# 目次

略語一覧 ..... 5
2.6.6 毒性試験の概要文 ..... 7
2.6.6.1 まとめ ..... 7
2.6.6.2 単回投与毒性試験 ..... 14
2.6.6.3 反復投与毒性試験 ..... 14
2.6.6.3.1 ラットを用いた試験 ..... 14
2.6.6.3.1.1 28 日間皮下投与用量設定試験（1） ..... 14
2.6.6.3.1.2 28 日間皮下投与用量設定試験（2） ..... 16
2.6.6.3.1.3 26 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 ..... 18
2.6.6.3.2 サルを用いた試験 ..... 26
2.6.6.3.2.1 28 日間皮下投与用量設定試験 ..... 26
2.6.6.3.2.2 39 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 ..... 28
2.6.6.4 遺伝毒性試験 ..... 32
2.6.6.4.1 In Vitro 遺伝毒性試験 ..... 32
2.6.6.4.1.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 ..... 32
2.6.6.4.1.2 染色体異常試験 ..... 33
2.6.6.4.2 In Vivo 遺伝毒性試験 ..... 33
2.6.6.4.2.1 ラット骨髄を用いた哺乳類赤血球小核試験 ..... 33
2.6.6.5 がん原性試験（TK 評価を含む） ..... 34
2.6.6.5.1 野生型 rasH2-Wt マウスの 7 日間皮下投与用量設定試験 ..... 36
2.6.6.5.2 野生型 rasH2-Wt マウスの 28 日間皮下投与用量設定試験 ..... 39
2.6.6.5.3 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（1） ..... 46
2.6.6.5.4 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（2） ..... 50
2.6.6.5.5 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（3） ..... 53
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 ..... 56
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 ..... 56
2.6.6.6.1.1 雄受胎能に関する試験 ..... 56
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 ..... 57
2.6.6.6.2.1 雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験 ..... 57
2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた忍容性及び胚・胎児発生用量設定試験 ..... 58
2.6.6.6.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 ..... 60
2.6.6.6.3 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 ..... 62
2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験 ..... 65
2.6.6.6.4.1 幼若ラットを用いた用量設定試験 ..... 65
2.6.6.6.4.2 幼若ラットを用いた 7 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 ..... 66
2.6.6.7 局所刺激性試験 ..... 68
2.6.6.7.1 ラットを用いた setmelanotide 製剤の 7 日間皮下投与局所刺激性試験及び 7 日間回復性

試験 68
2.6.6.8 その他の毒性試験 69
2.6.6.8.1 免疫毒性及び抗原性 69
2.6.6.8.2 不純物の安全性確認 70
2.6.6.8.2.1 原薬の不純物 70
2.6.6.8.2.1.1 ペプチド類縁物質 70
2.6.6.8.2.1.1.1 特定された既知のペプチド類縁物質 70
2.6.6.8.2.1.1.2 未特定のペプチド類縁物質 71
2.6.6.8.2.1.1.3 総ペプチド類縁物質 72
2.6.6.8.2.1.2 非ペプチド不純物 72
2.6.6.8.2.2 製剤の不純物 73
2.6.6.8.2.2.1 ペプチド類縁物質 73
2.6.6.8.2.2.2 非ペプチド不純物 73
2.6.6.8.3 光毒性 74
2.6.6.8.4 代謝物 74
2.6.6.8.5 依存性 74
2.6.6.8.6 新添加剤 74
2.6.6.9 考察及び結論 75
参考文献 81

## 表一覧

表 2.6.6-1 毒性試験プログラム 7
表 2.6.6-2 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における最大臨床用量 3 mg/日に対する安全域 10
表 2.6.6-3 Setmelanotide の保存料添加及び非添加製剤の組成 12
表 2.6.6-4 RM-493-TOX-026 試験の試験デザイン 15
表 2.6.6-5 RM-493-TOX-036 試験の試験デザイン 17
表 2.6.6-6 RM-493-TOX-023 試験の試験デザイン 19
表 2.6.6-7 雄ラットの投与部位及び骨格筋の病理組織学的所見（主試験群） 21
表 2.6.6-8 雌ラットの投与部位及び骨格筋の病理組織学的所見（主試験群） 22
表 2.6.6-9 雄ラットの投与部位の病理組織学的所見（回復群） 23
表 2.6.6-10 雌ラットの投与部位の病理組織学的所見（回復群） 24
表 2.6.6-11 雄ラット脳の病理組織学的所見（主試験群） 25
表 2.6.6-12 雌ラット脳の病理組織学的所見（主試験群） 25
表 2.6.6-13 雌ラット脳の病理組織学的所見（回復群） 25
表 2.6.6-14 ラットにおける TK パラメーター 26
表 2.6.6-15 RM-493-TOX-027 試験の試験デザイン 27

表 2.6.6-16 RM-493-TOX-024 試験の試験デザイン ....28
表 2.6.6-17 剖検所見（Day 274） ....29
表 2.6.6-18 皮膚及び投与部位の病理組織学的所見（Day 274） ....29
表 2.6.6-19 脳の病理組織学的所見（Day 274） ....30
表 2.6.6-20 回復群の病理組織学的所見（Day 302） ....31
表 2.6.6-21 TK パラメーター ....32
表 2.6.6-22 RM-493-TOX-020 試験の試験デザイン ....34
表 2.6.6-23 RM-493-TOX-040 試験の試験デザイン ....36
表 2.6.6-24 投与部位における痂皮、紅斑及び浮腫の発現頻度及び重症度 ....37
表 2.6.6-25 剖検時（Day 8）の剖検所見 ....38
表 2.6.6-26 剖検時（Day 8）の投与部位の淡色／暗色痂皮及び擦過傷の合算発現率 ....39
表 2.6.6-27 RM-493-TOX-041 試験の試験デザイン ....40
表 2.6.6-28 28 日間皮下投与後の TK パラメーター ....41
表 2.6.6-29 投与部位における痂皮／紅斑／浮腫の発現頻度及び重症度 ....42
表 2.6.6-30 剖検所見（Day 29） ....44
表 2.6.6-31 病理組織学的所見（Day 29） ....44
表 2.6.6-32 RM-493-TOX-042 試験の試験デザイン ....46
表 2.6.6-33 定量的及び標準的 PCR 解析に基づく各群の rasH2-Tg マウス数 ....47
表 2.6.6-34 遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスの生存率と主な死因 ....48
表 2.6.6-35 遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスにおける主要な腫瘍性所見 ....48
表 2.6.6-36 Setmelanotide/mPEG-DSPE 皮下投与後の Day 1 及び 182 における平均 setmelanotide 濃度-時間データ ....49
表 2.6.6-37 RM-493-TOX-044 試験の試験デザイン ....50
表 2.6.6-38 生存率データ及び主な死因 ....51
表 2.6.6-39 主な腫瘍性所見の発現率 ....51
表 2.6.6-40 Day 182 の平均血漿中 setmelanotide 濃度（ng/mL） ....52
表 2.6.6-41 RM-493-TOX-045 試験の試験デザイン ....53
表 2.6.6-42 生存率データ及び死因 ....54
表 2.6.6-43 主な腫瘍性所見の発現頻度 ....54
表 2.6.6-44 Day 182 の平均血漿中 setmelanotide 濃度（ng/mL） ....55
表 2.6.6-45 RM-493-TOX-029 試験の試験デザイン ....57
表 2.6.6-46 雌ラットにおける setmelanotide 皮下投与後の TK パラメーター ....58
表 2.6.6-47 RM-493-TOX-030 試験の忍容性試験（フェーズ I）の試験デザイン ....58
表 2.6.6-48 RM-493-TOX-030 試験の用量設定試験（フェーズ II）の試験デザイン ....59
表 2.6.6-49 RM-493-TOX-031 試験の試験デザイン ....61
表 2.6.6-50 雌ウサギにおける setmelanotide 皮下投与後の TK パラメーター ....61
表 2.6.6-51 RM-493-TOX-033 試験の試験デザイン ....63
表 2.6.6-52 Setmelanotide を F0 雌ラットに皮下投与したときの TK パラメーター（妊娠 20 日及

び分娩後 10 日） ..... 63
表 2.6.6-53 RM-493-TOX-034 試験の忍容性試験（フェーズ I）の試験デザイン ..... 65
表 2.6.6-54 RM-493-TOX-034 試験の用量設定試験（フェーズ II）の試験デザイン ..... 65
表 2.6.6-55 RM-493-TOX-035 試験の試験デザイン（サブセット A 及び B） ..... 67
表 2.6.6-56 RM-493-TOX-035 試験の試験デザイン（サブセット C 及び D） ..... 67
表 2.6.6-57 RM-493-TOX-022 試験の試験デザイン ..... 68
表 2.6.6-58 ラット及びサルの 13 週間皮下持続投与毒性試験（Lot [redacted] ）と規格値 0.5% 以下との比較に基づく、Setmelanotide 原薬の不純物に関する安全域 ..... 71
表 2.6.6-59 非ペプチド不純物の判定基準 ..... 72
表 2.6.6-60 mPEG-DSPE の毒性試験における最大臨床用量 3 mg/日に対する安全域 ..... 75
表 2.6.6-61 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における最大臨床用量 3 mg/日に対する安全域 ..... 80

# 略語一覧

| 略語 | 定義（英語） | 定義（日本語） |
|---|---|---|
| ADA | Anti-drug antibody | 抗薬物抗体 |
| A/G 比 | Albumin/globulin ratio | アルブミン／グロブリン比 |
| ALT | Alanine aminotransferase | アラニンアミノトランスフェラーゼ |
| AST | Aspartate aminotransferase | アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ |
| AUC | Area under the plasma concentration-time curve | 血漿中濃度‐時間曲線下面積 |
| $AUC_{0-\tau}$ | Area under the plasma concentration-time curve during a time interval | 投与間隔の血漿中濃度‐時間曲線下面積 |
| $AUC_{0-24}$ | Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours | 投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度‐時間曲線下面積 |
| $AUC_{last}$ | Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint | 投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血漿中濃度‐時間曲線下面積 |
| BBS | Bardet-Biedl syndrome | バルデー・ビードル症候群 |
| BLQ | Below the limit of quantitation | 定量下限未満 |
| cAMP | Cyclic adenosine monophosphate | 環状アデノシン一リン酸 |
| CAPA | Corrective and Preventive Action | 是正措置及び予防措置 |
| $C_{max}$ | Maximum plasma concentration | 最高血漿中濃度 |
| DCU | Dicyclohexylurea | ジシクロヘキシル尿素 |
| $EC_{50}$ | 50% effective concentration | 50%効果濃度 |
| ECAC | Executive Carcinogenicity Assessment Committee | ― |
| EDC | N-(3-Dimethylaminopropyl)-N’-ethylcarbodiimide hydrochloride | N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 |
| EMA | European Medicines Agency | 欧州医薬品庁 |
| EU | European Union | 欧州連合 |
| FDA | Food and Drug Administration | 米国食品医薬品局 |
| GD | Gestation day | 妊娠日数 |
| 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 |
| GMP | Good Manufacturing Practice | 医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準 |
| HOBT | Hydroxybenzotriazole | ヒドロキシベンゾチラゾール |
| HOPO | 2-Hydroxypyridine-N-oxide | 2-ヒドロキシピリジン-N-オキシド |
| HPLC | High performance liquid chromatography | 高速液体クロマトグラフィー |
| ICH | International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use | 医薬品規制調和国際会議 |
| IE | Immature erythrocytes | 幼若赤血球 |
| KIM-1 | Kidney injury molecule-1 | ― |
| LD | Lactation day | 授乳日数 |
| MCR | Melanocortin receptor | メラノコルチン受容体 |
| MC1R | Melanocortin type 1 receptor | メラノコルチン 1 型受容体 |

| 略語 | 定義（英語） | 定義（日本語） |
|---|---|---|
| MC2R | Melanocortin type 2 receptor | メラノコルチン 2 型受容体 |
| MC3R | Melanocortin type 3 receptor | メラノコルチン 3 型受容体 |
| MC4R | Melanocortin type 4 receptor | メラノコルチン 4 型受容体 |
| MC5R | Melanocortin type 5 receptor | メラノコルチン 5 型受容体 |
| ME | Mature erythrocytes | 成熟赤血球 |
| MIE | Micronucleated immature erythrocytes | 小核を有する幼若赤血球 |
| mPEG | Methoxypolyethylene glycol | メトキシポリエチレングリコール |
| mPEG-DSPE | N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine | N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000)-1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン |
| MTD | Maximum tolerated dose | 最大耐量 |
| NAG | N-acetyl-β-glucosaminidase | － |
| NMU | N-nitrosomethylurea | N-ニトロソメチル尿素 |
| NZW | New Zealand White | － |
| OECD | Organisation for Economic Co-operation and Development | 経済協力開発機構 |
| PCR | Polymerase chain reaction | ポリメラーゼ連鎖反応 |
| PEG | Polyethylene glycol | ポリエチレングリコール |
| pGTI | Potential genotoxic impurity | 潜在的な遺伝毒性不純物 |
| RM-493 | Setmelanotide | Setmelanotide |
| SD ラット | Sprague-Dawley rat | Sprague-Dawley ラット |
| Suc-OH | 1-Hydroxypyrrolidine-2,5-dione | 1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン |
| $t_{1/2}$ | Half-life | 半減期 |
| Tg | Transgenic | トランスジェニック |
| TK | Toxicokinetic(s) | トキシコキネティクス |
| Trt-OH | Trityl alcohol | トリチルアルコール |
| UHPLC | Ultra-high-performance liquid chromatography | 超高速液体クロマトグラフィー |
| WoE | Weight of evidence | 証拠の重み付け |

# 2.6.6 毒性試験の概要文

## 2.6.6.1 まとめ

Setmelanotide（別名 RM-493）は、合成された環状の 8 アミノ酸ペプチドであり、強力なメラノコルチン 4 型受容体（MC4R）作動薬として機能する。MC4R 経路は高度に保存された視床下部の経路であり、食欲、エネルギー消費及び体重の調節に重要な役割を果たす。この経路において、MC4R の上流における不活性変異は、早期に極度の過食症を引き起こし、最終的に生命を脅かす肥満をもたらす。Setmelanotide は、MC4R を直接的活性化することで上流の異常を回避して食欲を調節し、過食症を軽減し体重を減少させる。

N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000)-1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（mPEG-DSPE）を含む setmelanotide 製剤は、2020 年 11 月に米国食品医薬品局（FDA）によって承認され、2021 年 7 月に欧州連合（EU）の認可を受けた（IMCIVREE®、本概要文では setmelanotide/mPEG-DSPE 又は RM-493 in mPEG-DSPE とする）。Setmelanotide は、遺伝性疾患により MC4R 経路障害を有する成人及び 2 歳以上の小児患者を対象に、バルデー・ビードル症候群（BBS）及び両アレル性プロオピオメラノコルチン、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン 1 型又はレプチン受容体遺伝子欠損性肥満の治療及び空腹感のコントロールを適応症とする MC4R 作動薬である。IMCIVREE®は皮下投与であり、setmelanotide の最大臨床用量は 1 日 1 回 3 mg である。

本申請は、4 歳以上の患者を対象とした後天性視床下部性肥満患者に対する治療を目的としており、これまでに FDA、欧州医薬品庁（EMA）及びその他の規制当局によって重度の遺伝性肥満疾患の治療薬として承認された際に使用された非臨床及び臨床データを用いている。

Setmelanotide の毒性学的特性は、医薬品規制調和国際会議（ICH）の基準に適合した一連の試験で十分に評価されている。全ての重要な試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。Setmelanotide の開発プログラムを支援するために実施した毒性試験の一覧を表 2.6.6-1 に示す。

**表 2.6.6-1 毒性試験プログラム**

| Study Type and Duration | Route of Administration | Species | Compound/ Formulation |
|---|---|---|---|
| **Repeated-dose toxicity** | | | |
| 28-day dose range-finding toxicity | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| 28-day dose range-finding toxicity | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| 26-week toxicity with 4-week recovery | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| 28-day dose range-finding toxicity | SC injection | Monkey | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| 39-week toxicity with 4-week recovery | SC injection | Monkey | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |

| Study Type and Duration | Route of Administration | Species | Compound/ Formulation |
|---|---|---|---|
| **Genotoxicity** | | | |
| Bacterial reverse mutation | In vitro | *S. typhimurium, E. coli* | Setmelanotide |
| Chromosome aberration | In vitro | Human (PBL) | Setmelanotide |
| Bone marrow micronucleus | Continuous SC infusion | Rat | Setmelanotide/saline |
| **Carcinogenicity** | | | |
| 7-day dose range-finding | SC injection | Mouse (WT rasH2) | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| 28-day dose range-finding | SC injection | Mouse (WT rasH2) | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| 26-week carcinogenicity[a] | SC injection | Mouse (WT/Tg.rasH2) | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| 26-week carcinogenicity[a] | SC injection | Mouse (Tg.rasH2) | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| 26-week carcinogenicity[a] | SC injection | Mouse (Tg.rasH2) | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| **Reproductive and Developmental Toxicity** | | | |
| Male fertility[b] | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| Female fertility/ EFD | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| Dose range-finding EFD | SC injection | Rabbit | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| EFD | SC injection | Rabbit | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| Pre/postnatal development | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE |
| **Juvenile Toxicity** | | | |
| 28-day dose range-finding | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| 7-week toxicity | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE<br>Setmelanotide/saline |
| **Local Tolerance** | | | |
| 7-day SC irritation | SC injection | Rat | Setmelanotide/mPEG-DSPE |

EFD = embryo-fetal development; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; PBL = peripheral blood lymphocytes; SC = subcutaneous; Tg.rasH2 = transgenic rasH2; WT = wild-type.

a. Due to randomization errors in the first 26-week carcinogenicity study and complications at the study facility in the second 26 week carcinogenicity study, a third 26-week carcinogenicity study was conducted at a different facility.

b. Male fertility evaluations were conducted as part of the 26-week SC injection toxicity study in rats.

Setmelanotide の毒性試験における主な所見は以下のとおりである。これらの試験の安全域を表 2.6.6-2 に示す。

- Setmelanotide/mPEG-DSPE は、ラット及びサルの反復皮下投与毒性試験において最高血漿中濃度（$C_{max}$）及び血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC）に基づき、最大臨床用量（3 mg/日）よりも非常に高い曝露量で良好な忍容性を示した。
  - 各動物種に setmelanotide/mPEG-DSPE を反復皮下投与した結果、局所投与部位反応に基づく最大耐量（MTD）まで全身毒性は認められなかった。
  - 反復投与毒性試験で認められた有害所見は、用量制限性所見の投与部位炎症反応のみであり、主に媒体である mPEG-DSPE に関連し、高用量群では setmelanotide が一部関与していた。ヒトでの投与部位炎症反応は全般的に軽度であり、ほとんどが setmelanotide/mPEG-DSPE の臨床試験の開始直後に限られていた。

- ○ Setmelanotide/生理食塩液（初期製剤）では、より高用量の皮下投与が可能であった。この製剤は初期の 3 ヵ月間試験で評価され、また、setmelanotide/mPEG-DSPE よりも高い全身曝露量を得るために、反復投与毒性試験でも使用した。この生理食塩液製剤をラット及びサルに反復皮下投与したとき、最大臨床用量である 3 mg 投与時の曝露量と比較して、$C_{max}$ で 116～149 倍、AUC でそれぞれ 49 倍及び 38 倍の曝露量比が得られたが、全身毒性は認められなかった。
- ○ 血圧を上昇させることが知られている他の MC4R 作動薬と異なり、サルで setmelanotide/mPEG-DSPE の反復皮下投与による血圧の上昇は見られなかった。同様に、テレメトリーを用いたサルにおける setmelanotide の心血管系に関する安全性薬理試験（2.6.2）及び臨床試験においても血圧の変化は見られなかった。
- ○ 皮下投与毒性試験で認められた体重及び摂餌量の減少は、MC4R 作動薬である setmelanotide の主薬理作用に関連していた。
- ○ サルで認められた顔面の過度な色素沈着（皮膚の暗色化）は、メラノコルチン 1 型受容体（MC1R）における setmelanotide の過剰な薬理作用によるものであり、メラノサイトの分化や増殖とは関連していない。
- ○ mPEG-DSPE 媒体又は setmelanotide/mPEG-DSPE の反復投与後にラット及びサルの脳で観察されたポリエチレングリコール（PEG）関連の細胞質空胞化の程度は軽微で、脈絡叢の上皮細胞（ラット）又はマクロファージ（サル）に局在しており、他の臓器や組織では観察されなかった。脈絡叢の空胞化は正常な脳組織構造の歪みと関連しておらず、変性、炎症及び壊死などの有害な病理組織学的変化は見られず、一般状態観察において機能障害も見られなかった。したがって、この所見は PEG のクリアランスに関連する有害ではない適応反応であり、PEG に対する毒性反応ではないと考えられる（Rudmann 2013）。2015 年時点で承認済みの PEG を含有するバイオ医薬品 11 製品のうち 5 製品で、毒性試験において細胞空胞化との関連が認められた（Ivens 2015）。

- Setmelanotide は、細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo 骨髄小核試験において、ICH S2(R1)ガイドラインで規定された各試験の上限濃度までの範囲で遺伝毒性を示さなかった。
- Setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性は rasH2-トランスジェニック（Tg）マウスを用いた 3 試験の 26 週間がん原性試験で評価されており、いずれの試験でもがん原性は認められなかった。
  - ○ rasH2-Tg ヘミ接合マウスを用いた setmelanotide/mPEG-DSPE の 26 週間皮下投与がん原性試験を実施した。全例の組織サンプルのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、主試験群には rasH2-Tg マウスと野生型 rasH2-Wt マウスの両方が含まれていた（平均 rasH2-Tg マウス数：15 匹/性/群、範囲：11～20 匹）。これは、動物を主試験及びトキシコキネティクス（TK）／抗薬物抗体（ADA）群（サブグループ）に無作為化した際に発生したエラーによるものであった。統計解析により、無作為化された主試験動物（野生型 rasH2-Wt 及び rasH2-Tg マウスを含む）と遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスの間で死亡率、剖検所見及び病理組織学的所見に有意差は見られず、がん原性は認められな

かった。

- 2 回目の 26 週間皮下投与がん原性試験の試験期間中（2019 年 11 月）に、施設の給水システムが故障したため高用量の雄マウスのケージが浸水し、10 匹が死亡したが、試験を完了して有効なデータを全て収集し、試験報告書を作成した。その結果、Setmelanotide/mPEG-DSPE に関連するがん原性の証拠は認められなかった。
- 2 回目の 26 週間がん原性試験は、setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性の評価に有用なデータを追加するものであったが、別の施設で実施した 3 回目の試験では、被験物質のがん原性は認められなかった。

- ラットにおける雌雄受胎能、ラット及びウサギにおける催奇形性、並びにラットにおける出生前及び出生後の発生に対して setmelanotide/mPEG-DSPE の影響は認められなかった。
  - ヒトの AUC より低い曝露量におけるウサギの吸収胚数及び着床後胚損失率の増加は、投与期間中の摂餌量の顕著な減少に起因すると考えられ、ウサギは setmelanotide の主薬理作用に対して極めて鋭敏であることが示唆された。
- Setmelanotide/mPEG-DSPE を生後 7～55 日まで投与した幼若ラットにおいて忍容性は良好であった。いずれの用量においても病理組織学的影響、行動学的影響及び生殖に対する影響も含め、全身毒性は認められなかった。本試験は、setmelanotide/mPEG-DSPE の全ての年齢の小児患者への投与に対して、毒性学的な裏付けを提供しているものの、現行の添付文書では 2 歳以上の小児への適応が認められている。

これらの試験の安全域（表 2.6.6-2）より、ウサギを用いた胚・胎児発生試験を除き、毒性試験において setmelanotide の臨床曝露量と比較して、十分な安全域が得られることが示されている。各動物種の MTD（局所投与部位の忍容性による制限用量）までの用量における setmelanotide の非常に高い曝露量にもかかわらず、これらの試験では全身毒性は確認されなかった。ウサギでは、胚・胎児毒性は妊娠中の著しい摂餌量の減少に関連した、過剰な薬理作用に起因していた。

**表 2.6.6-2　Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における最大臨床用量 3 mg/日に対する安全域**

| Study | Setmelanotide Exposure Margins [a] | |
|---|---|---|
| | $C_{max}$ | AUC |
| 6-Month Rat [b] | 20 | 9 |
| 9-Month Monkey | 32 | 26 |
| Juvenile Rat | 21 | 7 |
| Female Fertility and EFD in Rats | 34 | 11 |
| EFD in Rabbits [c] | 1.4 | 0.4 |
| PPD in Rats | 20 | 7 |
| 26-Week Tg.rasH2 Mouse Carcinogenicity [d] | 81 | 17 |

AUC = area under the plasma concentration-time curve; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; EFD = embryo-fetal development; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NOAEL = no observed adverse effect level; PPD = pre/postnatal development; SC = subcutaneous; Tg.rasH2 = transgenic rasH2.

a Setmelanotide exposure margins are based on $C_{max}$ and AUC (sex-combined for studies with males and females) at the NOAEL for each study and human exposure of 37.9 ng/mL and 576 ng*hr/mL, respectively, following a 3.0 mg SC dose (clinical study RM-493-026 [5.3.3.1.4], Cohort 3).
b Includes evaluation of male fertility.
c Embryo-fetal toxicity in this species was related to grossly exaggerated pharmacology related to severe reductions in food consumption during pregnancy.
d Based on toxicokinetics from Study RM-493-TOX-041 (4.2.3.4.2-2), a 28-day dose-ranging study in wild-type rasH2 mice.

