目にトリグリセリドの軽度低下など、血液生化学的検査で軽度の変化が認められた。500 µg/kg 群の雌雄で 86/87 日目に軽度の無機リンの高値、150 µg/kg 以上の投与群の雄及び 500 µg/kg 群の雌で 86/87 及び 177 日目に軽微な ALP の高値が認められ、これらの変化は BMN 111 の薬理作用による骨芽細胞の活性亢進に関連する可能性が高いと考えられた。雄のトリグリセリドの低値を除いて、これらの変化は回復期間中に可逆性を示した。

BMN 111 に関連した尿検査及び尿化学的検査への影響は、150 µg/kg 以上の投与群の雌で 177 日目に尿量及び尿中 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) /クレアチニン比の軽度の高値が見られたのみであった。500 µg/kg 群で見られた尿中 GGT/クレアチニン比の高値に関しては、回復期間終了時にも回復性のエビデンスは認められなかった。これらの所見は腎臓の機能及び完全性に対する影響を示唆しているが、血清中の尿素窒素及びクレアチニンの上昇は見られなかった。腎臓に相関する肉眼的病変が認められなかったため、腎臓の病理組織学的検査は実施しなかった。

投与期間終了時に 500 µg/kg 群の全例で、肺の絶対重量及び相対重量が統計学的に有意に増加した。肺重量の増加は対照群と比較して 15%未満であり、被験物質に関連した肉眼的又は病理組織学的所見は認められなかった。500 µg/kg 群の雄では、副腎の絶対重量及び相対重量が投与群と比べて有意に増加した (17%未満の増加)。28 日間の回復期間後には、500 µg/kg 群の雄で肝臓の絶対重量及び脳相対重量の低値が認められたが、この群の雄では全体的に体重が低く、肝臓重量の体重比も対照群と有意差がなかった。これらの組織には肉眼的病変が認められなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

BMN 111 投与に関連した肉眼的所見は、骨の形態異常のみであった (表 2.6.6.3.3-3)。これらの肉眼的所見は一般に、病理組織学的な骨の成長板の肥厚及び/又は成長板の異形成と関連が見られた。雄の 50 µg/kg 以上及び雌の 150 µg/kg 以上の投与群で、複数の肉眼的病変が認められた。BMN 111 を投与した動物では、頭蓋骨形態異常の肉眼的所見が少数ながら認められたが、相関する病理組織学的変化が見られなかったことから、本所見は被験物質に関連した変化ではないと考えられた。

表 2.6.6.3.3-3 全剖検例における投与量／性別ごとの BMN 111 関連肉眼的所見の発現頻度

Observation	Number of Animals with Macroscopic Finding by Dose Level and Sex							
	1 (0 µg/kg)		2 (50 µg/kg)		3 (150 µg/kg)		4 (500 µg/kg)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Abnormal shape of joint (stifle, carpal joints)	0	0	3	0	11	6	13	14
Abnormal shape of tail	0	0	13	0	12	9	14	11
Abnormal shape of other bones (tibia, thoracic vertebra, spinal vertebra, entire)	0	0	3	0	6	0	6	2
Abnormal shape of femur	0	0	0	0	5	0	3	2
Abnormal shape of sternum	0	0	0	0	0	2	2	3

50 µg/kg 以上を投与した雄及び 150 µg/kg 以上を投与した雌で、大腿骨、胸骨、膝／手根関節骨、脛骨、脊椎及び尾椎に、軟骨細胞数の増加と組織性欠如及び／又は成長板の異形成を特徴とする成長板の肥厚などの、BMN 111 に関連した病理組織学的変化が認められた。これらの所見は、関節の変形及び腫脹、四肢不自由、歩行異常並びに骨・関節の異常形状などの肉眼的所見と関連していた。これらの変化は予想された BMN 111 の薬理作用と関連する。

150 及び 500 µg/kg 群の雄では、投与期間終了時に対照群と比べて 30.5%及び 26.5%の精子数の有意な減少が観察され、この変化は 28 日間の回復期間後も継続した。ラットでは精子形成サイクルが 28 日を超えるため、この回復期間では明らかな影響の回復には十分な期間ではない可能性が考えられる。

毒性試験用動物の一部は、176 及び／又は 211 日目（該当する場合）に ADA の陽性結果を示した。ADA 陽性（抗体価：>20~2500）が 3 用量の全てで観察されたが、陽性反応率は用量依存的ではなかった。第 2 群（50 µg/kg）では、雄 13 例中 10 例、雌 14 例中 9 例が 176 日目に ADA 陽性を示した。第 3 群（150 µg/kg）では、雄 15 例中 11 例、雌 15 例中 11 例が 176 日目に ADA 陽性を示した。第 4 群（500 µg/kg）では、雄 19 例中 5 例及び雌 24 例中 12 例が 176 日目に ADA 陽性を示し、雄 5 例中 1 例及び雌 5 例中 3 例が 211 日目に ADA 陽性を示した。第 4 群の雄 1 例（動物番号 B06973）は 176 日目に陽性を示したが、211 日目には陰性であった。第 4 群の雌 2 例（動物番号 B07074 及び B07076）は、176 日目に ADA 陽性であったが、211 日目には ADA が陰性であった。しかし、試験デザインによりこれらの動物では TK 測定用試料を採取しなかったため、ADA が BMN 111 の TK に及ぼす影響を直接評価することはできなかった。

ラットで実施した先行試験で観察されたように、BMN 111 は皮下投与後速やかに吸収され、排泄された。1 及び 85 日目における雄の BMN 111 曝露量は、一般に雌と比べてやや高値であった。176 日目には、雄の曝露量が AUC 及び C_{max} 共に雌の 2 倍を超えた高用量（500 µg/kg）群を除いて、雄と雌の BMN 111 曝露量はほぼ同程度であった。

雌雄の平均濃度－時間プロファイルから、全 TK 測定日で BMN 111 曝露量が 50~500 µg/kg/日への用量増加に伴って、おおむね増加したことが示された。この結果から、BMN 111 の平均濃度は、1 日目よりも連日の反復投与後に一般に高いことが示された。雌雄の血漿中 C_{max} 及び

AUC_{0-180m}は50～500 µg/kg/日の用量で増加したが、一貫性した用量比例性(1:1)は認められなかった。BMN 111の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.5]項に記載した。

結論:

以上より、ラットにBMN 111を50、150又は500 µg/kg/日の用量で連日皮下投与したとき忍容性が認められ、主にBMN 111の薬理作用である軟骨内骨化の促進に関連した毒性所見が観察された。雌と比べて雄で重度の影響が見られたが、原因として雄の曝露量が高いことが考えられる。

骨構造に対する持続性変化、*in vivo*で観察された一般状態への影響、及び150 µg/kg以上を投与した動物で認められた精子数への影響に基づき、BMN 111を26週間連日投与したラットの無毒性量は50 µg/kgと判断された。無毒性量における雄のC_{max}及びAUC₀₋₁₈₀はそれぞれ19,830 pg/mL及び592,675 pg·min/mL、雌のC_{max}及びAUC₀₋₁₈₀はそれぞれ16,800 pg/mL及び635,775 pg·min/mLであった。

2.6.6.3.4 BMN 111の幼若ラットにおける26週間皮下投与毒性試験及び6週間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-052])

試験の目的:

本試験は、ラットにBMN 111を出生後の乳児期から成熟期までの26週間連日投与し、骨格及び生殖機能の発達に対する毒性評価並びにTK測定、次いで6週間の回復期間後に毒性所見の可逆性あるいは遅発性発現を評価することを目的として実施した。本試験は、全般的な発達状態が0～4週齢のヒト乳児に相当し([Kilborn 2002])、長骨に一次・二次の化骨中心が出現する前の7日齢の新生児ラットを使用して実施した。本試験は26週間にわたって実施したため、長骨の成長板の癒合は完了していないが、小児期、青年期及び成熟期に至るまで動物を評価したと考えられる。

本試験は、[REDACTED] (カナダ、[REDACTED])において、米国、日本及びOECDのGLP基準に従って実施した。試験期間は20[REDACTED]年1月3日～20[REDACTED]年5月2日であった。組織学的形態計測の結果を含めるため、2013年8月30日に試験報告書改訂版が発行された。本試験の概要を[表 2.6.7.7-3]に示す。

材料と方法:

本試験には雌雄のCrI:CD(SD)ラットを使用し、試験開始時に7日齢で体重は11.2～22.1 gであった。動物を4群に割り付け、溶媒又はBMN 111を10、30及び90 µg/kg/日の用量で、生後7～188日まで1日1回26週間、胸・腰部の左右背部に皮下投与した。動物は生後3日齢で母動物と共に試験施設に入荷し、1腹の同腹児は雌雄各4匹以上であった。生後4日に各同腹児を雌雄4:4の性比に調整し、無作為に母動物に里親飼育させた。母動物にはその出生児を割り付けず、各腹に雌雄各1匹以内の同腹児を割り付けた後、動物を試験群(サブセット)に割り付けた。F₁ラットは試験開始日をずらした11のグループに分け、初回投与を20[REDACTED]年1月9日～同年2月6日に実施した。投与を行ったが試験群(サブセット)に割り付けなかったF₁動物は、生後21日に安楽死させ廃棄した。試験デザインを表 2.6.6.3.4-1に示す。

表 2.6.6.3.4-1 幼若ラットにおける 26 週間反復投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Number of Litters per Group	Number and Gender per Group			
				Dosing Phase (Subset A)	Recovery Study (Subset B)	Reproductive Phase (Subset C) ^b	Toxicokinetic and ADA Study (Subset D) ^c
1	Vehicle ^d	0	18	10M/10F	16M/16F	20M/20F	9M/9F
2	BMN 111 ^e	10	19	10M/10F	16M/16F	20M/20F	27M/27F
3		30	19	10M/10F	16M/16F	20M/20F	27M/27F
4		90	19	10M/10F	16M/16F	20M/20F	27M/27F

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Subset C was dosed once daily from PND 7 to 112, but was untreated during the mating period until termination of this subset.

c) Subset D was administered a single dose or was dosed for 26 weeks, depending on assignment to collection time point.

d) Vehicle composition: 0.005 mol/L citrate buffer solution (pH 5.5) in Sterile Water for Injection, USP, containing 0.0279% (w/v) citric acid monohydrate, 0.108% (w/v) sodium citrate dihydrate, 0.0727% (w/v) L-methionine, 5.8% (w/v) trehalose dihydrate, 1.5% (w/v) mannitol, and 0.005% (w/v) polysorbate 80.

e) Lot P2204-11003.

ケージサイド観察は、投与開始日に応じて 1~9 週目又は 13 週目までは投与 1~47 分後に 1 日 1 回、その後は投与 15~30 分後に週 1 回実施した。詳細な一般状態観察を離乳前は毎日、その後、離乳後は少なくとも週 1 回、安楽死させるまで実施した。

動物の体重は、投与期間の最初の 15 週間は週 2 回、その後は週 1 回測定した。生殖能評価に割り付けた動物（サブセット C）については、膈開口又は包皮分離が陽性となった日及び交配のため同居を開始した日に体重を測定した。サブセット C で妊娠が確認された雌については、妊娠 0、3、6、9 及び 13 日に体重を測定した。

また、サブセット A 及び B に割り付けた動物は、生後 7 日から週単位で頭殿長及び尾長を測定して成長をモニターした。

生後 21 日から摂餌量測定を開始して、サブセット A 及び B は剖検まで、サブセット C は交配のための同居開始まで測定した。サブセット C で交配が確認された雌の摂餌量は、妊娠 0、3、6、9 及び 13 日に測定した。

サブセット A 及び B の動物について、投与期間の最終週に眼科的検査を実施した。

生後 44/45 日及び 14/15、25/26、31/32 週目に麻酔したサブセット B の動物を対象に、DEXA (Hologic Discovery A 型骨密度計) により、BMD、BMC 並びに右大腿骨及び腰椎 (L1~L4) の面積を測定した。

全てのサブセット B の動物について、末梢骨定量的コンピュータ断層撮影法 (pQCT) により、右脛骨の骨面積、BMC、BMD、骨膜・骨内膜周囲長及び皮質厚の測定を、DEXA と同時期に実施した。

サブセット A 及び B の全生存動物について、生後 25 日、6 及び 16 週目、並びに投与期間終了時及び回復期間終了時に、全身骨格、右大腿骨、右脛骨及び右下顎骨の X 線写真を撮影した。サブセット B の全撮影時点及びサブセット A の動物の 16 週目及び投与期間終了時に、X 線写

真から大腿骨長、腰椎 (L1~L6) 骨長、脛骨長、下顎骨長、頭蓋骨長 (吻側-尾側)、上腕骨長・幅及び大腿骨幅を測定した。

4、8、13/14、24/25 及び 30/31 週目に、投与群をブラインド化したサブセット B の動物について、機能観察総合評価法 (FOB) を実施した。FOB には、ホームケージ観察、ハンドリング反応、新規環境行動 (オープンフィールド)、空中立ち直り反射 (臨床所見により 24/25 週目は中止)、握力、後肢の開脚 (13/14 週目以降中止) 及び体温測定を含む。FOB 終了後、8 字迷路で運動量を 1 時間測定した。

4、8、13/14、24/25 及び 30/31 週目に、サブセット B の動物で聴覚性驚愕反応を 8 秒間隔で 50 試行評価した。

サブセット A の動物で 25/26 週目及びサブセット B で 31/32 週目に、シンシナティ水迷路を用いて学習及び記憶の評価を実施した。最初に動物の遊泳能力を評価し、続いて学習及び記憶を評価した。

サブセット C の雄は、包皮分離を生後 36 日から陽性となるまで毎日観察した。サブセット C の雌は、膣開口を生後 25 日から陽性となるまで毎日観察した。交配前 14 日間 (生後 112~125 日)、毎日発情周期をモニターした。生後 126 日に、サブセット C の雌雄動物を用量群ごとに非同腹児と 1:1 で同居させ、膣垢中の精子の有無又は膣栓の有無により交配をモニターし、交配した雌を妊娠 0 日とした。

サブセット A 及び B の動物について、剖検予定日に臨床病理学的検査用の血液試料を採取した。尿検査用試料については、サブセット A は投与期間終了時に、サブセット B は雌雄各 10 匹/群から回復期間終了時に一晚採尿した。

26 週間連日投与後、生後 189 日にサブセット A の動物の体重を測定し、安楽死させ、剖検した。6 週間の回復期間後、生後 231 日にサブセット B の動物の体重を測定し、安楽死させ、剖検した。以下の器官を摘出し重量を測定した。副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体、前立腺、精囊、脾臓、精巣、胸腺及び甲状腺 (対器官は両側を合わせて測定)。骨髓塗抹標本作製したが検査は実施しなかった。病理組織学的検査のために組織を採取し、雌雄各 10 匹/群について検査を実施した。

右橈骨、右脛骨、右大腿骨、大後頭孔及び頭蓋骨をノギスで計測した。サブセット A 及び B は各群の動物番号の最初の 10 例について、右脛骨近位部を樹脂に包埋し、Pro Plus 画像解析装置を用いて組織形態学的分析を行った。サブセット A 及び B の各群 10 例について、分離した下顎骨の X 線画像を作成し、下顎骨長を測定した。Hologic Discovery A 型骨密度計を用いて *ex vivo* DEXA により、摘出した右大腿骨の BMD、BMC 及び面積を測定した。また、サブセット A 及び B の各群雌雄各 10 例から摘出した右大腿骨及び第 4 腰椎の *ex vivo* pQCT を実施し、BMC、BMD 及び各骨の面積のほか、生体力学試験で予想される大腿骨の断裂部位の骨膜・骨内膜周囲長及び皮質厚を測定した。骨の状態が検査可能であったサブセット A の全例、及び動物番号が若いサブセット B の各群雌雄各 10 例について、Bose Electroforce 3300 システムを用いて骨の生体力学試験を実施した。大腿骨は 3 点屈曲試験及び大腿骨頸部せん断試験を行い、第 4 腰椎は圧迫試験を行った。

サブセット C の雄は同居期間終了後 2~3 週間で剖検した。交尾を確認した雌は妊娠 13 日に剖検し、交尾が確認できなかった雌は交配期間終了後 7 日目以降に剖検した。全動物について剖検前に体重を測定した。各動物の精巣上体、前立腺、精嚢、精巣又は卵巣を摘出して、器官重量を測定した（対器官は両側を合わせて重量を測定）。雄の精巣を採取し、病理組織学的検査及び精子形成ステージ分析を実施した。精子の数、運動性及び形態の評価のため、各雄動物から精巣上体尾部又は精管を採取した。妊娠したサブセット C の雌から生殖器官を摘出し、子宮を切開して、着床部位、胎盤の状態、生存/死亡胚数及び早期吸収を調べた。卵巣上の黄体存在部位の数を計測した。外観上非妊娠の雌の子宮を 10% 硫化アンモニウムで染色し、着床痕の有無を確認した。

生後 7 及び 188 日に、サブセット D の動物から TK 解析用の血漿試料を採取した。生後 7 日は、各測定時点で雌雄各 3 匹から、心臓穿刺により試料を採取した。対照群の動物は一時点（投与後 15 分）、投与群は投与前、投与後 5、15、30、60 及び 120 分に試料を採取した。生後 188 日は、複数の測定時点で各群雌雄各 3 匹から試料を採取した。対照群の動物は投与前及び投与後 15 分に、投与群の動物は投与前、投与後 5、15、30、60、120 及び 180 分に試料を採取した。バリデートされた ELISA 法を用いて、血漿試料の BMN 111 濃度を分析した。

生後 188 及び 230 日の投与前に、全てのサブセット D の動物から抗 BMN 111 抗体検出用の血清を採取した。バリデートされた定性的ブリッジング ECLA を用いて、試料の抗 BMN 111 抗体を分析した。

生後 21 日（サブセット A、B 及び D）、6 及び 16 週目（サブセット A）、並びに予定剖検時（サブセット A 及び B）に、骨代謝の血清生化学マーカー（PINP、CTX-II、CTX-I 及び TRACP-5b）測定用の試料を採取した。表 2.6.6.3.4-2 に各時点で測定したバイオマーカーを示す。

表 2.6.6.3.4-2 骨代謝のバイオマーカー測定用試料のサンプリング計画

PND or Study Week	Subset	Parameter Analyzed			
		PINP	CTX-II	CTX-I	TRACP-5b
PND 21	A and D ^a	X			
PND 21	B		X ^b		
Week 6 (approximately PND 50)	A	X	X	X	
Week 16 (approximately PND 120)	A	X	X	X	X
PND 189	A	X	X	X	X
PND 231	B	X	X	X	X

CTX-II, C-terminal telopeptide of type II collagen; CTX-I, C-terminal telopeptide of type I collagen; PINP, procollagen type I N-terminal propeptide; PND, post-natal day; TRACP-5b, tartrate-resistant acid phosphatase-5b; X, sample collected and analyzed.

a) Obtained from all Subset A and six Subset D animals/group to ensure at least 10 samples would be available for testing.

b) Only 10 samples were analyzed although samples were collected from all animals.