Setmelanotide/mPEG-DSPE の皮下投与毒性試験として、ラット及びサル 28 日間用量設定試験、ラット 6 ヵ月及びサル 9 ヵ月間反復投与毒性試験、生後 7～34 日に投与した幼若ラットの 10 日間及び 28 日間用量設定試験、幼若ラットの生後 7～55 日に投与した 7 週間反復投与毒性試験、ラット受胎能試験（雄は 6 ヵ月間反復投与毒性試験の一部として評価し、雌は受胎能及び胚・胎児発生試験の複合試験にて評価）、ラット及びウサギ胚・胎児発生試験、ラットの出生前及び出生後の発生試験、並びに rasH2-Tg マウスの最長 28 日間用量設定試験を実施した。さらに、rasH2-Tg マウスを用いた 26 週間皮下投与がん原性試験を 3 試験実施しており、これらの試験は、MTD 又は最大投与可能用量までの setmelanotide の毒性及び TK を評価するためにデザインした。また、setmelanotide/mPEG-DSPE の反復皮下投与毒性試験には setmelanotide/生理食塩液群も含まれており、mPEG-DSPE に起因する投与部位の炎症反応により setmelanotide/mPEG-DSPE では達成困難であった setmelanotide の高用量及び高曝露下での全身毒性の評価が可能となった。

非臨床及び臨床試験において、保存料添加及び非添加 setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤が使用されている。ラット及びサルにおける重要な反復投与毒性試験、並びにラット及びウサギにおける生殖発生毒性試験では保存料非添加製剤を使用した。一方、rasH2-Tg マウスにおけるがん原性試験では保存料添加（商業用）製剤を使用した。カニクイザルを用いた setmelanotide/mPEG-DSPE の単回投与クロスオーバー試験において、保存料の添加が setmelanotide の薬物動態に影響を及ぼさないことが示された（2.6.4.3.3.1.2）。商業用製剤には、setmelanotide 製剤と同程度又はそれ以上の濃度で、各種皮下投与薬剤に使用が認可されている保存料が含まれている。Setmelanotide は mPEG-DSPE と結合しておらず、mPEG-DSPE は非臨床及び臨床製剤のいずれにおいても非結合の賦形剤として添加されている。

保存料添加及び非添加製剤の組成を表 2.6.6-3 に示す。以下に詳述するように、重要な毒性試験では 5%マンニトールで希釈した非臨床製剤を使用した。

表 2.6.6-3 Setmelanotide の保存料添加及び非添加製剤の組成

| Component | Quantity in Each Formulation | |
|---|---|---|
| | Unpreserved[a] | Preserved[b] |
| Setmelanotide (expressed as net peptide) | 10 mg/mL | 10 mg/mL |
| mPEG-DSPE | 100 mg/mL | 100 mg/mL |
| Carboxymethylcellulose sodium | 8 mg/mL | 8 mg/mL |
| Mannitol | 22 mg/mL | 5 mg/mL |
| Phenol | NA | 5.0 |
| Benzyl Alcohol | NA | 10.0 |
| Disodium Edetate | NA | 1.0 |
| Water for Injection | q.s. to 1.0 mL | q.s. to 1.0 mL |

NA = not applicable; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; q.s. = quantum satis.

a Formulations without (mPEG-DSPE vehicle control) or with setmelanotide were diluted 10-fold with 5% mannitol for use in pivotal toxicity studies (repeat-dose and reproductive/developmental studies).

b Commercial formulation (IMCIVREE®). This formulation, without or with setmelanotide, was diluted 5- to 50-fold with 5% mannitol for use in carcinogenicity studies with Tg.rasH2 mice; formulations without setmelanotide were diluted 5-fold to match the high dose in these studies.

主要な毒性試験の結果は以下のとおりである。

最初のラット 28 日間用量設定試験は、未希釈の非臨床 mPEG-DSPE 製剤に関連する投与部位反応が見られたため試験を終了した。2 試験目のラット用量設定試験で、非臨床 mPEG-DSPE 製剤（プラセボ及び setmelanotide）を 5%マンニトールで 10 倍に希釈したところ、忍容性が改善された。これらの結果に基づき、ラット 26 週間毒性試験、幼若ラット毒性試験、並びにラット及びウサギの生殖発生毒性試験では 10 倍に希釈した非臨床製剤を使用した。さらに、サル 9 ヵ月毒性試験では投与 8 週後に投与部位反応が見られたため、5%マンニトールで 10 倍に希釈した非臨床製剤を使用した。希釈製剤を用いたことにより、これらのいずれの重要な試験でも局所忍容性の改善が認められたが、最大臨床用量である 3 mg/日と比較して setmelanotide 及び mPEG-DSPE のそれぞれ極めて高い曝露量比及び用量比の投与量が含まれていた。

Setmelanotide/mPEG-DSPE 又は setmelanotide/生理食塩液（setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤よりも高用量及び高い全身曝露量を確保するために使用）は、ラットで最長 6 ヵ月間、サルで最長 9 ヵ月間投与した反復皮下投与毒性試験で良好な忍容性を示した。これらの試験で最も一般的な所見は、摂餌量及び体重の減少、並びに投与部位の炎症反応であった。体重及び摂餌量の影響は、MC4R 作動薬活性に関連する setmelanotide の主薬理作用に直接関連している。投与部位反応は主に媒体の mPEG-DSPE に起因し、高用量では setmelanotide も関与している可能性がある。Setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤を用いた臨床試験における局所投与部位反応は、一般的に軽度で可逆的であり、最も一般的な症状は紅斑、掻痒、痛み、硬結及び腫脹であり、通常 3 日以内に軽快する（RM-493-009 試験［5.3.3.1.3］）。ラット及びサルにおける setmelanotide の反復投与毒性試験では、全身的な有害作用は観察されなかった。ラット（上皮細胞）及びサル（マクロファージ）で反復投与後に脈絡叢で観察された mPEG-DSPE に関連する軽微な空胞化は、PEG のクリアランスに関連する有害ではない適応反応と考えられた（詳細は 2.6.6.9 項参照）。これらの試験の無毒性量における setmelanotide の全身曝露量は、臨床用量 3 mg/日における曝露量に対

して十分な安全域を示した。Setmelanotide/生理食塩液の無毒性量における $C_{max}$ 及び AUC は、6ヵ月ラット試験でそれぞれ臨床曝露量の 116 倍及び 49 倍、9 ヵ月サル試験でそれぞれ 149 倍及び 38 倍であった。したがって反復投与毒性試験では、setmelanotide/mPEG-DSPE の最大臨床用量 3 mg/日に対して、setmelanotide の十分な曝露量ベースの安全域が得られた。

ラットでは、最大臨床用量 3 mg/日の $C_{max}$ 及び AUC と比較してそれぞれ最大 34 倍及び 11 倍の曝露量で setmelanotide に関連する雌雄生殖能への影響は見られず、催奇形性も認められなかった。ウサギでは、ヒト AUC の約 0.4 倍を超える曝露量で吸収胚数及び着床後胚喪失率の増加が認められたが、これは薬理作用に起因する投与期間中の著しい摂餌量の低下による可能性が高い。さらに、ラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験では、setmelanotide の曝露量がヒト $C_{max}$ 及び AUC のそれぞれ最大 20 倍及び 7 倍であっても、母動物毒性や F1 世代への有害な影響は認められなかった。

生後 7～55 日の幼若ラットに setmelanotide/mPEG-DSPE を最高 3 mg/kg/日、setmelanotide/生理食塩液を 15 mg/kg/日（試験した最高用量）皮下投与したときの忍容性は良好であった。Setmelanotide に関連する有害な臨床症状は見られず、全身臓器、成長パラメーター、性成熟、行動、学習及び記憶、並びに生殖能への影響は認められなかった。1.5 mg/kg/日以上の群の投与期間中に予想される薬理作用による摂餌量及び体重増加量の減少が認められた。mPEG-DSPE 及び／又は setmelanotide に関連する投与部位の変化として、出血、炎症細胞浸潤、筋線維の変性／再生が全群で認められた。これらの変化は回復期間で可逆性を示した。これらの結果に基づき、全身的な無毒性量は、setmelanotide/mPEG-DSPE で 3 mg/kg/日、setmelanotide/生理食塩液で 15 mg/kg/日であった。15 mg/kg/日における曝露量比は、臨床用量 3 mg/日における $C_{max}$ 及び AUC と比較してそれぞれ 94 倍及び 33 倍であった。

2.6.6.5 項に詳細に記載したように、setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性を rasH2-Tg マウスを用いた 3 試験の 26 週間皮下投与試験で評価した。最初の試験で技術的問題が発生したため、その結果を確認するために追加試験を 2 試験実施した。これらの試験の用量は野生型 rasH2-Wt マウスを用いた 28 日間皮下投与用量設定試験（2.6.6.5.2 項）の結果に基づき選定した。最初の 26 週間がん原性試験では、誤って rasH2-Tg マウスと野生型 rasH2-Wt マウスの両方を主試験群に無作為に割り当ててしまった（平均 rasH2-Tg マウス数：15 匹/性/群、範囲：11～20 匹）。PCR によりトランスジェニックであることが確認されたマウスにおいて、死亡及び腫瘍発現の増加は認められなかった。最初の試験結果を確認するために、野生型 rasH2-Wt マウスを含まず rasH2-Tg マウスのみを用いた 2 試験の追加試験を実施した。2 試験目では、給水システムの故障によりケージが浸水し、高用量群の雄 10 匹が死亡したため、試験を終了させ、別の試験施設にて 3 試験目を実施した。3 試験全てにおいて、setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性は認められなかった。推定全身曝露量（$C_{max}$ 及び AUC）に基づくと、setmelanotide/mPEG-DSPE の臨床用量 3 mg/日に対してそれぞれ 81 倍及び 17 倍であった。

原薬及び製剤中の不純物は、setmelanotide/生理食塩液のラット及びサル 13 週間持続皮下投与毒性試験で安全性が確認されているか、ICH の適合性基準を下回る規格値が設定されている。

ADA 測定では、ラット、ウサギ及びサルを用いた毒性試験において抗原性の証拠は認められなかった。rasH2-Tg マウスの媒体対照群及び低用量群の各 1 例の血清試料で、陽性判定のカッ

トポイントをわずかに上回っていた。対照群は setmelanotide に曝露されていないこと、両動物の値はカットポイント付近であったこと、及びいずれの setmelanotide 投与群の他のマウスでも陽性を示さなかったことから、これらの結果は偽陽性である可能性が高いと考えられる。rasH2-Tg マウスを用いた 2 試験目のがん原性試験の血清試料は、ADA 陰性であった。また、3 試験目のがん原性試験における ADA 測定では、ADA 陽性動物は認められなかった。

Setmelanotide はペプチドであるため、ICH S10 ガイドラインに従い、setmelanotide の光毒性試験は実施していない。

単離された setmelanotide 代謝物の毒性試験は実施しておらず、必要とも考えていない。ヒトでは、尿中で測定可能な代謝物は M19 及び M7 の 2 種類のみであることが示されている。M19 は C 末端アミドの加水分解により[redacted]に変換されて生成され、M7 は[redacted]結合の切断及び[redacted]のさらなる消失によって生成される。M19 は 3 mg 投与量の約 2%、M7 は 1%未満、setmelanotide の未変化体は 30～40%を占めると推定された。

Setmelanotide の反復投与による依存性を評価する特定の試験は実施していない。ラット及びサルを用いた setmelanotide の反復投与毒性試験における一般状態観察では、投与終了後の回復期間中に薬物離脱の徴候は認められなかった。

mPEG-DSPE を最大 30 mg/日まで皮下投与したときの安全性は、一般毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験によって確認されている。

Setmelanotide の毒性試験については、以下の項に詳細に記載する。これらの試験は、2.6.2 及び 2.6.3 に記載された安全性薬理試験と併せて、本申請を支持するために十分であると考えられる。

重要な毒性試験で得られた無毒性量は、setmelanotide に対して十分な安全域を示しており、setmelanotide/mPEG-DSPE の成人及び 4 歳以上の小児における重度の早期発症型遺伝性肥満及び関連する併存疾患の治療を支持するものである。

### 2.6.6.2 単回投与毒性試験

Setmelanotide の単回投与毒性試験は実施していない。

### 2.6.6.3 反復投与毒性試験

#### 2.6.6.3.1 ラットを用いた試験

##### 2.6.6.3.1.1 28 日間皮下投与用量設定試験（1）

RM-493-TOX-026 試験（4.2.3.2-1）

Sprague-Dawley（SD）ラットを用いた長期の反復投与毒性試験の用量選択に必要なデータを得るために、未希釈の setmelanotide/mPEG-DSPE 非臨床製剤、mPEG-DSPE 及び setmelanotide/生理食塩液を 28 日間皮下投与したときの影響を評価した。投与開始時の動物は 10 週齢で、体重は雄 321～427 g、雌 186～263 g であった。試験デザインを表 2.6.6-4 に示す。

表 2.6.6-4 RM-493-TOX-026 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level [a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc [a] (mg/mL) | Number of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main Study | | TK Study [b] | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 1 [c] | mPEG-DSPE | 0 | 3 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3 |
| 2 [d] | RM-493 in saline | 30 | 3 | 10 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 3 [d] | RM-493 in mPEG-DSPE | 2 | 0.2 | 10 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 4 [d] | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 1 | 10 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 5 [d] | RM-493 in mPEG-DSPE | 20 | 2 | 10 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 6 [c] | RM-493 in mPEG-DSPE | 30 | 3 | 10 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 7 [d] | mPEG-DSPE | 0 | 1 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.
RM-493 in mPEG-DSPE: mPEG-DSPE formulation containing 10 mg/mL setmelanotide and 100 mg/mL mPEG-DSPE
a Expressed as peptide content.
b TK animals were used for TK and ADA evaluation only.
c Due to clinical observations noted, dosing for animals in Groups 1 and 6 were discontinued on Day 14/15 (main study animals) and on Day 15/16 (TK animals).
d Due to clinical observations noted, main study animals in Groups 2 to 5 and 7 were sent to necropsy on Day 23/22 (Groups 2 to 5; males and females, respectively) and on Day 16 (Group 7; males and females). TK Study animals in Groups 2 to 5, and 7 received a final dose on Day 23/22 (Groups 2 to 5; males and females, respectively) and on Day 16 (Group 7; males and females), followed by TK and ADA evaluations.
Note: RM-493=setmelanotide

本試験では一般状態、体重、摂餌量、投与部位、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK パラメーター、剖検所見及び器官重量を評価した。

投与初日（Day 1）に setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群から採取した試料の TK 評価において、血漿中 setmelanotide 濃度はおおむね用量の増加に伴い上昇した。$C_{max}$ は雌雄で類似しており、投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積（$AUC_{0-24}$）は、雌と比較して雄でやや高値を示した。反復投与後の血漿中 setmelanotide 濃度は、Day 1 と比較して雌雄共に全用量群で高値を示した。Setmelanotide の曝露量（$C_{max}$ 及び投与間隔の血漿中濃度 - 時間曲線下面積［$AUC_{0-\tau}$］）は、全用量群において明らかな性差は見られず雌雄で同程度であった。定常状態では、雄の 20～30 mg/kg/日間を除き、$C_{max}$ は雌雄共に用量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は雌雄の 2～10 mg/kg/日間、雌の 10～20 mg/kg/日間で用量に比例して増加した。一方、雄の 10～20 mg/kg/日間、雌雄の 20～30 mg/kg/日間では、やや用量比を下回って増加した。定常状態におけるこのような用量比を下回る曝露量の増加は、setmelanotide の吸収過程の律速によるものと考えられる。

Setmelanotide/生理食塩液 30 mg/kg/日群の単回投与後の $C_{max}$ は、setmelanotide/mPEG-DSPE 30 mg/kg/日群と比較して雄で約 83%、雌で約 11%高値であった。Setmelanotide/mPEG-DSPE 及び setmelanotide/生理食塩液群共に、反復投与後の血漿中 setmelanotide 濃度は、単回投与後と比較して高値であった。Setmelanotide/mPEG-DSPE 及び setmelanotide/生理食塩液の 30 mg/kg/日群の反復投与後の $C_{max}$ は、雌雄共に同程度であった。$AUC_{0-\tau}$ では雌雄共に吸収の程度にわずかな差が見られた。概して、本試験では全身曝露量に一貫した性差は見られなかった。

全ての投与群において、投与部位皮膚の赤色・黒色化及び痂皮形成、並びに痂皮、痂皮の剥離、蒼白及び／又は壊死などの有害な症状が認められたため投与の継続が困難となり、Day 15～23 に全群を試験終了とした。ハンドリング中の過敏、過反応及び／又は異常発声は、投与部位の変化に関連するストレス及び不快感を反映していた。1、6 及び 7 群を投与 2 週間後に安楽死させ、2～5 群を投与 3 週間後に安楽死させた。動物は概して体重増加を示したが、setmelanotide/mPEG-DSPE 30 mg/kg/日群では、mPEG-DSPE 対照群と比較して Day -1～14 に体重増加量のわずかな低値が認められた。同様に、Day -1～21 に setmelanotide/生理食塩液 30 mg/kg/日群と比較して、10 及び 20 mg/kg/日群の雄、並びに 20 mg/kg/日群の雌で体重の軽微から軽度な減少が見られた。Day 1～8 では、mPEG-DSPE 1 mL/kg/日群を除く全用量群の雌雄で摂餌量のわずかな減少が認められ、mPEG-DSPE 3 mL/kg/日対照群の雄（減少は投与 2 週まで持続）及び setmelanotide/mPEG-DSPE 30 mg/kg/日群の雌雄でより顕著であった。

白血球数の増加は特に mPEG-DSPE 1 及び 3 mL/kg/日対照群、並びに setmelanotide/mPEG-DSPE 30 mg/kg/日群の雄で見られ、雌雄共にフィブリノゲン濃度の増加も見られた。これらは炎症及び腫脹を示唆する一般状態所見及び投与部位の肉眼的所見と関連していた。さらに、血小板数及び網赤血球数の増加も全ての群の雌雄で観察された。

剖検では mPEG-DSPE 1 及び 3 mL/kg/日対照群の投与部位に肉眼的所見（痂皮、暗色斑、腫脹、肥厚、擦過傷及び癒着）が見られた。Setmelanotide/mPEG-DSPE 群の投与部位では 2 mg/kg/日以上の群で痂皮、腫脹、暗色斑及び肥厚が見られ、10、20 及び／又は 30 mg/kg/日群では擦過傷及び癒着が認められた。Setmelanotide/生理食塩液 30 mg/kg/日群の投与部位では暗色斑、腫脹、痂皮及び肥厚が見られた。この群の所見は setmelanotide/mPEG-DSPE 群と類似していたが、それらの発現頻度は概して同程度か低かった。

mPEG-DSPE 対照群と setmelanotide/mPEG-DSPE 群で類似した反応が見られたこと、さらに発現頻度は全体的に低いものの setmelanotide/生理食塩液群でも同様の投与部位の変化が観察されたことから、投与部位に確認された肉眼的変化は、主に媒体の mPEG-DSPE の影響である可能性が高いと考えられるが、setmelanotide の影響を完全には排除できない。

Setmelanotide/mPEG-DSPE 30 mg/kg/日群で、setmelanotide に関連すると考えられる器官重量の変化（雌の胸腺及び脾臓重量の減少）が見られた。

結論として、setmelanotide/生理食塩液（30 mg/kg/日）、setmelanotide/mPEG-DSPE（2、10、20 及び 30 mg/kg/日）及び mPEG-DSPE（1 及び 3 mL/kg/日）の皮下投与による忍容性は低く、投与部位の状態悪化に基づき全ての投与量は有害と判断された。投与部位の肉眼的観察では皮膚の痂皮、腫脹、暗色斑及び肥厚が認められ、一般状態観察で見られた痂皮、病変及び／又は壊死性皮膚、並びに白血球数及びフィブリノゲン濃度の増加に関連していた。これらの結果に基づき、本試験で無毒性量は推定できなかった。

### 2.6.6.3.1.2 28 日間皮下投与用量設定試験（2）

RM-493-TOX-036 試験（4.2.3.2-2）

RM-493-TOX-026 試験（2.6.6.3.1.1 項）で無毒性量が推定できなかったため、本試験ではラットに非臨床用 setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤を 5%マンニトールで 1:10 に希釈したもの

（1 mg/mL setmelanotide、10 mg/mL mPEG-DSPE、0.8 mg/mL CMC）を用い、setmelanotide として 1、3 及び 5 mg/kg/日の用量（1、3 及び 5 mL/kg/日）で皮下投与した。対照群には mPEG-DSPE を 5%マンニトールで 1:10 に希釈し、1、3 及び 5 mL/kg/日の用量で投与した。5 mL/kg/日が投与可能最大容量と考えられたため、1:10 希釈 setmelanotide/mPEG-DSPE の投与可能最大用量は 5 mg/kg/日と考えられる。Setmelanotide を生理食塩液でも調製し、2.5～30 mg/kg/日（Setmelanotide 濃度 2.5～7.5 mg/mL、投与容量 1 又は 2 mL/kg/日）の用量で投与した。投与開始時の動物は 10 週齢で、体重は雄 318～413 g、雌 209～275 g であった。試験デザインを表 2.6.6-5 に示す。

表 2.6.6-5　RM-493-TOX-036 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level [a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc [a] (mg/mL) | No. of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main Study | | TK Study [b] | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 1 | mPEG-DSPE (1:10) [c] | 0 | 1 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3 |
| 2 | mPEG-DSPE (1:10) [c] | 0 | 3 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3 |
| 3 | mPEG-DSPE (1:10) [c] | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 3 | 3 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE (1:10) [c] | 1 | 1 | 1 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE (1:10) [c] | 3 | 3 | 1 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 6 | RM-493 in mPEG-DSPE (1:10) [c] | 5 | 5 | 1 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 7 | RM-493 in saline | 7.5 | 1 | 7.5 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 8 | RM-493 in saline | 5 | 1 | 5 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 9 | RM-493 in saline | 2.5 | 1 | 2.5 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 10 | RM-493 in saline | 15 | 2 | 7.5 | 5 | 5 | 12 | 12 |
| 11 [d] | RM-493 in saline | 30 | 2 | 7.5 | 5 | 5 | 12 | 12 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.

a Expressed as peptide content.

b TK animals were used for TK evaluation only.

c mPEG-DSPE vehicle or RM-493 in mPEG-DSPE diluted 1:10 with 5% mannitol.

d Twice daily (BID) dosing 12 hours apart (±30 minutes). The dose level was 15 mg/kg/dose at a dose volume of 2 mL/kg/dose. All other dose groups received one dose per day.

Note: RM-493=setmelanotide

一般状態、体重、摂餌量、投与部位、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、TK パラメーター、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査を評価項目とした。

一般状態観察では、全ての製剤における忍容性はおおむね良好であった。ごく軽度の紅斑及び／又は浮腫、痂皮及び／又は蒼白、並びに痂皮剥離が、全群の雌雄で散発的に認められたが、用量制限毒性ではなかった。その他に一般状態の異常は認められなかった。

体重及び体重増加量の減少は主に setmelanotide 投与群の雌で認められた。Setmelanotide/生理食塩液 30 mg/kg/日群の雌雄で好中球数の軽度増加が認められた。この好中球数増加は、投与部位での混合細胞浸潤などの病理組織学的所見と関連していた。Setmelanotide/生理食塩液 30 mg/kg/日群の雌雄でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の軽微な増加が認められた。AST の増加は、投与部位での筋線維の

変性／壊死などの病理組織学的所見と関連していた。他の血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査パラメーターには、setmelanotide/mPEG-DSPE 投与に関連する所見は認められなかった。器官重量に setmelanotide に関連した変化は認められなかった。

mPEG-DSPE 及び／又は setmelanotide の投与に関連する剖検所見及び病理組織学的変化が投与部位に認められた。病理組織学的変化として投与部位で皮下組織及び筋線維の変性／壊死、皮下浮腫並びに混合性炎症細胞浸潤が認められ、腫脹、肥厚及び／又は硬結などの肉眼的所見、並びに血管炎及び血栓症などの病理組織学的変化と関連しており、mPEG-DSPE（1:10）、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）及び setmelanotide/生理食塩液の局所刺激性と一致していた。概して、同程度の容量を投与した mPEG-DSPE（1:10）及び setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）群の雌雄の投与部位で、浮腫、混合性炎症細胞浸潤、血栓症、血管炎及び筋線維の変性／壊死（雄）の病理組織学的変化が同程度の発現頻度及び重症度で認められた。

Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）群の雌では、同程度の容量を投与した mPEG-DSPE（1:10）群と比較して、投与部位の筋線維変性／壊死の発現頻度及び重症度はわずかに低かった。Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）5 mg/kg/日群の雌雄の投与部位では、同程度の容量（5 mL/kg）を投与した mPEG-DSPE（1:10）群と比較して、皮下組織の変性／壊死の重症度がわずかに高かった。Setmelanotide/生理食塩液群の投与部位でも同様の病理組織学的変化が認められたが、概して setmelanotide/生理食塩液 ≤7.5 mg/kg/日群では、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）群より発現頻度及び重症度が低かった。mPEG-DSPE（1:10）、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）及び setmelanotide/生理食塩液群の投与部位の皮下線維症は、肥厚及び硬結の肉眼的所見と関連しており、投与部位における炎症性及び変性性変化の進行中の修復過程と一致する予想された変化であった。mPEG-DSPE（1:10）、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）及び setmelanotide/生理食塩液群の投与部位における皮下出血は、肉眼的に観察される暗色斑と通常関連しており、投与手技に一部起因すると考えられ、投与容量の増加によって増悪した可能性がある。mPEG-DSPE（1:10）及び setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）群の投与部位の皮下組織における空胞化組織球浸潤は、setmelanotide ではなく mPEG-DSPE（1:10）に関連すると考えられた。

本試験の結果に基づき、ラットの 26 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 項）では、3 mL/kg/日以下の希釈 mPEG-DSPE、3 mg/kg/日の希釈 setmelanotide/mPEG-DSPE 及び高用量として 15 mg/kg/日以下の setmelanotide/生理食塩液が推奨された。

### 2.6.6.3.1.3 26 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

RM-493-TOX-023 試験（4.2.3.2-3）

Setmelanotide をラットに 26 週間反復皮下投与したときの毒性を評価し、さらに 4 週間の回復期間を設けて、観察された所見の可逆性を検討した。加えて、setmelanotide の TK 特性を検討し、ICH S5(R2)ガイドラインに基づき、雄生殖能及び初期胚発生に及ぼす影響についても評価した。投与開始時の動物は 10 週齢であり、体重は雄で 271～361 g、雌で 189～264 g であった。試験デザインを表 2.6.6-6 に示す。

表 2.6.6-6 RM-493-TOX-023 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level [a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc [a] (mg/mL) | Number of Animals | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main Study [b] | | TK Study [c] | | Naïve |
| | | | | | M | F | M | F | F |
| 1 | Saline Control | 0 | 3 | 0 | 20 | 20 | 3 | 3 | 20 |
| 2 | mPEG-DSPE [d] | 0 | 3 | 0 | 20 | 20 | 3 | 3 | 20 |
| 3 | RM-493 in Saline | 3 | 3 | 1 | 20 | 20 | 12 | 12 | 20 |
| 4 | RM-493 in Saline | 15 | 3 | 5 | 20 | 20 | 12 | 12 | 20 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE [d] | 0.5 | 0.5 | 1 | 20 | 20 | 12 | 12 | 20 |
| 6 | RM-493 in mPEG-DSPE [d] | 1.5 | 1.5 | 1 | 20 | 20 | 12 | 12 | 20 |
| 7 | RM-493 in mPEG-DSPE [d] | 3 | 3 | 1 | 20 | 20 | 12 | 12 | 20 |

ADA = anti-drug antibody; Conc = Concentration; F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.

a Expressed as peptide content.

b 5 rats/sex/group retained at the end of the dosing period for a 4-week recovery.

c TK animals were used for TK and ADA evaluations only.

d Nonclinical mPEG-DSPE control (placebo) and RM-493 in mPEG-DSPE formulations diluted 1:10 with 5% mannitol. The dose of mPEG-DSPE in the vehicle control group: 10 mg/mL × 3 mL/kg = 30 mg/kg/day

Note: RM-493=setmelanotide

より高い用量及び全身曝露量を得るために、本試験では setmelanotide/mPEG-DSPE と比べて投与部位の炎症が軽度である setmelanotide/生理食塩液群を含めた。Setmelanotide/生理食塩液の MTD である 15 mg/mL は、最大臨床用量 3 mg/日投与時のヒト曝露量（AUC）の少なくとも 50 倍の安全域を確保することを目的とした。

本試験では、一般状態、体重、摂餌量、発情周期、交配、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、アルドステロン、尿検査及び尿生化学検査）、TK パラメーター、ADA 検査、剖検所見（卵巣及び子宮の検査並びに雄性生殖器の評価を含む）、器官重量、病理組織学的検査（精子形成サイクル検査を含む）について評価した。

生理食塩液、mPEG-DSPE、setmelanotide/mPEG-DSPE 及び setmelanotide/生理食塩液投与群では、生存性、摂餌量、親動物の生殖能（交尾率［交尾成立雄数／交配雄数×100］、雄授胎率［妊娠させた雄数／交配雄数×100］及び雌受胎率［妊娠雌数／交尾成立雌数×100］）、卵巣／子宮検査、眼科学的検査に投与に関連する影響は認められなかった。ADA は検出されなかった。

投与期間終了前に 412 例中 11 例が状態不良又は悪化により死亡したが、これらの死亡はいずれも setmelanotide の投与に起因するものではなかった。生存例に setmelanotide に関連する有害な病理組織学的変化が認められなかったこと、及びこれらの途中死亡／安楽殺例数に用量依存性が見られなかったことから、setmelanotide 投与と途中死亡との関連は低いと判断された。

投与期間終了時に実施した雄性生殖器検査（交尾、精子運動性、精子形態及び精子数）において、setmelanotide に関連する影響は認められなかった。これらの評価結果の詳細は 2.6.6.6.1.1 項に示す。

投与部位における局所刺激性の変化として、mPEG-DSPE 対照群、setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 3 mg/kg/日群で、痂皮形成、被毛疎及び／又は散発

的な皮膚病変が認められた。皮膚の肥厚は全ての setmelanotide 投与群で認められた。これらの変化は試験期間中の重症度が低く、投与部位の変化に伴うストレス／不快感に関連する二次的な臨床症状の発現であったことから、有害とは判断しなかった。皮膚の肥厚に関連する臨床病理学的変化として、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日以上の群の雄及び 15 mg/kg/日群の雌で、好中球数及びフィブリノゲン濃度の軽微～軽度増加が認められた。加えて、雄ではアルブミン濃度及びアルブミン／グロブリン比（A/G 比）の減少が認められた。これらと同様の変化は、setmelanotide/mPEG-DSPE 0.5 mg/kg/日以上の群でも見られたが、その程度は軽微であった。28 日間皮下投与試験（2.6.6.3.1.2 項）において setmelanotide/生理食塩液 30 mg/kg/日群で見られた AST 及び ALT の軽微な増加は、本試験では認められなかった。これらの臨床病理学的変化の大部分は、4 週間の回復期間終了時には完全又は部分的に回復した。

Setmelanotide 投与群及び mPEG-DSPE 対照群では、予想される薬理作用である体重及び体重増加量の減少が投与期間を通じて認められ、最も顕著な変化は setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群で見られ、投与期間終了時点で対照群の体重の雄で 18%、雌で 15%低値であった。Setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日以上の群の雄で、血清中グルコース及びコレステロール濃度の軽微な減少が認められた。さらに setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日以上の群、又は setmelanotide/mPEG-DSPE 1.5 mg/kg/日以上の群の雄及び／又は雌で血清中トリグリセリド濃度の軽微～軽度の減少が認められた。なお、投与期間終了時点で mPEG-DSPE 対照群の雄においても、トリグリセリド濃度の軽微な低下が認められた。これら血清中グルコース、コレステロール及びトリグリセリド濃度の変化は、体重及び体重増加量の減少と一致しており、4 週間の回復期間終了時には完全又は部分的に回復した。

血清中アルドステロン濃度及び尿中腎障害バイオマーカーである KIM-1 及び N-acetyl-β-glucosaminidase（NAG）を評価した結果、setmelanotide/mPEG-DSPE 3 mg/kg/日群の雄でアルドステロン濃度の中等度低下が認められたが、血清中ナトリウム、クロール及びカリウム濃度の変化や病理組織学的変化を伴っておらず、有害とは判断されなかった。Setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日以上の群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 0.5 mg/kg/日以上の群の雌で、尿比重の軽微な低下が認められ、setmelanotide/生理食塩液群で見られた尿比重の低下は一過性であった。Setmelanotide/mPEG-DSPE 3 mg/kg/日群で見られた尿比重の低下は、KIM-1 排泄量の軽微な増加と関連していた。これらの変化に関連する病理組織学的変化は見られず、NAG 濃度に影響は認められなかった。

mPEG-DSPE 投与に関連すると考えられる臨床病理学的変化として、好中球数及びフィブリノゲン濃度の軽微～軽度の増加が認められ、雄ではアルブミン濃度及び／又は A/G 比の軽微～軽度の減少を伴っていた。これらの変化は投与部位における炎症性変化と一致しており、回復期間終了時には回復していた。

Setmelanotide/生理食塩液及び setmelanotide/mPEG-DSPE の全用量群で、前立腺の絶対重量及び相対重量（体重・脳重量比）の群平均値の高値が認められたが、用量依存性は見られず、剖検所見又は病理組織学的所見との相関も認められなかった。4 週間の回復期間終了時には、setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群の雄で、前立腺重量の高値が依然として認められたが、その程度は投与終了時よりも軽度であり、部分的に回復したと判断された。Setmelanotide/生理

食塩液 3 mg/kg/日群の雄、及び setmelanotide/mPEG-DSPE 全用量群の雄で、前立腺重量は完全に回復していた。

26 週間皮下投与後の病理組織学的検査では、投与に関連した変化として setmelanotide/生理食塩液の全用量群の投与部位に対照群と比較して皮下組織における混合性細胞浸潤、出血（暗色斑に関連）及び線維症（肥厚及び蒼白斑に関連）の発現頻度の増加が認められた（表 2.6.6-7 及び表 2.6.6-8）。さらに、setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群では、皮幹筋筋線維の変性／再生、血管炎、並びに投与部位の皮膚における炎症、びらん／潰瘍、毛包萎縮及び壊死が認められた。筋線維の変性／再生は、setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群の雌雄の大腿四頭筋においても認められた。変性／再生の領域は皮膚直下の浅層筋に位置しており、投与部位からの刺激の波及によるものと考えられた。同様の病理組織学的変化は、mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 群の雌雄にも認められ、これらの所見の発現頻度及び／又は重症度は、mPEG-DSPE 対照群と setmelanotide/mPEG-DSPE 3 mg/kg/日群の間で同程度であった。

**表 2.6.6-7　雄ラットの投与部位及び骨格筋の病理組織学的所見（主試験群）**

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **15** | **15** | **14** | **14** | **15** | **14** | **15** |
| **Site, Injection (No. Examined)** | (15) | (15) | (14) | (14) | (15) | (14) | (15) |
| Infiltration, mixed cell | 5 | 15 | 11 | 14 | 15 | 14 | 15 |
| Minimal | 5 | 0 | 11 | 0 | 7 | 1 | 0 |
| Mild | 0 | 9 | 0 | 14 | 8 | 11 | 12 |
| Moderate | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| Hemorrhage | 2 | 15 | 5 | 13 | 7 | 12 | 13 |
| Minimal | 2 | 10 | 5 | 8 | 7 | 9 | 10 |
| Mild | 0 | 4 | 0 | 5 | 0 | 3 | 2 |
| Moderate | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Fibrosis | 2 | 15 | 12 | 14 | 13 | 14 | 15 |
| Minimal | 2 | 0 | 12 | 0 | 9 | 1 | 0 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 3 | 0 |
| Moderate | 0 | 11 | 0 | 12 | 0 | 10 | 15 |
| Marked | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltration, vacuolated histiocytes | 0 | 15 | 0 | 0 | 14 | 14 | 15 |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 | 2 | 1 |
| Mild | 0 | 14 | 0 | 0 | 8 | 12 | 14 |
| Degeneration/regeneration, myofiber | 0 | 12 | 1 | 14 | 1 | 5 | 3 |
| Minimal | 0 | 6 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 |
| Mild | 0 | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| Moderate | 0 | 1 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Atrophy; hair follicle | 0 | 2 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| Minimal | 0 | 2 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Inflammation, skin | 0 | 5 | 0 | 12 | 0 | 2 | 2 |
| Minimal | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Mild | 0 | 2 | 0 | 7 | 0 | 1 | 0 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 |

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **15** | **15** | **14** | **14** | **15** | **14** | **15** |
| Erosion/ulcer; skin | 0 | 4 | 0 | 7 | 0 | 0 | 2 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mild | 0 | 2 | 0 | 6 | 0 | 0 | 1 |
| Moderate | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marked | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Necrosis; skin | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Moderate | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Inflammation, vascular | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| **Muscle, Skeletal (No. Examined)** | (15) | (15) | (14) | (14) | (15) | (14) | (15) |
| Degeneration/regeneration | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |

a Group 1: Saline control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6 and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.

Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-8 雌ラットの投与部位及び骨格筋の病理組織学的所見（主試験群）

| **Group** [a]<br>**Dose (mg/kg/day)** | **1**<br>**0** | **2**<br>**0** | **3**<br>**3** | **4**<br>**15** | **5**<br>**0.5** | **6**<br>**1.5** | **7**<br>**3** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **No. Animals Examined** | **15** | **14** | **15** | **15** | **15** | **14** | **15** |
| **Site, Injection (No. Examined)** | (15) | (14) | (15) | (15) | (15) | (14) | (15) |
| Infiltration, mixed cell | 0 | 14 | 14 | 15 | 15 | 14 | 15 |
| Minimal | 0 | 0 | 14 | 8 | 15 | 14 | 4 |
| Mild | 0 | 14 | 0 | 7 | 0 | 0 | 10 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hemorrhage | 2 | 11 | 9 | 13 | 1 | 3 | 4 |
| Minimal | 2 | 7 | 8 | 8 | 1 | 3 | 3 |
| Mild | 0 | 4 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1 |
| Moderate | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fibrosis | 1 | 14 | 7 | 11 | 1 | 13 | 14 |
| Minimal | 1 | 1 | 7 | 7 | 1 | 13 | 4 |
| Mild | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| Moderate | 0 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| Marked | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infiltration, vacuolated histiocytes | 0 | 14 | 0 | 0 | 15 | 13 | 15 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 7 | 5 |
| Mild | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 6 | 10 |
| Degeneration/regeneration, myofiber | 0 | 9 | 2 | 15 | 0 | 3 | 7 |
| Minimal | 0 | 8 | 2 | 9 | 0 | 2 | 6 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Atrophy; hair follicle | 0 | 7 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Minimal | 0 | 7 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Inflammation, skin | 1 | 5 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Minimal | 1 | 5 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **15** | **14** | **15** | **15** | **15** | **14** | **15** |
| Erosion/ulcer; skin | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Marked | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Inflammation, vascular | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Muscle, Skeletal (No. Examined)** | (15) | (14) | (15) | (15) | (15) | (14) | (15) |
| Degeneration/regeneration | 0 | 0 | 0 | 7 | 1 | 1 | 0 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 1 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |

a Group 1: Saline control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6 and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.
Note: RM-493=setmelanotide

4 週間の回復期間終了時に、setmelanotide/生理食塩液群では、投与部位及び骨格筋における血管炎、皮膚の壊死及び炎症、並びに皮幹筋筋線維の変性／再生は完全に回復したが（表 2.6.6-9 及び表 2.6.6-10）、15 mg/kg/日群の線維症、毛包萎縮及び皮膚のびらん／潰瘍は完全には回復しなかった。Setmelanotide/mPEG-DSPE 群では、4 週間の回復期間終了時に所見は完全には回復しなかったが、発現頻度及び／又は重症度は概して低かったことから、部分的な回復が示唆された。mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE の全用量群の投与部位の皮下組織に空胞化組織球浸潤が認められ、mPEG-DSPE 対照群と setmelanotide/mPEG-DSPE 3 mg/kg/日群の間で発現頻度及び重症度に差は認められなかった。この所見は mPEG-DSPE 投与に起因するものと考えられ、4 週間の回復期間終了時でも観察された。

**表 2.6.6-9 雄ラットの投与部位の病理組織学的所見（回復群）**

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **5** | **5** | **3** | **5** | **5** | **5** | **5** |
| **Site, Injection (No. Examined)** | (5) | (5) | (3) | (5) | (5) | (5) | (5) |
| Infiltration, mixed cell | (1) | (3) | (2) | (1) | (0) | (2) | (0) |
| Minimal | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hemorrhage | (0) | (1) | (1) | (1) | (0) | (2) | (0) |
| Minimal | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Fibrosis | (0) | (5) | (0) | (5) | (5) | (5) | (5) |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 0 |
| Mild | 0 | 2 | 0 | 5 | 0 | 3 | 3 |
| Moderate | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Infiltration, vacuolated histiocytes | (0) | (5) | (0) | (0) | (0) | (1) | (5) |
| Minimal | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| Mild | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Atrophy; hair follicle | (0) | (1) | (0) | (3) | (0) | (0) | (0) |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **5** | **5** | **3** | **5** | **5** | **5** | **5** |
| Erosion/ulcer; skin | (0) | (0) | (0) | (3) | (1) | (0) | (0) |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |

a Group 1: Saline control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6 and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.
Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-10 雌ラットの投与部位の病理組織学的所見（回復群）