結果:

授乳期間中、90 µg/kg 群の雄 1 例及び 30 µg/kg 群の雌 1 例が生後 15 日に死亡した。死因は特定できなかったが、この期間の死亡率が低かったことから、BMN 111 投与に関連した死亡ではないと考えられた。離乳後には死亡又は安楽死させた動物が数例認められ、対照群、10、30 及

び90 µg/kg 群でそれぞれ2、4、1及び1例が死亡した。用量依存的な傾向は認められず、死亡例の多くは偶発的であったことから、BMN 111 投与に起因する死亡ではないと考えられた。

いずれの投与量でも、眼科的検査、聴覚性驚愕反応、膈開口及び包皮分離の時期、発情周期、血液凝固能、尿検査、精子発生及び精子パラメーター、あるいは器官重量に、BMN 111 と関連する明らかな影響は認められなかった。

BMN 111 の90 µg/kg 群で投与に関連した一般状態の変化が、雄で投与12週目(生後84日)、雌では投与14週目(生後98日)から観察され、後足/後肢の外形・機能異常、歩行異常、外反足、背骨突出、円背姿勢及び曲尾などの影響が認められた。30 µg/kg 群の雌3例で身体の菲薄状態も認められた。重症例では、X線検査及び肉眼的所見による脛骨の湾曲/屈曲に相応した、後肢の全体的な外形/形状の異常が認められた。BMN 111 に関連した全ての臨床観察所見に明らかな可逆性は認められず、6週間の回復期間終了時に回復は見られなかった。

BMN 111 を10、30又は90 µg/kg/日の用量で投与した、主試験、回復性試験及び生殖能評価の雌の体重に明らかな影響はなかった。90 µg/kg 群の雄では、投与期間終了時にかけて体重増加量がやや少なかったため、平均体重の低値傾向が認められた(対照群と比較して最大6%減)。逆に、30 µg/kg 群の雄では20週目から体重がわずかに高くなり、回復期間終了時まで持続した(対照群と比較して最大5%増)。サブセットC(生殖能評価)に割り付けた雄では、対照群と比較して体重に差は認められなかった。

頭殿長及び尾長から評価した成長は、90 µg/kg 群の雌は投与8週目から、90 µg/kg 群の雄では15週目から増加した。成長の差は、投与期間及び回復期間を通じて継続した。30 µg/kg 群の頭殿長及び尾長はときに対照群よりも長かったが、雄の体重が重いことが原因と考えられる。

90 µg/kg 群の雄における体重への影響は、この群の平均摂餌量が16週目から低値であったことに起因する可能性が高い。同様に、30 µg/kg 群の雄で体重増加量が高値であったのは、この群の摂餌量が16週目から対照群と比較して増加したことに関連する可能性が考えられる。サブセットA及びBの雌、あるいはサブセットCに割り付けた動物には、明らかな影響は見られなかった。

90 µg/kg 群の特に雄で、BMN 111 の神経筋機能に対する明らかな影響が、24/25及び30/31週目のFOBで認められた。動物の状態によっては高用量群の動物で、伸筋突き上げ(extensor thrust)、つま先つまみ(toe pinch)、姿勢位置活動及び後肢握力などの一部の試験が実施できなかった。歩行異常は雌雄共に認められ、自発運動、身体姿勢、立ち上がり行動、toe pinch 反応及び覚醒状態の変化は雄にのみに認められた。これらの所見は、BMN 111 の中枢神経系に対する影響ではなく、症状観察で見られたように後足/後肢の状態に起因していた。

90 µg/kg 群の雄では、投与13/14週目から自発運動の低下が認められ、投与期間及び回復期間を通じて継続した。雌では差は見られなかった。FOBと同様に、これらの差異は雄の後足/後肢の状態とそれに伴う歩行困難に起因するものであった。

シンシナティ水迷路試験による学習及び記憶の評価では、後足/後肢の状態により高用量群の雄で水泳能力に影響が見られた。90 µg/kg 群の雄では、各経路を完了するまでの時間が対照群と比べて有意に増加したが、エラー数は増加しなかったことから、迷路を完了するまでの時

間の差は、BMN 111 の学習及び記憶に対する作用より、むしろ単に身体状態による水泳能力の低下に起因するものであることが示唆された。雌では差は見られなかった。

生殖能（受胎率）は、90 µg/kg 群で対照群と比較してわずかに低下したが、背景値の範囲内であった。妊娠率及び交配までの平均日数は投与の影響を受けなかったことから、この変動は生物学的な変動の範囲内であり、発生過程における BMN 111 投与に起因する変化ではないと考えられた。黄体数、着床前胚損失率、着床数及び生存胚数に対照群との差が認められ、着床数及び生存胚数は背景値を下回った。これらの差は、2 例の母動物で着床前胚損失率が高かったこと（1 例は黄体が片側のみ存在）に起因しており、BMN 111 投与との関連はないと考えられた。

90 µg/kg 群の雄の全例で 16 週目から、両側脛骨の遠位骨幹及び骨幹端に軽度～重度の X 線透過性亢進が認められた。この変化は、骨の位置異常／断裂及び軽微な骨膜反応と関連していた。高用量群の大部分の雌及び 30 µg/kg 群の雄でも、X 線透過性に対する影響が認められたが、程度は軽減していた。同時点では、90 µg/kg 群の雄の約半数に、軽微～中等度の大腿骨遠位部及び脛骨近位部の X 線透過性亢進が認められた。90 µg/kg 群の雄及び 30 µg/kg 群の少数の雄では、上腕骨近位部、橈骨、尺骨／肘頭、踵骨及び中足骨の骨端でも、軽微～軽度の X 線透過性の亢進が観察された。90 µg/kg 群の雌の大部分と 30 µg/kg 群の雌 1 例では、肘頭部にのみ X 線透過性の亢進が観察された。90 µg/kg 群の雄の約半数及び 90 µg/kg 群の雌 1 例で、脛骨遠位部の位置異常と関連した踵骨の形状異常が観察された。26 週目には、X 線病変は 16 週目に認められた病変と類似しており、主に 90 µg/kg 群の雄で尾椎の椎間腔縮小、側弯／後弯、X 線透過性亢進及び形状異常などの追加所見が認められ、発現頻度及び重症度が増加した。回復期間終了時には、大腿骨近位部及び脛骨遠位部の X 線所見は、90 µg/kg 群の一部の雌で認められた脛骨遠位部の所見を除いて、同じ動物の投与期間終了時と同程度の発現頻度及び重症度であり、大腿骨近位部及び脛骨遠位部の病変と関連する顕著な骨膜反応が認められた。90 µg/kg 群の雌で中足骨、肘頭及び橈骨／尺骨の所見の発現頻度及び重症度が低下し、一部の動物の骨端で部分的な回復が認められた。

X 線検査と同様の傾向として、*in vivo* DEXA では、90 µg/kg 群の雄で 14/15 週目から、大腿骨及び腰椎の BMC 及び BMD が対照群と比較して減少した。26 週目までには、90 µg/kg 群の雌でも BMC 及び BMD の減少が認められた。回復期間終了時には、投与期間中に認められた変化はおおむね継続していた。pQCT による BMD 及び BMC の測定では、BMN 111 投与に関連した類似の影響が認められた。90 µg/kg 群の雌雄では、14/15 週目から投与期間及び回復期間を通じて、脛骨の近位骨幹端で BMD 及び BMC が対照群と比較して減少した。脛骨骨幹の pQCT でも、90 µg/kg 群の雄で BMC、皮質面積及び皮質厚の減少が認められた。25/26 週までには、90 µg/kg 群の雌でもこれらの指標に差が認められた。これらの変化は回復期間終了時まで継続した。

6 週目から、90 µg/kg 群の雄で対照群と比較して、統計学的に有意な脛骨長の増加が認められた。16 週目から、90 µg/kg 群の雌雄で脛骨長、大腿骨長及び腰椎長の増加が認められたが、雌の脛骨長の増加は有意ではなかった。高用量群の雄では上腕骨長の増加も認められた。26 週目には、90 µg/kg 群の雄で頭蓋骨長及び上腕骨長に、雌雄で大腿骨長、脛骨長及び腰椎長に有

意な増加が認められた。90 µg/kg 群の雌で上腕骨長が増加したが、有意差は見られなかった。これらの差は回復期間を通じて継続した。

投与期間終了時に、90 µg/kg 群の雌 8 例中 3 例で軽微な好中球数の増加（対照群と比較して +56%）が認められたが、統計学的有意差はなかった。この増加は、病理組織学的検査及び X 線検査で観察された、骨の変性/壊死に起因するものであった。

30 及び 90 µg/kg 群の雄で血清リンの増加、90 µg/kg 群の雄で血清 ALP の増加及びクレアチニンの減少が認められた。これらの変化は、90 µg/kg 群における骨格の成長及び変性に起因するものであり、高用量群の動物の状態不良（体重の低値及び摂餌量の減少）を反映してクレアチニンが低値であった。

生後 189 日の剖検では、30 及び 90 µg/kg 群で用量依存的に、症状観察及び X 線検査と一致する骨の肉眼的所見が観察されたが、30 µg/kg 群では肉眼的所見と相関する病理組織学的変化は認められなかった。30 及び 90 µg/kg 群の雌雄で、大腿骨頭及び頸部に変色、陥凹又は隆起部位、断裂及びサイズ異常が認められた。90 µg/kg 群の雌雄で、寛骨臼の肥厚及び大腿骨-寛骨臼関節の腫大が見られた。90 µg/kg 群の雄では、脛骨及び脛骨-足根関節の腫大又は隆起部位も見られた。6 週間の回復期間後、生後 231 日の剖検では、大腿骨、脛骨及び関節に同様の肉眼的所見が認められた。軟部組織には、BMN 111 に関連した肉眼的所見は認められなかった。

病理組織学的検査において、生後 189 日に剖検した動物で認められた BMN 111 関連の所見は、30 µg/kg 以上を投与した動物で観察された BMN 111 の過剰な薬理作用に起因する骨格構造の変化のみであり、症状観察、肉眼的所見及び X 線検査所見と一致した。付属骨格（後肢及び前肢）、中軸骨格及び関節の骨に影響が見られた。主な変化として、成長板及び関連する骨幹端に影響が認められた。関節及び関節軟骨も二次的な影響を受けた。性差はほとんど認められなかった。このような病理組織学的変化として、多数の骨で見られた軟骨細胞増殖に対する薬理作用と関連した骨幹端の肥大及び成長板の残存、大腿骨頭/頸部及び寛骨臼の変性/壊死、脛骨の軟骨構造及び骨成長の乱れ、並びに脛骨-足根関節/関節周囲の炎症が認められた。これらの所見は変形性関節疾患又は変形性骨関節炎として記述され、機械的な機能不全を引き起こす過度の成長、及びおそらく組織統合性の欠如を誘発する血管障害に起因すると考えられた。BMN 111 投与に関連した軟部組織の病理組織学的変化は認められなかった。6 週間の休薬期間後、生後 231 日の剖検では尺骨及び橈骨を除いて、多くの骨で認められた病理組織学的所見が依然として存在した。生後 189 日の剖検時と比較して、大腿骨近位部及び寛骨臼の変性/壊死性変化の重症度がわずかに低減し、脛骨遠位部における軟骨構造及び骨成長の乱れの重症度がわずかに増加した。

90 µg/kg 群の動物では、骨幅の減少に相応した骨長の増加が認められた。生後 189 日に剖検した動物では、対照群と比較して 90 µg/kg 群の雌雄のいずれにおいても、BMN 111 に関連した成長板の厚みの増加（雄 9%、雌 15%）が認められた。回復期間終了時には、成長板の厚みの変化は見られなかった。

生後 189 日の剖検で採取した大腿骨の *ex vivo* DEXA の結果は *in vivo* DEXA と一致し、90 µg/kg 群の雌雄で大腿骨全体の BMD が、90 µg/kg 群の雄で BMC が有意に減少した。*Ex vivo* DEXA で評価したいくつかの大腿骨標本（90 µg/kg 群の雄 5 例及び雌 1 例）では、大腿骨頭/頸部の

断裂又は石灰化遅延のため大腿骨頭／頸部が認められず、結果として大腿骨近位部の面積が減少した。90 µg/kg 群の他の標本では大腿骨近位部の面積の増加が観察され、*in vivo* DEXA の結果と一致した。回復期間終了時には、これらの変化は継続していた。

生後 189 日の剖検時に採取した大腿骨の *ex vivo* pQCT では、90 µg/kg 群で骨幹の総面積、皮質面積、皮質 BMD 及び BMC 並びに皮質厚の減少が認められ、雄は全ての項目が統計学的に有意であり、雌は皮質面積及び皮質 BMD のみ有意であった。骨内膜周囲長及び骨膜周囲長も減少した。これらの所見は回復期間を通じて継続した。90 µg/kg 群の雄及び 30 µg/kg 以上の投与群の雌では、同時期に採取した第 4 腰椎の骨全体及び骨梁部の BMD 及び BMC が減少した。この変化は雄では回復期間を通じて継続した。

大腿骨の骨幅、BMD 及び BMC の減少、並びに病理組織学的に観察された退行性変化は、骨の生体力学試験結果に反映された。骨量と骨強度との間には強い相関が認められた。高用量群では骨の破断や採取中に破損があったため、数本の大腿骨は検査が不可能であった。30 µg/kg 以上の投与群の雄及び 90 µg/kg 群の雌では、試験に用いた無傷の大腿骨で最大荷重、剛性、破断エネルギー（曲線下面積 [AUC]）及び強度の減少が認められた。90 µg/kg 群では、第 4 腰椎体の最大荷重、剛性及び AUC も減少を示した。6 週間の回復期間後、30 µg/kg 群の雄では骨生体力学に対する影響が回復したが、90 µg/kg 群では回復が見られなかった。

雌雄の平均血漿中濃度推移から、生後 188 日の BMN 111 曝露量は 10~90 µg/kg の範囲でおむね投与量と共に増加した。BMN 111 の平均濃度は、生後 7 日と比べて連日反復投与後の生後 188 日で高値であった。雌雄共に投与量の増加に応じて BMN 111 曝露量が増加したが、一貫した用量比例性 (1:1) は認められなかった。

生後 7 及び 188 日の TK 測定の時点では、全投与群で BMN 111 濃度に大きな変動（変動係数 [CV%] はほとんどが 40%超）が認められた。BMN 111 は皮下投与後速やかに吸収され、最高濃度到達時間 (T_{max}) は生後 7 日の初回投与後は 5.0 分、26 週間連日投与後の生後 188 日には 5.0~30 分の範囲であった。BMN 111 濃度は C_{max} 到達後急速に低下し、生後 188 日の $t_{1/2}$ は 40.1~44.1 分であった。生後 7 日には、BMN 111 濃度が消失速度定数 (λ_z) の算出に必要な定量可能な濃度レベルに達していなかったため、数種の薬物動態 (PK) パラメーターは全用量について算出することができなかった。

試験の各種エンドポイントで BMN 111 に関連した影響に性差が認められたように、BMN 111 の曝露量は、全ての用量で生後 7 日の C_{max} 並びに生後 188 日の C_{max} 及び AUC_{0-t} が、雌と比べて雄で高値であった（生後 7 日の 90 µg/kg 群の C_{max} を除く）。 C_{max} 及び AUC_{0-t} の雄／雌比は、それぞれ 0.87~12.3 及び 1.60~2.25 であった。10 µg/kg 群の雄を除いて、生後 188 日の C_{max} 値は生後 7 日と比べて高値であった。BMN 111 の $t_{1/2}$ が短いことから、生後 188 日の C_{max} の高値が蓄積に起因する可能性は低く、連日の反復投与及び／又は授乳期から成熟期にかけての生理学的発達によるクリアランスの変化を反映していると考えられる。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は、[2.6.4.3.2.6]項に記載した。

10、30 及び 90 µg/kg の全 3 用量群で ADA が認められ、生後 188 日における ADA 陽性率は 3 用量群とも同程度であった。雌雄で陽性率又は抗体価の平均値／中央値に有意差はなかった。10 及び 90 µg/kg 群では、6 週間の回復期間後、生後 230 日の ADA 陽性率は生後 188 日と比較

して低下した。30 µg/kg 群では、回復期間後も抗体陽性率は維持された。6 週間の回復期間後、抗体価の平均値及び中央値に低下が認められ、用量群を通して平均 72%の低下が認められた。生後 230 日の試料では、雌雄で陽性率又は抗体価の平均値/中央値に有意差は認められなかった。

I型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (CTX-I) 値の差は観察されなかった。90 µg/kg 群の雌並びに 30 及び 90 µg/kg 群の雄では、生後 21 日に骨形成マーカーである I 型プロコラーゲン N 末端ペプチド (PINP) が対照群と比較して低値を示した。その後の測定時点では差は見られなかった。全用量群の雄及び高用量群の雌で、16 及び 26 週目に骨吸収マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ-5b (TRACP-5b) が対照群と比較して高値を示し、90 µg/kg 群の雄では統計学的に有意であった。90 µg/kg 群の雄で、生後 21 日及び 26 週目に軟骨分解マーカーである CTX-II が高値を示し、26 週目には有意であった。雌では差は認められなかった。回復期間終了時には、骨バイオマーカー値は全ての動物で対照群と同程度であった。

結論：

以上より、幼若ラットに BMN 111 を 10、30 及び 90 µg/kg/日の用量で、生後 7~188 日まで連日皮下投与した結果、用量依存的な骨病変の増加、BMC 及び BMD の低下、並びに骨の生体力学的指標の低下が認められた。生体力学的変化は、*in vivo* 観察で認められた四肢及び関節機能の低下、並びに関節の腫脹及び表面の変位による外形異常と相応した。これらの変化は、成長（頭殿長及び尾長）の促進及び BMD・BMC の低下はあるものの、幼若期には *in vivo* で観察されず、ラットが青年期から成熟期（約 8~15 週齢）に達するまで、骨の過成長に関連する臨床症状はほとんど現れなかった。本試験では骨格に対する影響の発現頻度及び重症度に性差が認められたが、これは雄で BMN 111 の曝露量が高いためと考えられた。BMN 111 の投与に関連した幼若ラットの行動及び性成熟への明らかな影響は認められなかった。

BMN 111 を 26 週間皮下投与した幼若ラットの無毒性量は、この用量での所見の発現頻度及び重症度が低かったことから、10 µg/kg/日と判断された。無毒性量における生後 188 日の平均 C_{max} 及び AUC_{0-4} は、それぞれ雄が 680 pg/mL 及び 22,842 pg·min/mL、雌が 527 pg/mL 及び 10,133 pg·min/mL であった。

2.6.6.3.5 BMN111-B3 のテレメトリーシステム装着サルにおける漸増用量設定試験、並びに 7 日間反復皮下投与血行動態、毒性及びトキシコキネティクス試験（第 I 相及び第 II 相）（試験番号[BMN111-09-067]）

試験の目的：

本試験は、サルに BMN 111 を単回皮下投与したときの心血管系機能に対する最大耐量 (MTD) を決定し（試験第 I 相）、次いで MTD 及び MTD の 2.5 倍の用量を 7 日間連続投与した場合の影響を観察すること（試験第 II 相）を目的として実施した。本項では、毒性学的評価に関するデータを記載する。明白な心血管系の臨床症状が見られない場合に、血圧の 10%低下及び/又は心拍数の 25%増加が認められた用量を MTD と定義した。

本試験は、() で実施した。試験期間は 20 年 10 月 9 日~20 年 11 月 4 日であった。[表 2.6.7.6-1]に試験の概要を示す。

材料と方法：

本試験では未使用のカニクイザル雌雄各 4 匹を使用し、試験開始時に約 3 歳齢で体重は 2.2 ~2.7 kg であった。

試験の第 I 相では、BMN 111 を麻酔動物には 1.4、7、14、28 及び 70 µg/kg、覚醒動物には 28、49、70 及び 140 µg/kg の用量で皮下投与した。心血管系の反応を未使用動物と同様に確実にするため、BMN111-B3 の各投与間でおおむね 3 日間のウォッシュアウト期間を設けた。第 I 相の試験デザインを表 2.6.6.3.5-1 に示す。

表 2.6.6.3.5-1 BMN111-B3 のテレメトリーシステム装着サルにおける漸増用量設定試験、並びに 7 日間反復皮下投与血行動態、毒性及びトキシコキネティクス試験（第 I 相）の試験デザイン

Animal ID	BMN111-B3 Dose Level (µg/kg) by Study Day ^{c,d}									
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10
1001	0 ^a	ND	ND	70 ^a	ND	ND	7 ^a	ND	0 ^b	70 ^b
1002	1.4 ^a	ND	ND	28 ^a	ND	ND	14 ^a	ND	0 ^b	140 ^b
1501	0 ^a	ND	ND	7 ^a	ND	ND	70 ^a	ND	0 ^b	70 ^b
1502	1.4 ^a	ND	ND	28 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1003	ND	ND	14 ^a	28 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	49 ^b
1503	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14 ^a	ND	0 ^b	28 ^b

ND, not dosed.

a) Animal was anesthetized.

b) Animal was conscious.

c) Based on analysis of BMN111-B3 used in this study, actual dose concentrations and dose levels were approximately 35% of the nominal values. Doses reported in this table are actual.

d) BMN111-B3 lot CM092309, vehicle lot 092209; 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% (w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

試験の第 I 相終了後、7 日間の休薬期間をおいて、第 I 相で使用した動物から無作為に選択した 4 匹（雄 2 匹 [動物番号 1001 及び 1002]、雌 2 匹 [動物番号 1501 及び 1503]）並びに未使用のサル 2 匹（雌雄各 1 匹）を第 II 相に組み入れた（表 2.6.6.3.5-2）。第 I 相で使用した動物は BMN 111 投与群（28 又は 70 µg/kg）に割り付け、未使用のサルは溶媒対照群に割り付けた。全ての動物に溶媒、BMN 111 の 28 又は 70 µg/kg を 1 日 1 回 7 日間連日皮下投与した後、2 日間休薬した。BMN 111 の投与量は、MTD（28 µg/kg）又は MTD の 2.5 倍に相当する用量を選択した。第 II 相では覚醒動物を使用した。

表 2.6.6.3.5-2 BMN111-B3 のテレメトリーシステム装着サルにおける漸増用量設定試験、並びに 7 日間反復皮下投与血行動態、毒性及びトキシコキネティクス試験（第 II 相）の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^b	Dosing Frequency	No. and Gender per Group
1	vehicle	0	Once daily for seven days	1M/1F
2	BMN111-B3 ^a	28		1M/1F
3		70		1M/1F

F, female; M, male.

a) BMN111-B3 lot CM092309, vehicle lot 092209; 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1%(w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

b) Based on analysis of BMN 111-B3 used in this study, actual dose concentrations and dose levels were approximately 35% of the nominal values. Doses reported in this table are actual.