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **5** | **5** | **5** | **5** | **4** | **5** | **5** |
| **Site, Injection (No. Examined)** | **(5)** | **(5)** | **(5)** | **(5)** | **(4)** | **(5)** | **(5)** |
| Infiltration, mixed cell | (0) | (1) | (0) | (0) | (0) | (1) | (2) |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Hemorrhage | (0) | (2) | (0) | (0) | (0) | (1) | (1) |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fibrosis | (0) | (5) | (0) | (4) | (0) | (4) | (5) |
| Minimal | 0 | 2 | 0 | 4 | 0 | 4 | 2 |
| Mild | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Infiltration, vacuolated histiocytes | (0) | (5) | (0) | (0) | (2) | (5) | (5) |
| Minimal | 0 | 5 | 0 | 0 | 2 | 5 | 5 |
| Atrophy; hair follicle | (0) | (5) | (0) | (2) | (0) | (0) | (1) |
| Minimal | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| Mild | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Erosion/ulcer; skin | (2) | (2) | (0) | (1) | (0) | (0) | (0) |
| Minimal | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

a Group 1: Saline control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6, and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.
Note: RM-493 = setmelanotide

脳では mPEG-DSPE に関連する病理組織学的所見として、脈絡叢上皮細胞の軽微な限局性空胞化が mPEG-DSPE 対照群の雌 14 例中 2 例、mPEG-DSPE/setmelanotide 0.5 mg/kg/日群の雌雄各 15 例中 1 例、1.5 mg/kg/日群の雄 14 例中 3 例及び 3 mg/kg/日群の雌 15 例中 2 例で認められた（表 2.6.6-11 及び表 2.6.6-12）。4 週間の回復期間終了時では、脈絡叢上皮細胞の軽微な空胞化が mPEG-DSPE/setmelanotide 0.5 mg/kg/日群の雌 4 例中 2 例及び mPEG-DSPE/setmelanotide 1.5 mg/kg/日群の雌 5 例中 2 例で観察され、この変化が完全には回復しないことが示唆された（表 2.6.6-13）。一方、mPEG-DSPE 対照群及び mPEG-DSPE/setmelanotide 3 mg/kg/日群の回復群では、脈絡叢上皮細胞の空胞化は認められなかった。脈絡叢上皮細胞の変化は限局性で、発現頻度及び重症度が極めて低く、脳実質及び脳室に変化が認められなかった（いずれの動物においても脳組織の変形は見られず、この所見の見られたサルの脳にも変性、炎症及び壊死は見られず、一般状態観察で脳の機能的変化の証拠も認められなかった）ことから、有害とは判断されなかった（2.6.6.9 項参照）。肝臓及び腎臓では空胞化は認められなかった。

表 2.6.6-11 雄ラット脳の病理組織学的所見（主試験群）

| **Group** [a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **15** | **15** | **14** | **14** | **15** | **14** | **15** |
| **Brain (No. Examined)** | (15) | (15) | (0) | (15) | (15) | (14) | (15) |
| Vacuolation; epithelial cells, choroid plexus | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 |

a Group 1: Saline Control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6 and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.
Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-12 雌ラット脳の病理組織学的所見（主試験群）

| **Group**[a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **15** | **15** | **14** | **14** | **15** | **14** | **15** |
| **Brain (No. Examined)** | **(15)** | **(14)** | **(0)** | **(15)** | **(15)** | **(14)** | **(15)** |
| Vacuolation; epithelial cells, choroid plexus | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Minimal | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |

a Group 1: Saline Control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6 and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.
Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-13 雌ラット脳の病理組織学的所見（回復群）

| **Group**[a] | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **15** | **0.5** | **1.5** | **3** |
| **No. Animals Examined** | **5** | **5** | **5** | **5** | **4** | **5** | **5** |
| **Brain (No. Examined)** | **(5)** | **(5)** | **(5)** | **(5)** | **(4)** | **(5)** | **(5)** |
| Vacuolation; epithelial cells, choroid plexus | (0) | (0) | (0) | (0) | (2) | (2) | (0) |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |

a Group 1: Saline Control, Group 2: Diluted mPEG-DSPE control, Groups 3 and 4: RM-493 in saline, Groups 5, 6 and 7: Diluted RM-493 in mPEG-DSPE.
Note: RM-493=setmelanotide

選択した動物の脳切片で mPEG に対する免疫組織化学染色を実施した結果、全ての脳切片で脈絡叢上皮は陰性であった。影響が見られた動物の脈絡叢全体を検査した結果、空胞化を示す上皮細胞はごく少数であり、免疫染色の感度が不十分であった可能性、又は組織の処理過程で空胞内容物が失われた可能性がある。そのため、この微細な変化に対する免疫染色による空胞の性状の特定は結論付けられなかった。しかしながら、これらの空胞内に PEG 化物質が存在する可能性は、脈絡叢での位置及び PEG 含有媒体投与との関連が文献（Rudmann 2013；Ivens 2015）に記載されている内容と一致していることから否定できない。

Setmelanotide/生理食塩液 3 及び 15 mg/kg/日群の初回皮下投与後（Day 1）の曝露量（$C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$）は雌と比較して雄で高かった。$C_{max}$ は用量比を下回って増加したが、$AUC_{0-\tau}$ は雌では用量にほぼ比例し、雄ではやや用量比を下回った。90 及び 180 日間の反復投与後の $C_{max}$ は、3 mg/kg/日群では雌雄でほぼ同程度であったが、15 mg/kg/日群では雌の方がやや高値を示した。$C_{max}$ は、Day 90 の雌雄及び Day 180 の雌で用量に比例して増加したが、Day 180 の雄ではやや用

量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$は、雄では Day 90 及び 180 共に用量に比例して増加したが、雌ではやや用量比を上回って増加した。

Setmelanotide/mPEG-DSPE 0.5、1.5 及び 3 mg/kg/日群の Day 1 の曝露量（$C_{max}$及び$AUC_{0-\tau}$）は雌と比較して雄で高かった。$C_{max}$は用量比を下回って増加したが、$AUC_{0-\tau}$は雌雄共に用量にほぼ比例して増加した。Day 90 及び 180 の$C_{max}$及び Day 90 の$AUC_{0-\tau}$は雌雄でおおむね同程度であったが、Day 180 の雄の$AUC_{0-\tau}$は雌よりも高かった。概して、本試験において全身曝露量の一貫した性差は認められなかった。$C_{max}$は用量にほぼ比例していたが、$AUC_{0-\tau}$には一貫した傾向は認められなかった。

本試験における TK パラメーターの概要を表 2.6.6-14 に示す。

表 2.6.6-14　ラットにおける TK パラメーター

| Parameter | Day | Group 3 (3 mg/kg in Saline) | | Group 4 (15 mg/kg in Saline) | | Group 5 (0.5 mg/kg in mPEG-DSPE) | | Group 6 (1.5 mg/kg in mPEG-DSPE) | | Group 7 (3 mg/kg in mPEG-DSPE) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| $C_{max}$ (ng/mL) | 1 | 636 | 460 | 1,830 | 1,110 | 158 | 108 | 379 | 247 | 599 | 376 |
| | 90 | 907 | 1,040 | 4,910 | 6,230 | 145 | 157 | 532 | 591 | 912 | 1,110 |
| | 180 | 998 | 1,070 | 3,820 | 4,940 | 156 | 121 | 417 | 314 | 644 | 901 |
| $C_{max}$/Dose ([ng/mL]/[mg/kg]) | 1 | 212 | 153 | 122 | 73.9 | 315 | 216 | 253 | 164 | 200 | 125 |
| | 90 | 302 | 348 | 328 | 416 | 290 | 315 | 355 | 394 | 304 | 370 |
| | 180 | 333 | 357 | 255 | 329 | 311 | 243 | 278 | 209 | 215 | 300 |
| $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 1 | 1,370 | 877 | 5,000 | 4,420 | 384 | 295 | 1,330 | 858 | 2,730 | 1,520 |
| | 90 | 5,600 | 2,310 | 29,200 | 23,900 | 571 | 524 | 3,090 | 2,210 | 5,830 | 5,820 |
| | 180 | 5,730 | 2,440 | 28,300 | 28,700 | 1,480 | 325 | 2,930 | 1,300 | 6,160 | 4,040 |
| $AUC_{0-\tau}$/Dose ([ng*hr/mL]/ [mg/kg]) | 1 | 457 | 292 | 333 | 295 | 768 | 591 | 887 | 572 | 909 | 507 |
| | 90 | 1,870 | 771 | 1,940 | 1,600 | 1,140 | 1,050 | 2,060 | 1,470 | 1,940 | 1,940 |
| | 180 | 1,910 | 814 | 1,890 | 1,910 | 2,960 | 650 | 1,950 | 869 | 2,050 | 1,350 |

$AUC_{0-\tau}$ = area under the plasma concentration-time curve during a time interval; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.

以上の結果に基づき、本試験における無毒性量は、setmelanotide/生理食塩液で 15 mg/kg/日（雄：$C_{max}$ 3,820 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 28,300 ng*hr/mL、雌：$C_{max}$ 4,940 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 28,700 ng*hr/mL［Day 180 の値］）、setmelanotide/mPEG-DSPE で 3 mg/kg/日（雄：$C_{max}$ 644 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 6,160 ng*hr/mL、雌：$C_{max}$ 901 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 4,040 ng*hr/mL［Day 180 の値］）であった。

Setmelanotide/生理食塩液の無毒性量（15 mg/kg/日）における$C_{max}$及び AUC（雌雄合算）は、最大臨床用量である 3 mg/日の推定臨床曝露量のそれぞれ 116 倍及び 49 倍であった。

## 2.6.6.3.2 サルを用いた試験

### 2.6.6.3.2.1 28 日間皮下投与用量設定試験

RM-493-TOX-027 試験（4.2.3.2-4）

本試験は、39 週間皮下投与毒性試験（2.6.6.3.2.2 項）の用量選択に必要なデータを得るために

setmelanotide/mPEG-DSPE をカニクイザルに 28 日間皮下投与したときの影響を評価した。Setmelanotide/生理食塩液の評価も実施した。投与開始時の動物は 2.7～3.6 歳であり、体重は雄 2.9～4.0 kg、雌 2.4～3.1 kg であった。試験デザインを表 2.6.6-15 に示す。

**表 2.6.6-15　RM-493-TOX-027 試験の試験デザイン**

| Group No. | Test Material | Dose Level [a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Concentration [a] (mg/mL) | Number of Animals | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Males | Females |
| 1 | mPEG-DSPE | 0 | 0.2 | 0 | 3 | 3 |
| 2 | RM-493 with saline | 2 | 0.2 | 10 | 3 | 3 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.2 | 0.02 | 10 | 3 | 3 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.75 | 0.075 | 10 | 3 | 3 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 2 | 0.2 | 10 | 3 | 3 |

a　Doses and concentrations are expressed in terms of peptide content.
Note: RM-493=setmelanotide.

本試験における評価項目は、一般状態、体重、摂餌量、局所刺激性、心電図、血圧、臨床病理検査（血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査）、TK パラメーター、ADA 検査、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査とした。

試験期間中に死亡例は認められず、体重、心電図、血圧、臨床病理検査及び器官重量において、投与に関連する変化は認められなかった。ADA は検出されなかった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE 0.2 mg/kg/日以上の群の雌雄で皮膚の暗色色素沈着（口吻部及び頭部の黒色皮膚として観察）が Day 14 より見られ、投与期間終了まで持続した。この一般状態変化は、病理組織学的検査で見られた皮膚及び投与部位の暗色色素沈着と相関していた。

投与部位におけるその他の病理組織学的所見として、軽微～中等度の皮下空胞化組織球、皮下炎症及び多核巨細胞の集簇が mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE の全用量群で観察されたが、setmelanotide/生理食塩液群では認められなかった。これらの所見は setmelanotide ではなく mPEG-DSPE に起因するものと考えられた。軽微～軽度の皮下出血、線維化、単核細胞浸潤及び筋線維の変性／再生は、全群で投与手技に起因するものと考えられた。これらの所見はいずれも用量制限毒性ではなかった。

結論として、カニクイザルに setmelanotide を 0.2、0.75 及び 2 mg/kg/日の用量で 28 日間皮下投与したときの忍容性は良好であった。0.2 mg/kg/日以上の群で、一般状態の変化として皮膚の変色、並びに皮膚及び投与部位における病理組織学的変化（メラノサイトの増殖を伴わない暗色化及び色素沈着の増加）が認められた。これらの変化に有害性が認められなかったことから、無毒性量は、setmelanotide/生理食塩液で 2 mg/kg/日（雌雄合算 $C_{max}$：3,940 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$：16,700 ng*hr/mL）、setmelanotide/mPEG-DSPE で 2 mg/kg/日（雌雄合算 $C_{max}$：1,060 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$：14,800 ng*hr/mL）と判断した。本試験の結果を 39 週間皮下投与毒性試験の用量設定に用いた。

### 2.6.6.3.2.2 39 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

RM-493-TOX-024 試験（4.2.3.2-5）

本試験の目的は、setmelanotide をカニクイザルに 39 週間 1 日 1 回反復皮下投与したときの毒性及び観察された変化の可逆性を評価することであった。Setmelanotide の TK パラメーターも評価した。本試験では setmelanotide/mPEG-DSPE 群、setmelanotide/生理食塩液群及び両媒体の対照群を設定した。投与開始時の動物は 1.5～5 歳、体重は雄 2.4～3.2 kg、雌 2.3～2.6 kg であった。試験デザインを表 2.6.6-16 に示す。

表 2.6.6-16 RM-493-TOX-024 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level [a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc [a] (mg/mL) | No. of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main Study | | Recovery Study | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 1 | Saline Control | 0 | 0.3 | 0 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 2 | mPEG-DSPE Control | 0 | 0.3/1 [b] | 0 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 3 | RM-493 in Saline | 3 | 0.3 | 10 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.5/0.25 [b] | 0.05/0.25 [b] | 10/1 [b] | 4 | 4 | - | - |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 1.5/0.5 [b] | 0.15/0.5 [b] | 10/1 [b] | 4 | 4 | - | - |
| 6 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3/1 [b] | 0.3/1 [b] | 10/1 [b] | 4 | 4 | 2 | 2 |

- = not applicable; F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.

a Dose levels and concentrations are expressed as net peptide content, concentrations were corrected for lot specific test item potency.

b Due to dose-limiting injection site reactions, starting during Week 8 the RM-493 mPEG-DSPE and mPEG-DSPE vehicle formulations were diluted 10-fold in 5% mannitol, and the dose volume was adjusted to achieved reduced dose levels as indicated. Values represent Weeks 1-8/Weeks 9-39. The dose of mPEG-DSPE in the vehicle control group: 10 mg/mL × 0.3/1 mL/kg = 3/10 mg/kg/day

Note: RM-493=setmelanotide

本試験における評価項目は一般状態、局所刺激性、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図、血圧、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査［アルドステロンを含む］及び尿検査［尿中 KIM-1 及び NAG を含む］）、TK、ADA 検査、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査とした。

全例が剖検まで生存した。摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量に setmelanotide に起因する差は認められなかった。ADA は検出されなかった。

心電図（投与に関連しない心拍数の変化を含む）及び血圧においても、setmelanotide に起因する差は認められなかった。

mPEG-DSPE 媒体に起因する投与部位の皮膚肥厚により、複数の動物で投与が困難となった。原液である未希釈製剤の濃度で肥厚の程度が著しかったため、Day 53/54 以降、mPEG-DSPE を 5%マンニトールで 1:10 に希釈し、生理食塩液対照群及び setmelanotide/生理食塩液群を除いた全群の投与容量を増量することで用量を減量させた。

mPEG-DSPE 対照群、setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群の全群及び setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群の雄で、生理食塩液対照群と比較して体重の低値が見られた。Setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 3/1 mg/kg/日群の雄では、体重及び体重増加量の

統計学的に有意な低下が認められた。これらの変化は setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群では setmelanotide に起因し、その他の群では mPEG-DSPE に起因しており、setmelanotide/mPEG-DSPE 3/1 mg/kg/日群では setmelanotide によって増悪したと考えられた。さらに、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群の雌で、投与期間中の体重及び体重増加量の低下が認められた。回復期間中の体重増加量は、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 3/1 mg/kg/日群で、生理食塩液対照群及び mPEG-DSPE 対照群よりもわずかに高かった。これらの体重変化は、有害とは見なされなかった。

尿比重の軽微な低下を伴う尿中 NAG 濃度の軽微な増加が、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群の雄で Week 13 に認められた。Week 39 には、同群の雌雄及び setmelanotide/mPEG-DSPE 3/1 mg/kg/日群の雌でも、NAG 排泄量の軽微～軽度の増加が認められた。回復期間終了時に、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群の雄 1 例で軽微な尿中 NAG/クレアチニン比の増加が依然として見られたが、setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群では回復した。これらの変化は、腎臓の病理組織学的所見や腎バイオマーカーKIM-1 の変化とは関連しなかった。

全ての setmelanotide 投与群において、主に顔面部に軽微～軽度の細胞内色素増加が認められた（表 2.6.6-18）。色素は主に表皮基底層に認められ、皮膚の暗色化という肉眼的及び臨床的所見と相関した（表 2.6.6-17）。皮膚にメラノサイト過形成の所見はなく、網膜に色素沈着に関連する変化も認められなかった。皮膚の色素沈着は、4 週間の回復期間終了後も一般状態観察及び剖検時に認められたが、病理組織学的な相関は認められなかった。

表 2.6.6-17 剖検所見（Day 274）

| | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** |
| **No. Animals Examined** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** |
| **Skin (No. Examined)** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Discoloration, dark | - | - | 4 | 2 | 4 | 3 | - | - | 4 | 4 | 4 | 4 |

- = not applicable.

表 2.6.6-18 皮膚及び投与部位の病理組織学的所見（Day 274）

| | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** |
| **No. Animals Examined** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** |
| **Skin (No. Examined)** | | | | | | | | | | | | |
| Pigment, increased | (0) | (0) | (4) | (3) | (4) | (2) | (0) | (0) | (3) | (4) | (3) | (4) |
| Minimal | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 2 | 2 | 3 | 1 |
| Mild | - | - | 3 | 2 | 3 | 1 | - | - | 1 | 2 | 0 | 3 |
| **Injection site (No. Examined)** | | | | | | | | | | | | |
| Infiltration, mixed cell | (0) | (0) | (0) | (0) | (1) | (1) | (0) | (1) | (0) | (0) | (2) | (0) |
| Minimal | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | 1 | - |
| Mild | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Infiltration, mononuclear cell | (0) | (2) | (1) | (0) | (0) | (0) | (0) | (1) | (0) | (0) | (0) | (2) |
| Minimal | - | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |

| | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** |
| **No. Animals Examined** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** |
| Mild | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| Inflammation, chronic-active | (0) | (2) | (0) | (0) | (0) | (0) | (0) | (1) | (1) | (0) | (1) | (4) |
| Minimal | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - |
| Mild | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 3 |
| Moderate | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |

- = not applicable.
Numbers in parentheses represent the number of animals with the finding.

mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 1.5/0.5 mg/kg/日以上の群の投与部位で、皮下組織における軽微～中等度の慢性活動性炎症、皮下組織における軽微～軽度の混合性炎症細胞浸潤及び／又は真皮における軽微～軽度の単核細胞浸潤が認められた。同様の所見は、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群にも認められた。これらの変化は主に mPEG-DSPE に起因するものと考えられるが、setmelanotide の関与を完全には否定できない。これらの変化は、setmelanotide/mPEG-DSPE 3/1 mg/kg/日群の雌で、Day 178 及び／又は Day 274 にフィブリノゲン濃度の可逆的上昇と同時に認められ、4 週間の回復期間終了時には部分的に回復した。

媒体投与に関連する病理組織学的所見は、mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群の全群の脳で認められたが（表 2.6.6-19）、setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群では認められなかった。これらの変化は、脈絡叢における軽微な泡沫状（空胞化）マクロファージ集簇であり、その発現頻度は mPEG-DSPE の用量に依存していた。これらの変化は重症度が低く限局性であり、脳実質及び脳室系に変化が認められなかった（いずれの動物においても脳組織の変形はなく、変性、炎症及び壊死などの他の病理組織学的変化も認められず、臨床観察に基づく脳機能の変化もなかった）ことから、有害とは判断されなかった。したがって、脈絡叢における泡沫状マクロファージ集簇は、PEG のクリアランスに関連する適応反応であると考えられる（詳細は 2.6.6.9 項参照）。この mPEG-DSPE に関連する脈絡叢の泡沫状マクロファージ集簇は、4 週間の回復期間では回復しなかった（表 2.6.6-20）。空胞化は他の組織又は細胞型では認められなかった。肝臓及び腎臓の病理組織学的ピアレビューにより、これらの臓器に空胞化が認められないことが確認された。

**表 2.6.6-19 脳の病理組織学的所見（Day 274）**

| | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** | **0** | **0** | **3** | **0.5/0.25** | **1.5/0.5** | **3/1** |
| **No. Animals Examined** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** |
| **Brain (No. Examined)** | | | | | | | | | | | | |
| Macrophage aggregation, choroid plexus | (0) | (4) | (0) | (0) | (4) | (4) | (0) | (4) | (0) | (2) | (3) | (4) |
| Minimal | - | 4 | - | - | 4 | 4 | - | 4 | - | 2 | 3 | 4 |

- = not applicable.
Numbers in parentheses represent the number of animals with the finding.

表 2.6.6-20 回復群の病理組織学的所見（Day 302）

| | Males | | | | Females | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **6** | **1** | **2** | **3** | **6** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **3** | **3/1** | **0** | **0** | **3** | **3/1** |
| **No. Animals Examined** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** |
| **Injection site (No. Examined)** | | | | | | | | |
| Infiltration, mixed cell | (0) | (0) | (0) | (1) | (0) | (0) | (0) | (0) |
| Minimal | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| Infiltration, mononuclear cell | (0) | (0) | (0) | (0) | (0) | (2) | (1) | (0) |
| Minimal | - | - | - | - | - | 2 | 1 | - |
| **Brain (No. Examined)** | | | | | | | | |
| Macrophage aggregation, choroid plexus | (0) | (2) | (0) | (2) | (0) | (2) | (0) | (2) |
| Minimal | - | 2 | - | 2 | - | 2 | - | 2 |

- = not applicable.
Numbers in parentheses represent the number of animals with the finding.

PEG に対する免疫組織化学染色は、全例の脈絡叢（間質及び上皮）で陰性であったが、動物番号 2502 の脳切片 1 枚において、血管内の泡沫状マクロファージ 2 個が、細胞質内に陽性の褐色物質を有していた。これらのマクロファージは投与部位から直接移行したか、又は循環中に PEG を取り込んだ細胞である可能性がある。いずれにおいても、これらのマクロファージ中 PEG 含量は免疫組織化学染色で検出可能なレベルであったが、脈絡叢マクロファージ中 PEG 含量は低く、個体あたりの細胞数が少ないため、免疫染色法の検出感度を下回っていた可能性がある。したがって、免疫染色法の限界によりマクロファージ内物質の性状の特定について結論付けることができず、これらのマクロファージに PEG 化物質が存在する可能性は否定できない。

Setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg を皮下投与したカニクイザルにおいて、$C_{max}$ は雌雄で同程度であり、$AUC_{0-\tau}$ は雌でやや高値を示した。反復投与後の Week 13、26 及び 39 でも、$C_{max}$ は雌雄で同程度であり、$C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ はいずれの測定週においても同程度であった。半減期（$t_{1/2}$）は全ての測定週で性差はなく、3.70～4.08 時間であった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE 0.5、1.5 及び 3 mg/kg/日を皮下投与したときの Day 1 の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ は雌雄で同程度であり、$C_{max}$、$AUC_{0-\tau}$ 及び投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血漿中濃度 - 曲線下面積（$AUC_{last}$）は、おおむね用量に比例して増加した。用量を 0.25、0.5、1 mg/kg/日に減量して反復投与したとき、Week 26 及び 39 の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ は Week 13 よりも高値を示し、Week 26 及び 39 の間では雌雄で同程度であった。Week 13、26 及び 39 の $C_{max}$、$AUC_{0-\tau}$ 及び $AUC_{last}$ は、0.25～0.5 mg/kg/日間では用量比を下回って増加したが、0.5～1 mg/kg/日間では雌で用量比を上回り、雄では用量に比例して増加した。

TK パラメーターの要約を表 2.6.6-21 に示す。

表 2.6.6-21 TK パラメーター

| Parameter | Occasion | Group 3 (3 mg/kg in Saline) | | Group 4 (0.5/0.25 mg/kg in mPEG-DSPE) | | Group 5 (1.5/0.5 mg/kg in mPEG-DSPE) | | Group 6 (3/1 mg/kg in mPEG-DSPE) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M | F | M | F | M | F | M | F |
| $C_{max}$ (ng/mL) | Day 1 | 5,210 | 5,840 | 329 | 307 | 706 | 575 | 1,390 | 1,670 |
| | Week 13 | 4,250 | 5,260 | 294 | 190 | 381 | 280 | 791 | 792 |
| | Week 26 | 4,170 | 5,330 | 417 | 319 | 430 | 314 | 792 | 1,410 |
| | Week 39 | 5,020 | 6,240 | 439 | 346 | 399 | 468 | 766 | 1,640 |
| $C_{max}$/Dose ([ng/mL]/[mg/kg]) | Day 1 | 1,740 | 1,920 | 657 | 614 | 470 | 383 | 465 | 555 |
| | Week 13 | 1,420 | 1,750 | 1,180 | 760 | 763 | 560 | 791 | 792 |
| | Week 26 | 1,390 | 1,780 | 1,670 | 1,280 | 860 | 627 | 792 | 1,410 |
| | Week 39 | 1,670 | 2,080 | 1,760 | 1,380 | 799 | 936 | 766 | 1,640 |
| $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | Day 1 | 19,600 | 25,100 | 6,540 | 3,070 | 9,450 | 8,730 | 20,000 | 20,300 |
| | Week 13 | 16,700 | 20,900 | 3,280 | 1,790 | 3,960 | 2,410 | 6,920 | 8,250 |
| | Week 26 | 16,400 | 21,400 | 5,620 | 4,150 | 3,570 | 2,760 | 7,940 | 21,100 |
| | Week 39 | 21,400 | 22,800 | 5,990 | 3,730 | 3,820 | 3,200 | 8,890 | 21,600 |
| $AUC_{0-\tau}$ /Dose ([ng*hr/mL]/[mg/kg]) | Day 1 | 6,540 | 8,360 | 7,080 | 6,130 | 6,300 | 5,820 | 6,670 | 6,760 |
| | Week 13 | 5,580 | 6,950 | 13,100 | 7,180 | 7,910 | 4,810 | 6,920 | 8,250 |
| | Week 26 | 5,460 | 7,130 | 22,500 | 16,600 | 7,140 | 5,530 | 7,940 | 21,100 |
| | Week 39 | 7,140 | 7,600 | 24,000 | 14,900 | 7,640 | 6,400 | 8,890 | 21,600 |

$AUC_{0-\tau}$ = area under the plasma concentration-time curve during a time interval; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.

これらの結果に基づき、全身的影響に対する無毒性量は setmelanotide/生理食塩液では 3 mg/kg/日（雄：$C_{max}$ 5,020 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 21,400 ng*hr/mL、雌：$C_{max}$ 6,240 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 22,800 ng*hr/mL［Week 39］）、setmelanotide/mPEG-DSPE では 3/1 mg/kg/日（雄：$C_{max}$ 766 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 8,890 ng*hr/mL、雌：$C_{max}$ 1,640 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 21,600 ng*hr/mL［Week 39］）と判断された。

Setmelanotide/生理食塩液 3 mg/kg/日群の $C_{max}$ 及び AUC（雌雄合算）は、最大臨床用量 3 mg/日の臨床曝露量のそれぞれ 149 倍及び 38 倍に相当する。

## 2.6.6.4 遺伝毒性試験

### 2.6.6.4.1 In Vitro 遺伝毒性試験

#### 2.6.6.4.1.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

RM-493-TOX-008 試験（4.2.3.3.1-1）

Setmelanotide の遺伝毒性を評価するために細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

ネズミチフス菌試験菌株（TA1535、TA1537、TA98 及び TA100）及び大腸菌試験菌株 WP2*uvrA* を被験物質の 5,000 µg/plate（本試験系における標準限度用量）までの濃度範囲でラット肝分画（S9 mix）の存在下及び非存在下で処理した。試験はプレート法を用いて実施した。細菌に陽性対照物質を添加して培養し、各菌株の反応により試験系の感受性及び S9 mix の活性を確認した。

S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株でも被験物質による復帰突然変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。規制当局のガイドラインに準拠して実施した本 in vitro 変異原性試験において、setmelanotide は遺伝毒性を示さなかった。

### 2.6.6.4.1.2 染色体異常試験

RM-493-TOX-009 試験（4.2.3.3.1-2）

Setmelanotide の遺伝毒性を評価するために in vitro 染色体異常試験を実施した。

ヒト末梢血リンパ球を培養中に分裂誘導し、被験物質を 5 mg/mL の標準限界濃度までの範囲で処理した。ラット肝 S9 mix の存在下及び非存在下で 4 時間、S9 mix 非存在下で 21 時間処理を行い、それぞれの処理条件に対して適切な媒体対照及び陽性対照を設定した。

過剰な毒性を示さなかった被験物質の高濃度 3 群（適切な媒体対照群及び陽性対照群を含む）について、光学顕微鏡を用いて分裂中期細胞の染色体異常の有無を詳細に観察した。

Setmelanotide を 21 時間処理した培養細胞では、最高濃度（2,500 µg/mL）で異常分裂中期細胞の割合が統計学的に有意に増加した。この濃度では相対有糸分裂指数は 37%で高い毒性を示した。低用量や他の処理条件では、染色体損傷の有意な増加は認められなかった。このため、より適切な用量で評価を行い、初回試験で得られた偽陽性の結果を明確にするために追加試験を実施した。追加試験において、setmelanotide の毒性限界までの濃度で処理した培養細胞では、異常分裂中期細胞の発現頻度に統計学的に有意な増加は認められなかった。初回試験で観察された染色体損傷の増加は濃度依存性及び再現性がなく、わずかに低い濃度では認められなかった。

陽性対照物質は、染色体損傷を有する細胞の割合を有意に増加させ、本試験系の感受性及び S9 mix の有効性が確認された。

以上の結果から、規制当局のガイドラインに準拠して実施した本 in vitro 染色体損傷誘発試験において、setmelanotide は遺伝毒性を示さなかった。

## 2.6.6.4.2 In Vivo 遺伝毒性試験

### 2.6.6.4.2.1 ラット骨髄を用いた哺乳類赤血球小核試験

RM-493-TOX-020 試験（4.2.3.3.2-1）

Setmelanotide の遺伝毒性を評価するためにラット骨髄を用いた小核試験を実施した。ラットに媒体対照（0.9%塩化ナトリウム注射液、USP）又は setmelanotide を 2 日間皮下持続投与（24 時間/日）した。陽性対照（シクロホスファミド）は単回強制経口投与した。投与開始時の動物は約 67 日齢で、体重は雄で 245～282 g、雌で 187～201 g であった。試験デザインを表 2.6.6-22 に示す。

表 2.6.6-22 RM-493-TOX-020 試験の試験デザイン

| Group/Material | | Dosage [a] (mg/kg/day) | Dose Conc. (mg/mL) | Dose Volume (mL/kg) | Infusion Rate (mL/kg/ hour) | No. of Animals | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Male | Female |
| 1 | Vehicle control | - | - | NA | 0.5 | 5 | - |
| 2 | RM-493 | 50 [b] | 4.167 [b] | NA | 0.5 | 5 | - |
| 3 | RM-493 | 100 [b] | 8.333 [b] | NA | 0.5 | 5 | - |
| 4 | RM-493 | 200 [b] | 16.667 [b] | NA | 0.5 | 5 | 5 |
| 5 | Cyclophosphamide | 20 [c] | 10.000 | 10 | NA | 3 | - |

NA = not applicable.
a Where 200 mg/kg/day RM-493was the MTD in accordance with current guidelines.
b Expressed as peptide content.
c Positive control (20 mg of the monohydrate per kg) dosed once only, by oral gavage, 24 hours prior to sampling.
Note: RM-493=setmelanotide

媒体対照群及び 50 mg/kg/日群では、皮下持続投与後に被験物質に関連した一般状態の変化は観察されなかった。100 mg/kg/日群では、耳介の皮膚は全般的に赤く、2 例で腫脹（鼻甲介）が見られた。200 mg/kg/日群の雄では全般的に腫脹（鼻甲介及び/又は下顎）が見られ、皮膚は赤色（耳介、後肢及び／又は前肢）であり、活動性低下が認められた。200 mg/kg/日群の雌では活動性低下が見られ、1 例で耳介に赤色皮膚が認められた。

投与終了後 24 時間（陽性対照群は単回経口投与後）に動物を安楽死させ、両大腿骨を切開し骨髄を採取した。骨髄塗抹標本を固定し、アクリジンオレンジで染色後、コード化して蛍光顕微鏡を用いて観察した。1 例あたり合計 2,000 個の幼若赤血球（IE）について、染色体損傷を示す小核の存在を調べた。さらに骨髄毒性の評価として、各個体における全赤血球集団（幼若赤血球及び成熟赤血球［ME］）に占める IE の割合を算出した。

同時媒体対照のデータ（群平均% IE / [IE + ME]及び小核を有する幼若赤血球［MIE］）は、試験施設の背景データの範囲内又はそれに近かった。陽性対照群では、MIE の発現率の有意な増加が明らかに認められた。媒体対照群及び陽性対照群の結果から、本試験の妥当性が示された。

Setmelanotide 群では、MIE の発現率の実質的な増加は認められなかった。Setmelanotide 群では、IE の割合（平均% IE / [IE + ME]）に有意な減少は認められず、骨髄毒性はないことが示された。

規制当局のガイドラインに準拠して実施した本 in vivo 試験では、setmelanotide は染色体損傷誘発性を示さなかった。

## 2.6.6.5 がん原性試験（TK 評価を含む）

rasH2-Tg マウスを用いた 26 週間皮下投与試験を 3 試験実施し、setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性を評価した。初回の試験で技術的問題が発生したため、結果確認のため追加の 2 試験を実施した。26 週間がん原性試験の用量は、野生型 rasH2-Wt マウスを用いた 28 日間用量設定試験の結果に基づいて選択し、試験開始前に FDA Executive Carcinogenicity Assessment Committee（ECAC）により承認された。これらの試験及びその他の用量設定試験の概要を以下に示した。

最初のがん原性試験では、rasH2-Tg マウス及び野生型 rasH2-Wt マウスが誤って主試験群に無

作為に割り付けられた（平均 rasH2-Tg マウス数：15 匹/性/群、範囲：11～20 匹）。PCR によりトランスジェニックであることが確認されたマウスにおいて、死亡及び腫瘍発現の増加は認められなかった（2.6.6.5.3 項）。脳を含む選択した全組織の病理組織学的検査を実施し、同様の評価を追加試験でも実施した。

初回試験の結果を確認するため、rasH2-Tg マウス（野生型 rasH2-Wt マウスは使用せず）を用いた追加試験を 2 試験実施した。2 回目の試験（2.6.6.5.4 項）では、給水システムの故障によりケージが浸水し、高用量群の雄 10 例が死亡した。試験を終了させ、3 回目の試験を別の試験施設で実施した（2.6.6.5.5 項）。初回及び 2 回目の試験に対しては、毒性試験施設により是正措置及び予防措置（CAPA）調査を実施し、CAPA 計画を開始した。加えて、試験委託者による GLP 監査も実施した。3 試験のいずれにおいても死亡及び腫瘍発現の増加は認められなかった。

rasH2-Tg マウスは、setmelanotide の薬理作用として MC1 受容体を介した被毛の暗色化が観察されること、及び本系統が皮膚における化学発がんに対して感受性を有することから、メラノーマのリスク評価に適している。Setmelanotide は、マウスのメラノコルチン受容体（MCR）を介した環状アデノシン一リン酸（cAMP）産生を刺激し、MC1R、メラノコルチン 3 型受容体（MC3R）及び MC4R に対する 50%効果濃度（$EC_{50}$）はそれぞれ 26、1.3 及び 0.21 nmol/L であった（2.6.2.2.1.1 参照）。メラノコルチン 2 型受容体（MC2R）及びメラノコルチン 5 型受容体（MC5R）に対する活性は検出されなかった。したがって、rasH2-Tg マウスの 26 週間がん原性試験で定常状態における投与 1 時間後に観察された setmelanotide の血漿中濃度約 400～2,000 ng/mL（360～1,800 nmol/L）は、マウス MCR の $EC_{50}$ を大きく上回っていた。rasH2-Tg マウスは非遺伝毒性及び遺伝毒性を有する医薬品の評価に推奨されており、自然発生的な皮膚腫瘍（扁平上皮乳頭腫及び癌）及び化学発がん物質 N-ニトロソメチル尿素（NMU）による皮膚腫瘍（乳頭腫、ケラトアカントーマ、扁平上皮癌）を発生することが知られている（Nambiar 2012）。ただし、ヒトの皮膚ではメラノサイトが表皮－真皮接合部及び毛包内に存在するのに対し、マウスでは主に毛包内に存在する。マウスのメラノサイトの MC1R 活性化により被毛の暗色化が生じ（Beaumont 2011）、これはサル及びヒトで観察される皮膚の暗色化と類似した薬理作用である。rasH2-Tg マウスを用いた 26 週間がん原性試験、特に初回（RM-493-TOX-042 試験［4.2.3.4.2-3］）及び 3 回目（RM-493-TOX-045 試験［4.2.3.4.2-5］）の試験では、被毛の黒色化又は暗色化が用量依存的に認められ、毛包メラノサイトにおける MC1R 活性に関連している可能性が高いと考えられたが、化学発がん物質に反応して皮膚腫瘍を発症することが知られている系統のマウスを用いたこれらの試験において、メラノサイトの増殖、異形成及び腫瘍形成は認められなかった。

総合的な証拠の重み付け（WoE）評価では、setmelanotide/mPEG-DSPE はヒトでの発がんリスクを有していないと考えられる。26 週間がん原性試験において、setmelanotide を投与した rasH2-Tg マウスで死亡及び腫瘍発現の増加は認められず、また、setmelanotide は細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo 小核試験において遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.4 項）。さらに、ラットの最長 26 週間、サルの最長 39 週間の反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 及び 2.6.6.3.2.2 項）及び生後 7～55 日に投与した幼若ラット試験（2.6.6.6.4.2 項）でも、肥大、過形成、前がん病変の増加は認められなかった。これらの試験では、最大臨床用量

3 mg/日における臨床曝露量（AUC）に対して十分な曝露量比が得られた（表 2.6.6-61）。加えて、mPEG-DSPE を臨床用量に対して高倍率の用量で投与した場合においても、前がん性及び増殖性組織反応は認められていない。したがって、総合的な WoE 評価に基づき、setmelanotide/mPEG-DSPE はがん原性を有していないと判断される。

### 2.6.6.5.1 野生型 rasH2-Wt マウスの 7 日間皮下投与用量設定試験

RM-493-TOX-040 試験（4.2.3.4.2-1）

Setmelanotide を雄の野生型 rasH2-Wt マウスに 7 日間反復皮下投与したときの毒性を評価した。試験デザインを表 2.6.6-23 に示す。

**表 2.6.6-23 RM-493-TOX-040 試験の試験デザイン**

| Group No. | Test Material | Dose Level (mg/kg/day) [a] | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc. (mg/mL) [a] | No. of Males [b] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | mPEG-DSPE [c] | 0 | 10 | 0 | 5 |
| 2 | mPEG-DSPE [d] | 0 | 10 | 0 | 5 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 10 | 10 | 1 | 5 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 20 | 10 | 2 | 5 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 40 | 10 | 4 | 5 |
| 6 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 60 | 10 | 6 | 5 |
| 7 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 80 | 10 | 8 | 5 |
| 8 | RM-493 in mPEG-DSPE | 100 | 10 | 10 | 5 |
| 9 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 20 | 5 | 4 | 5 |
| 10 | RM-493 in mPEG-DSPE [e] | 40 | 5 | 8 | 5 |
| 11 | RM-493 in mPEG-DSPE | 50 | 5 | 10 | 5 |

mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.
a Expressed as peptide content.
b Animals were euthanized after 7 doses, on Day 8.
c mPEG-DSPE control diluted 2.5-fold with 5% mannitol (equivalent to 4 mg/mL RM-493 in mPEG-DSPE).
d mPEG-DSPE control diluted 1.25-fold with 5% mannitol (equivalent to 8 mg/mL RM-493 in mPEG-DSPE).
e RM-493 in mPEG-DSPE diluted with 5% mannitol to achieve the indicated dose concentrations.
Note: RM-493=setmelanotide

被験物質又は対照物質を Day 1～7 まで、背部、胸部及び腰部に 1 日 1 回皮下投与した。各動物の投与容量は、直近の体重に基づいて算出した。シリンジ及び針を用いて、指定された部位に投与した。投与初日を Day 1 とした。

投与部位は、以下の順序で 4 ヵ所を日替わりでローテーションした：1）背側胸部左、2）背側胸部右、3）腰部右、4）腰部左。指定の皮下投与部位が当該日に使用できない場合は、ローテーション内の次の使用可能な部位を用いた。Day 6 には、7 群の雄 2 例及び 8 群の雄 1 例で指定部位 No. 2 が使用不可であったため、部位 No. 3 に投与し、Day 7 にはこれら 3 例で部位 No. 4 に投与した。

本試験における評価項目は一般状態、局所刺激性評価、体重、摂餌量及び剖検所見とした。局所刺激評価は Day 1、5 及び 7 に実施した。観察は Draize 変法のスコア評価基準に従って実施した。Setmelanotide 全投与群で、最大 3 例について投与部位病変の写真を撮影した。また Day 8 の剖検時に、投与部位の観察記録として麻酔下で写真撮影した。

Day 4 の局所刺激性評価では、技術的な見落としにより Draize 変法のスコア評価基準に従わず、一般状態観察の結果として「皮膚の痂皮」を記録した。このため、Day 5 に局所刺激性評価を実施した。Day 5 に評価が適切に行われたため、この逸脱は試験の信頼性に影響を及ぼさないと判断された。

試験期間中に予期しない死亡は認められなかった。両対照群で投与部位に刺激性や剖検所見は認められなかった。Setmelanotide 全投与群の摂餌量に投与に関連した変化は認められなかった。個体別又は平均摂餌量の変動は、正常範囲内と判断された。

Setmelanotide 全投与群で、Day 4 及び 7 に体重減少（1 群と比較して−4.0〜−9.5%）が認められた。これらの変化は setmelanotide の薬理作用によるものと考えられ、対照群との差が小さいことから有害ではないと判断された。

Setmelanotide 投与群全群の投与部位の一般状態所見として、皮膚の痂皮、発赤及び／又は乾燥が、同一部位への 1 回又は 2 回投与後に認められた。これらの所見の発現率は、痂皮、紅斑及び浮腫の存在とおおむね一致しており（表 2.6.6-24）、10 mg/kg/日群では 1 例（No. 3001）のみであり、20 mg/kg/日以上の群と比較して著しく低かった。20 mg/kg/日以上の群では全例でこれらの一般状態の変化が認められた。

Setmelanotide 投与群全群の投与部位で、投与に関連した顕著な皮膚病変として、痂皮（スコア 1〜4）、紅斑（全て最大スコア）及び浮腫（全て重度）が、同一部位への 1 回又は 2 回の投与後に認められた。痂皮の存在により紅斑の観察が困難であること、及び痂皮が顕著な皮膚病変とみなされることから、痂皮が認められた場合には紅斑スコアを最大とした。初回投与後に投与部位にごく軽度の紅斑及び皮膚の発赤が認められた 5 群（40 mg/kg/日）の 1 例（No. 5002）を除き、その他の投与部位病変は、概して投与開始から 4〜5 日後（同一部位への 1 回又は 2 回投与後）に認められた。10 mg/kg/日群では、投与部位病変の発現率は低く（1 例のみ、No. 3001）、20 mg/kg/日以上の群では、全例で痂皮、紅斑及び浮腫が認められた。

痂皮、紅斑及び浮腫の発現頻度及び重症度を表 2.6.6-24 に示す。

**表 2.6.6-24　投与部位における痂皮、紅斑及び浮腫の発現頻度及び重症度**

| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **10** | **20** | **40** | **60** | **80** | **100** | **20** | **40** | **50** |
| **Dose volume (mL/kg)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **5** | **5** | **5** |
| **No. Animals Examined** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** |
| **No Injection Sites evaluated** | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| **Total Sites with Lesions Day 5**[a] | 0 | 0 | 1 | 5 | 6 | 9 | 7 | 8 | 7 | 7 | 7 |
| Eschar score 1 [b] | - | - | 1 | 5 | 4 | 8 | 5 | 4 | 7 | 3 | 6 |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | 2 | 1 | 1 | 1 | - | 4 | 1 |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | 1 | 3 | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **Total Sites with Lesions Day 7**[a] | 0 | 0 | 2 | 6 | 10 | 12 | 12 | 10 | 7 | 8 | 9 |
| Eschar score 1 [b] | - | - | 2 | 5 | 5 | 9 | 8 | 3 | 7 | 3 | 7 |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | 1 | 5 | 2 | 2 | 3 | - | 4 | 2 |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | 1 | 1 | 4 | - | - | - |
| **No. Animals with Eschar/Erythema/Edema** | 0 | 0 | 1 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

- = not applicable.

a Incidence of injection sites with observation of eschar/erythema/edema. When eschar is present, erythema score was maximized as notable dermal lesions. All eschar presented were associated with severe edema.
b Focal and/or pinpoint areas up to 10% of assessment site.
c >10% to <25% of assessment site.
d >25% to <50% of assessment site.
e >50% of assessment site.