試験の第 I 相及び第 II 相共に、テレメトリーシステムを動物に装着し、大腿動脈に留置カテーテルを恒久的に埋め込んだ。カテーテルは腰背部を通し、頸部で体表に出した。動物には、皮下に埋め込んだ恒久的カテーテルを用いて遠隔投与した。

ケージサイドの観察は 1 日 2 回行った。動物は有害反応の有無を投与後少なくとも 30 分間連続的に観察し、その後 2 時間は少なくとも 1 時間に 1 回観察した。摂餌量を毎日測定した。体重を第 I 相では試験前に少なくとも 1 回及び各投与の前日に測定し、第 II 相では 1、7、9 日目及び剖検前に測定した。

曝露量、抗体及びバイオマーカーの評価のため、試験期間中に血漿/血液試料を採取したが、分析は行わなかった。

予定日に剖検を実施し、副腎、脳、心臓、精巣上体、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣、胸腺及び上皮小体を含む甲状腺の重量を測定した。大腿骨の骨髓塗抹標本を作製した。肝臓、肺、心臓、腎臓、脳、遠位成長板を含む大腿骨、及び投与部位の皮膚を病理組織学的検査に供した。

結果：

第 I 相では、麻酔に関連した死亡が 4 日目に 1 例発生した。動物番号 1502 は、蘇生処置を施したにもかかわらず麻酔から回復せず、安楽死させた。剖検時の肉眼的検査から、気管内挿管により気道が刺激され、その後咽頭浮腫が生じたことが示唆された。この麻酔後の回復期間中の合併症は手技に関連したものであり、BMN 111 投与とは関連しないと考えられた。

第 I 相及び第 II 相の試験期間中に、BMN 111 と関連する一般状態、摂餌量及び体重の変化は認められなかった。

全動物群で投与部位の皮下組織に炎症及び部分的な出血が認められ、BMN 111 を投与した動物でより顕著であった。

第 II 相では、血液学的検査、臨床化学的検査、尿検査パラメーター、器官の絶対/相対重量及び肉眼的病理所見に変化は認められなかった。病理組織学的検査では、BMN 111 を投与した全ての動物で、骨端成長板の肥大帯に軽微～軽度の拡大が認められたのみであった。これは BMN 111 の作用機序（軟骨細胞形成の促進）から予想された所見であった。

結論：

以上より、覚醒した幼若カニクイザルに BMN 111 を 70 µg/kg までの用量で 7 日間皮下投与したとき、一般状態、摂餌量、体重、器官の絶対/相対重量及び肉眼的病理所見に BMN 111 に関連した変化は認められなかった。組織学的所見は、BMN 111 の作用機序に基づく成長板肥大帯の拡大のみであった。

2.6.6.3.6 BMN 111 のカニクイザルにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-019])

試験の目的：

本試験は、カニクイザルに BMN 111 を 28 日間連日皮下投与した場合の毒性の評価及び TK 測定、並びに 7 日間回復後に影響の可逆性、持続性又は遅発性の影響を評価することを目的として実施した。

本試験は (米国、) において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20 年 4 月 7 日～同年 10 月 21 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.7-4]に示す。試験デザインを表 2.6.6.3.6-1 に示す。

表 2.6.6.3.6-1 カニクイザルの 28 日間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Dosing Frequency and Duration	Dosing Phase: No. and Gender per Group	Recovery Phase: No. and Gender per Group
1	Vehicle ^b	0	Once daily for 28 days	7M/7F	3M/3F
2	BMN 111 ^c	20	Once daily for 28 days	4M/4F	NA
3	BMN 111 ^c	90	Once daily for 28 days	4M/4F	NA
4	BMN 111 ^c	300	Once daily for 28 days	7M/7F	3M/3F

F, female; M, male; NA, not applicable.

a) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg (subcutaneous).

b) Animals in group 1 received vehicle only (0.005 mol/L citrate buffer solution (pH 5.5) in Sterile Water for Injection, USP containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80).

c) BMN 111 lot CM041811-FBDS.

材料と方法：

本試験では未使用の雌雄カニクイザルを使用し、試験開始時に 2~3 歳齢で体重は雄が 2.4~3.4 kg、雌は 2.2~3.1 kg であった。動物を 4 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 20、90 又は 300 µg/kg/日の用量で 1 日 1 回 28 日間皮下投与した。その後、第 1 及び 4 群の雌雄各 3 匹を 7 日間の回復期間に移行した。皮下投与は、肩甲骨間の 2 ヶ所の投与部位を毎日交互に使用して行った。

動物の死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。投与後 15~30 分の詳細な観察を含むケージサイド観察を毎日実施した。詳細な観察及び体重測定を、試験開始前に少なくとも 1 回、投与期間中は 1 及び 2 日目の投与前に、その後は週 1 回実施した。臨床観察及び定性的な摂餌量の測定を 1 日 2 回行った。動物の体重を毎週測定した。試験開始前並びに投与 2、3、5、7、14、21 及び 28 日目 (投与後 1~5 時間) に、高解像度オシロメトリー (HDO) を用

いて血圧を測定した。全動物について試験開始前、投与期間中は週1回及び回復期間に1回、ジャケツト式テレメトリーシステム (JET) を用いて心電図を記録した。

試験開始前に2回、投与29日目及び回復期間7日目に、絶食した動物から血液学的検査、凝固検査及び血液生化学的検査用の血液試料を採取した。試験開始前、29日目及び回復期間7日目の採血前に、一晚絶食した動物から一夜間の尿 (尿検査及び尿化学検査用) を採取した。2及び28日目の投与前、投与後5、15、30、60、120、240、360及び600分に、TK解析用の血漿を採取した。初回投与前、29日目及び回復期間7日目に、毒性評価動物から血清抗体測定用の血液を採取した。毒性評価動物からcGMP (2及び28日目の投与前、投与後30及び60分)、ANP (28日目の投与前、投与後30分、29日目の剖検時、回復期間7日目)、並びにCTX-II (29及び35日目の予定剖検時) 分析用の血液試料を採取した。

予定日に動物を剖検し、以下の組織/器官を採取して重量を測定した。副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、胆嚢 (胆汁を排出) を含む肝臓、肺、卵巣、下垂体、前立腺、唾液腺 (顎下腺)、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、上皮小体を含む甲状腺 (2葉) 及び子宮。剖検後に右大腿骨長を測定した。左大腿骨及び胸骨から骨髓塗抹標本を作製した。全用量群について、各動物の保存組織及び肉眼的病変を病理組織学的検査に供した。加えて、全用量群で胸骨の病理組織学的検査を実施した。H&E染色及びサフラニンO染色による組織学的検査、並びに成長板の静止軟骨、増殖/肥大帯の測定による形態学的評価など、大腿骨の詳細な分析を実施した。

結果:

全例が予定剖検日まで生存した。BMN 111を20、90又は300 µg/kg/日の用量で28日間連日皮下投与した結果、一般状態、摂餌量、体重及び血圧に影響は認められなかった。BMN 111に起因する定性的な心電図の異常所見は認められなかった。300 µg/kg群の雄 (28~42%) 及び雌 (9~33%) では、1日目の投与後2~3時間に心拍数の高値が観察されたが、投与後5時間にはベースラインに戻り、8、15及び22日目には顕著な影響は見られなかった。本試験では、血圧の測定時点が遅く (投与後4時間、最低値は投与後1時間)、覚醒動物にカフを装着して測定したため動物にストレスがかかったことから、一貫した血圧の変化は認められなかった。

BMN 111に関連した投与部位の変化は認められなかった。

BMN 111の20、90又は300 µg/kgを皮下投与した結果、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、尿検査及び尿化学検査に影響は見られなかった。BMN 111に起因する器官重量の変化や肉眼的所見は認められなかった。検査したいずれの組織においても、BMN 111に起因する骨外性石灰化巣は認められなかった。BMN 111の投与により、剖検後に測定した大腿骨長がおおむね増加した (統計学的有意性なし) が、これは幼若動物で予想された薬理作用である。

大腿骨及び胸骨にBMN 111と関連した病理組織学的変化が認められた。BMN 111の薬理活性は、BMN 111を投与した本試験の全群で胸骨成長板の厚さを増加させた。成長板の肥厚は、増殖・成熟・肥大帯の軟骨細胞層の増加を主な特徴とした。この所見の程度は軽微~軽度で、雄がより顕著であり、明らかな用量依存性は認められなかった。BMN 111を投与した動物の胸骨切片の骨化部分は正常に見え、軟骨内骨化が正常に進行したことが示唆された。300 µg/kg群の全例で、7日間の回復期間後も軽微な胸骨成長板の肥厚が継続して認められた。

BMN 111 の 20 µg/kg 以上を投与した動物では、大腿骨の骨端軟骨、一次海綿骨及び骨梁に組織形態学的所見が認められた。大腿骨遠位部の成長板の 3 つの領域（静止軟骨帯、増殖帯及び肥大／石灰化帯）全体の幅と面積から、90 及び 300 µg/kg 群の雌雄で増殖帯及び肥大帯の幅と面積の増加が明らかになった。各領域を合計したデータでは、300 µg/kg 群の雄で成長板の幅の増加、雌で幅と面積の増加が認められた。回復期間終了時には、雌で幅と面積の増加のみが残存した。

一次海綿骨の所見として、厚みの増加、壊死及び血管進入の減少が認められた。骨梁の所見は線維化及び出血であった。これらの所見は、300 µg/kg 群では雌雄の発現頻度及び重症度が同程度であったが、20 及び 90 µg/kg 群では雌と比べて雄での発現頻度が高く重度であった。回復期間の終了時には、一部の BMN 111 関連所見は完全に消失したが、他の所見は低い発現頻度及び重症度で継続して認められた。継続した所見は、骨端軟骨の増殖帯及び肥大／石灰化帯における軟骨細胞の厚みの増加及び崩壊、並びに一次海綿骨における血管侵入の減少であった。投与期間終了時の 29 日目とは異なり、回復期間 7 日目に継続した所見は、雄よりも雌で発現頻度が高く重度であった。

投与期間及び回復期間終了時の病理組織学的所見の概要を、それぞれ表 2.6.6.3.6-2 及び表 2.6.6.3.6-3 に示す。

表 2.6.6.3.6-2 BMN 111 関連の病理組織学的所見の発現頻度及び重症度—投与期間

Dose Level (µg/kg)	Males			Females		
	20	90	300	20	90	300
Sternum Bone						
Number Examined	4	4	4	4	4	4
Increased Thickness, Growth Plate						
Minimal	3	1	1	2	4	3
Slight	1	3	3	2	0	1
Average Severity	1.3	1.8	1.8	1.5	1.0	1.3

Severity scale: 1 = minimal and 2 = slight.

表 2.6.6.3.6-3 BMN 111 関連の病理組織学的所見の発現頻度及び重症度—回復期間

Dose Level (µg/kg)	Males			Females		
	20	90	300	20	90	300
Sternum Bone						
Number Examined	0	0	3	0	0	3
Increased Thickness, Growth Plate						
Minimal	NA	NA	3	NA	NA	3
Average Severity	NA	NA	1.0	NA	NA	1.0

NA, not applicable.

Severity scale: 1 = minimal.

カニクイザルの単回投与毒性及び TK 試験で認められたように、BMN 111 は皮下投与後速やかに吸収され、その後循環血中から消失した。平均 $t_{1/2}$ は、投与 2 日目には全投与群でほぼ同程度であったが、28 日目には 300 µg/kg 群で高値を示した。90 及び 300 µg/kg 群では、2 及び 28 日目の C_{max} と AUC_{0-600m} におおむね性差はなかった。しかし、20 µg/kg 群は定量下限の値が

多くデータが限られるが、2 及び 28 日目共に全般的に雄は雌と比べて BMN 111 の曝露量が高値であった。2 及び 28 日目における平均 C_{max} の雄/雌比はそれぞれ 1.73 及び 1.63、平均 AUC_{0-600m} の雄/雌比はそれぞれ 4.74 及び 4.14 であった。 C_{max} 及び AUC_{0-600m} の平均値は、全般的に 2 日目より 28 日目の方が高く、蓄積比の平均値は 1.22~3.83 であった。BMN 111 の $t_{1/2}$ が比較的短く、28 日目に定量限界未満 (BQL) の濃度が多数あったことを考慮すると、反復投与後の曝露量の増加は蓄積による可能性は低いと考えられる。反復投与後の曝露量の増加から、サルでは BMN 111 の時間依存的な薬物動態が示唆され、これは NPR-C を介したクリアランスの調節など、様々な機序に起因する可能性が考えられた。雌雄の平均濃度-時間プロファイルから、20 から 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ への投与量の増加に伴って、BMN 111 の曝露量が増加することが示される。雌雄の平均血漿中 C_{max} 及び AUC_{0-600m} は、この用量範囲でおおむね用量比を上回って増加した。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.9]項に示した。

本試験では、29 日目に 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雌 1 例 (動物番号 I01451) が抗 BMN 111 抗体陽性を示した。20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で抗 BMN 111 抗体が陽性の雌は、同群の他の雌と比較して血漿中 BMN 111 濃度が低かった。

いずれの測定時点においても ANP 値の変化は認められなかった。これは利尿/ナトリウム排泄に変化がないことと一致し、BMN 111 の 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの皮下投与は ANP 値にも ANP 及び BNP 活性にも影響しないことが示唆された。全ての BMN 111 投与群で、2 及び 28 日目の投与後 30 及び 60 分に、血漿中 cGMP 濃度の上昇が認められた。cGMP 濃度はおおむね投与量の増加に伴って上昇し、ばらつきが大きい 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雄を除いて、2 日目と 28 日目で同程度であった。28 日目の曝露量の増加は cGMP 濃度に影響を及ぼさなかった。20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の抗 BMN 111 抗体が陽性の雌 (動物番号 I01451) は、2 日目に cGMP 濃度の上昇は認められず、28 日目にごくわずかな上昇が見られたのみであった。300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で抗 BMN 111 抗体が陽性の雌 (動物番号 I01464) は、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雌の平均 cGMP 濃度と同程度であった。軟骨リモデリングは軟骨内骨化の一過程であることから、予想されたとおり BMN 111 投与に反応して CTX-II 濃度が上昇した。

結論:

以上より、カニクイザルに BMN 111 を 20、90 及び 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で 28 日間連日皮下投与したとき、忍容性が良好であった。予想された BMN 111 関連の影響として、1) 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群にのみ一過性の心拍数増加、2) 全ての BMN 111 投与群で軟骨内骨化の促進、及び 3) 曝露量が減少した雌 1 例で抗 BMN 111 抗体の産生が観察されたのみであった。雄は大腿骨に雌と比べてより顕著な組織学的変化が認められ、これは雄で観察された高い曝露量と一致していた。胸骨及び大腿骨で観察された成長板の所見は BMN 111 の作用機序と一致しており、回復期間終了時には部分的な回復が見られたことから、これらの変化は有害所見とは判断しなかった。これらの組織学的変化は、高用量の BMN 111 を投与した正常動物における、BMN 111 の過剰な薬理作用に起因すると考えられた。予想されたとおり、cGMP 及び CTX-II 濃度が BMN 111 投与に反応して増加した。ANP 濃度に変化はなかった。

本試験で毒性標的器官は特定されず、BMN 111 を 28 日間連日皮下投与した場合の無毒性量は 300 µg/kg/日であった。無毒性量における平均 C_{max} 及び AUC_{0-600m} は、雄が 132,071 pg/mL 及び 11,646,607 pg·min/mL、雌は 144,357 pg/mL 及び 10,673,021 pg·min/mL であった。

2.6.6.3.7 BMN 111 のカニクイザルにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 28 日間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-035])

試験の目的:

本試験は、若齢/青年期のカニクイザルに BMN 111 を 26 週間連日投与した場合の毒性評価及び TK 測定、並びに 28 日間回復後に毒性所見の可逆性又は遅発性の影響を評価することを目的として実施した。本試験は、成長板閉鎖の平均月齢(雄:57 ヶ月齢、雌:63 ヶ月齢[Kilborn 2002])に達していない、性的に未成熟な 2~3 歳齢のサルを用いて実施した。

本試験は (米国、) において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20 年 5 月 26 日~20 年 2 月 7 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.7-5]に示す。

材料と方法:

本試験では 2~3 歳齢の雌雄カニクイザルを使用し、試験開始時の体重は雄が 2.1~2.7 kg、雌は 2.1~2.9 kg であった。動物を 4 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 20、90 及び 300 µg/kg/日の用量で 1 日 1 回 26 週間、肩甲骨間の 4 ヶ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には 5 ヶ所目の未使用の部位を使用した。試験デザインを表 2.6.6.3.7-1 に示す。

表 2.6.6.3.7-1 幼若サルの 26 週間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Number and Gender per Group	
			Main Study	Recovery Study
1	Vehicle ^b	0	4M/4F	3M/3F
2	BMN 111 ^c	20	4M/4F	NA
3		90	4M/4F	NA
4		300	4M/4F	3M/3F

F, female; M, male; NA, not applicable.

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle composition: 0.005 mol/L citrate buffer solution, pH 5.5, containing 5.8% (w/v) trehalose dihydrate, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 prepared in Sterile Water for Injection, USP.

c) Three lots of BMN 111 were used during the study: CM052711-FBDS, CM050611-FBDS and 2011-111-11-101711.

動物の死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。投与後 15~30 分の詳細な観察を含むケージサイド観察を毎日 1 回実施した。詳細な観察を試験開始前に少なくとも 1 回、1 日目の投与前、試験期間を通じて週 1 回及び予定剖検日に実施した。体重は試験開始前に週 1 回、投与開始の前日、1 日目の投与前、その後週 1 回測定した。定性的な摂餌量の測定を試験期間中毎日実施した。

試験開始前、投与 3、8、15、22 及び 29 日目、その後試験期間を通じて月 1 回血圧を測定した。無麻酔の動物で HDO を使用して血圧を測定した。HDO による試験開始前の血圧測定は、予定投与時間とほぼ同時刻 (±2 時間) に実施した。投与期間中の血圧測定は、投与後 1 時間±30 分に実施した。

試験群に割り付ける 1 週間前に麻酔下の動物で心電図を記録し、何らかのリズム異常の有無をスクリーニングした。試験群への割付け後、投与開始前に 1 回、投与 2 日目、その後の試験期間中月 1 回、JET を使用して無麻酔の動物で心電図を記録した。投与開始前及び回復期間には、朝から開始して 20 時間以上心電図を記録した。投与期間中は投与前に 1.5 時間以上、投与後は 20 時間以上心電図を記録した。投与後約 0.75、1、2、4 及び 10 時間に記録した 1~1.5 分間の心電図について、定性的評価（投与開始前及び回復期間に記録した心電図との比較）を行った。定性的評価で選択した心電図波形のセグメントについて定量的評価を行い、PR、QT 及び QTc 間隔並びに QRS 持続時間を測定した。心電図データは、ベースライン（投与開始前）、ブロック 1（投与後の明期）及びブロック 2（投与後の暗期）の 3 つの解析ブロックに分類した。

麻酔動物を用いた DEXA スキャンを投与開始前に 1 回、投与期間の 13 及び 25 週目にそれぞれ 1 回、並びに回復期間の 3 週目に 1 回実施した。この DEXA により、右脛骨の近位成長板幅、右大腿骨、右脛骨及び右上腕骨長を計測し、全身及び局所の BMC 及び BMD を測定した。右足根関節もスキャンしたが測定は行わなかった。症状観察で股関節に異常が認められた動物は、最初の見所観察から期間を空けて股関節の DEXA スキャンを実施した。

投与開始前に 2 回、投与期間の 13 及び 26 週目並びに回復期間の 28 日目に、臨床病理検査用の血液を採取した。投与開始前に 1 回、投与期間の 13 及び 26 週目並びに回復期間の 28 日目に、尿検査及び尿化学検査用の試料を採取した。

26 週間連日皮下投与した後、雌雄各 4 匹/群を絶食させ、体重を測定して安楽死させた。さらに 28 日間の回復期間の後、生存動物の全例を絶食させ、体重を測定して安楽死させた。全例について詳細な剖検を行った。以下の器官を摘出し重量を測定した。副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、胆嚢含む肝臓、肺、下顎腺、卵巣、下垂体、前立腺、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、上皮小体を含む甲状腺及び子宮（対器官は両側を合わせて測定）の重量を測定した。各動物の胸骨から骨髓塗抹標本作製したが、検査は実施しなかった。

全身の組織/器官を摘出し、ホルマリンで保存して病理組織学的検査を実施した。各雄から精巣及び精巣上体を採取し、顕微鏡下で精子形成ステージ分析を実施した。

第 1~4 腰椎の長さ、大後頭孔（縦横）及び頭蓋骨（縦横）の骨長測定を行った。左大腿骨及び第 3 腰椎を採取し、骨の生体力学試験を行った。各大腿骨の中央を pQCT でスキャンし、その後 3 点屈曲試験を行った。各動物の第 3 腰椎について圧迫試験を実施した。44 例から大腿骨及び頭蓋冠を採取し、脱灰してパラフィン包埋し、骨の形態計測及び病理組織学的検査を行った。

1、85 及び 176 日目の投与前、投与後 5、15、30、60、120、240、360 及び 600 分に、TK 解析用の血漿を採取した。バリデートされた ELISA 法を使用して分析を実施した。

投与開始前に 1 回、投与期間の 13 及び 26 週目、並びに回復期間の最終週に 1 回、抗 BMN 111 抗体測定用の血清を採取した。バリデートされた ECLA 法を使用して試料を分析した。

血漿中 cGMP 濃度測定用の試料を投与開始前に 1 回、13 及び 26 週目の投与前、投与後 30 及び 60 分に採取した。バリデートされた ELISA 法を用いて血漿試料を分析した。

骨関連バイオマーカー測定用の血清は、投与開始前、投与 13 及び 26 週目並びに予定剖検日の朝採取した。P1NP、CTX-II、CTX-I、オステオカルシン（OC）、I 型コラーゲン架橋 N-テロ

ペプチド (NTx) 及び骨型アルカリホスファターゼ (BSAP) を ELISA 又はラジオイムノアッセイ法を用いて測定した。

血漿中 ANP 及び BNP は、投与開始前に 1 回、13 及び 26 週目の投与前、投与後 30 及び 90 分、並びに回復期間の最終週に 1 回採取した試料で測定した。バリデートされた ELISA 法を用いて試料を分析した。

結果：

全例が予定剖検日まで生存した。

摂餌量、体重、心電図、血圧、臨床病理検査、器官重量及び骨の生体力学的指標に、BMN 111 と関連する変化は認められなかった。

BMN 111 に関連した一般状態の変化は、300 µg/kg 群の動物 (雄 7 例中 4 例、雌 7 例中 1 例) で認められた、後肢及び股関節の機能への影響のみであった。雄 1 例では、股関節の可動域の減少が投与 88 日目の早期に発現し、その後投与期間終了にかけて (約 21 週目) は股関節が非可動状態となった。これらの影響は回復期間を通じて継続し、28 日間の休薬期間中にも別の雄で発現が見られた。これらの所見が発現した雄では、85 日目の C_{max} が同群で所見が発現しなかった動物と比べて 2~15 倍高値であった。

BMN 111 の連日投与により、全身骨格並びに右大腿骨及び脛骨/腓骨の局所で測定した BMC 及び BMD に影響は認められなかった。動物の全身的成長のため全群を通じて、BMC は試験の進行と共におおむね増加したが、BMD は試験期間中に比較的变化がなかった。BMN 111 の投与により、用量依存的な長骨 (脛骨、大腿骨及び上腕骨) の成長増加を誘発した。この作用は脛骨及び上腕骨でより顕著であり、高用量 (90 µg/kg 以上) では平均成長速度に統計学的有意差が認められた。対照群及び投与群の動物で 13~25 週目の間に成長速度が全般的に遅くなり、回復期間終了時には差が見られなかった。この成長速度の増加は、90 µg/kg 以上を投与した動物における脛骨成長板幅の増加に対応しており、90 µg/kg 以上を投与した雄及び 300 µg/kg を投与した雌で有意であった。

股関節及び後肢の機能低下の臨床症状と一致して、投与期間終了時の剖検では、影響が認められた 300 µg/kg 群の雌雄各 1 例で両側の大腿骨頭に異常が観察された。剖検時に両側の大腿骨頭に異常が認められた 300 µg/kg 群の雄について、寛骨臼蓋窩を病理組織学的に検査した。右寛骨臼を形成する骨の硝子軟骨の成長中心は、左寛骨臼と比較して組織性が欠如し肥大していた。両側の寛骨臼の関節軟骨は変性していた。左寛骨臼には、多巣性のびらん及び線維化が認められた。右寛骨臼では、関節軟骨及びその下の硝子軟骨の大部分が辺縁からほぼ中心まで欠如し、肉芽性組織に置換していた。右寛骨臼の残りの部分では、関節軟骨の変性は広範囲の軟骨下裂と限局性の嚢胞性変化を特徴とした。回復性試験の動物から寛骨臼の標本を採取しなかったため、これらの病変の回復性は評価できなかった。

投与期間終了時に剖検した動物では、胸骨の成長板の幅が軽微~軽度に増加し、その発現頻度及び重症度は用量と共に増加した。28 日間の回復期間後、300 µg/kg 群の胸骨成長板の幅は正常であった。

第 1~4 腰椎長、大後頭孔及び頭蓋骨の測定値に BMN 111 に関連した変化はなかった。

BMN 111 の連日投与により、投与期間終了時に全投与群で、対照群と比べて大腿骨の近位成長

板の面積及び幅が用量依存的に増加した。病理組織学的検査では、骨端軟骨の増殖帯及び肥大／石灰化帯で厚みの増加が認められたが、いずれの投与群でもおおむね軽微～軽度であった。90 µg/kg 以上の投与群の雌雄では、増殖帯に軟骨細胞の配列の乱れも観察された。一次海綿骨の肥厚も全投与群で認められた。この所見は雌では回復期間終了時までには回復したが、300 µg/kg 群の雄では3例中2例で依然として観察された。これらの所見は骨格の成長に対するBMN 111の薬理作用と一致し、ラットにおけるこれまでの観察結果とも一致する。

対照群を含むほとんどの動物で、投与部位に血管周囲性白血球浸潤（リンパ球／マクロファージ及び好酸球）、急性炎症、毛幹を中心とした肉芽腫性炎症の小病巣、出血、線維化及び皮下筋の変性／再生などの所見が、様々な組み合わせで認められた。投与部位に所見が認められた場合には、その程度は軽微又は軽度であった。全体として、投与動物では血管周囲性浸潤の発現頻度及び重症度がわずかに高く、BMN 111は溶媒単独よりもやや刺激性が強いことが示唆された。全ての投与部位について、BMN 111を投与した動物ではリンパ球／マクロファージ及び好酸球浸潤の発現頻度／重症度が対照群よりも高かったが、明らかな用量依存性はなかった。また、最終投与部位（未投与の5番目の部位）では、90 µg/kg以上を投与した雌で急性炎症の発現頻度／重症度がやや高かった。回復性試験の動物では所見の回復性を反映して、全体的な投与部位所見の発現頻度及び重症度が、投与期間終了時よりも低下した。

年齢、体重及び精巣の形態学的評価から、20及び300 µg/kg群の雄各1例は投与期間終了時に思春期前後と考えられた。投与期間終了時に剖検した残りの雄及び回復期間終了時に剖検した雄は全て性成熟前であった。思春期前後の動物では、精子形成に明らかな影響は認められなかった。

投与85日目に20 µg/kg群の雄4例中3例及び雌4例中2例、176日目に20 µg/kg群の雄4例中3例及び雌全例、並びに90 µg/kg群の雄1例ではBMN 111が検出されなかったことから、85及び176日目のTK評価には限界があった。20 µg/kg群のデータは限られているため、この用量群との比較は注意が必要である。雌雄の平均濃度－時間プロファイルでは、20 µg/kgから300 µg/kgへの投与量の増加に伴って、BMN 111の曝露量が増加したことを示している。しかし、BMN 111の血漿中濃度は大きく変動することが明らかとなった（CV% > 30%）。したがって、算出したPKパラメーターは大きく変動した（CV% > 30%）。雌雄の平均C_{max}及びAUC_{0-600m}の増加は、概して投与量比を上回った。これまでに実施した試験で観察されたように、皮下投与したBMN 111は速やかに吸収され、その後循環血中から消失した。BMN 111の平均曝露量は、C_{max}及びAUCから見て一貫した性差は認められず、性差はおおむね2倍未満であった。20及び90 µg/kg群では、初回投与後と比べて85及び176日目の曝露量がおおむね低かったが、例数が少ないことから計算値には限界がある。一方、300 µg/kg群の曝露量は、初回投与後よりも85及び176日目がおおむね高値であった。本試験におけるBMN 111のTKに関する詳細は、[2.6.4.3.2.10]項に記載した。

一部の動物で85及び176日目にADAが検出され、20 µg/kg群で8例中7例（88%）、90 µg/kg群で8例中2例（25%）、300 µg/kg群では14例中5例（36%）がADA陽性であった。85日目にADA陽性の動物は、全てが176日目も陽性のままであった。20 µg/kg群でADA陽性の発現率が高かったのは、高用量を投与した動物で抗体検出法における薬物干渉が原因の可能性が考

えられる。第3及び4群の各投与前の最高薬物濃度 (1.03 ng/mL) は、同検査法による薬物検出濃度 (10 ng/mL) よりもわずかに低かった。したがって、第3及び4群で抗体検出率が低かったことに、薬物干渉が何らかの役割を果たした可能性がある。薬物のウォッシュアウト後に、ADAについて検体の再検査を行わなかったため、確定的な判定はできない。これ以外の低用量群における高い ADA 発現率の説明として、高用量群における免疫寛容作用が考えられる。これらの動物の濃度-時間データをプロットして視覚的に調べたところ、ADA 陽性又は抗体価による TK への決定的な影響は見られなかった。20 µg/kg 群の 85 及び 176 日目の TK データが限られているため、TK に及ぼす ADA の影響の評価には限界があった。

BMN 111 の投与により、血漿中 cGMP 濃度が用量依存的に増加した。

300 µg/kg 群の雌雄で、投与後 30 及び 60 分に血漿中 cGMP 濃度の有意な上昇が認められた。(13 週目の投与後に測定した cGMP 濃度は、雄の投与後 30 分を除いて、いずれも投与前値の 243~462%であった。統計学的有意差は認められなかった。) また、90 µg/kg 群の雌では、26 週目の投与後 30 分に血漿中 cGMP 濃度の有意な上昇が認められた (投与前値の 174%)。投与 13 週目と 26 週目の cGMP 濃度が同程度であったことから、BMN 111 の薬力学的作用は 26 週間の連日投与で明らかな変化を示さないことが示唆された。

BMN 111 の連日投与により、90 µg/kg 以上を投与した動物で投与期間中に CTX-II (コラーゲン分解マーカー) の増加が認められた。しかし、回復期間中には逆に軟骨構造の回復を示す病理組織学的所見が観察された。骨形成マーカーの P1NP 及び BSAP が用量反応的な軽度の増加を示し、BMN 111 の薬理作用と関連した用量依存的な骨格成長の増進と一致した。

13 及び 26 週目の投与後約 30 及び 90 分、並びに予定剖検日に測定した血漿中 ANP 及び BNP 濃度はデータのばらつきが大きく、BMN 111 の投与は ANP 及び BNP の濃度に明らかな影響を示さないと考えられた。

結論：

以上より、カニクイザルに BMN 111 を 20、90 又は 300 µg/kg/日の用量で 26 週間連日皮下投与したときの忍容性は良好であった。BMN 111 に関連する影響は、骨格の成長及びそれに関連した運動機能の変化のみであった。雄で認められた重要な臨床症状は、85 日目における各動物の曝露量 (C_{max}) の違いが反映されると考えられた。この曝露量との関連は、臨床症状に影響が見られた雌 1 例では明らかではなかった。投与部位における軽度の刺激性増加は、BMN 111 の連日投与に起因し、被験物質に対する免疫反応に関連する、あるいは、それによって増強された可能性が考えられた。300 µg/kg を投与した動物で持続的な骨及び関節の臨床症状が認められたことから、カニクイザルに BMN 111 を連日長期反復投与したときの無毒性量は 90 µg/kg/日と判断された。無毒性量における投与 176 日目の C_{max} は 10,984 pg/mL、 AUC_{0-600m} は 523,098 pg·min/mL であった。

2.6.6.3.8 BMN 111 のカニクイザルにおける 44 週間反復皮下投与 (連日) 毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験 (試験番号[BMN111-11-043])

試験の目的：

本試験は、カニクイザルに BMN 111 を 44 週間以上連日皮下投与した場合の毒性評価及び TK 測定、並びに 13 週間回復後に毒性所見の可逆性、持続性又は遅発性の影響を評価することを目的として実施した。本試験は、骨成長に対する BMN 111 の薬理作用を軽減し、より多くの動物が投与期間中生存して長期投与による毒性作用を評価できるよう、ラットの 26 週間反復投与毒性試験（試験番号 BMN111-11-036、2.6.6.3.3 項）と同様に年齢の進んだ成熟動物を用いて実施した。また、年齢の進んだ動物を使用することにより、性成熟した霊長類における BMN 111 の長期投与の影響を評価することが可能となった。

本試験は [REDACTED] (米国、[REDACTED]) において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20[REDACTED] 年 7 月 25 日～20[REDACTED] 年 8 月 29 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.7-6]に示す。

材料と方法：

本試験では 4～5 歳齢の雌雄カニクイザルを使用し、試験開始時の体重は雄が 2.6～5.4 kg、雌は 2.8～4.1 kg であった。

動物を無作為に 4 群に割り付け、溶媒又は BMN 111 を 25、75 及び 250 µg/kg/日の用量で 1 日 1 回 44 週間、肩甲骨間の 4 ヶ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には 5 ヶ所目の未使用の部位を使用した。試験デザインを表 2.6.6.3.8-1 に示す。

表 2.6.6.3.8-1 カニクイザルの 44 週間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Dosing Frequency	Dosing phase: No. and Gender per Group	Recovery Phase: No. and Gender per Group
1	Vehicle ^b	0	Once daily for 44 weeks	4M/4F	3M/3F
2	BMN 111 ^c	25		4M/4F	NA
3		75		4M/4F	NA
4		250		4M/4F	3M/3F

F, female; M, male; NA, not applicable.

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle composition: 0.005 mol/L citrate buffer solution, pH 5.5, containing 5.8% (w/v) trehalose dihydrate, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 prepared in Sterile Water for Injection, USP.

c) Four lots of BMN 111 were used during the study: CM050611-FBDS, 2011-111-11-101711 (P2204-11001), P2204-11003, and P2204-12001.

動物の死亡、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。ケージサイド観察は、投与後 15～30 分に 1 日 1 回実施した。詳細な観察を試験開始前に少なくとも週 1 回、2 日目の投与前、試験期間を通じて週 1 回及び予定剖検日に実施した。体重は試験開始前に週 1 回、投与開始の前日、2 日目の投与前、その後週 1 回測定した。定性的な摂餌量の測定を試験期間中毎日実施した。

有資格の獣医眼科医による直接及び間接眼科的検査を、試験開始前及び投与 28、81、178 及び 304 日目に 1 回実施した。

試験開始前、並びに 1、3、12、24、36 及び 44 週目に各 1 回血圧を測定した。無麻酔の動物で HDO を使用して血圧を測定した。HDO による試験開始前の血圧測定は、予定投与時間とほぼ同時刻 (±2 時間) に実施した。投与期間中の血圧測定は、投与後 1 時間±30 分に実施した。

試験群に割り付ける1週間前に麻酔下の動物で心電図を記録し、何らかのリズム異常の有無をスクリーニングした。試験群への割付け後、投与開始前に1回、投与1、19、80、164、248及び305日目、並びに回復期間の17日目に、JETを使用して無麻酔の動物で心電図を測定した。投与開始前及び回復期間には、朝から開始して20時間以上心電図を記録した。投与期間中は投与前に1.5時間以上、投与後は20時間以上心電図を記録した。投与後約0.75、1、2、4及び10時間に記録した1~1.5分間の心電図について、定性的評価（投与開始前及び回復期間に記録した心電図との比較）を行った。定性的評価で選択した心電図波形のセグメントについて定量的評価を行い、PR、QT及びQTc間隔並びにQRS持続時間を測定した。心電図データは、ベースライン（投与開始前）、ブロック1（投与後の明期）及びブロック2（投与後の暗期）の3つの解析ブロックに分類した。

雌は試験期間を通じて投与開始前8日目から毎日、膣スワブ検体による月経の評価を行った。

麻酔動物を用いたDEXAスキャンを投与開始前に1回、投与期間の13、24、36及び44週目にそれぞれ1回、並びに回復期間の7及び13週目に1回実施した。このDEXAにより、右脛骨の近位成長板、並びに右大腿骨、右脛骨及び右上腕骨長を計測し、全身及び局所のBMC及びBMDを測定した。右足根関節もスキャンしたが測定は行わなかった。投与24週目及び回復期間7週目に、一部の動物について股関節のDEXAスキャンを実施した。

投与開始前に3回、投与期間の4、12、24及び36週目並びに回復期間の13週目に、臨床病理検査用の血液を採取した。投与開始前に1回、投与期間の4、12、24及び36週目並びに回復期間の13週目に、尿検査及び尿化学検査用の試料を採取した。

44週間連日皮下投与した後、雌雄各4匹/群を絶食させ、体重を測定して安楽死させた。さらに13週間の回復期間の後、生存動物の全例を絶食させ、体重を測定して安楽死させた。全例について詳細な剖検を行った。以下の器官を摘出し重量を測定した。副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、胆嚢を含む肝臓、肺、下顎腺、卵巣、下垂体、前立腺、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、上皮小体を含む甲状腺及び子宮（対器官は両側を合わせて測定）の重量を測定した。各動物の胸骨から骨髓塗抹標本作製したが、検査は実施しなかった。

全身の組織/器官を採取し、ホルマリンで保存した。肉眼的病変（骨の異常）の病理組織学的検査を実施し、他の全ての組織は検査を実施せずに保存した。

第1~4腰椎の長さ、大後頭孔（縦横）及び頭蓋骨（縦横）の骨長測定を行った。左大腿骨及び第3腰椎を採取し、骨の生体力学試験を行った。各大腿骨の中央をpQCTでスキャンし、その後3点屈曲試験を行った。各動物の第3腰椎について圧迫試験を実施した。44例から大腿骨及び頭蓋冠を採取し、脱灰してパラフィン包埋し、骨の形態計測及び病理組織学的検査を行った。

精子の形態、運動性及び総精子数を調べるために、各雄動物から右の精管及び精巣上体を採取した。精巣の容積（左右別個に測定）も記録した。BMN 111を投与した全ての雄の精巣について、顕微鏡下で精子形成ステージ分析を実施した。

2日目、4、12及び44週目の投与前、投与後5、15、30、60、120、240及び360分に、TK解析用の血漿を採取し、最終投与後24時間にも追加で採取した。回復期間は8日目及び4週目

に血漿試料を採取した。血漿の分析は当初バリデートされた ELISA 法を用いて Intertek 社で実施したが、BioMarin 社でバリデートされた ELISA 法により再分析を実施した。

投与開始前に 1 回、投与期間の 4、12、24 及び 44 週目、並びに回復期間の 13 週目に 1 回、抗 BMN 111 抗体測定用の血清を採取した。バリデートされた ECLA 法を使用して試料を分析した。

血漿中 cGMP 濃度測定用の試料を投与開始前に 1 回、4、12、24 及び 44 週目の投与前、投与後 30 及び 60 分に採取した。最終投与後 24 時間に追加の試料を採取した。回復期間には、8 日目及び 4 週目に試料を採取した。バリデートされた ELISA 法を用いて血漿分析した。

骨関連バイオマーカー測定用の血清は、投与開始前、投与 12、24、36 及び 44 週目、並びに回復期間 13 週目の朝採取した。PINP、CTX-II、CTX-I、OC、NTx 及び BSAP を ELISA 法又はラジオイムノアッセイ法を用いて測定した。

血漿中 ANP 及び BNP は、投与開始前に 2 回、4、24 及び 44 週目の投与前、投与後 30 及び 90 分、並びに回復期間の 13 週目に 1 回採取した試料で測定した。ELISA 法により試料を分析した。

血清中テストステロン及びインヒビン-B 測定用の試料を、投与開始前は 1 週毎に 3 回（試験 8 日目から開始）、投与期間及び回復期間は月 1 回採取したが、これらの試料は分析しなかった。

結果：

全例が予定剖検日まで生存した。

体重、摂餌量、眼科的検査、月経周期、血圧、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、BMC、BMD、大後頭孔の大きさ、大腿骨の生体力学試験、頭頂骨の組織形態計測、器官重量、精子数・形態・運動性、精巣容積及び精子形成に明らかな BMN 111 の影響は認められなかった。

BMN 111 の薬理作用に起因する臨床症状が認められ、250 µg/kg 群の雄 5 例及び雌 1 例、並びに 75 µg/kg 群の雄 1 例で後肢の可動性低下が観察された。この臨床症状は、高用量群の雄では投与 21 週目という早期に現れた。

投与期間中に実施した DEXA スキャンでは、後肢の可動性低下の原因となる股関節異常を示す明らかな所見は認められなかったが、回復期間 7 週目に高用量群の 1 例をスキャンしたところ、大腿骨頭が左右非対称で X 線透過性の亢進が認められた。また、大腿骨頭の軽度脱臼が見られ、臼蓋窩は浅く不整形であった。大腿骨頸部に骨の突起を示す所見も認められた。これらの臨床所見は、250 µg/kg 群の雌雄及び 75 µg/kg 群の雄で剖検時に認められた大腿骨頭の異常と関連していた。高用量群の動物では、回復期間を通じてこれらの所見が継続した。

250 µg/kg 群の雄では、投与直後に活動性低下及び一時的な横臥が数回認められたが、これはハンドリング後の股関節の不快感と疼痛に起因するものと考えられた。本試験で血圧低下は観察されていないが、この影響は BMN 111 を同程度の用量で投与した霊長類で観察された血圧低下と関連する可能性が考えられた。