投与容量 10 mL/kg では、60 mg/kg/日以下の群で痂皮、紅斑及び浮腫の発現率は用量依存的に増加した。80 及び 100 mg/kg/日群では、発現率は 40 又は 60 mg/kg/日とおおむね同程度であった。投与容量 5 mL/kg では、20、40 及び 50 mg/kg/日の 3 用量群で刺激性の発現率はおおむね同程度であった。痂皮の重症度は、10～100 mg/kg/日の範囲で、10 又は 5 mL/kg のいずれの投与容量でも用量依存的に増加した。

同一濃度で異なる投与容量／用量を比較した場合（5 群 vs 9 群、7 群 vs 10 群及び 8 群 vs 11 群）、10 mL/kg の投与容量における高用量群では、各濃度において投与部位病変の発現率及び重症度が高くなる傾向が認められた。一方、20 mg/kg/日以上の群で、同一用量で異なる濃度を比較した場合（4 群 vs 9 群、5 群 vs 10 群）、刺激性の発現率及び重症度は類似していた。

Setmelanotide 関連の特記すべき皮膚病変は、setmelanotide 全投与群において見られた投与部位の剖検所見（淡色／暗色痂皮又は擦過傷）とおおむね一致していた。

Setmelanotide 関連の投与部位における剖検所見を表 2.6.6-25 に要約した。

**表 2.6.6-25　剖検時（Day 8）の剖検所見**

| Group | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **10** | **20** | **40** | **60** | **80** | **100** | **20** | **40** | **50** |
| **Dose volume (mL/kg)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **5** | **5** | **5** |
| **No. Animals** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** |
| **Site, injection (No. Animals Examined)** | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Scab; pale [a] | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 1 | 3 | 4 |
| Scab; dark [a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| Abrasion; pale [a] | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Abrasion; dark [a] | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Thick [a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

a Numbers represent the number of animals with the finding.

Setmelanotide 関連の淡色／暗色の擦過傷及び痂皮は、それぞれ 10 mg/kg/日以上及び 20 mg/kg/日以上の群で認められたが、明確な用量反応関係は認められなかった。100 mg/kg/日群の 1 例では皮下組織の肥厚が認められた。

投与部位における淡色／暗色の痂皮又は擦過傷は、急性／亜急性期で見られる擦過傷が慢性化し痂皮へと変化する、同じ病変の連続的変化と考えられた。表 2.6.6-26 に示すように、淡色／暗色の痂皮及び擦過傷の発現率を合算し、用量群ごとに影響が見られた投与部位数を算出することで、setmelanotide 関連の投与部位における肉眼的変化の全体像が明確となり、これらの合算パラメーターにおける用量反応関係がそれぞれ 60 及び 80 mg/kg/日以下で示された。

同一用量で異なる濃度を比較した場合（4 群 vs 9 群、5 群 vs 10 群）、投与部位における痂皮／擦過傷の発現率及び群ごとの影響が見られた投与部位数は、4 群が 9 群より高く、5 群と 10 群では同程度であった。一方、同一濃度で異なる用量を比較した場合（5 群 vs 9 群、7 群 vs 10

群、8 群 vs 11 群)、高用量群（5、7 及び 8 群）は、低用量群（9、10 及び 11 群）と比較して、投与部位における痂皮／擦過傷の発現率及び影響が見られた投与部位数が多かった。これらの結果は、同一濃度においては、高投与容量である 10 mL/kg で 5 mL/kg よりも忍容性が低いことを示唆している。

その他の剖検所見は偶発的な変化又は試験手技に起因するものであり、setmelanotide/mPEG-DSPE 投与とは関連がないと判断された。

**表 2.6.6-26　剖検時（Day 8）の投与部位の淡色／暗色痂皮及び擦過傷の合算発現率**

| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **10** | **20** | **40** | **60** | **80** | **100** | **20** | **40** | **50** |
| **Dose volume (mL/kg)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **5** | **5** | **5** |
| **No. Animals Examined** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** | **5** |
| **Site, injection (total No. examined)** | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Scab; pale/dark [a] | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 6 | 2 | 4 | 5 |
| Abrasion; pale/dark [b] | 0 | 0 | 1 | 3 | 2 | 3 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Scab/abrasion; pale/dark [c] | 0 | 0 | 1 | 4 | 6 | 8[d] | 8 | 7 | 2 | 5 | 5 |
| Injection sites with scab/abrasion | 0 | 0 | 1/20[e] | 5/20 | 6/20 | 8/20 | 10/20 | 9/20 | 2/20 | 7/20 | 7/20 |

a Combined incidence of pale and dark scab.
b Combined incidence of pale and dark abrasion.
c Combined incidence of pale/dark scab and abrasion.
d Some values are higher than number of animals examined within a group and they represent the total incidence of pale and dark scab/abrasion within the group.
e The fraction represents the number of injection sites affected by scab or abrasion out of 20 injections sites (5 animals x 4 injection sites) within a group.

結論として、setmelanotide/mPEG-DSPE を 7 日間皮下投与したとき、10 mg/kg/日で投与部位の顕著な皮膚病変の発現率が低かったこと（1/5 例、2/20 投与部位）及び関連する剖検所見の発現率が低かったこと（1/20 投与部位）から忍容性が認められた。一方、20 mg/kg/日以上（2 mg/mL 以上で 10 mL/kg、又は 4 mg/mL 以上で 5 mL/kg）では、投与部位における痂皮、浮腫及び紅斑の発現率及び重症度が高く、淡色／暗色の痂皮又は擦過傷の剖検所見も伴ったことから、忍容性は不良と判断された。

### 2.6.6.5.2 野生型 rasH2-Wt マウスの 28 日間皮下投与用量設定試験

RM-493-TOX-041 試験（4.2.3.4.2-2）

Setmelanotide を野生型 rasH2-Wt マウスに 28 日間反復皮下投与したときの毒性を評価し、setmelanotide の TK 特性も評価した。投与開始時の動物は 9 週齢であり、雄の体重は 20.1～28.1 g、雌の体重は 19.6～23.6 g であった。試験デザインを表 2.6.6-27 に示す。

表 2.6.6-27　RM-493-TOX-041 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level (mg/kg/day)[a] | Dose Volume (mL/kg) | Dose Concentration (mg/mL)[a] | Number of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main Study | | TK Study | |
| | | | | | M | F | M | F |
| **1** | mPEG-DSPE[b] | 0 | 10 | 0 | 10 | 10 | 12 | 12 |
| **2** | Saline | 0 | 10 | 0 | 10 | 10 | 12 | 12 |
| **3** | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 10 | 1 | 10 | 10 | 48 | 48 |
| **4** | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 5 | 2 | 10 | 10 | 48 | 48 |
| **5** | RM-493 in mPEG-DSPE | 20 | 5 | 4 | 10 | 10 | 48 | 48 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; Saline = 0.9% Sodium Chloride; TK = toxicokinetic.
a　Dose levels and concentrations expressed as peptide content.
b　mPEG-DSPE control was diluted 10-fold with 5% mannitol (equivalent to 1 mg/mL RM-493 in mPEG-DSPE).
Note: RM-493=setmelanotide

本試験の用量は、2.6.6.5.1 項（RM-493-TOX-040 試験）に記載した野生型 rasH2-Wt マウスにおける 7 日間皮下投与用量設定試験の結果に基づいて設定した。本試験では、濃度 1、2、4、6、8 及び 10 mg/mL を投与容量 10 mL/kg で、並びに 4、8 及び 10 mg/mL を投与容量 5 mL/kg で雄マウスに投与し、投与部位の忍容性を評価した。Setmelanotide/mPEG-DSPE 10 mL/kg（2 mg/mL 以上）又は 5 mL/kg（4 mg/mL 以上）の投与により痂皮、浮腫及び紅斑の発現率及び重症度が用量依存的に増加し、皮膚の潰瘍及び剥離が生じたため、7 日間投与の忍容性は不良であった。

肩甲部及び背側胸部に被験物質及び対照物質を 1 日 1 回 28 日間皮下投与した。各動物の投与容量は、直近の体重に基づいて算出した。シリンジ及び針を用いて指定された部位内に投与した。投与部位はスケジュールに従い日替わりでローテーションした（部位#1：肩甲部左側、#2：肩甲部右側、#3：背側胸部右側、#4：背側胸部左側）。指定の皮下投与部位が当該日に使用できない場合は、ローテーション内の次の使用可能な部位を用いた。投与初日を Day 1 とした。

本試験における評価項目は一般状態、局所刺激評価、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的及び血液生化学的検査）、TK パラメーター、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査とした。

試験期間中に死亡例は認められず、眼科学的検査、血液学的検査及び器官重量に、setmelanotide に関連する変化は認められなかった。

血漿中 setmelanotide 濃度の TK 評価において、Day 1 の $C_{max}$ は雄雌間で類似しており、$AUC_{0-\tau}$ は雄が雌よりも高かった。Day 28 では 10 mg/kg/日（5 mL/kg）群の $C_{max}$ は雄雌で同程度であったが、10 mg/kg/日（10 mL/kg）及び 20 mg/kg/日群の $C_{max}$ は雄がやや高値であった。Day 28 においても $AUC_{0-\tau}$ は雄が雌よりも高値であった。Day 1 の 10 mg/kg/日群の血漿中濃度は雄雌で同程度であり、10 及び 20 mg/kg/日群間の $C_{max}$ は雄雌で用量比を下回って増加し、$AUC_{0-\tau}$ は用量に比例して増加した。Day 28 の 10 mg/kg/日投与群の血漿中濃度は雄雌で同程度であった。Day 28 の 1 日 1 回反復投与後の血漿中濃度は、Day 1 の単回投与後とおおむね同程度であった。10 及び 20 mg/kg/日群の雄雌で $C_{max}$ は用量比を下回って増加し、$AUC_{0-\tau}$ は用量に比例して上昇した。

野生型 rasH2-WT マウス血漿中の setmelanotide の定常状態における TK パラメーターを表

2.6.6-28 に示す。

表 2.6.6-28　28 日間皮下投与後の TK パラメーター

| Parameter | Male:<br>Group 3, mPEG-DSPE<br>RM-493 10 mg/kg (1 mg/mL) | Female:<br>Group 3, mPEG-DSPE<br>RM-493 10 mg/kg (1 mg/mL) |
|---|---|---|
| $C_{max}$ (ng/mL) | 3,570 | 2,430 |
| $C_{max}$/Dose (ng/mL/(mg/kg)) | 357 | 243 |
| $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 11,800 | 9,030 |
| $AUC_{0-\tau}$/Dose (ng*hr/mL/(mg/kg)) | 1,180 | 903 |
| **Parameter** | **Male:<br>Group 4, mPEG-DSPE<br>RM-493 10 mg/kg (2 mg/mL)** | **Female:<br>Group 4, mPEG-DSPE<br>RM-493 10 mg/kg (2 mg/mL)** |
| $C_{max}$ (ng/mL) | 3,140 | 3,140 |
| $C_{max}$/Dose (ng/mL/(mg/kg)) | 314 | 314 |
| $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 10,400 | 8,850 |
| $AUC_{0-\tau}$/Dose (ng*hr/mL/(mg/kg)) | 1,040 | 885 |
| **Parameter** | **Male:<br>Group 5, mPEG-DSPE<br>RM-493 20 mg/kg** | **Female:<br>Group 5, mPEG-DSPE<br>RM-493 20 mg/kg** |
| $C_{max}$ (ng/mL) | 4,520 | 3,250 |
| $C_{max}$/Dose (ng/mL/(mg/kg)) | 226 | 162 |
| $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 24,300 | 15,600 |
| $AUC_{0-\tau}$/Dose (ng*hr/mL/(mg/kg)) | 1,210 | 782 |

$AUC_{0-\tau}$ = area under the plasma concentration-time curve during a time interval; $AUC_{0-\tau}$/Dose = dose-normalized area under the plasma concentration-time curve during a time interval; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; $C_{max}$/Dose = dose-normalized maximum plasma concentration; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.
Note: RM-493=setmelanotide

主な臨床症状は投与部位で認められた（表 2.6.6-29）。投与部位の刺激性が対照群を含む全群で認められたが、setmelanotide 投与群ではその発現率及び重症度が高かった。20 mg/kg/日群では、軽微～軽度の浮腫及び中等度～重度の浮腫を伴う軽微～最大レベルの紅斑が散見され、投与部位面積の 10～25%未満の限局した痂皮（剥離がほとんど認識できないものを含む）を伴った。また、雌雄の数例では、投与部位に軽度～中等度の軟性又は硬性の腫脹が認められ、雌雄各 1 例では投与部位皮膚の発赤が見られ、雌 1 例では触診で投与部位が温かく、雄では皮膚痂皮の発現率が高かった。10 mg/kg/日（5 mL/kg）群では、軽微～中等度の浮腫、軽微～最大レベルの紅斑及び投与部位面積の 10～25%未満に限局した痂皮（剥離がほとんど認識できないものを含む）が認められた。10 mg/kg/日（10 mL/kg）では、最大レベルの紅斑及び投与部位面積の 10～25%未満に限局した痂皮が数例に認められ、ときに明瞭な痂皮剥離、軽微～軽度の浮腫及び雄 1 例では投与部位の 50%以上に及ぶ痂皮を伴った。さらに、雌 1 例では投与部位皮膚の発赤が認められた。上記の臨床症状に加えて setmelanotide 群では、投与部位の皮膚で全体的に淡色、青色及び肥厚している傾向が認められた。これらの所見は、発現率及び重症度のいずれも用量依存的であった。10 mg/kg/日群では、同一用量においても、5 mL/kg 群よりも 10 mL/kg 群の方が刺激性の程度及び頻度が高かった。

表 2.6.6-29　投与部位における痂皮／紅斑／浮腫の発現頻度及び重症度

| **Group** | **1** | | **2** | | **3** | | **4** | | **5** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | | **0** | | **10** | | **10** | | **20** | |
| **Dose volume (mL/kg)** | **10** | | **10** | | **10** | | **5** | | **5** | |
| **Dose concentration (mg/mL)** | **0** | | **0** | | **1** | | **2** | | **4** | |
| **No. Animals Examined** | **20** | | **20** | | **20** | | **20** | | **20** | |
| **Gender** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** |
| **No Injection Sites evaluated** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** |
| Total Sites with Lesions Day 4 [a] | (1) | (1) | (4) | (8) | (7) | (9) | (8) | (4) | (10) | (7) |
| Eschar score 1 [b] | 1 | 1 | 4 | 8 | 4 | 5 | 8 | 3 | 8 | 5 |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | 2 | 3 | - | 1 | 2 | 2 |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | 1 | - | - | - | 2 | 1 | - | - | 1 |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 7 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (1) | (1) | (2) | (0) | (13) | (4) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | 1 | 1 | 2 | - | 7 | 3 |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | 5 | 1 |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | - |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 11 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (2) | (0) | (2) | (1) | (7) | (0) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | 2 | - | 2 | 1 | 6 | - |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | - |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 14 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (2) | (0) | (1) | (2) | (1) | (0) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | 2 | - | 1 | 2 | 1 | - |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 18 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (1) | (0) | (0) | (1) | (1) | (0) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | - |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 21 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (0) | (0) | (0) | (2) | (0) | (1) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | - | - | - | 2 | - | 1 |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| **Group** | **1** | | **2** | | **3** | | **4** | | **5** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | | **0** | | **10** | | **10** | | **20** | |
| **Dose volume (mL/kg)** | **10** | | **10** | | **10** | | **5** | | **5** | |
| **Dose concentration (mg/mL)** | **0** | | **0** | | **1** | | **2** | | **4** | |
| **No. Animals Examined** | **20** | | **20** | | **20** | | **20** | | **20** | |
| **Gender** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** |
| **No Injection Sites evaluated** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** | **40** |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 25 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (2) | (0) | (1) | (1) | (0) | (0) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | 2 | - | 1 | 1 | - | - |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | 2 | - | 1 | - | - | - |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total Sites with Lesions Day 28 [a] | (0) | (0) | (0) | (0) | (1) | (0) | (0) | (0) | (3) | (0) |
| Eschar score 1 [b] | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 3 | - |
| Eschar score 2 [c] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 3 [d] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar score 4 [e] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [f] | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 2 | - |
| Eschar exfoliation [g] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eschar exfoliation [h] | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **No. Animals with Edema** | (0) | (0) | (0) | (2) | (3) | (9) | (1) | (4) | (10) | (10) |
| **No. Animals with Erythema** | (1) | (1) | (5) | (6) | (5) | (7) | (7) | (7) | (10) | (8) |

F = females; M = males.
a Incidence of injection sites with observation of eschar.
b Focal and/or pinpoint areas up to 10% of assessment site.
c >10% to <25% of assessment site.
d >25% to <50% of assessment site.
e >50% of assessment site.
f Barely perceptible scales.
g Distinct scales.
h Pronounced flaking with denuded site.

28 日間の投与期間を通じて、setmelanotide 投与群では、mPEG-DSPE 対照群と比較して雌で摂餌量の高値が認められ、雄では有意に高かった。雄で最大 37%、雌で最大 30%の摂餌量増加が認められた。これらの摂餌量の増加は、体重増加としても反映され、投与終了時に雄で最大 0.97 g、雌で最大 0.94 g の体重増加が認められた。

Setmelanotide に関連した軽微～中等度の血液生化学的変化が見られ、全用量群の雌雄にカリウム及びアルブミンの低下が認められた。アルブミンの低下は、雌の全群で総タンパク及び A/G 比の低下を引き起こし、これは投与部位における高頻度かつ重度の混合性細胞浸潤の病理組織学的変化と関連している可能性があると考えられた。全用量群の雌で setmelanotide に関連したトリグリセリドの軽微～中等度の増加が認められた。10 mg/kg/日（5 mL/kg）及び 20 mg/kg/日群の雌では、setmelanotide に関連したアルカリホスファターゼ活性の軽微な低下が認められた。20 mg/kg/日群の雌では、setmelanotide に関連したリンの中等度の増加が認められた。さらに、mPEG-DSPE 単独又は setmelanotide との併用投与により、雄でアルカリホスファターゼ活性の軽微な低下、雌雄でコレステロールの軽微な増加が認められた。これらの血液生化学的変化はいずれも有害とは考えられなかった。

Setmelanotide に起因する剖検所見として、投与部位に肥厚及び／又は腫脹が認められた（表 2.6.6-30）。これらの所見は 20 mg/kg/日群で最も多く認められ、投与部位における混合性細胞浸潤の病理組織学的所見と一致していた。

**表 2.6.6-30　剖検所見（Day 29）**

| | Males | | | | | Females | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **10** | **10** | **20** | **0** | **0** | **10** | **10** | **20** |
| **No. Animals Examined** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| **Site, Injection, Dorsal Thoracic, Left** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Swelling | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Thick | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Site, Injection, Dorsal Thoracic, Right** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Thick | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Swelling | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Site, Injection, Scapular, Left** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Thick | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| **Site, Injection, Scapular, Right** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Thick | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Swelling | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Setmelanotide 投与群の投与部位の病理組織学的検査で認められた混合性細胞浸潤は、生理食塩液対照群と比較して発現率が高く、重症度もやや高かった（表 2.6.6-31）。Setmelanotide 投与群における投与部位の混合性細胞浸潤の発現率は、mPEG-DSPE 対照群とおおむね同程度であったが、平均重症度は setmelanotide 投与群の方がやや高い傾向を示した。したがって、投与部位における混合性細胞浸潤は、mPEG-DSPE 対照群と比較してわずかに重症度が高かったことから、部分的に setmelanotide に起因するものと判断された。

病理組織学的所見に用量、投与容量及び濃度の違いによる顕著な差異は認められず、全ての投与部位変化は有害ではないと判断された。

**表 2.6.6-31　病理組織学的所見（Day 29）**

| | Males | | | | | Females | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **10** | **10** | **20** | **0** | **0** | **10** | **10** | **20** |
| **No. Animals Examined** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| **Injection Site, Dorsal-Thoracic (L)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Infiltration, mixed cell | (8) [a] | (2) | (8) | (9) | (10) | (10) | (4) | (10) | (10) | (10) |
| Minimal | 3 | 2 | 4 | 5 | 2 | 8 | 4 | 5 | 3 | 2 |
| Mild | 4 | 0 | 4 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 4 | 8 |
| Moderate | 1 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| Severity grade [b] | 1.8 | 1.0 | 1.5 | 1.6 | 2.3 | 1.2 | 1.0 | 1.8 | 2.0 | 1.8 |

| | Males | | | | | Females | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **10** | **10** | **20** | **0** | **0** | **10** | **10** | **20** |
| **No. Animals Examined** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| **Injection Site, Dorsal-Thoracic (R)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Infiltration, mixed cell | (8)[a] | (2) | (6) | (9) | (10) | (8) | (4) | (10) | (10) | (10) |
| Minimal | 8 | 1 | 2 | 6 | 5 | 8 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| Mild | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0 | 2 | 6 | 3 | 4 |
| Moderate | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 |
| Severity grade[b] | 1.0 | 1.5 | 1.8 | 1.3 | 1.7 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.1 | 2.4 |
| **Injection Site, Scapular (L)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Infiltration, mixed cell | (8)[a] | (3) | (9) | (9) | (10) | (8) | (2) | (9) | (10) | (10) |
| Minimal | 8 | 3 | 2 | 5 | 4 | 7 | 2 | 5 | 2 | 4 |
| Mild | 0 | 0 | 6 | 4 | 6 | 1 | 0 | 4 | 3 | 6 |
| Moderate | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| Severity grade[b] | 1.0 | 1.0 | 1.9 | 1.4 | 1.6 | 1.1 | 1.0 | 1.4 | 2.3 | 1.6 |
| **Injection Site, Scapular (R)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| Infiltration, mixed cell | (7)[a] | (1) | (10) | (8) | (10) | (8) | (0) | (9) | (9) | (10) |
| Minimal | 6 | 1 | 3 | 3 | 4 | 7 | - | 4 | 5 | 1 |
| Mild | 1 | 0 | 7 | 5 | 4 | 1 | - | 4 | 3 | 6 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | - | 1 | 1 | 3 |
| Severity grade[b] | 1.1 | 1.0 | 1.7 | 1.6 | 1.8 | 1.1 | NA | 1.7 | 1.6 | 2.2 |