250 µg/kg 群では 305 日目に、ブロック 1 の心拍数が対照群と比較して雄で 33 bpm、雌で 47 bpm 増加し、BMN 111 投与との関連が見られた。これらの動物では、心拍数の増加に伴って QT 間隔が短縮した。25 及び 75 µg/kg 群では、心拍数及び QT 間隔に明らかな影響は認められなかつ

た。他の心電図パラメーターである PR 間隔、QRS 間隔及び QTc 間隔にこれ以上の変化は認められず、リズム異常も観察されなかった。

BMN 111 に関連した尿検査及び尿化学的検査パラメーターの変化として、250 µg/kg 群の雌で 304 日目に尿 pH の軽微な低下が観察されたのみであるが、回復期間中に回復した。

DEXA スキャンで観察されたように、75 及び 250 µg/kg 群の雌雄で対照群と比較して骨長が増加したが、これらの群の雌雄では投与開始前の骨長が対照群と比べて短いことから、群間比較に影響が見られた。骨長の増加をベースライン（投与開始前）と比較した場合、75 及び 250 µg/kg 群は 44 週目に有意であり、250 µg/kg 群は 13 週目と比較して 24 週目に有意に増加した。骨長の変化は 24 から 36 週目の間はそれほど顕著ではなく、36 から 44 週目の間は対照群と投与群の間で同程度であった。75 及び 250 µg/kg 群で、脛骨の近位成長板幅が用量依存的に増加した。投与 44 週目までに対照群の動物では成長板はおおむね閉鎖したが、75 µg/kg 群の一部の動物及び、特に 250 µg/kg 群の動物では未閉鎖の状態が継続し、成長板幅が増加した。13 週間の回復期間の後、全ての動物で成長板が閉鎖した。

剖検では、75 µg/kg 以上の投与群の雄及び 250 µg/kg 群の雌で、肉眼的所見として大腿骨、寛骨臼、脛骨、膝蓋骨、上腕骨、肩甲骨及び尺骨など、骨に対する影響のみが認められた（表 2.6.6.3.8-2）。これらの変化は、関節軟骨のびらん、線維軟骨の存在、関節周囲性外骨腫、及び滑膜の肥厚／線維化などの病理組織学的所見と合致した（表 2.6.6.3.8-3）。回復性試験の剖検では、250 µg/kg 群の雄で投与終了時剖検と同様の肉眼的な骨変化が継続していた。250 µg/kg 群の雄 1 例では、上腕骨頭部に不完全な断裂（軽微）が認められた。BMN 111 を投与した動物では、病理組織学的検査で成長板の肥厚が観察され、DEXA スキャンによる観察結果と関連していた。

投与部位の病理組織学的検査では、BMN 111 は溶媒よりもやや刺激性が強く、特に反復投与した部位で強いことが示唆された。特に 75 µg/kg 以上を投与した雌では、投与部位で単核細胞の血管周囲性浸潤及び線維化が用量依存的に増加した。13 週間の回復期間後、これらの変化は全ての動物で完全には回復せず、一部の動物では軽微な単核浸潤が認められ、250 µg/kg 群の雄 1 例では 1 ヶ所に軽微な線維化が認められた。最終投与に使用した部位では、急性炎症の発現頻度・重症度の用量依存的な増加は見られず、回復期間終了時にこの部位で明らかな変化は認められなかった。

表 2.6.6.3.8-2 投与期間終了時における BMN 111 関連の肉眼的所見の発現頻度

Dose Level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Males				Females			
	0	25	75	250	0	25	75	250
Number Examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Femur								
Abnormal shape ^a	0	0	0	1	0	0	0	1
Depressed area	0	0	1	2	0	0	0	0
Raised area	0	0	1	3	0	0	0	2
Fracture	0	0	0	2	0	0	0	0
Thickened joint capsule ^a	0	0	0	1	0	0	0	0
Bone, Other ^b								
Abnormal shape ^a	0	0	0	1	0	0	0	0
Depressed area	0	0	1	2	0	0	0	0
Raised area	0	0	0	0	0	0	0	1
Shallow acetabulum ^a	0	0	0	2	0	0	0	0
Luxation ^a	0	0	0	0	0	0	0	1

a) All or some recorded as a tissue comment or an observation comment.

b) Pelvis (acetabulum), tibia, patella, humerus, scapula, and/or ulna.

表 2.6.6.3.8-3 投与期間終了時における BMN 111 関連の病理組織学的所見の発現頻度

Dose Level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Males				Females			
	0	25	75	250	0	25	75	250
Bone, Other ^a								
Number Examined	1	0	1	2	1	0	0	1
Increased Thickness, Growth Plate								
Slight	0	0	0	2	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Erosion, Articular Cartilage								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	1	2	0	0	0	0
Exostosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Fracture								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Fibrosis, Joint Capsule								
Moderate	0	0	1	1	0	0	0	0
Marked	0	0	0	1	0	0	0	0
Hyperplasia, Synovium								
Slight	0	0	1	0	0	0	0	0
Sternum								
Number Examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Increased Thickness, Growth Plate								
Minimal	0	0	0	0	0	4	4	4

a) Pelvis (acetabulum), tibia, humerus, scapula, and/or ulna.

回復期間終了時に BMN 111 を投与した動物で頭蓋骨長及び第 1~4 腰椎長に差が認められたが、評価動物数が少ないため投与との関連は不明であった。同様に、投与期間終了時に第 3 腰椎圧迫パラメーターの低下は認められなかったが、回復期間終了時には低下が認められた。

大腿骨の病理組織学的変化は、骨端、骨幹端及び骨幹部にのみ認められた。骨端及び骨幹端で認められた唯一の所見は骨梁の厚みの増加であった。骨幹端では、成長板の完全又は不完全閉鎖、増殖帯の軟骨細胞増殖及び軟骨肥大帯の厚みの減少が観察された。成長板の完全又は不完全閉鎖の発生率が、75 µg/kg 以上の投与群よりも対照群及び低用量群の方がやや高かったことから、BMN 111 による成長板閉鎖の遅延が示唆されたが、動物数及び発生数が少なかったことから、確定的な結論を下すことはできなかった。関節軟骨に組織学的異常は見られなかった。回復期間後の剖検でも同様の所見が認められ、対照群の方が高用量群と比べて成長板の閉鎖が進んでいた。また、成長板の増殖帯における軟骨細胞の増殖は、対照群の雌雄いずれにも認められなかったが、回復期間後の剖検時に 250 µg/kg 群の雌雄全例で軽微な軟骨細胞増殖が認められた。

250 µg/kg 群の雄では、投与期間中に大腿骨遠位部の増殖帯及び成長板の面積と幅が増大した。回復期間の動物では、250 µg/kg 群の雄で成長板全体の幅が減少した。雌では、成長板の形態学的計測で被験物質に関連した影響は認められなかった。

雄、雌及び雌雄合算の平均濃度-時間プロファイルから、25 µg/kg から 250 µg/kg への投与量の増加に伴って、BMN 111 の曝露量が増加することが示された。投与量の増加に伴って雌雄の平均 C_{max} 及び AUC_{0-6} は、概して用量比を上回って増加した。BMN 111 の平均濃度は、最低用量の 25 µg/kg を除いて、単回投与と比べて概して反復投与後の方が高かった。

これまでに実施した試験で観察されたように、BMN 111 は皮下投与後に速やかに吸収され、その後消失した。250 µg/kg 群の雌の平均 C_{max} が全ての TK 測定日で一貫して雄よりも高値であったことを除いて、BMN 111 の平均 C_{max} 及び AUC_{0-6} に一貫した性差は認められなかった。25 µg/kg 群では、平均 C_{max} 及び AUC が雄は 2 日目から、雌は 4 週目から低下傾向が見られ、44 週目の曝露量は全般的に低値又は測定下限未満であった。75 µg/kg 群では、4 及び 12 週目の平均 C_{max} 及び AUC が 2 日目よりも概して高かったが、雄では 44 週目の曝露量が 2 日目よりも低かった。250 µg/kg 群では、4、12 及び 44 週目の平均 C_{max} 及び AUC が 2 日目よりも高く、反復投与後の平均 AUC_{0-6} 値はおおむね 2 日目の 2 倍を超えた。この投与量の増加に伴う曝露量の増加は、見かけのクリアランス (CL/F) のわずかな低下とおおむね相応した。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.11]項に記載した。

4 週目までは抗 BMN 111 抗体が産生した動物はほとんどなかったが、試験の進行と共に陽性動物数が増加し、44 週目には大半の動物が抗 BMN 111 抗体陽性であった。ADA と血漿中薬物濃度間に直接的な相関はなかったが、ADA が血漿中濃度のばらつきに関与した可能性があり、特に 25 µg/kg 群では 44 週目に雌の BMN 111 濃度が低値又は検出下限未満であった。高用量群では、ADA の発現が低及び中用量群に比べて遅延すると考えられた。

ANP 濃度はばらつきが大きく、群平均値の解釈は困難であった。しかし、BMN 111 の 75 µg/kg 以上の投与群で、投与後 30 及び 90 分に ANP 濃度の高値が高い発現頻度で認められた。

BMN 111 の投与により、血漿中 cGMP 濃度が用量依存的に上昇した。25 及び 75 µg/kg 群の雌雄では、BMN 111 の投与に反応して時間と共に平均 cGMP 濃度が低下する傾向が見られた。一方、250 µg/kg 群の雌雄ではこの傾向は観察されなかった。回復期間の cGMP 濃度を解析した結果、雄では 1 日目（最終投与後 24 時間）の平均 cGMP 濃度がベースライン値よりも高かった。この傾向は雌では認められなかった。

解析した骨バイオマーカーのうち、軟骨分解マーカーである CTX-II のみで BMN 111 関連の変化が認められ、75 µg/kg 以上の投与群の雌雄でやや増加し、投与期間の 36 及び 44 週目には対照群と比較して統計学的に有意であった。回復期間終了時には、250 µg/kg 群の雌 2 例で CTX-II の増加が継続したが、雄では対照群と同程度の値に復した。

結論：

以上より、カニクイザルに BMN 111 を 25、75 又は 250 µg/kg/日の用量で 44 週間連日皮下投与したときの忍容性は良好であった。BMN 111 に関連する影響は、薬理作用に起因する骨格の成長及び成長板閉鎖に対する予想された影響、並びに投与直後に心拍数の増加が認められたのみであった。股関節の可動域の減少及び骨の変形を引き起こす持続的な骨及び関節の所見に基づき、カニクイザルに BMN 111 を 44 週間連日反復投与したときの無毒性量は 25 µg/kg/日と判断された。無毒性量における投与期間終了時の平均 C_{max} は 1170 pg/mL であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

BMN 111 の遺伝毒性試験は実施していない。BMN 111 は全て天然アミノ酸で構成されるペプチドであり、合成リンカーを含まないため、DNA と直接反応することは予想されない ([Sawant 2014]、[Thybaud 2016]、ICH S6(R1) 2011)。したがって、BMN 111 が遺伝毒性作用を有する可能性は低いと考えられる。

2.6.6.5 がん原性試験

BMN 111 のがん原性試験は実施していない。BMN 111 のがん原性リスク評価は、ICH S1A「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」を踏まえ、(1) BMN 111 の作用機序、(2) 腫瘍の発生、増殖及び転移に対する BMN 111 の影響に関する文献の評価、(3) BMN 111 を用いて実施した非臨床毒性試験における細胞増殖作用の評価、及び(4) BMN 111 の遺伝毒性作用を考慮して実施した。詳細ながん原性評価を[4.2.3.4.3]項に示した。

エビデンスの重みを考慮して、BMN 111 のげっ歯類を用いた標準的ながん原性試験を実施することにより、FGFR3 経路の阻害に関する既知の情報に加えて、BMN 111 のがん原性リスクを予測する臨床的意味のある安全性情報が得られる可能性は低いと判断した。

- BMN 111 あるいは CNP の発がんに及ぼす影響に関する直接的なデータはほとんどない。既知の情報では、CNP (及び BMN 111) は弱い発がん阻害剤であることが報告されている ([Vesely 2006]、[Vesely 2016]、[Zenitani 2016])。
- ACH 患者は *FGFR3* の機能獲得型変異を有することから、BMN 111 による *FGFR3* 経路の阻害が ACH 患者の有効な治療法となる理由である。*FGFR3* 受容体を直接阻害することにより、BMN 111 の投与ががん原性に影響を及ぼす可能性が考えられる。言い換えると、BMN 111 の投与はがん細胞の増殖を阻害する可能性が考えられる。
- BMN 111 のラット (成熟動物の 6 ヶ月間投与試験：試験番号 BMN111-11-036、2.6.6.3.3 項、及び幼若動物の 6 ヶ月間投与試験：試験番号 BMN111-11-052、2.6.6.3.4 項を参照)、並びにカンクイザル (幼若動物の 6 ヶ月間投与試験：試験番号 BMN111-11-035、2.6.6.3.7 項、及び成熟動物の 10 ヶ月間投与試験：試験番号 BMN111-11-043、2.6.6.3.8 項を参照) を用いた長期反復投与毒性試験では、病理組織学的検査で増殖性病変、前がん病変又は腫瘍性病変の明らかなエビデンスは認められなかった。
- これまでに得られた 5 年間の臨床データでは、BMN 111 の発がんリスクを示すエビデンスはない。
- 正常動物は BMN 111 の長期投与に耐えられないことから、標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験は実施不可能であり、ACH 患者におけるがん原性リスクの評価に必要なとは考えられない。

エビデンスの重みを考慮すると、BMN 111 が発がん性を有することは予想されない。*CNP/FGFR3* 経路が関連する発がんについては広く検討されており、BMN 111 が発がん性を有すると考える説得力のある理由は存在しない。実際にはこれまでに得られたエビデンスから、逆に *CNP* 及び関連ペプチドがある種の腫瘍の増殖を阻害する可能性があることが示唆される。

加えて、正常動物で BMN 111 が長期間にわたり忍容性が良好であることは考えにくい。しかも、このような動物における試験結果は ACH 患者には関連しないと考えられる。したがって、げっ歯類を用いた標準的ながん原性試験を耐容用量で実施することは不可能であり、実施してもがん原性のリスク評価にさらなる情報を得ることができず、科学的根拠はないと考えられる。ACH 患者集団に特有なリスクを含め、BMN 111 のヒトにおける発がん性リスクに対して臨床的に最も意味のある対処は、BMN 111 を長期間投与したヒト患者の厳密な臨床モニタリングと市販後調査である。これまで（5年間）のところで、BMN 111 が患者の発がんリスクを増大させるエビデンスはない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

BMN 111 の生殖発生毒性は、ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C～D（胚・胎児発生）をウサギで、ステージ A～F（受胎能、胚・胎児発生、分娩、及び性成熟までの次世代の生後発達）をラットを用いて評価した。

2.6.6.6.1 BMN 111 のラットにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（試験番号 [BMN111-14-061]）

試験の目的：

本試験は、妊娠ラットに BMN 111 を投与したときの毒性及び TK を評価し、着床から硬口蓋閉鎖までの胚・胎児の発生に及ぼす影響を検討することを目的として実施した。本試験は、ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C 及び D を評価するようデザインした。

本試験は、XXXXXXXXXX（米国、XXXXXXXXXX）において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20XXXX 年 12 月 17 日～20XXXX 年 4 月 25 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.13-1]に示す。

材料と方法：

本試験では 67～72 日齢の SD 系雌ラット (CrI:CD[SD]) を使用し、入荷時の体重は 198～240 g であった。動物を無作為に 4 群に割り付けた。試験デザインを表 2.6.6.6.1-1 に示す。

溶媒又は BMN 111 を主試験では 1 日 1 回妊娠 6～17 日に、TK 試験では妊娠 6～18 日に投与した。溶媒及び BMN 111 は、肩甲骨間の 4 ヶ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には 5 ヶ所目の未使用の部位を使用した。

表 2.6.6.6.1-1 ラットの胚・胎児発生毒性試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Main Study: No. Females per Group	Toxicokinetic Study: No. Females per Group
1	Vehicle ^b	0	25	3
2	BMN 111 ^c	90	25	6
3		270	25	6
4		540	25	6

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle: BMN 111 Vehicle Control Solution 2 (0.005 mol/L Citrate Buffer, Solution, pH 5.5 +/- 0.2).

c) One lot of BMN 111 was used during the study: P2203-11004.

一般状態観察を投与開始前に1回、投与期間中（妊娠6～17日）は毎日投与後1～2時間に、投与期間終了後（妊娠18～21日）は1日1回実施した。

体重は動物供給業者で出荷前の妊娠0日、入荷の翌日に試験施設で、その後は妊娠6～21日まで毎日測定した。

摂餌量は妊娠6、10、14、18及び21日に測定した。

妊娠21日に母動物を安楽死させ、生殖器官を腹腔から摘出・切開して検査した。生存及び死亡胎児数を計数し、生存胎児を子宮から摘出して詳細に検査した。卵巣の黄体数及びその分布を調べ、子宮の着床数及び早期/後期吸収胚を検査した。明らかに不妊と見られる雌については、ガラス板で子宮を挟んで着床痕がないことを確認し、子宮及び卵巣をホルマリン保存した。各母動物について肉眼的剖検を実施した。全ての動物について投与部位を採取し、保存した。

胎児の体重測定及び外表検査を実施し、半数は内部（内臓）検査、残りの胎児はアリザリンレッドSで染色して骨格検査に供した。

TK試験に割り付けた動物から、妊娠6及び17日にTK測定用の血漿を採取した。対照群（第1群）は、3匹の動物から投与後15分の1時点のみ血漿を採取した。投与群（第2～4群）は、各3匹の2サブセットから、投与前、投与後5、15、30、60、90、120及び180分に血漿を採取し、合成してTKプロフィールを作成した。これらの動物の妊娠状態を確認した後、妊娠18日の投与後30分に、TK試験用母動物から外科的に娩出した胎児の血液試料を採取した。同腹児ごと試料をプールした。バリデートされた分析法を使用して、血漿中のBMN 111濃度を測定した。血清中の抗BMN 111抗体を測定するため、TK試験の全動物は投与開始前及び妊娠18日の投与前に、主試験の動物は妊娠21日の投与前及び安楽死後に試料を採取した。試料はECLA法で分析した。

結果：

全例が予定剖検日まで生存した。各群の母動物24～25例で妊娠を確認した。妊娠21日に1匹以上の生存胎児が存在した、0（対照群）、90、270及び540 µg/kg/日群の、それぞれ23、25、25及び24例の母動物について、帝王切開による観察を行った。対照群の母動物1例は、妊娠21日の安楽死前に分娩した。

一般状態観察、体重変化、摂餌量、帝王切開パラメーター及び同腹児の発育に、BMN 111に関連した明らかな影響は認められなかった。各パラメーターの同腹児平均値は、BMN 111投与群間で同等であった。胎児の発達にBMN 111の明らかな影響は認められず、観察された外表、軟部組織及び骨格異常はいずれも対照群の発生率と同程度であり、この動物種/系統における背景値の範囲内であった。胎児の骨化進行度の平均値は、対照群と投与群で同等であった。

BMN 111の T_{max} は投与後5又は15分に観察され、投与群間で顕著なばらつきはなかった。血漿中 $t_{1/2}$ 平均値は、3群を通して13.6～25.0分であった。 C_{max} 及び AUC_{0-t} で評価したBMN 111の曝露量は、投与量にほぼ比例して増加した。反復投与後の曝露量（ AUC_{0-t} ）は、90 µg/kg群で約2.3倍、270 µg/kg群で約1.5倍、540 µg/kg群で約2.6倍に増加した。

母動物の投与後30分に採取した少数の胎児のプールした試料では、測定可能な濃度のBMN 111が検出された。プールした胎児試料のBMN 111濃度は、全用量群でほとんどがBQL（<0.1 ng/mL）であったが、一部の胎児では妊娠18日の母動物への投与後30分に0.106～

0.144 ng/mL の範囲で測定可能な濃度の BMN 111 が認められた。これらの胎児における BMN 111 濃度は、測定時期が一致する妊娠 17 日の母動物の平均血漿中濃度 7.74~51.4 ng/mL と比較して、約 50~500 倍低値であった。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は [2.6.4.3.2.1]項に記載した。

結論：

以上より、妊娠ラットに BMN 111 を 0、90、270 又は 540 µg/kg/日の用量で妊娠 6~17 日まで連日皮下投与した結果、母動物毒性及び発生毒性は認められなかった。BMN 111 の母動物及び胎・胎児発生に関する無毒性量は 540 µg/kg/日と判断された。無毒性量における C_{max} は 64.5 ng/mL、 AUC_{0-t} は 3950 ng·min/mL であった。

2.6.6.6.2 BMN 111 のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験（試験番号[BMN111-14-060]）**試験の目的：**

本試験は、雌雄ラットに BMN 111 を交配前、交尾及び受精卵の着床までの期間投与し、毒性及び TK を評価することを目的として実施した。本試験は、BMN 111 が雌の性周期、卵管内輸送、着床、及び着床前段階の胚発生に及ぼす影響を検出し、反復投与毒性試験における病理組織学的検査では検出されない、雄の生殖能及び性的能力に対する機能的影響が検出可能なように、ICH S5(R3)の生殖発生ステージ A 及び B を評価するようデザインした。

本試験は、XXXXXXXXXX（米国、XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX）において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20XXXX 年 12 月 11 日~20XXXX 年 3 月 22 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.12-1]に示す。

材料と方法：

本試験では、雌雄の SD 系 (CrI:CD[SD]) ラットを使用し、入荷時に雄は 71 日齢で体重が 295~344 g、雌は 66 日齢で体重が 193~230 g であった。動物を無作為に 4 群に割り付けた。試験デザインを表 2.6.6.6.2-1 に示す。

雄には、溶媒又は BMN 111 を交配開始 28 日前から剖検前日まで毎日、合計 50~52 回投与した。雌には、交配開始 15 日前から交配期間を通して妊娠 7 日まで毎日投与した。22 日間の交配期間終了までに交尾が確認されなかった場合は、交配最終日を妊娠 0 日とした。雌雄共に、溶媒又は BMN 111 を肩甲骨間の 4 ヶ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には 5 ヶ所目の未使用の部位を使用した。

表 2.6.6.2-1 雌雄ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Main study: No. and Gender per Group	Toxicokinetic Study: No. and Gender per Group
1	Vehicle ^b	0	25M/25F	3M/3F
2	BMN 111 ^c	90	25M/25F	6M/6F
3		270	25M/25F	6M/6F
4		540	25M/25F	6M/6F

F, female; M, male.

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle: BMN 111 Vehicle Control Solution 2 (0.005 mol/L Citrate Buffer, Solution, pH 5.5 +/- 0.2).

c) One lot of BMN 111 was used during the study: P2203-11004.

動物の生死を1日2回観察した。一般状態の観察は、馴化期間中は週1回で3回まで、その後は投与期間中及び投与期間終了後は毎日実施した。投与期間中の一般状態観察は、投与後1～2時間に実施した。

体重は、入荷日、馴化期間中に2回まで、投与期間中及び投与期間終了後は毎日、並びに剖検前に測定した。

摂餌量は、交配期間を除いて投与期間中は週2回以上測定した。交配後の雌については、妊娠0～7日、7～10日、10～12日及び12～13日に摂餌量を測定した。

雌ラットの発情周期を観察するため、膣垢検査を実施した。膣垢検査は、投与開始前に少なくとも14日間、投与開始日から連続して14日間、その後、交尾栓又は膣垢中の精子の存在により交尾が確認されるまでの交配期間中に実施した。

雌は投与開始後15日、雄は投与開始後28日に、同一群内の雌雄ラットを1:1の比率で同居させ交配した。14日間の同居後に交尾が確認されなかった雌は、同一群内の別の雄に再割り付けし、さらに7日間同居させた。上記のように交配確認日を妊娠0日とした。

雄はBMN 111を50～52日間連日投与した後、51～53日目に安楽死させた。肉眼的に剖検を実施し、以下の器官を摘出して重量を測定し、保存又は精子検査に供した。精巣上体（各動物の全体及び左側尾部）、前立腺、精囊、及び精巣（重量は左右別に測定）。精子運動性、精巣上体精子含量及び精巣内精子細胞数の評価のため、各雄動物から精管、左精巣上体及び左精巣を採取した。肉眼的病変（存在する場合）及び投与部位も採取して保存した。保存した組織／器官の病理組織学的検査は実施しなかった。

交尾を確認した雌は妊娠13日に安楽死させた。肉眼的に剖検を行い、生殖器官を腹腔から摘出した。卵巣は黄体数と分布を調べ、重量を測定した。子宮を切開して、着床数、胎盤の状態及び生存／死亡胚数を調べた。明らかに不妊と見られる雌については、ガラス板で子宮を挟んで着床痕がないことを確認した。各雌動物から乳腺、子宮、子宮頸部、卵巣及び卵管を採取し、保存した。保存した組織／器官の病理組織学的検査は実施しなかった。

TK試験に割り付けた動物から1日目、50日目（雄）又は妊娠7日（雌）に血漿試料を採取した。対照群の動物は、投与前及び投与後15分に試料を採取した。投与群は、測定時点で雌雄各3匹/群（可能な場合）から、投与前、投与後5、15、30、60、90、120、180分に試料を採取し、合成してTKプロファイルを作成した。バリデートされた分析法を使用して、血漿中のBMN 111濃度を測定した。

各動物から投与開始前、29日目（雄）又は妊娠7日（雌）に、ADA測定用の血清を採取した。

結果：

全例が予定剖検日まで生存した。剖検時に妊娠を確認した雌は、0、90、270及び540 µg/kg群で、それぞれ22、21、23及び22例であった。

摂餌量、発情周期、帝王切開及び同腹児パラメーターに、BMN 111に関連した明らかな影響は認められなかった。

90 µg/kg以上を投与した雄では、一般毒性試験で既に観察されているように、正常な成熟動物におけるBMN 111の過剰な薬理作用に関連した、円背姿勢及び異常歩行の症状が認められた。270 µg/kg以上の用量では、これらの影響は有害所見と考えられた。さらに、これらの動物では接触に対する感受性の増大（異常発声）のほか、後肢の可動性低下及び立毛（身づくろい困難による乱れた外観）が観察された。540 µg/kg群の雄では、尾の屈曲／ねじれ及び色素鼻漏の発現頻度が増加した。一部の動物では色素鼻漏及び活動性低下も認められた。270 µg/kg以上を投与した雌では、異常歩行と円背姿勢が用量依存的に増加した。妊娠期間中は、円背姿勢と異常歩行を示す動物の数が増加した。270 µg/kg以上を投与した一部の雌では、交配前及び妊娠期間中にも後肢の可動性低下が観察された。これらの影響は有害所見と判断された。

270及び540 µg/kg群の雄では、交配前の4週間（1～28日目）に体重増加量が有意に減少した。90及び270 µg/kg群では、交配終了後の剖検までの期間で、体重増加量の変動が対照群と比較して大きかった。540 µg/kg群の体重増加量は対照群と同程度であったが、全試験期間（1～50日目）の全体的な体重増加量は、540 µg/kg群で有意に減少した。270及び540 µg/kg群では、交配前（11、15、18、22、25及び28日目）、並びに同居開始後の32、36及び39日目（540 µg/kg群のみ）に体重が有意に減少した。雌の体重は、交配前及び妊娠期間中に被験物質と関連する影響は認められなかった。雌雄共に剖検時の最終体重に差はなかった。

交配が確認されるまでの同居日数は、540 µg/kg群で対照群と比較して有意に増加した。540 µg/kg群では雌の交尾数が1週目に有意に減少したが、2週目には有意に増加したことで相殺された。全体的な雌の受胎率及び交尾数は、対照群と投与群で差がなかった。

剖検時の雌ラットでは、被験物質に関連した肉眼的所見や器官重量の差は認められなかった。対照群、90、270及び540 µg/kg群の雄で、それぞれ1、1、2及び2例に精巣の萎縮／弛緩及び精巣上体の萎縮が認められた。540 µg/kg群の1例で精巣の肥大が認められた。投与群の雄で精巣の絶対／体重相対重量が有意に減少した。540 µg/kg群で右精巣の体重相対重量が有意に増加した。

540 µg/kg群では、精巣の精子数及び密度が対照群と比べて有意に低下した。他の精子パラメーターは全て対照群と同等であった。

これまでに実施した反復投与毒性試験で観察されたように、BMN 111は雌雄ラットのいずれにおいても速やかに吸収され、その後循環血中から消失した。曝露量（C_{max}）は、1日目、50日目（雄）又は妊娠7日（雌）に、90～540 µg/kgの用量範囲（6倍）で雌雄いずれもほぼ投与量に比例（1:1）して増加した。曝露量（AUC_{0-∞}）は90～540 µg/kgの範囲で、1日目の雌雄及び

50日目の雄では投与量の増加と共に曝露量が約2:1の比率で増加したが、反復投与した妊娠7日の雌では投与量の増加に伴う曝露量の増加比率はほぼ1:1であった。

全体的にTK測定を実施した用量範囲及び測定日では、投与量-曝露量の比例性及び線形性に一貫性が見られなかった。BMN 111の曝露量(AUC_{0-t})は、反復投与した妊娠7日の雌では、1日目と比較して90 µg/kg群で約7倍、270及び540 µg/kg群で約2倍に増加した。反復投与した50日目の雄では、AUC_{0-t}が1日目と比較して90 µg/kg群で約2倍に増加し、270及び540 µg/kg群では2倍未満の増加であった。BMN 111のC_{max}は、雄は1~50日目に2倍未満の増加を示し、雌は1日目~妊娠7日まで大きな変化はなかった(<20%)。BMN 111の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.3]項に記載した。

BMN 111を投与したほとんどの雌雄ラットがADA陽性を示した。曝露量に対するADAの影響は、正式には評価しなかった。

結論：

以上より、雄ラットに交配前から交配期間を通じて合計50~52回、雌ラットに交配前2週間及び妊娠初期まで、BMN 111を90、270又は540 µg/kg/日の用量で連日皮下投与したとき、忍容性が認められた。BMN 111の骨成長に対する薬理作用と関連した影響が全用量の雌雄で観察され、270 µg/kg以上の用量では有害所見と考えられた。その結果、雌雄ラットに対する無毒性量は共に90 µg/kg/日であった。無毒性量における、雄の50日目のC_{max}は13.6 ng/mL、AUC_{0-t}は411 ng·min/mL、雌の妊娠7日のC_{max}は8.46 ng/mL、AUC_{0-t}は628 ng·min/mLであった。540 µg/kg群で、交配までの日数のわずかな増加、精子数の減少及び精嚢重量の減少が観察されたが、受胎率への影響がないことから有害所見とは判断しなかった。ラットの生殖毒性に関する無毒性量は540 µg/kg/日であった。無毒性量における、雄の50日目のC_{max}は86.1 ng/mL、AUC_{0-t}は4510 ng·min/mL、雌の妊娠7日のC_{max}は45.0 ng/mL、AUC_{0-t}は3280 ng·min/mLであった。

2.6.6.6.3 BMN 111のラットにおける、出生前及び出生後の発生、並びに、母体の機能に関する皮下投与試験 (試験番号[BMN111-18-103])

試験の目的：

本試験は、BMN 111を雌ラットに着床から離乳まで毎日投与し、胚・胎児発生から性成熟に至るまでの出生児の発達に及ぼす影響を評価することを目的として実施した。本試験では帝王切開及び胎児検査は実施していないが(2.6.6.6.1項を参照)、ICH S5(R3)の生殖発生ステージC~Fを評価するようデザインした。

本試験は、XXXXXXXXXX (米国、XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX)において、米国、日本及びOECDのGLP基準に従って実施した。試験期間は20XXXX年12月11日~20XXXX年12月16日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.14-1]に示す。

材料と方法：

本試験では、交配済みのSD系雌ラット(Crl:CD[SD])を使用し、入荷時に82~91日齢で体重が201~254 gであった。動物を無作為に4群に割り付けた。試験デザインを表 2.6.6.6.3-1に示す。

F₀雌には、溶媒又はBMN 111を妊娠6日～授乳20日まで1日1回投与した。溶媒又はBMN 111を肩甲骨間の4ヵ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には5ヵ所目の未使用の部位を使用した。F₁動物には直接投与しなかった。

表 2.6.6.6.3-1 ラットの出生前及び出生後の発生に関する試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	No. per Group (F ₀ Generation)	No./Sex per Group (F ₁ Generation)
1	Vehicle ^b	0	24F	24M/24F
2	BMN 111 ^c	90	24F	24M/24F
3		270	24F	24M/24F
4		540	24F	24M/24F

F, female; M, male.

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle: BMN 111 vehicle control solution 2 (0.005 mol/L citrate buffer solution, pH 5.5 +/- 0.2).

c) One lot of BMN 111 was used during the study: P12003-15102.

F₀動物の生死を1日2回観察した。一般状態の観察は、馴化期間中に1回、その後は投与期間中及び投与期間終了後は毎日実施した。出産後の母動物の行動を観察した。各投与後1～2時間の観察所見を記録した。F₁世代は、同腹児ごとに生死を観察し、離乳まで毎日一般状態を記録した。各動物の一般状態観察を離乳後に週1回、及び予定剖検日に実施した。雌ラットは妊娠0、3、7、10及び14日にも観察した。

F₀世代の体重は、動物供給業者で出荷前の妊娠0日、入荷日に試験施設で、その後は剖検まで毎日測定した。F₁世代の体重については、離乳前の同腹児は出生日(生後1日)、生後4、7、10、14、18及び21日に測定した。離乳後は週1回体重を測定し、F₁雌動物は妊娠0、3、7、10及び14日にも体重を測定した。

F₀世代の摂餌量は妊娠6、9、12、15、18及び21日、並びに授乳1、4、7、10及び14日に測定した。F₁世代の摂餌量は、離乳後、交配までは週1回測定した。F₁世代の雌は、妊娠0、3、7、10及び14日にも摂餌量を測定した。

分娩時には難産や有害な臨床症状の有無を観察し、母動物ごとに妊娠期間、同腹児数及び出生児の生死を記録した。

離乳までに表 2.6.6.6.3-2 に示す出生児の発達指標を観察した。全ての出生児で発達指標が完了するまで観察を続けた。

表 2.6.6.6.3-2 生後発達の観察時期

Developmental Index	PND of Evaluation
Surface righting reflex	PND 1 until achieved
Pinnae unfolding	PND 2 until achieved
Incisor eruption	PND 9 until achieved
Eye opening	PND 12 until achieved
Forelimb grip	Once on PND 21
Pupil constriction	Once on PND 21

PND, post-natal day.

雄については、亀頭包皮分離を生後39日から完了するまで毎日観察した。雌は膻開口を生後28日から完了するまで毎日観察した。各動物がこの指標を完了した時点で体重を測定した。

生後 23 日に各腹の雌雄各 1 例を FOB で検査した。各動物をホームケージ及び新規環境（オープンフィールド）で少なくとも 2 分間観察し、神経機能及び行動を評価した。

受動的回避試験による学習及び記憶の評価を、生後 24 及び 31 日に 1 腹当り雌雄各 1 例の動物で実施した。受動的回避試験では、最大潜時を 60 秒、試行間隔を 15 秒間として 15 回の試行を終了するか、又は動物が 3 回連続で明区画に 60 秒間留まるまで試行を実施した。試行ごとに暗区画に入るまでの潜時を計測した。学習は、最初のセッションで 3 試行の基準に達するまでの時間で評価した。短期記憶保持は、最初のセッションの第 2 試行で暗区画に入るまでの潜時間で評価した。長期記憶保持は、3 試行の基準に達するまでの試行回数、及び 2 回目のセッションで暗区画に入るまでの潜時の両方で評価した。

また、学習及び記憶については、生後 65 及び 90 日に 1 腹当り雌雄各 1 例の動物を用いてモリス水迷路試験を実施して評価した。動物を 3 日連続の 3 セッションで試験した。最初の 2 セッションは、学習及び短期記憶を評価するために 9 試行を行い、各試行で隠れたプラットホームに達するまでの潜時を測定した。長期記憶保持を評価する第 3 セッションでは、プラットホームを取り除いた 1 回の試行を行った。ラットにプラットホームを 30 秒間探索させ、以前にプラットホームが置かれていた四分円で費やした時間を記録した。

交配開始の少なくとも 14 日前から交尾が確認されるまで、膣垢検査を実施して発情周期を観察した。生後 92、93、94、95 又は 96 日から、各群内で兄妹交配を避けて雌雄ラットを 1:1 で同居させた。動物を 14 日間同居させ、交尾栓又は膣垢中に精子の有無を毎日観察した。交尾が確認された日を妊娠 0 日とした。最初の 7 日間に交尾が確認されなかった場合は、雌を同腹以外の雄と交配した。14 日間の交配期間で交尾しなかった雌は、交配最終日を妊娠 0 日とし、交配終了 8 日後に安楽死させた。

授乳 21 日に F₀ 雌を安楽死させ剖検した。腹腔から生殖器官を摘出し、子宮を切開して着床数を計数した。以下の器官を摘出して重量を測定し、保存した。対器官は両側を合わせて測定し共に保存した。脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、子宮・子宮頸部及び膣を保存した。投与部位、胸骨、膝関節を含む脛骨、副腎、甲状腺、上皮小体、肉眼的病変及び胃も採取して保存した。

離乳後の観察に使用しない F₁ 動物は生後 21 日に安楽死させ、剖検して水頭症の有無を調べた。

離乳後の観察に使用した F₁ 雄は、14 日間の交配期間後に安楽死させ剖検した。以下の器官を摘出し重量を測定し、保存した。対器官は両側を合わせて測定し共に保存した。脳、精巣上体、副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び精巣を保存した。胸骨、脛骨、甲状腺、上皮小体、肉眼的病変及び胃も採取して保存した。

F₁ 雌は妊娠 14 日に剖検し、交尾が確認されなかった雌は交配終了後 8 日目に安楽死させ剖検した。生殖器官を腹腔から摘出して検査した。卵巣の黄体数及びその分布を調べ、重量を測定して保存した。子宮を切開して、胎盤の状態、生存又は死亡胚・胎児数、着床数及び早期/後期吸収胚数を検査した。明らかに不妊と思われる動物については、子宮をスライドグラスで挟んで着床痕がないことを確認した。子宮重量は子宮頸部及び膣と一緒に測定した。また、脳、

子宮頸部、副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺及び脾臓の重量を測定して保存した。胸骨、脛骨、甲状腺、上皮小体、肉眼的病変及び胃も採取して保存した。

任意の F₀ 母動物 5 例から、授乳 14 日の投与後 30 分に乳汁試料を採取した。試料にプロテアーゼ阻害剤を添加し、半定量的 ECLA 法を用いて分析した。

乳汁を採取した任意の 5 例と同じ F₀ 母動物から、授乳 14 日の投与後約 30 分の時点で血漿試料を採取した。生後 1 日の授乳前に、各群任意の 2 腹の出生児雌雄各 1 例から、断頭により血漿を採取した。生後 14 日に、各群任意の 2 腹の出生児雌雄各 1 例から、心臓穿刺により血漿を採取した。バリデートされた ECLA 法により、血漿試料を分析した。

血漿及び乳汁を採取した同じ 5 例の母動物から、授乳 14 日の投与後約 30 分に ADA 測定用の血清を採取した。生後 1 日に、各群任意の 2 腹の出生児雌雄各 1 例から、断頭により血清を採取した。生後 14 日に、各群任意の 2 腹の出生児雌雄各 1 例から、心臓穿刺により血清を採取した。試料の分析は実施しなかった。

結果：

90 µg/kg 群の F₀ 母動物 1 例は、死産児を 1 例出産し難産の徴候が見られたため、妊娠 22 日に安楽死させた。子宮内に 15 例の死亡胎児が認められた。離乳前の F₁ 動物の死亡を表 2.6.6.6.3-3 に示した。生存して出産した出生児は全て、剖検時に腹部で乳汁の吸引が認められた。離乳後の観察のため選択した F₁ 動物は、いずれも予定剖検時まで生存した。

表 2.6.6.6.3-3 各群の離乳前死亡 F₁ 動物数

Treatment Group	Total Number of Unscheduled Pre-Weaning Necropsies	Number Stillborn	Number Found Dead	Number Euthanized Early
1 (vehicle control)	7	6	1	0
2 (90 µg/kg)	2 ^a	0	1	1
3 (270 µg/kg)	3	0	3	0
4 (540 µg/kg)	3	0	3	0

a) Excludes pups from dam euthanized on Gestation Day 22 due to dystocia.

F₀ 動物の一般状態、体重、摂餌量、分娩状況、肉眼的所見及び器官重量には、BMN 111 に関連した明らかな影響は認められなかった。

F₀ 母動物に BMN 111 を 90、270 又は 540 µg/kg 投与した結果、F₁ 世代の一般状態、体重、摂餌量、性成熟、神経行動学的発達、生殖能、肉眼的所見、器官重量、及び F₂ 世代の初期胚・胎児発生への影響は認められなかった。

BMN 111 の全身曝露量は、授乳 14 日の投与後 30 分の平均血漿中濃度に見られるように、投与量の 90~540 µg/kg への増加に伴って上昇した。

BMN 111 を妊娠 6 日から授乳 20 日まで投与した結果、授乳 14 日に 90 µg/kg 群の 5 例中 1 例、270 µg/kg 群の 5 例中 3 例及び 540 µg/kg 群の 5 例中 5 例で、乳汁中濃度が定量可能であった。授乳 14 日における各母動物の乳汁中 BMN 111 濃度は、90 µg/kg 群で BQL~0.452 ng/mL、270 µg/kg 群で BQL~0.563 ng/mL、及び 540 µg/kg 群で 0.489~1.57 ng/mL の範囲にあった。BMN 111 の乳汁曝露量は、乳汁中の平均濃度に見られるように、投与量の 90~540 µg/kg への増加に伴って上昇した。授乳 14 日における、乳汁中 BMN 111 濃度はおおむね血漿中濃度の 5%

未満であった。推定可能な場合の乳汁中／血漿中の BMN 111 濃度比は、270 µg/kg 群で 0.0130～0.0473、及び 540 µg/kg 群で 0.0162～0.0502 であった。

全般的に、BMN 111 の 0、90、270 又は 540 µg/kg を妊娠 6 日～授乳 20 日まで連日投与した母動物の出生児では、生後 1 及び 14 日に採取した試料から BMN 111 は検出されなかった。例外として、540 µg/kg 群の母動物（動物番号 1189）の出生児（動物番号 1189F1）では、生後 1 日に定量可能な濃度（0.137 ng/mL）の BMN 111 が検出された。母動物（動物番号 1189）から同時期に採取した試料がないため、出生児／母動物の血漿中 BMN 111 濃度比は算出できなかった。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.4]項に記載した。

結論：

以上より、雌ラットに BMN 111 を 90、270 及び 540 µg/kg/日の用量で、妊娠 6 日（着床）から授乳 20 日（離乳）まで連日皮下投与した結果、忍容性が良好であった。BMN 111 を投与した雌では、出生前及び出生後の発生、生存率、並びに出生児の哺育に及ぼす影響は認められなかった。BMN 111 を投与した雌の乳汁中で低濃度の BMN 111 が検出され、出生児から薬物が検出されたのは血漿採取前に授乳していない 1 例のみであったが、特に高用量群で出生後に F₁ 世代が BMN 111 に曝露される可能性が示された。ラットにおける母動物毒性、並びに出生前及び出生後の発生に関する無毒性量は 540 µg/kg/日と判断された。無毒性量における、授乳 14 日の投与後 30 分の血漿中濃度は 16.0～42.3 ng/mL の範囲であった。

2.6.6.6.4 BMN 111 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験（試験番号[BMN111-14-055]）

試験の目的：

本試験は、妊娠ウサギに BMN 111 を妊娠 7～19 日まで毎日投与し、毒性及び TK を予備的に評価することを目的として実施した。

本試験は、XXXXXXXXXX（米国、XXXXXXXXXX）で実施した。試験期間は 20XXXX 年 11 月 7 日～20XXXX 年 8 月 25 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.11-1]に示す。

材料と方法：

本試験では、交配済みの雌ウサギ（Hra: [NZW] SPF）を使用し、入荷時に約 6 ヶ月齢で体重は 2.6～3.5 kg であった。動物を無作為に 4 群に割り付けた。試験デザインを表 2.6.6.6.4-1 に示す。

雌ウサギに、溶媒又は BMN 111 を主試験は妊娠 7～19 日、TK 試験は妊娠 7～20 日まで連日投与した。溶媒又は BMN 111 を肩甲骨間の 4 ヶ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には 5 ヶ所目の未使用の部位を使用した。

表 2.6.6.6.4-1 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	Main Study: No. Females per Group	Toxicokinetic Study: No. Females per Group
1	Vehicle ^b	0	8	2
2	BMN 111 ^c	45	8	3
3		135	8	3
4		240	8	3

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle: BMN 111 vehicle control solution 2 (0.005 mol/L Citrate Buffer, Solution, pH 5.5 +/- 0.2).

c) One lot of BMN 111 was used during the study: P2203-11004.

全例について、一般状態観察を入荷日並びに投与期間中及び投与期間終了後は毎日実施した。各投与後 1~2 時間の観察所見を記録した。

体重は動物供給業者で妊娠 0 日、入荷日に試験施設で測定し、その後は投与期間中及び投与期間終了後は毎日測定した。入荷後毎日、摂餌量を測定した。

妊娠 29 日に主試験の動物を安楽死させ剖検した。生殖器官を摘出して子宮を切開し、子宮内検査を実施した。胎児を摘出して重量を測定し、外表及び内臓検査を実施した。黄体数及びその分布、着床数、胎盤の状態、生存及び死亡胎仔数、並びに早期/後期吸収胚数を検査した。明らかに不妊と見られるウサギの子宮をスライドガラスで挟んで、着床痕がないことを確認した。全動物から投与部位及び明らかな肉眼的病変を採取し、保存した。非妊娠動物の子宮及び卵巣も全て保存した。病理組織学的検査は実施しなかった。

妊娠 7 及び 19 日に TK 試験用の F₀ ウサギ (母動物) から血漿を採取した。対照群の動物は投与後 5 分に試料を採取し、投与群の動物は投与前、投与後 5、15、30、60、90、120 及び 180 分に試料を採取した。妊娠 20 日の投与後約 30 分に、TK 試験用動物から外科的に摘出した生存胎児を断頭して、胎児の血漿試料を採取した。同腹児ごとに血漿をプールした。バリデートされた分析法を使用して、血漿中の BMN 111 濃度を分析した。

全ての F₀ 動物から、投与始前及び剖検前に ADA 測定用の血清を採取した。試料の分析は実施しなかった。

結果:

全例が予定剖検日まで生存した。体重、摂餌量及び剖検時の肉眼的所見に影響は認められなかった。240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、8 例中 4 例で BMN 111 投与と関連する軟便又は液状便が観察された。

240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与により、胚・胎児の生存率及び胎児体重に影響が認められた。同群では、対照群 (25%) 及び背景値 (平均値 27.3%、範囲 0~50%) と比較して、吸収胚の発現率が高く (1 ヵ所以上の吸収胚を有する動物が 71%)、平均吸収胚数も増加した。着床後胚損失率は対照群と比較して上昇したが、背景値の範囲内であった。

240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の胎児 1 例で腹壁破裂が認められたが、この変化の発現頻度は背景値の範囲内であった。

C_{max} 及び AUC_{0-t} で評価した BMN 111 の曝露量は、投与量と共に増加し、その増加割合は投与量比を上回った (> 1:1)。BMN 111 の曝露量は、妊娠期間中 (妊娠 7~19 日) に全ての用量でわずかな減少が観察された。投与期間中に認められた曝露量の減少から、反復投与による蓄

積性がないことが示された。BMN 111 の T_{max} は他の動物種よりも長く、多くは妊娠 7 及び 19 日の投与後 60 又は 90 分に観察され、投与量に伴って延長した。 C_{max} 到達後、血漿中 BMN 111 濃度は低下し、妊娠 7 及び 19 日の母動物の群平均 $t_{1/2}$ は約 1 時間と推定された。しかし、各動物の $t_{1/2}$ はばらつきがあり (25.2~117 分)、中及び高用量群の一部の動物では、 C_{max} 到達後次の TK 測定時点までに血漿中の BMN 111 が消失しなかったため、 $t_{1/2}$ を算出することができなかった。

BMN 111 を妊娠ウサギに投与した結果、妊娠 20 日の最終投与後約 30 分に、プールした胎児の血漿中で定量可能な濃度の BMN 111 は認められなかった (<0.100 ng/mL)。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.7]項に記載した。

結論：

以上より、BMN 111 は妊娠ウサギにおいて 240 µg/kg/日までおおむね良好な忍容性を示した。観察された臨床症状は軟便又は液状便のみであった。本試験では、大規模な試験でさらなる評価が必要な、母動物の毒性に起因する典型的な胚・胎児発生に及ぼす影響が観察された。GLP 適合のウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 (試験番号 BMN111-14-081、2.6.6.6.5 項) で評価する投与量として、240 µg/kg/日を設定した。

2.6.6.6.5 BMN 111 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験 (試験番号 [BMN111-14-081])

試験の目的：

本試験は、妊娠ウサギに BMN 111 を着床から硬口蓋閉鎖まで曝露したときの毒性及び TK を評価し、胚・胎児発生に及ぼす影響を評価することを目的として実施した。本試験は、ICH S5(R3) ガイドラインの生殖発生ステージ C 及び D を評価するようデザインした。

本試験は、[REDACTED] (米国、[REDACTED]) において、米国、日本及び OECD の GLP 基準に従って実施した。試験期間は 20[REDACTED] 年 1 月 27 日~20[REDACTED] 年 2 月 14 日であった。本試験の概要を[表 2.6.7.13-2]に示す。

材料と方法：

本試験では、交配済みの雌ウサギ (Hra:[NZW] SPF) を使用し、入荷時に約 5 ヶ月齢で体重は 2.6~3.7 kg であった。動物を無作為に 4 群に割り付けた。試験デザインを表 2.6.6.6.5-1 に示す。

雌ウサギに溶媒又は BMN 111 を主試験は妊娠 7~19 日、TK 試験は妊娠 7~20 日まで連日投与した。溶媒又は BMN 111 を肩甲骨間の 4 ヶ所の部位を順に使用して皮下投与した。最終投与には 5 ヶ所目の未使用の部位を使用した。

表 2.6.6.5-1 ウサギの胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (µg/kg) ^a	Main Study: No. Females per Group	Toxicokinetic Study: No. Females per Group
1	Vehicle ^b	0	20	2
2	BMN 111 ^c	45	20	3
3		135	20	3
4		240	20	3

a) The dose volume was 1 mL/kg.

b) Vehicle: BMN 111 Vehicle Control Solution 2 (0.005 mol/L citrate buffer, solution, pH 5.5 +/- 0.2).

c) One lot of BMN 111 was used during the study: P2203-11004.

全例について、一般状態観察を入荷日並びに投与期間中及び投与期間終了後は毎日実施した。各投与後 1~2 時間の観察所見を記録した。

体重は、動物供給業者で妊娠 0 日、入荷日に試験施設で測定し、その後は投与期間中及び投与後期間終了後は毎日測定した。入荷後毎日、摂餌量を測定した。

妊娠 29 日に主試験の動物を安楽死させ剖検した。生殖器官を摘出して子宮を切開し、子宮内検査を実施した。胎児を摘出して重量を測定し、外表、内臓及び骨格検査を実施した。黄体数及びその分布、着床数、胎盤の状態、生存及び死亡胎児数、並びに早期/後期吸収胚数を検査した。明らかに不妊と見られるウサギの子宮をスライドグラスで挟んで、着床痕がないことを確認した。全動物から投与部位及び明らかな肉眼的病変を採取し、保存した。非妊娠動物の子宮及び卵巣も全て保存した。病理組織学的検査は実施しなかった。

妊娠 7 及び 19 日に TK 試験用の F₀ ウサギ (母動物) から血漿を採取した。対照群の動物は投与後 5 分に試料を採取し、投与群の動物は投与前、投与後 5、15、30、60、90、120、180、240 及び 360 分に試料を採取した。妊娠 20 日の投与後約 32~39 分に、TK 試験用動物から外科的に摘出した生存胎児を断頭して、胎児の血漿試料を採取した。同腹児ごとに血漿をプールした。バリデートされた分析法を使用して、血漿中の BMN 111 濃度を分析した。

全ての F₀ 動物から、投与開始前及び剖検前に ADA 測定用の血清を採取した。ADA 産生の有無について試料を分析した。

結果:

全例が予定剖検日まで生存した。対照群及び 240 µg/kg 群では 20 例の全例、45 及び 135 µg/kg 群では 20 例中 19 例で妊娠を確認した。

一般状態、体重、摂餌量、肉眼的所見、帝王切開及び胎児の指標には、BMN 111 に関連した明らかな影響は認められなかった。

本試験で観察された胎児の奇形及び変異は、背景データの奇形・変異と同種類で発現頻度も同等であり、多くは対照群の母動物の胎児で観察された。胎児の平均骨化進行度に差はなかった。

本試験でも用量設定試験 (2.6.6.4 項) と類似した BMN 111 の薬物動態が観察され、他の動物種と比較して T_{max} 及び t_{1/2} の延長が認められた。C_{max} 及び AUC_{0-t} で評価した BMN 111 の曝露量は、投与量と共に増加し、その増加割合は 45~240 µg/kg で全般的に投与量比を上回った

(> 1:1)。BMN 111 の蓄積は認められなかった。BMN 111 の曝露量及び薬物動態に関する詳細は[2.6.4.3.2.8]項に記載した。

胎児のプールした血漿中の BMN 111 濃度は、対照群及び 45 µg/kg 群で BQL (<0.100 ng/mL) であった。135 µg/kg 群の胎児血漿中の平均濃度は 0.253 ng/mL、240 µg/kg 群では 0.460 ng/mL であった（投与量の 1.8 倍の増加に比例して血漿中濃度が 1.8 倍に増加）。全体として、母動物と同じ投与後 30 分では、胎児血漿中の BMN 111 濃度は母動物の数 100 分の 1 に低下した。

5 試料を除いて全試料の ADA 活性を検査した結果、ADA は検出されなかった。

結論：

以上より、妊娠ウサギに BMN 111 を 45、135 及び 240 µg/kg/日の用量で、妊娠 7～19 日まで連日皮下投与したとき、忍容性が良好であった。母動物の妊娠及び胚・胎児発生に及ぼす影響は認められなかった。ウサギにおける母動物毒性及び胚・胎児発生に関する無毒性量は 240 µg/kg/日と判断された。無毒性量における、妊娠 19 日の母動物の C_{max} は 379 ng/mL、AUC_{0-t} は 58,000 ng·min/mL であった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

反復投与毒性試験の一部として BMN 111 の局所刺激性を評価した (2.6.6.3.2 項、2.6.6.3.3 項、2.6.6.3.4 項、2.6.6.3.6 項、2.6.6.3.7 項、及び 2.6.6.3.8 項参照)。BMN 111 の独立した局所刺激性試験は実施しなかった。

ラット及びカニクイザルで観察された皮下投与部位の所見から、BMN 111 は溶媒単独よりもやや刺激性が強いことが示唆された。

2.6.6.8 その他の毒性試験

BMN 111 のその他の毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

BMN 111 の非臨床安全性評価として、SD 系ラット及びカニクイザルの幼若及び成熟動物を用いて、単回投与毒性試験、並びにそれぞれ最長 26 及び 44 週間までの反復投与毒性試験を実施した。BMN 111 の生殖発生毒性についても、ICH R5(S3)ガイドラインのステージ A～F を SD 系ラットで、ステージ C 及び D (胚・胎児発生) を New Zealand White ウサギを用いて評価した。

全体的に BMN 111 の作用は、成長板及び血管系の NPR-B シグナル伝達に対する、予想された作用のみであった。ラット及びサルでは軟骨内骨化の促進により、特に体重を支える関節の変性及び機能不全、並びに骨塩量及び骨密度の低下が認められた。関節の変化は、試験及び動物の年齢にかかわらず、特に BMN 111 を長期投与した動物で観察された。これらの影響はラットの特に雄で顕著であり、BMN 111 の曝露量 (C_{max} 及び AUC) が高かったことによるものと考えられる。成熟動物では体重に性差があり、そのため体重の重い雄で BMN 111 の総投与量が多かったことによるものと考えられる。非臨床毒性試験は正常動物を用いて実施したことから、投与期間、試験開始時の動物の年齢、動物種及びその遺伝的背景を考慮して、骨所見の重篤性を解釈する必要があると考える。

サルで心拍数の一過性の増加も観察されたが、これはテレメトリーシステムを装着したサルで観察された一過性の血圧低下に伴う二次的な変化であった。これらの影響は一貫して観察さ

れた変化ではなく、全般的に無症候性であった。最後に、ラットの長期投与毒性試験で精子数及び濃度の低下が認められたが、雌雄ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験では、精子数の減少に伴う受胎率の低下は認められなかった。性成熟に達したサルに最長 44 週間投与しても影響は認められなかった。

解剖学的構造、成長板の生理学的特徴及び個体発生の類似性から、サルはヒトと最も関連のある動物種と考えられる。高用量で認められた骨格に対する有害作用に基づき、BMN 111 を最長 26 週間投与した幼若サルの無毒性量は 90 µg/kg であった。この投与量は平均 C_{max} が 19.8 ng/mL に相当し、小児第 3 相試験における曝露量と比較した安全係数は 3.4 倍であった。いずれの毒性試験でも、他の器官系/軟部組織には BMN 111 に関連した影響は認められなかった。

BMN 111 の遺伝毒性試験は実施していない。BMN 111 は完全に天然アミノ酸で構成されるペプチドであり、合成リンカーを含まないため、BMN 111 が DNA と直接反応することは予想されない。BMN 111 のがん原性試験は実施していない。BMN 111 の潜在的ながん原性リスクを予測するために、げっ歯類を用いた BMN 111 の標準的ながん原性試験から、FGFR3 経路の阻害に関する既知の情報に加えて、臨床的意味のある安全性情報が得られる可能性は低い。

BMN 111 は、ラットを用いた生殖発生毒性試験において、雌雄の受胎能に影響を及ぼさなかった。BMN 111 を妊娠ラット及びウサギの器官形成期に連日投与した結果、胚・胎児毒性は認められなかった。母動物の妊娠期及び授乳期に投与した場合、BMN 111 は出生児の生殖能や発達に影響を及ぼさないと考えられた。BMN 111 を投与した幼若動物又は BMN 111 を投与した母動物の出生児に、神経学的発達への影響は認められなかった。BMN 111 は授乳中の母動物の乳汁中に検出されたが、哺育中の出生児では検出されなかった。これは、BMN 111 の乳汁中濃度が低く、消化管内ではペプチドの安定性が低いことが原因と考えられる。

結論として、BMN 111 の非臨床毒性試験は、予想される過剰な薬理作用の特徴を明らかにし、臨床開発を担保する情報を提供した。

ボックスゾゴ[®]皮下注用 0.4mg
ボックスゾゴ[®]皮下注用 0.56mg
ボックスゾゴ[®]皮下注用 1.2mg

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.6.7	毒性試験概要表.....	4
2.6.7.1	毒性試験：一覧表.....	4
2.6.7.2	トキシコキネティクス：試験一覧表.....	8
2.6.7.3	トキシコキネティクス：試験成績の一覧.....	9
2.6.7.4	毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧.....	11
2.6.7.5	単回投与毒性試験.....	12
2.6.7.6	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....	13
2.6.7.7	反復投与毒性試験：重要な試験.....	14
2.6.7.8	<i>In Vitro</i> 遺伝毒性試験.....	106
2.6.7.9	<i>In Vivo</i> 遺伝毒性試験.....	106
2.6.7.10	がん原性試験.....	106
2.6.7.11	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....	107
2.6.7.12	生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....	108
2.6.7.13	生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験.....	111
2.6.7.14	生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....	116
2.6.7.15	新生児を用いた試験.....	120
2.6.7.16	局所刺激性試験.....	120
2.6.7.17	その他の毒性試験.....	120

表目次

表 2.6.7.1-1	毒性試験一覧表.....	4
表 2.6.7.2-1	トキシコキネティクス試験の一覧表.....	8
表 2.6.7.3-1	トキシコキネティクス試験成績の一覧.....	9
表 2.6.7.4-1	非臨床試験に使用した被験物質一覧.....	11
表 2.6.7.5-1	単回投与毒性試験.....	12
表 2.6.7.6-1	反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験.....	13
表 2.6.7.7-1	BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験.....	14
表 2.6.7.7-2	BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 28 日間回復性試験.....	20
表 2.6.7.7-3	BMN 111 の幼若ラットにおける 26 週間皮下投与毒性試験及び 6 週間回復性試験.....	28
表 2.6.7.7-4	BMN 111 のカニクイザルにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験.....	73
表 2.6.7.7-5	BMN 111 のカニクイザルにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 28 日間回復性試験.....	81
表 2.6.7.7-6	BMN 111 のカニクイザルにおける 44 週間反復皮下投与（連日）毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験.....	88
表 2.6.7.11-1	生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験.....	107
表 2.6.7.12-1	BMN 111 のラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する皮下投与試験.....	108
表 2.6.7.13-1	BMN 111 のラットにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験.....	111
表 2.6.7.13-2	BMN 111 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験.....	114
表 2.6.7.14-1	BMN 111 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する皮下投与試験.....	116

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表

Test Article: BMN 111

Type of Study	Test System	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses (µg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study/Report Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity								
Single dose toxicity in rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Once, Day 1. 7 days recovery.	SC: 0, 80, 240, 800 IV: 0, 15, 50, 150	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-015]	4.2.3.1
		Intravenous						
Single dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	Subcutaneous	Once, Day 1. 7 days recovery.	SC: 0, 20, 60, 200 IV: 0, 2, 6, 20	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-006]	4.2.3.1
		Intravenous						
Repeat-Dose Toxicity								
21-day pilot feasibility study in juvenile rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Daily, 21 days.	0, 90	Non-GLP	BioMarin Pharmaceutical, Novato, CA, USA	[BMN111-11-053]	4.2.3.2
28-day repeat dose toxicity in rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Daily, 28 days. 7 days recovery.	0, 50, 150, 500	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-029]	4.2.3.2
26-week repeat dose toxicity study in rats	Rat, Hsd:SD	Subcutaneous	Daily, 26 weeks. 28 days recovery.	0, 50, 150, 500	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-036]	4.2.3.2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表 (続き)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses (µg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study/Report Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity								
26-week repeat dose toxicity study in juvenile rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Daily, 26 weeks. 6 weeks recovery.	0, 10, 30, 90	GLP ^a	[REDACTED] Canada	[BMN111-11-052]	4.2.3.2
CV safety pharmacology and dose range finding in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	Subcutaneous	Phase I: Day 1, 3, 4, 7 (anesthetized). Day 9, 10 (conscious).	Phase I: 0, 1.4, 7, 14, 28, 70 (anesthetized) 0, 28, 49, 70, 140 (conscious)	Non-GLP	[REDACTED] Canada	[BMN111-09-067]	4.2.1.3
			Phase II: Once daily, 7 days.	Phase II: 0, 28, 70 (conscious)				
28-day repeat dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	Subcutaneous	Daily, 28 days. 7 days recovery.	0, 20, 90, 300	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-019]	4.2.3.2
26-week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	Subcutaneous	Daily, 26 weeks. 28 days recovery.	0, 20, 90, 300	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-035]	4.2.3.2
44-week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	Subcutaneous	Daily, 44 weeks. 13 weeks recovery.	0, 25, 75, 250	GLP ^a	[REDACTED] USA	[BMN111-11-043]	4.2.3.2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表 (続き)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	GLP Compliance	Testing Facility	Study/Report Number	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity								
Embryo-fetal developmental toxicity in rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Daily, GD 6-17	0, 90, 270, 540	GLP ^a	██████████ USA	[BMN111-14-061]	4.2.3.5.2
Male and female fertility and early embryonic development in rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Males: Daily, from 28 days pre-cohabitation to confirmation of mating Females: Daily, 15 days pre-cohabitation to GD 7	0, 90, 270, 540	GLP ^a	██████████ USA	[BMN111-14-060]	4.2.3.5.1
Pre-and postnatal developmental toxicity study in rats	Rat, Crl:CD (SD)	Subcutaneous	Daily, GD 6 to LD 20	0, 90, 270, 540	GLP ^a	██████████ USA	[BMN111-18-103]	4.2.3.5.3
Embryo-fetal developmental toxicity dose-range finding in rabbits	Rabbit, Hra:(NZW) SPF	Subcutaneous	Daily, GD 7-19	0, 45, 135, 240	Non-GLP	██████████ USA	[BMN111-14-055]	4.2.3.5.2
Embryo-fetal developmental toxicity in rabbits	Rabbit, Hra:(NZW) SPF	Subcutaneous	Daily, GD 7-19	0, 45, 135, 240	GLP ^a	██████████ USA	[BMN111-14-081]	4.2.3.5.2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧表 (続き)

CV, cardiovascular; NZW, New Zealand White; GD, gestation day; GLP, Good Laboratory Practice; IV, intravenous; LD, lactation day; SD, Sprague Dawley; SC, subcutaneous; SPF, specific pathogen-free.

- a) This study was compliant with United States Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations, Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare Good Laboratory Practice Standards Ordinance No. 21; Organisation for Economic Co-operation and Development Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：試験一覧表

表 2.6.7.2-1 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: BMN 111

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (µg/kg)	GLP Compliance	Study/Report Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity						
28-day repeat dose toxicity in rats	Rat, CrI:CD (SD)	SC	0, 50, 150, 500	GLP ^a	[BMN111-11-029]	4.2.3.2
26-week repeat dose toxicity study in rats	Rat, Hsd:SD	SC	0, 50, 150, 500	GLP ^a	[BMN111-11-036]	4.2.3.2
26-week repeat dose toxicity study in juvenile rats	Rat, CrI:CD (SD)	SC	0, 10, 30, 90	GLP ^a	[BMN111-11-052]	4.2.3.2
28-day repeat dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	SC	0, 20, 90, 300	GLP ^a	[BMN111-11-019]	4.2.3.2
26-week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	SC	0, 20, 90, 300	GLP ^a	[BMN111-11-035]	4.2.3.2
44-week repeat dose toxicity study in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	SC	0, 25, 75, 250	GLP ^a	[BMN111-11-043]	4.2.3.2

GLP, Good Laboratory Practice; SD, Sprague Dawley; SC, subcutaneous.

- a) This study was compliant with United States Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations, Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare Good Laboratory Practice Standards Ordinance No. 21; Organisation for Economic Co-operation and Development Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17.

2.6.7.3 トキシコキネティクス：試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: BMN 111

Repeat-Dose Toxicity Studies				
AUC _{0-t} (pg·min/mL)				
Daily Dose (µg/kg)	Rats ^a		Monkeys ^a	
	Male	Female	Male	Female
10	22,842 ^b	10,133 ^b	-	-
20	-	-	186,104 ^c , 39,100 ^d	41,263 ^c , NC ^d
25	-	-	795 ^c	1050 ^c
30	140,208 ^b	84,208 ^b	-	-
50	679,658 ^f , 592,675 ^g	250,175 ^f , 635,775 ^g	-	-
75	-	-	17,800 ^e	13,100 ^e
90	734,877 ^b	459,917 ^b	900,544 ^c , 574,854 ^d	700,163 ^c , 426,156 ^d
150	3,381,317 ^f , 1,436,808 ^g	1,043,417 ^f , 1,317,208 ^g	-	-
250	-	-	137,000 ^e	188,000 ^e
300	-	-	11,634,778 ^c , 4,081,291 ^d	10,652,793 ^c , 14,867,791 ^d
500	5,998,467 ^f , 25,410,983 ^g	10,313,983 ^f , 8,715,225 ^g	-	-
C _{max} (pg/mL)				
Daily Dose (µg/kg)	Rats ^a		Monkeys ^a	
	Male	Female	Male	Female
10	680 ^b	527 ^b	-	-
20	-	-	3320 ^c , 400 ^d	2034 ^c , NC ^d
25	-	-	2350 ^c	2440 ^e
30	3857 ^b	1987 ^b	-	-
50	13,703 ^f , 19,830 ^g	5790 ^f , 16,800 ^g	-	-
75	-	-	20,300 ^e	19,800 ^e
90	26,150 ^b	16,900 ^b	18,813 ^c , 9263 ^d	16,600 ^c , 12,275 ^d
150	73,333 ^f , 38,067 ^g	36,633 ^f , 27,817 ^g	-	-
250	-	-	87,900 ^e	138,000 ^e
300	-	-	132,071 ^c , 66,800 ^d	144,357 ^c , 151,986 ^d
500	151,333 ^f , 495,667 ^g	214,867 ^f , 163,333 ^g	-	-

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧 (続き)

AUC, area under the concentration-time curve; C_{max} , maximum observed plasma concentration; NC, not calculated; -, not included in a study.

- a) Subcutaneous injection.
- b) BMN111-11-052: 26-week juvenile rat toxicity study (Day 182).
- c) BMN111-11-019: 28-day monkey toxicity study (Day 28).
- d) BMN111-11-035: 26-week monkey toxicity study (Day 176). Values of 20 µg/kg males are for n = 1.
- e) BMN111-11-043: 44-week monkey toxicity study (Week 4).
- f) BMN111-11-029: 28-day rat toxicity study (Day 28).
- g) BMN111-11-036: 26-week rat toxicity study (Day 176).

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4-1 非臨床試験に使用した被験物質一覧

Test Article: BMN 111

Product Lot	Purity ^{a,b} (%)	Study	Study/Report Number
CM092309	95	CV safety pharmacology and dose range finding in monkeys	[BMN111-09-067]
CM112410	86.2	Single dose toxicity in rats	[BMN111-11-015]
		Single dose toxicity in monkeys	[BMN111-11-006]
CM041811-FBDS	89.2	28-day repeat dose toxicity in rats	[BMN111-11-029]
		28-day repeat dose toxicity in monkeys	[BMN111-11-019]
CM052711-FBDS	85.1	26-week repeat dose toxicity study in rats	[BMN111-11-036]
		26-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-035]
CM050611-FBDS	86.1	26-week repeat dose toxicity study in rats	[BMN111-11-036]
		26-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-035]
		44-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-043]
P2204-11003	92.6	26-week repeat dose toxicity study in juvenile rats	[BMN111-11-052]
		44-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-043]
P2204-11001	91.1	26-week repeat dose toxicity study in rats	[BMN111-11-036]
		21-day pilot feasibility study in juvenile rats	[BMN111-11-053]
		26-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-035]
P2204-12001	87.5	44-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-043]
		44-week repeat dose toxicity study in monkeys	[BMN111-11-043]
P2203-11004	87.1	Embryo-fetal developmental toxicity in rats	[BMN111-14-061]
		Fertility and early embryonic development in rats	[BMN111-14-060]
		Embryo-fetal developmental toxicity dose-range in rabbits	[BMN111-14-055]
		Embryo-fetal developmental toxicity in rabbits	[BMN111-14-081]
P12003-15102	88.0	Pre- and post-natal developmental toxicity study in rats	[BMN111-18-103]

CV, cardiovascular; FBDS, formulated bulk drug substance.

a) Purity by high performance liquid chromatography (HPLC). Proposed specification is > 80.0%.

b) Refer to Section [3.2.S.3.2] for a discussion of specified impurities for each lot.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 2.6.7.5-1 単回投与毒性試験

Test Article: BMN 111

Test System	Route of Administration	Doses (µg/kg)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	NOAEL	Study/Report Number
Rat, CrI:CD (SD)	SC	0	Toxicity: 10M/10F TK: 3M/3F (vehicle), 9M/9F (BMN 111).	Minimal increases in alkaline phosphatase activity in males given 800 µg/kg BMN 111 on Day 8.	800 µg/kg (SC), 150 µg/kg (IV)	[BMN111-11-015] ^a
		80				
		240				
		800				
	IV	0				
		15				
		50				
		150				
Monkey, cynomolgus	SC	0	3M/3F	Mildly to moderately increased urine volumes were observed in 1/3 males and 3/3 females given 200 µg/kg BMN 111 SC on Day 8.	200 µg/kg (SC), 20 µg/kg (IV)	[BMN111-11-006] ^a
		20				
		60				
		200				
	IV	0				
		2				
		6				
		20				

IV, intravenous; NOAEL, no-observed-adverse-effect level; SC, subcutaneous; SD, Sprague Dawley.

a) This study was compliant with United States Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations, Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare Good Laboratory Practice Standards Ordinance No. 21; Organisation for Economic Co-operation and Development Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6-1 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: BMN 111

Test System	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses (µg/kg)	Noteworthy Findings and NOAEL	Study/Report Number
Rat, CrI: CD(SD)	SC	Daily, 21 days	0, 90	<ul style="list-style-type: none"> Mean body weight of BMN 111-treated males was significantly different from control males at several timepoints until Study Day 15, after which no differences were noted. At study end, tail length for male and female BMN 111-treated rats was longer than controls (0.7 cm and 1.2 cm longer mean tail lengths for males and females, respectively). NOAEL: ND 	[BMN111-11-053]
Monkey, cynomolgus	SC	Phase I: Day 1, 3, 4, 7 (anesthetized). Day 9, 10 (conscious)	Phase I: 0, 1.4, 7, 14, 28, 70 (anesthetized). 0, 28, 49, 70, 140 (conscious)	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation and some hemorrhage of the subcutis noted at injection sites in all groups and was more pronounced in BMN 111-treated animals. Histological findings were limited to a widening of the hypertrophic zone of the growth plate. NOAEL: ND 	[BMN111-09-067]
		Phase II: Once daily, 7 days	Phase II: 0, 28, 70 (conscious)		

NOAEL, no-observed-adverse-effect level; ND, not determined; SC, subcutaneous, SD, Sprague Dawley.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7.7-1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験

Report Title: 28-Day Repeat-Dose Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study of BMN 111 in Sprague Dawley Rats with a 7-Day Recovery	Duration of Dosing: 28 days	Study No.: [BMN111-11-029]
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Post-dose: 7 days	Location in CTD: 4.2.3.2
Initial Age: 7-7.6 weeks	Method of Administration: Subcutaneous injection	Test Article: BMN 111
Date of First Dose: 20 May 2011	Vehicle/Formulation: 0.005 mol/L citrate buffer solution (pH 5.5) in Sterile Water for Injection, USP, containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80	GLP Compliance: Yes
The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL): 150 µg/kg/day		

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Number of TK Animals^a	3	3	9	9	9	9	9	9
TKs:								
Day 1:								
AUC_{0-t} (pg·min/mL)	NA	NA	80,225	73,125	371,850	230,875	1,947,550	1,301,850
C_{max} (pg/mL)	NA	NA	4007	3360	13,550	13,733	62,567	57,267
T_{max} (min)	NA	NA	5.0	5.0	15.0	5.0	5.0	5.0
t_{1/2} (min)	NA	NA	NC	NC	14.1	NC	15.7	13.5
Day 28:								
AUC_{0-t} (pg·min/mL)	NA	NA	679,658	250,175	3,381,317	1,043,417	5,998,467	10,313,983
C_{max} (pg/mL)	NA	NA	13,703	5790	73,333	36,633	151,333	214,867
T_{max} (min)	NA	NA	30.0	30.0	15.0	15.0	5.0	15.0
t_{1/2} (min)	NA	NA	NC	NC	31.8	35.0	NC	15.2

表 2.6.7.7-1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (続き)

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund – Toxicity Animals (Dosing Phase)	0	0	0	0	1	0	0	0
Died or Sacrificed Moribund – Toxicity Animals (Recovery Phase)	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Signs (Dosing Phase)^b:								
Swollen Ankle -Left	-	-	-	-	1	-	15	5
Swollen Ankle -Right	-	-	-	-	1	-	15	5
Swollen Hind Paws	-	-	-	-	0	-	1	-
Limited Use of Hind Legs	-	-	-	-	-	-	11	4
Clinical Signs (Recovery Phase)^b:								
Swollen Ankle -Left	-	-	-	-	-	-	3	2
Swollen Ankle -Right	-	-	-	-	-	-	3	2
Limited Use, Hind Legs	-	-	-	-	-	-	3	2
Body Weight Change (Dosing Phase):								
Days 1 -29 (g)	-	54	-	-	-	-	-	72*
Food Consumption								
	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations (Dosing Phase)^b:								
No. Examined	15	15	15	15	14	15	15	15
Femur Bone								
Abnormal Shape	0	0	0	0	0	0	1	0
Tarsal Joint								
Abnormal Shape	0	0	0	0	0	0	9	0
Subcutaneous Injection Site								
Discolored	1	0	7	1	2	1	3	1

表 2.6.7.7-1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (続き)

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Macroscopic Observations (Recovery Phase)^b:								
No. Examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Left Tarsal Joint								
Abnormal Shape	0	0	0	0	0	0	3	1
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (Dosing Phase)^b:								
No. Examined	15	15	15	15	14	15	15	15
Sternum bone:								
Increased Growth Plate Thickness								
Minimal	0	0	6	3	7	7	7	6
Left tarsal joint:								
Increased Growth Plate Thickness								
Minimal	0	0	10	9	3	10	0	0
Slight	0	0	5	1	10	4	3	3
Moderate	0	0	0	0	1	0	11	12
Marked	0	0	0	0	0	0	1	0
Endochondral Ossification, Increased								
Minimal	0	0	8	6	7	11	3	8
Slight	0	0	0	0	5	0	8	2
Degeneration/ Hemorrhage, Growth Plate								
Minimal	0	0	0	1	1	4	6	5
Periarticular Fibromatous/ Myxomatous Tissue, Increased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	3
Slight	0	0	0	0	0	0	3	1

表 2.6.7.7-1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (続き)

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Histopathology (Dosing Phase) (cont'd)^b:								
Subcutaneous Injection Site								
Infiltrate, Mononuclear Cell								
Minimal	11	12	4	2	4	3	3	3
Slight	0	1	7	8	5	8	8	7
Moderate	0	0	4	5	5	4	2	5
Histopathology (Recovery Phase)^b:								
No. Examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Sternum bone:								
Increased Growth Plate Thickness								
Minimal	0	0	0	2	3	1	0	3
Left tarsal joint:								
Increased Growth Plate Thickness								
Minimal	0	0	4	2	1	2	0	0
Slight	0	0	0	0	3	3	1	4
Moderate	0	0	0	0	1	0	4	1
Endochondral Ossification, Increased								
Minimal	0	0	1	0	4	4	1	2
Slight	0	0	0	0	1	0	3	2
Degeneration/ Hemorrhage, Growth Plate								
Minimal	0	0	0	0	2	4	0	1
Periarticular Fibromatous/Myxomatous Tissue, Increased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2

表 2.6.7.7-1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (続き)

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Subcutaneous Injection Site								
Infiltrate, Mononuclear Cell								
Minimal	2	2	1	3	2	2	2	0
Slight	0	0	0	2	0	3	0	0
Femur Bone Histology (Dosing Phase)^b:								
No. Examined	15	15	15	15	14	15	14	14
Disorganization, Physis, Proliferative Zone								
Minimal	-	-	-	1	-	1	-	-
Increased Thickness, Physis, Proliferative Zone								
Minimal	-	-	-	4	2	7	13	12
Disorganization, Physis, Hypertrophic/Calcified Zone								
Minimal	-	-	-	-	-	-	3	-
Thickness Increased, Physis, Hypertrophic/Calcified Zone								
Minimal	-	-	-	1	2	-	5	-
Disorganization, Primary Spongiosa								
Minimal	-	-	-	-	-	-	1	-
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-
Thickness Increased, Primary Spongiosa								
Minimal	-	-	-	-	-	-	2	-
Mild	-	-	-	-	-	-	1	-

表 2.6.7.7-1 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 28 日間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 7 日間回復性試験 (続き)

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
Number of Animals	20	20	20	20	20	20	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Bone Measurements (Dosing Phase) ^c:								
No. Examined	15	15	15	15	14	15	14	14
Bone Length (mm)								
Right Femur	36.36	33.55	-	-	3.5%*	-	6.1%*	3.6%*
Right Tibia	41.02	38.26	-	-	4.2%*	-	7.3%*	-
Growth Plate								
Zone of Multiplication Height (µm)	123.328	97.635	-	-	15.2%*	12.4%*	23.3%*	20.9%*
Zone of Reserve Height (µm)	32.484	30.900	-	-	40.1%*	12.5%*	-	20.0%*
Zone of Hypertrophy Height (µm)	101.446	57.689	-	-	-	17.9%*	27.2%*	19.6%*
Zone of Multiplication Area (mm ²)	1.047	0.631	-	13.6%*	-	-	-	31.1%*
Zone of Reserve Area (mm ²)	0.256	0.193	-	-	-	-	-	35.2%*
Zone of Hypertrophy Area (mm ²)	0.832	0.336	-	-	-	20.2%*	-	22.6%*
Sum of All Zones at the Growth Plate								
Area (mm ²)	2.134	1.159	-	-	-	15.7%*	-	29.4%*
Height (µm)	257.258	186.224	-	-	-	14.1%*	22.9%*	20.4%*
Serum CTX-II Levels ^{c,d}:								
Dosing Day 29 (pg/mL)	7.32	7.41	-	-	198.2%	177.3%	156.8%	142.4%
Recovery Day 7 (pg/mL)	20.26	7.37	-	-	110.7%	280.6%	60.4%	186.8%

-, no noteworthy findings; AUC, area under the plasma concentration-time curve; C_{max}, maximum observed plasma concentration; CTX-II, C-terminal telopeptide of type II collagen; GLP, Good Laboratory Practice; NA, not applicable; NC, not calculated; SC, subcutaneous; TK, toxicokinetics; T_{max}, time to peak plasma concentration; t_{1/2}, elimination phase half-life.

* p ≤ 0.05 Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

a) Satellite TK animals. TK calculated based on a composite of 3 rats/sex/group/time point.

b) These values represent the number of incidences that each was observed.

c) For controls, group means shown. For BMN 111 groups, percent difference from controls shown.

d) A midpoint value of 3.125, between 0 and 6.25 (assay detection limit), was used for below limit of quantitation values for statistical analysis.

表 2.6.7.7-2 BMN 111 の Sprague Dawley ラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 28 日間回復性試験

Report Title: 26-Week Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study by Subcutaneous Administration of BMN 111 in Sprague Dawley Rats with a 28-Day Recovery

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley

Duration of Dosing: 26 weeks

Study No.: [BMN111-11-036]

Initial Age: 8 months

Duration of Post-dose: 28 days

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 06 July 2011 (males),
14 July 2011 (females)

Method of Administration: SC

Test Article: BMN 111

Vehicle/Formulation: 0.005 mol/L citrate buffer solution, pH 5.5 containing 5.8% (w/v) trehalose dihydrate, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 prepared in Sterile Water for Injection, USP.

GLP Compliance: Yes

NOAEL: 50 µg/kg/day

Gender	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Daily Dose (µg/kg)	0 (Control)	0 (Control)	50	50	150	150	500	500
dayNumber of Animals	20	20	15	15	15	15	20	20
Number of Recovery Animals	5	5	0	0	0	0	5	5
Number of Toxicokinetic Animals	6	6	9	9	9	9	9	9
TK ^a :								
Day 1:								
AUC _{0-t} (pg·min/mL)	NA	NA	404,204	145,417	762,758	682,408	4,780,983	2,634,433
Day 85:								
AUC _{0-t} (pg·min/mL)	NA	NA	1,851,217	783,308	4,464,550	2,673,133	29,684,542	8,580,967
Day 176:								
AUC _{0-t} (pg·min/mL)	NA	NA	592,675	635,775	1,436,808	1,317,208	25,410,983	8,715,225