L = left; NA = not applicable; R = right.

a Numbers in parentheses represent the number of animals with the finding.

b Mean severity grade = ((Number of minimal*1)+(Number of mild*2)+(Number of moderate*3))/Total number in group with finding

結論として、Setmelanotide/mPEG-DSPE を野生型 rasH2-Wt マウスに 28 日間 1 日 1 回皮下投与したとき、20 mg/kg/日までの用量における忍容性はおおむね良好であった。摂餌量及び体重増加量の増加、並びに血液生化学的パラメーターの変化は有害とは判断されなかった。投与部位における刺激性の臨床症状（痂皮、痂皮剥離、浮腫及び紅斑）は、発現率及び重症度共に用量依存的であった。10 mg/kg/日群では、5 mL/kg よりも 10 mL/kg で刺激性の程度が高かった。Day 1 には全ての setmelanotide 投与群で皮膚の痂皮が観察されたが、20 mg/kg/日群の雄では Day 7 以降に発現率が高くなった。剖検及び病理組織学的所見は投与部位に限局しており、いずれも有害ではないと判断された。投与部位における setmelanotide 関連の剖検所見（肥厚及び／又は腫脹）は、20 mg/kg/日群で最も多く認められ、病理組織学的には混合性細胞浸潤と一致していた。病理組織学的所見に用量、投与容量及び濃度の違いによる顕著な差異は認められなかった。

これらの結果に基づき、無毒性量は 20 mg/kg/日と判断された。ただし、10 mg/kg/日（10 mL/kg、1 mg/mL 製剤）及び 20 mg/kg/日（5 mL/kg、4 mg/mL 製剤）で認められた投与部位における刺激性の増加は、rasH2-Tg マウスの長期投与における用量制限因子と考えられた。したがって、rasH2-Tg マウスにおけるがん原性試験では 5 mL/kg（2 mg/mL 製剤）の容量で 10 mg/kg/日の最大用量を使用した。

### 2.6.6.5.3 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（1）

RM-493-TOX-042 試験（4.2.3.4.2-3）

Setmelanotide を rasH2-Tg ヘミ接合マウスに 6 ヵ月間反復皮下投与し、毒性及びがん原性を評価し、血漿中 setmelanotide 濃度を測定した。併せて、陽性対照として既知の化学発がん物質である NMU を用いて、本動物モデルの発がん物質に対する感受性を確認した。

主試験群として rasH2-Tg（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic ヘミ接合型）マウス 380 匹（雌雄各 190 匹）、TK 及び ADA 群として野生型 rasH2-Wt（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic WT）マウス 292 匹（雌雄各 146 匹）を入荷した。投与開始日（Day -1）の動物は 9～10 週齢であり、体重は雄 20.4～35.8 g、雌 17.0～27.4 g であった。

試験デザインを表 2.6.6-32 に示す。10 mg/kg/日（投与容量：5 mL/kg）は、野生型 rasH2-Wt マウスを用いた 28 日間用量設定試験（2.6.6.5.2 項）の結果に基づき、MTD と考えられた。

**表 2.6.6-32 RM-493-TOX-042 試験の試験デザイン**

| Group No. | Test Material | Dose Level [a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc. [a] (mg/mL) | No. of Animals | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main Study | | TK Study | | ADA Study | |
| | | | | | M | F | M | F | M | F |
| 1 | Saline Control | 0 | 5 | 0 | 25 | 25 | 12 | 12 | 4 | 4 |
| 2 | mPEG-DSPE placebo [b] | 0 | 5 | 0 | 25 | 25 | 12 | 12 | 4 | 4 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 1 | 5 | 0.2 | 25 | 25 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 5 | 0.6 | 25 | 25 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 5 | 2 | 25 | 25 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 6 | NMU positive control [c] | 75 | 10 | 7.5 | 25 | 25 | NA | NA | NA | NA |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NA = not applicable; NMU = N-nitrosomethylurea; TK = toxicokinetic.
a Dose levels and concentration expressed as peptide content.
b Placebo for RM-493 was diluted 5-fold with 5% mannitol (equivalent to 2 mg/mL RM-493 in mPEG-DSPE).
c Intraperitoneal administration (10 mL/kg) of NMU positive control once on Day 1.
Note: RM-493=setmelanotide

本試験における評価項目は、死亡、詳細な一般状態（触知可能な腫瘤の有無を含む）、体重、摂餌量、血漿中濃度、ADA 検査、遺伝子型評価、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査とした。

剖検後、全ての主試験動物の組織に対してヒト c-Ha-ras トランスジーンの PCR 増幅を実施し、遺伝子型を評価した。その結果、rasH2-Tg 及び野生型 rasH2-Wt マウスが誤って主試験群に無作為に割り当てられていたことが判明した。各群における rasH2-Tg マウスの数を表 2.6.6-33 に示す。詳細は後述するが、この逸脱は試験結果及び結論に影響を及ぼさなかったと判断された。

表 2.6.6-33　定量的及び標準的 PCR 解析に基づく各群の rasH2-Tg マウス数

| Gender | Group 1 [a] Saline Control | Group 2 mPEG-DSPE Control | Group 3 RM-493 in mPEG-DSPE (1 mg/kg/day) | Group 4 RM-493 in mPEG-DSPE (3 mg/kg/day) | Group 5 RM-493 in mPEG-DSPE (10 mg/kg/day) | Group 6 NMU Positive Control |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Male | 14/25 | 12/25 | 16/25 | 14/25 | 15/25 | 15/25 |
| Female | 11/25 | 17/25 | 20/25 | 17/25 | 14/25 | 15/25 |
| Male + Female | 25/50 | 29/50 | 36/50 | 31/50 | 29/50 | 30/50 |

mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NMU = N-nitrosomethylurea; PCR = polymerase chain reaction.
a　All data represent the number of confirmed transgenic mice/total number of mice (Tg.rasH2 + WT rasH2 ) per group.
Note: RM-493=setmelanotide

Setmelanotide は全ての用量において忍容性が良好であった。生存性、体重及び摂餌量に setmelanotide 投与に起因する変化は認められなかった。

Setmelanotide に関連する一般状態の変化として、1 mg/kg/日以上の群で顕著な背骨の突出及び被毛の黒色化が認められた。投与部位では、皮膚肥厚、被毛薄化、痂皮形成、白色／淡色皮膚、軟性腫脹が全ての用量で観察された。これらの所見は 10 mg/kg/日群でより高頻度に認められた。

腫瘍データの統計解析は、遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウス単独、及び rasH2-Tg マウスと野生型 rasH2-Wt マウスを合わせて実施した。マウスの系統は試験計画どおりに無作為化されなかったが、試験結果及び結論に影響はなかったと判断された。主試験群全体（野生型 rasH2-Wt マウス及び rasH2-Tg マウス）と遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスの結果を比較した結果、また rasH2-Tg マウスのみの結果を用いて群間比較した場合でも、死亡率、肉眼的及び病理組織学的所見に差は認められなかった。概して、rasH2-Tg マウスに setmelanotide/mPEG-DSPE の最高 10 mg/kg/日を 6 ヵ月間皮下投与しても、腫瘍形成に関連する所見は認められなかった。遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスの結果は以下のとおりである。

遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスにおいて、6 ヵ月間の setmelanotide/mPEG-DSPE 投与に関連した死亡、剖検所見及び腫瘍性変化は認められなかった。雌雄別及び雌雄合算で解析した場合においても、腫瘍発現率に統計学的に有意な用量依存的増加は認められなかった。生理食塩液対照群、mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 群で観察された良性及び悪性腫瘍は、このマウスの系統及び週齢において一般的に認められる性質のものであり、発現率は対照群及び被験物質投与群で同程度であり、用量依存性の傾向は見られず、試験施設の背景データの範囲内であったことから、自然発生的と判断された。陽性対照である NMU 群では、生理食塩液対照群及び mPEG-DSPE 対照群と比較して、アルキル化発がん物質で予想されるとおり雌雄共に高い死亡率並びにリンパ腫及び胃腫瘍（扁平上皮乳頭腫及び／又は癌）の高い発現率が認められた。rasH2-Tg マウスにおける生存率及び腫瘍性所見の要約をそれぞれ表 2.6.6-34 及び表 2.6.6-35 に示す。

表 2.6.6-34　遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスの生存率と主な死因

| | Male | | | | | | Female | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group No.** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6 [a]** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6 [a]** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| Survivability | 13/14 | 12/12 | 16/16 | 11/14 | 14/15 | 1/15 | 11/11 | 17/17 | 19/20 | 16/17 | 14/14 | 1/15 |
| Survival rate (%) | 93 | 100 | 100 | 79 | 96 | 7 | 100 | 100 | 95 | 94 | 100 | 7 |
| **Cause of Death** | | | | | | | | | | | | |
| Lymphoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Accidental | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Undetermined | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

NMU = N-nitrosomethylurea.
a. NMU positive control group.

表 2.6.6-35　遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスにおける主要な腫瘍性所見

| | Male | | | | | | Female | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group No.** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6 [a]** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6 [a]** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| **No. Animals per Group** | **14** | **12** | **16** | **14** | **15** | **15** | **11** | **17** | **20** | **17** | **14** | **15** |
| **Hemolymphoreticular tissue** | 14 | 12 | 16 | 14 | 15 | 15 | 11 | 17 | 20 | 17 | 14 | 15 |
| Lymphoma, malignant | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| **Lung** | 14 | 12 | 16 | 14 | 15 | 15 | 11 | 17 | 20 | 17 | 14 | 15 |
| Bronchioloalveolar adenoma | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Skin** | 13 | 12 | 16 | 14 | 15 | 15 | 11 | 17 | 20 | 17 | 14 | 15 |
| Papilloma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| **Stomach** | 14 | 12 | 16 | 14 | 15 | 15 | 11 | 17 | 20 | 17 | 14 | 15 |
| Papilloma | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |

NMU = N-nitrosomethylurea.
a. NMU positive control group.

Setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する非腫瘍性の病理組織学的所見は、皮下投与部位における空胞化マクロファージ及び混合性細胞浸潤に限定された。空胞化マクロファージ浸潤は mPEG-DSPE 投与に起因すると考えられたが、setmelanotide による増悪の可能性は否定できなかった。混合性細胞浸潤は試験操作に起因し、mPEG-DSPE による増悪が示唆されたが、setmelanotide によるさらなる増悪の可能性も排除できなかった。ラット及びサルの反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 及び 2.6.6.3.2.2 項）で観察された脳組織の空胞化は、本試験では認められなかった。

Setmelanotide 投与後 1 時間に、setmelanotide 投与群（3 群：1 mg/kg、4 群：3 mg/kg、5 群：10 mg/kg）の全例で定量可能な血漿中濃度が確認され、本 6 ヵ月間毒性試験において動物が setmelanotide に曝露されていたことが裏付けられた（表 2.6.6-36）。Day 1 では 3 群（1 mg/kg）

で雌の血漿中濃度が雄よりも低く、4 群及び 5 群では雌雄で同程度であった。Day 182 では、3、4 及び 5 群のいずれにおいても、雌の血漿中濃度は雄よりも低かった。概して Day 182 の血漿中濃度の数値は Day 1 よりも低かったが、その差はおおむね標準偏差 1 未満であった。

**表 2.6.6-36 Setmelanotide/mPEG-DSPE 皮下投与後の Day 1 及び 182 における平均 setmelanotide 濃度 - 時間データ**

| | | | Male | | | | Female | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Group** | **Study Day** | **Time (h)** | **n** | **Mean (ng/mL)** | **SD (ng/mL)** | **CV%** | **n** | **Mean (ng/mL)** | **SD (ng/mL)** | **CV%** |
| 3 | 1 | 0.00 | 3 | 0.00 | 0.00 | NC | 3 | 0.00 | 0.00 | NC |
| | | 1.00 | 3 | 548 | 95.1 | 17.4 | 3 | 407 | 55.7 | 13.7 |
| 3 | 182 | 0.00 | 2 | 0.00 | 0.00 | NC | 3 | 0.00 | 0.00 | NC |
| | | 1.00 | 3 | 480 | 38.5 | 8.03 | 3 | 375 | 94.3 | 25.1 |
| 4 | 1 | 0.00 | 3 | 0.00 | 0.00 | NC | 3 | 0.00 | 0.00 | NC |
| | | 1.00 | 3 | 1,270 | 203 | 16.0 | 3 | 1,290 | 463 | 35.9 |
| 4 | 182 | 0.00 | 3 | 0.00 | 0.00 | NC | 3 | 0.00 | 0.00 | NC |
| | | 1.00 | 2 | 1,430 | 7.07 | 0.496 | 3 | 1,080 | 109 | 10.0 |
| 5 | 1 | 0.00 | 3 | 0.00 | 0.00 | NC | 3 | 0.00 | 0.00 | NC |
| | | 1.00 | 3 | 2,190 | 656 | 30.0 | 3 | 2,210 | 457 | 20.7 |
| 5 | 182 | 0.00 | 3 | 0.00 | 0.00 | NC | 3 | 0.00 | 0.00 | NC |
| | | 1.00 | 2 | 2,140 | 219 | 10.3 | 3 | 1,660 | 106 | 6.37 |

CV = coefficient of variation; NC = not calculated; SD = standard deviation.
Note: Plasma samples analyzed using a bioanalytical method with a validated range of 5.00 to 2,000 ng/mL. Concentrations below limit of quantification set to zero (0.00 ng/mL) in the data summarization.

本試験における setmelanotide の全身曝露量（$C_{max}$ 及び AUC）は、RM-493-TOX-041 試験（4.2.3.4.2-2）から得られた曝露データにより推定可能である（2.6.6.5.2 項）。Day 28 の 10 mg/kg/日群（2 mg/mL を 5 mL/kg/日で投与）において、雌雄合算の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ はそれぞれ 3,070 ng/mL 及び 9,600 ng*hr/mL であった。

スクリーニング陽性となった 2 検体（1 例は mPEG-DSPE 対照群、1 例は低用量群）は、setmelanotide に対する抗体陽性と確認された。ただし、本アッセイの確認カットポイント（11.1%）はプレートベースのリガンド結合アッセイにおける許容変動範囲内であり、偽陽性のリスクが高まる可能性がある。1 例が mPEG-DSPE 対照群であったこと、Day 1 及び 182 の血漿中濃度データに基づき中和抗体の存在が示唆されなかったことから、いずれも偽陽性である可能性が高いと考えられる。

結論として、10 mg/kg/日までの setmelanotide を皮下投与した結果、rasH2-Tg マウスにおいてがん原性は認められなかった。

Day 182 の平均血漿中 setmelanotide 濃度は、雄で 480～2,140 ng/mL、雌で 375～1,660 ng/mL であった。試験前のマウス系統の無作為化が計画どおりでなかったにもかかわらず、主試験動物全体（rasH2-Tg＋野生型 rasH2-Wt）と遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスとの比較、並びに遺伝子型が確認された rasH2-Tg マウスのみを用いた群間の統計解析において、死亡率、剖検所見、病理組織学的所見に差は認められなかった。したがって、rasH2-Tg マウスに MTD である 10 mg/kg/日までを 26 週間皮下投与したとき、setmelanotide/mPEG-DSPE に関連するがん原性は

認められなかった。

本試験における setmelanotide/mPEG-DSPE 10 mg/kg/日群の setmelanotide の $C_{max}$ 及び AUC は、RM-493-TOX-041 試験（4.2.3.4.2-2）の Day 28 の TK データに基づくと、最大臨床用量（3 mg/日）におけるヒト曝露量のそれぞれ 81 倍及び 17 倍であった（表 2.6.6-61）。

### 2.6.6.5.4 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（2）

RM-493-TOX-044 試験（4.2.3.4.2-4）

rasH2-Tg マウスに setmelanotide を 6 ヵ月間反復皮下投与したときの毒性及びがん原性を評価し、血漿中 setmelanotide 濃度を測定した。併せて、陽性対照物質（NMU）を用いて既知の化学発がん物質に対する本動物モデルの感受性を確認した。rasH2-Tg マウスと野生型 rasH2-Wt マウスの群分け時のエラーを回避するため、本試験では rasH2-Tg マウス（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic ヘミ接合型）のみを使用した。

試験デザインの概要を表 2.6.6-37 に示す。高用量として設定した 10 mg/kg/日（投与容量：5 mL/kg）は、野生型 rasH2-Wt マウスを用いた 28 日間用量設定試験（2.6.6.5.2 項）の結果に基づき、MTD と考えられた用量である。投与開始時点の動物は 8 週齢であり、体重は雄で 18.3～28.8 g、雌で 15.5～21.5 g であった。

**表 2.6.6-37 RM-493-TOX-044 試験の試験デザイン**

| Group No. | Test Material | Dose Level[a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc.[a] (mg/mL) | No. of Animals | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | M | F |
| **1** | Saline Control | 0 | 5 | 0 | 25 | 25 |
| **2** | mPEG-DSPE placebo[b] | 0 | 5 | 0 | 25 | 25 |
| **3** | RM-493 in mPEG-DSPE | 1 | 5 | 0.2 | 25 | 25 |
| **4** | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 5 | 0.6 | 25 | 25 |
| **5** | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 5 | 2 | 25 | 25 |
| **6** | NMU positive control[c] | 75 | 10 | 7.5 | 25 | 25 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NMU = N-nitrosomethylurea.
a Dose levels and concentration expressed as peptide content.
b Placebo for RM-493 was diluted 5-fold with 5% mannitol (equivalent to 2 mg/mL RM-493 in mPEG-DSPE).
c Intraperitoneal administration (10 mL/kg) of NMU positive control once on Day 1.
Note: RM-493=setmelanotide

本試験における評価項目は、死亡、詳細な一般状態（触知可能な腫瘤の有無を含む）、体重、摂餌量、血漿中濃度、ADA 検査、剖検所見及び病理組織学的検査とした。

試験期間中、試験施設において給水システムの故障が発生し、高用量群の雄マウスが収容されたケージが浸水した結果、10 匹が死亡した。本試験を完了させ、得られた全ての有効なデータを収集して試験報告書を作成した。

Setmelanotide/mPEG-DSPE は全ての用量において臨床的に良好に耐容された。生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群と比較して、setmelanotide/mPEG-DSPE 投与による生存率、体重、摂餌量、触知可能な腫瘤に関連する変化は認められなかった。また、生理食塩液対照群と比較して、mPEG-DSPE 投与による変化も認められなかった。生存率データの要約を表 2.6.6-38 に示す。

表 2.6.6-38 生存率データ及び主な死因

| Group No. | Male | | | | | | Female | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6[a] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6[a] |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| Survivability (including accidental deaths) | 22/25 | 24/25 | 25/25 | 23/25 | 13/25 | 2/25 | 24/25 | 25/25 | 23/25 | 24/25 | 24/25 | 0/25 |
| Survival rate (including accidental deaths) | 88% | 96% | 100% | 92% | 52% | 8% | 96% | 100% | 92% | 96% | 96% | 0% |
| Survivability (not including accidental deaths) | 22/25 | 24/25 | 25/25 | 23/25 | 13/15 | 2/24 | 24/25 | 25/25 | 23/25 | 24/25 | 24/24 | 0/25 |
| Survival rate (not including accidental deaths) | 88% | 96% | 100% | 92% | 87% | 8% | 96% | 100% | 92% | 96% | 100% | 0% |
| **Cause of Death** | | | | | | | | | | | | |
| Lymphoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 |
| Hemangiosarcoma | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Accidental | 0 | 0 | 0 | 0 | 10[b] | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Undetermined | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

a N-nitrosomethylurea (NMU) positive control group.
b Accidental deaths of 10 group 5 males due to malfunction of water supply and drowning due to cage flooding.

Setmelanotide に関連する一般状態は投与部位に限定され、皮膚の肥厚、痂皮形成／白色皮膚が全用量群及び mPEG-DSPE 対照群で認められた。

rasH2-Tg マウスに 10 mg/kg/日までの setmelanotide/mPEG-DSPE を反復皮下投与した結果、生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群と比較して投与に起因する腫瘍性所見は見られず、mPEG-DSPE 対照群においても、生理食塩液対照群と比較して腫瘍性所見は認められなかった（表 2.6.6-39）。

表 2.6.6-39 主な腫瘍性所見の発現率

| Group No. | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6[a] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6[a] |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| **No. Animals per Group** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** |
| Hemolymphoreticular tissue | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Lymphoma, malignant | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 |
| Skin | 25 | 25 | 24 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 24 | 25 |
| Papilloma; squamous cell | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 12 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 |
| Squamous cell carcinoma | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Stomach | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Papilloma; squamous cell | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Spleen | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 24 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Hemangiosarcoma | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| Lung | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Bronchioloalveolar adenoma | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

a N-nitrosomethylurea (NMU) positive control group.

Setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する病理組織学的変化は投与部位に限定され、血清細胞性痂皮、混合性細胞浸潤及び空胞化マクロファージ浸潤が認められた。血清細胞性痂皮は試験操作に起因し、setmelanotide 投与により増悪した可能性があると考えられた。混合性細胞浸潤は試験操作に起因し、空胞化マクロファージ浸潤は mPEG-DSPE 投与に起因すると判断されたが、いずれの所見においても setmelanotide による増悪の可能性は否定できなかった。下顎及び腸間膜リンパ節における空胞化マクロファージ浸潤も mPEG-DSPE 投与に起因すると考えられた。ラット及びサルの反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 及び 2.6.6.3.2.2 項）で観察された脳組織の空胞化は、本試験では 3 mg/kg/日群の雄マウス 1 例のみで認められた。mPEG-DSPE 対照群及びその他の setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群で脳の空胞化は認められなかったことから、この所見は投与に起因するものとは考えられなかった。

陽性対照（NMU）群では、予想どおり mPEG-DSPE 対照群と比較して生存率は低く、リンパ腫やその他の腫瘍の発現率は高かった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE 群では ADA は認められなかった。スクリーニング検査で陽性となった 3 検体は確認試験でいずれも陰性と判定された。

Day 182 における生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群の血漿中 setmelanotide 濃度は、全ての採取時点で定量下限未満（BLQ）であった（表 2.6.6-40）。1～10 mg/kg/日群の投与後 1 時間では、血漿中 setmelanotide 濃度は用量の増加に伴い上昇し、投与後 24 時間では全ての setmelanotide 投与群で BLQ であった。

表 2.6.6-40　Day 182 の平均血漿中 setmelanotide 濃度（ng/mL）

| Group No. | Dose (mg/kg/day) | Plasma Concentration[a] (ng/mL) | |
|---|---|---|---|
| | | 1 hour Postdose | 24 hour Postdose |
| 1 | 0 (saline) | BLQ | BLQ |
| 2 | 0 (mPEG-DSPE) | BLQ | BLQ |
| 3 | 1 | 462 | BLQ |
| 4 | 3 | 1,130 | BLQ |
| 5 | 10 | 1,950 | BLQ |

BLQ = below the limit of quantitation; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.
a Mean values for males and females combined.

結論として、rasH2-Tg マウスに 10 mg/kg/日までの setmelanotide/mPEG-DSPE を反復皮下投与したとき、がん原性や ADA の発現は認められなかった。Day 182 の投与後 1 時間では、1～10 mg/kg/日群で血漿中 setmelanotide 濃度は用量の増加に伴い上昇し、投与後 24 時間では全ての setmelanotide 投与群で BLQ であった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する病理組織学的変化は投与部位に限定され、血清細胞性痂皮、混合性細胞浸潤及び空胞化マクロファージ浸潤が認められた。血清細胞性痂皮は試験操作に起因し、setmelanotide 投与により増悪した可能性があると考えられた。混合性細胞浸潤は試験操作に起因し、空胞化マクロファージ浸潤は mPEG-DSPE 投与に起因すると判断されたが、いずれの所見においても setmelanotide による増悪の可能性は否定できなかった。下顎及び腸間膜リンパ節における空胞化マクロファージ浸潤も mPEG-DSPE 投与に起因すると考えられた。

陽性対照（NMU）群では、予想どおり、mPEG-DSPE 対照群と比較して生存率は低く、リンパ腫やその他の腫瘍の発現率は高かった。

### 2.6.6.5.5 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（3）

RM-493-TOX-045 試験（4.2.3.4.2-5）

rasH2-Tg マウスに setmelanotide を 6 ヵ月間反復皮下投与したときの毒性及びがん原性を評価し、血漿中 setmelanotide 濃度を測定した。併せて、陽性対照物質（NMU）を用いて既知の化学発がん物質に対する本動物モデルの感受性を確認した。

rasH2-Tg マウスと野生型 rasH2-Wt マウスの群分け時エラーを回避するため、本試験では rasH2-Tg マウス（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic ヘミ接合型）のみを使用した。また、給水システムの故障を回避するため、各ケージに個別の給水ボトルを使用した。

試験デザインの概要を表 2.6.6-41 に示す。野生型 rasH2-Wt マウスを用いた 28 日間用量設定試験（2.6.6.5.2 項）の結果に基づき、高用量である 10 mg/kg/日（投与容量：5 mL/kg）は MTD であると考えられた。

表 2.6.6-41 RM-493-TOX-045 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level[a] (mg/kg/day) | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc.[a] (mg/mL) | No. of Animals | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | M | F |
| 1 | Saline Control | 0 | 5 | 0 | 25 | 25 |
| 2 | mPEG-DSPE placebo[b] | 0 | 5 | 0 | 25 | 25 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 1 | 5 | 0.2 | 25 | 25 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 5 | 0.6 | 25 | 25 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 5 | 2 | 25 | 25 |
| 6 | NMU[c] | 75 | 10 | 7.5 | 25 | 25 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NMU = N-nitrosomethylurea (positive control).

a Dose levels and concentration expressed as peptide content

b Placebo for RM-493 was diluted 5-fold with 5% mannitol (equivalent to 2 mg/mL RM-493 in mPEG-DSPE). The dose of mPEG-DSPE: 10 mg/mL × 5 mL/kg = 50 mg/kg/day

c Intraperitoneal administration (10 mL/kg) of NMU positive control once on Day 1.

Note: RM-493=setmelanotide

本試験における評価項目は死亡、詳細な一般状態（触知可能な腫瘤の有無を含む）、体重、摂餌量、血漿中濃度、剖検所見、器官重量及び病理組織学的検査とした。ADA 陽性動物は認められなかった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE は全ての用量において臨床的に良好な忍容性が得られ、生存率、体重、摂餌量、触知可能な腫瘤、剖検所見に setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する影響は認められなかった。これは、生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群との比較、又は mPEG-DSPE 対照群と生理食塩液対照群との比較でも同様であった。生存率データを表 2.6.6-42 に示す。

表 2.6.6-42　生存率データ及び死因

| Group No. | Male | | | | | | Female | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6[a]** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6[a]** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| **No. Animals per Group** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** |
| Survivability | 25 | 25 | 24 | 25 | 24 | 1 | 25 | 25 | 25 | 23 | 25 | 2 |
| % Survival Rate | 100 | 100 | 96 | 100 | 96 | 4 | 100 | 100 | 100 | 92 | 100 | 8 |
| **Cause of Death** | | | | | | | | | | | | |
| Lymphoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| Hemangiosarcoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Undetermined | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

a　N-nitrosomethylurea (NMU) positive control group.

1 mg/kg/日以上の群で、setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する一般状態として、被毛の薄化（主に背側頸部、背側胸部、肩甲部及び投与部位）及び Week 10 以降に用量依存的な被毛の暗色化（複数部位、投与部位を含む）の発現率上昇が認められた。10 mg/kg/日群の雌では、尾部の淡色／ピンク色の変色の発現率が上昇した。これらの所見は動物の全般的な健康状態に影響を及ぼさなかったことから、有害ではないと判断された。

いずれの用量においても、setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する腫瘍性変化は認められなかった（表 2.6.6-43）。各臓器及び組織で認められた腫瘍はこの系統及び週齢のマウスで一般的に観察される性質のものであり、生理食塩液対照群、mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群での発現率は同程度であり、用量依存的な傾向が見られず、試験施設の背景データの範囲内であったことから、自然発生的と判断された。したがって、これらの腫瘍性変化は setmelanotide/mPEG-DSPE 投与との関連性はないと考えられた。

陽性対照（NMU）群では、生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群と比較して生存率は低く、リンパ腫やその他の腫瘍所見の発現率が高かったなど、予想された毒性学的反応が認められた。これらの所見は、NMU 投与 rasH2-Tg マウスに関する公表文献（Nambiar 2012）と同様であった。

表 2.6.6-43　主な腫瘍性所見の発現頻度

| Group No. | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6[a]** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6[a]** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| **No. Animals per Group[b]** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** |
| **Hemolymphoreticular tissue (No. Examined)** | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Lymphoma, malignant | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **20** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **20** |
| **Skin (No. Examined)** | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Papilloma | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | **7** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |

| Group No. | Males | | | | | | Females | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6[a]** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6[a]** |
| **Dose (mg/kg/day)** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** | **0** | **0** | **1** | **3** | **10** | **75** |
| **No. Animals per Group[b]** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** | **25** |
| **Stomach (No. Examined)** | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Papilloma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **11** | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | **10** |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **6** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | **6** |
| **Spleen (No. Examined)** | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Hemangiosarcoma | 0 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| **Lung (No. Examined)** | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Bronchioloalveolar adenoma | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| **Uterus (No. Examined)** | - | - | - | - | - | - | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Polyp Endometrial | | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | **6** |

a N-nitrosomethylurea (NMU) positive control group.
b Neoplastic findings are reported from all study animals.
Note: Values in bold significantly different from Group 2 $p \leq 0,05$ pairwise comparison test.

Setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する非腫瘍性の病理学的所見は投与部位に限定しており、1 mg/kg/日以上の群の雌雄で混合性細胞浸潤の重症度が用量依存的に増加し、10 mg/kg/日群の雄ではアカントーシスが認められた。mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 群の雄雌で、投与部位に軽微～軽度の空胞化マクロファージ浸潤が認められた。この所見は生理食塩液対照群では認められなかったことから、mPEG-DSPE 投与に起因すると判断された。これらの病理組織学的所見は、影響を受けた組織で機能障害の徴候が認められず、動物の全体的な健康状態にも影響を及ぼさなかったことから、有害ではないと判断された。ラット及びサルの反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 及び 2.6.6.3.2.2 項）で見られた脳組織の空胞化は、本試験では認められなかった。

Day 182 における生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群の血漿中 setmelanotide 濃度は、全ての採取時点で BLQ であった。投与後 1 時間では全用量群（1～10 mg/kg/日）で用量依存的に血漿中濃度は上昇し、投与後 24 時間では全用量群で BLQ であった。雌では 1～10 mg/kg/日群の全用量群で、血漿中 setmelanotide 濃度は用量に比例して増加した。雄では 1～3 mg/kg/日群間で用量に比例して増加し、3～10 mg/kg/日群間で用量比をやや下回って増加した。

表 2.6.6-44　Day 182 の平均血漿中 setmelanotide 濃度（ng/mL）

| Time Post-Dose | Group 1 | | Group 2 | | Group 3 | | Group 4 | | Group 5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** | **M** | **F** |
| 1 hour | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 458 | 381 | 1,160 | 1,190 | 2,150 | 3,010 |
| 24 hour | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |

BLQ = below the limit of quantitation; F = females; M = males.

結論として、10 mg/kg/日までの setmelanotide/mPEG-DSPE を rasH2-Tg マウスに 6 ヵ月間反復皮下投与した結果、がん原性は認められなかった。Day 182 の血漿中 setmelanotide 濃度は、投与後 1 時間では全用量群（1～10 mg/kg/日）で用量依存的に上昇し、投与後 24 時間では全群で

BLQ であった。1 mg/kg/日以上の群で被毛の薄化及び暗色化、10 mg/kg/日群の雌で尾部の淡色／ピンク色の変色が認められ、いずれも有害ではないと判断された。病理組織学的検査では、setmelanotide/mPEG-DSPE に関連する変化として 1 mg/kg/日以上の群の投与部位で混合性細胞浸潤、10 mg/kg/日群の雄でアカントーシスが認められたが、いずれも有害ではないと判断された。また、mPEG-DSPE 対照群及び全ての setmelanotide/mPEG-DSPE 群において、投与部位に有害ではないが mPEG-DSPE に関連した空胞化マクロファージ浸潤が認められた。

RM-493-TOX-041 試験（4.2.3.4.2-2）の Day 28 の TK データに基づくと、本試験における setmelanotide 10 mg/kg/日の雌雄合算の $C_{max}$ 及び AUC は、最大臨床用量（3 mg/日）投与時の臨床曝露量のそれぞれ 81 倍及び 17 倍であった（表 2.6.6-61）。

## 2.6.6.6 生殖発生毒性試験

### 2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Setmelanotide/mPEG-DSPE 及び setmelanotide/生理食塩液が雄の生殖能及び初期胚発生に及ぼす影響について、ICH S5(R2)ガイドラインに準拠し、26 週間反復皮下投与毒性試験（RM-493-TOX-023 試験［4.2.3.2-3］）の一環としてラットを用いて評価した。本試験の試験デザイン及び一般毒性並びに TK データについては、2.6.6.3.1.3 項に示す。

Setmelanotide/mPEG-DSPE の雌受胎能及び初期胚発生に及ぼす影響については、雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（RM-493-TOX-029 試験、2.6.6.6.2.1 項）において評価した。

#### 2.6.6.6.1.1 雄受胎能に関する試験

RM-493-TOX-023 試験（4.2.3.2-3）

26 週間反復皮下投与毒性試験で、主試験群及び回復群の雄ラットを Day 29 より未処置の雌ラットと交配させた。全ての未処置雌動物（予備動物を含む）について、交配前 14 日間及び交配期間中の交配確認日まで、膣垢検査により発情周期を確認した。交配確認雌を妊娠 13 日に安楽死させ、卵巣及び子宮を摘出して黄体数、着床数、胎盤異常、生存・死亡胚、早期吸収胚の数と分布を評価した。雄については、交尾率（交尾成立雄数／交配雄数×100）及び授胎率（妊娠させた雄数／交配雄数×100）、精子の濃度・運動性・形態評価、並びに雄性生殖器の病理組織学的検査を実施した。

Setmelanotide/生理食塩液及び setmelanotide/mPEG-DSPE のいずれの用量でも、交尾率、雌雄受胎率に影響は認められなかった。また、着床数、生存・死亡胚数、早期吸収胚数及び着床前・後胚損失率に、いずれの用量でも影響は認められなかった。未交配雌の黄体数は全群で同程度であった。投与期間終了時に、精子の運動性、形態及び数に setmelanotide に関連した影響は認められなかった。剖検まで生存した 1、2、4 及び 7 群の雄について、精子形成サイクル評価を含む精巣の詳細な病理組織学的検査を実施したが、精巣に mPEG-DSPE 又は setmelanotide の投与に起因する変化は認められなかった。

本試験の結果に基づき、setmelanotide/生理食塩液の無毒性量は 15 mg/kg/日（雄：$C_{max}$ 3,820 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 28,300 ng*hr/mL、雌：$C_{max}$ 4,940 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 28,700 ng*hr/mL［Day 180］、setmelanotide/mPEG-DSPE の無毒性量は 3 mg/kg/日（雄：$C_{max}$ 644 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 6,160 ng*hr/mL、雌：$C_{max}$ 901 ng/mL、$AUC_{0-\tau}$ 4,040 ng*hr/mL［Day 180］）と判断された。

Setmelanotide/生理食塩液の無毒性量 15 mg/kg/日における $C_{max}$ 及び AUC 値（雌雄合算）は、最大臨床用量（3 mg/日）投与時の臨床曝露量のそれぞれ 116 倍及び 49 倍であった。

## 2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

### 2.6.6.6.2.1 雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

RM-493-TOX-029 試験（4.2.3.5.1-1）

本試験では、ICH S5(R2)ガイドラインの生殖発生ステージ A～D（交尾前～妊娠終了）を対象とし、未処置雄との交配開始 14 日前から交配期間中及び妊娠 17 日（GD17）まで、setmelanotide/mPEG-DSPE の 0.5、3.0 及び 5.0 mg/kg/日（非臨床製剤を 1:10 で希釈し、setmelanotide の 0.5、3.0 及び 5.0 mL/kg/日を 1 mg/mL の容量で投与）を皮下投与して、雌の受胎能及び胚・胎児発生に対する影響を評価した。対照群として、生理食塩液群及び mPEG-DSPE 群を設定した。本試験の用量は、ラットの 28 日間皮下投与用量設定試験（2.6.6.3.1.2 項）の結果に基づいて設定し、高用量の 5 mg/kg/日は MTD と考えられる。投与開始時の動物は 7～8 週齢で、体重は 205～280 g であった。試験デザインの概要を表 2.6.6-45 に示す。

表 2.6.6-45 RM-493-TOX-029 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material [a] | Dosage Level [a] (mg/kg/day) | Conc. [b] (mg/mL) | Dosage Volume (mL/kg) | No. of Main Study Animals | No. of TK Study Animals [c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | mPEG-DSPE control | 0 | 0 | 5.0 | 22 | 3 |
| 2 | Saline control | 0 | 0 | 5.0 | 22 | 3 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 22 | 9 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3.0 | 1.0 | 3.0 | 22 | 9 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 5.0 | 1.0 | 5.0 | 22 | 9 |

mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.
a mPEG-DSPE vehicle and RM-493 in mPEG-DSPE diluted 1:10 with 5% mannitol; Saline control, 0.9% NaCl; The dose of mPEG-DSPE was 50 mg/kg/day (10 mg/mL × 5 mL/kg).
b Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
c TK animals were used for TK and ADA evaluation only.
Note: RM-493=setmelanotide

母動物の評価項目は、死亡、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、発情周期、交尾率、受胎率、妊娠率、TK、ADA 検査、卵巣及び子宮検査（黄体数、着床部位、胎盤検査、生存及び死亡胎児、早期及び後期吸収胚）、並びに剖検所見とした。胎児の評価項目は、性比、着床前・後胚損失率、体重、内臓及び骨格検査とした。

本試験の結果、妊娠前及び妊娠中に全ての投与群で、摂餌量及び体重の用量依存的な減少が認められた。これらの変化は、setmelanotide の薬理作用によるものと判断された。5.0 mg/kg/日群の投与部位では、局所的な変化として暗色斑が観察された。Setmelanotide 投与群で、ADA の

産生は認められなかった。

本試験における TK パラメーターを表 2.6.6-46 に示す。

表 2.6.6-46 雌ラットにおける setmelanotide 皮下投与後の TK パラメーター

| Day | Parameter | 0.5 mg/kg/day | 3.0 mg/kg/day | 5.0 mg/kg/day |
|---|---|---|---|---|
| SD 1 | $C_{max}$ (ng/mL) | 130 | 470 | 445 |
| SD 1 | $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 396 | 1,870 | 3,190 |
| GD 17 | $C_{max}$ (ng/mL) | 147 | 608 | 1,280 |
| GD 17 | $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 388 | 3,150 | 6,450 |

$AUC_{0-\tau}$ = area under the plasma concentration-time curve during a time interval; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; GD = gestation day; SD = study day.

全身の母動物毒性は認められず、発情周期、受胎能及び胚・胎児発生に投与に関連した影響は認められなかった。したがって、母動物毒性、受胎能及び胚・胎児発生に関する無毒性量は 5.0 mg/kg/日と判断された（GD17 の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ はそれぞれ 1,280 ng/mL 及び 6,450 ng*hr/mL）。

本試験における無毒性量は、$C_{max}$ 及び AUC に基づくと最大臨床用量である 3 mg 投与時の臨床曝露量のそれぞれ 34 倍及び 11 倍であった（表 2.6.6-61）。

### 2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた忍容性及び胚・胎児発生用量設定試験

RM-493-TOX-030 試験（4.2.3.5.2-1）

1）妊娠 New Zealand White（NZW）ウサギにおける setmelanotide/mPEG-DSPE の忍容性評価、2）ウサギを用いた胚・胎児発生試験に使用する用量選定のための情報提供、3）雌ウサギの着床から硬口蓋閉鎖までの期間における setmelanotide/mPEG-DSPE の曝露による胚・胎児発生に対する影響の予備的評価を実施した。ICH S5(R2)ガイドラインにおける生殖発生ステージ C 及び D（着床～妊娠終了）を対象とし、妊娠ウサギにおける setmelanotide の TK も評価した。投与開始時の動物は 6 ヵ月齢で、体重は 2.9～3.5 kg であった。試験デザインの概要を表 2.6.6-47 及び表 2.6.6-48 に示す。

表 2.6.6-47 RM-493-TOX-030 試験の忍容性試験（フェーズ I）の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dosage Level [a] (mg/kg/day) | Concentration[a] (mg/mL) | Dosage Volume (mL/kg) | No. of Main Study Animals |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.03 | 1 | 0.03 | 2 |
| 2 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.1 | 1 | 0.1 | 2 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.3 | 1 | 0.3 | 2 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 3 | 1 | 3 | 2 |
| 6 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 10 | 1 | 10 | 2 |

mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.
a Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-48 RM-493-TOX-030 試験の用量設定試験（フェーズ II）の試験デザイン

| Group No. | Test Material [a] | Dosage Level [b] (mg/kg/day) | Concentration [b] (mg/mL) | Dosage Volume (mL/kg) | No. of Main Study Animals |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | mPEG-DSPE control | 0 | 0 | 10 | 5 |
| 8 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.05 | 1 | 0.05 | 6[c] |
| 9 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.5 | 1 | 0.5 | 6[c] |
| 10 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 1 | 3 | 6[c] |
| 11 | RM-493 in mPEG-DSPE | 10 | 1 | 10 | 6[c] |
| 12 | RM-493 in mPEG-DSPE | 20 | 10 | 2 | 6[c] |

mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; pc = postcoitum.
a For Groups 7-11, mPEG-DSPE vehicle and RM-493 in mPEG-DSPE was diluted 1:10 with 5% mannitol; For Group 12, the clinical mPEG-DSPE was left undiluted.
b Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
c The first three animals/group were dosed from Days 7 to 13 pc, and the last three animals/group were dosed from Days 13 to 19 pc.
Note: RM-493=setmelanotide

本試験における評価項目は母動物の一般状態、体重、摂餌量、TK パラメーター（用量設定試験のみ）及び剖検所見（用量設定試験のみ）とした。忍容性試験では妊娠状態を確認した。用量設定試験では、雌の生殖器を摘出し、卵巣を切除して黄体数を計数した。妊娠子宮重量を測定し、子宮内容物（胎盤を含む）を観察した。生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数を記録し、胎児の性別判定、体重測定、外表検査を実施した。

忍容性試験では、setmelanotide/mPEG-DSPE の 5%マンニトール希釈臨床製剤（1 mg/mL）の 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日を、妊娠 7～13 日の 7 日間皮下投与し、投与期間後 7 日間の回復期間を設けた。0.1 mg/kg/日以上の群で摂餌量の顕著な減少が認められ、1 mg/kg/日以上の群では体重減少が見られた。これらの変化は回復期間中に可逆的であった。交尾後 20 日時点で全動物が妊娠していた。

用量設定試験では、妊娠ウサギに setmelanotide/mPEG-DSPE の希釈製剤（1 mg/mL）を 0、0.05、0.5、3 及び 10 mg/kg/日、並びに未希釈製剤（10 mg/mL）を 20 mg/kg/日の用量で投与した。各群 3 匹の 2 つのサブグループを設け、妊娠 7～13 日（サブグループ A）及び 13～19 日（サブグループ B）に投与した。対照群には妊娠 7～19 日に希釈 mPEG-DSPE を投与した。

サブグループ A の妊娠 7 日の $AUC_{0-\tau}$ は、0.05～3 mg/kg/日間ではわずかに用量比を上回って増加し、3～10 mg/kg/日間では用量に比例して増加し、10～20 mg/kg/日間では用量比を下回って増加した。妊娠 13 日の $AUC_{0-\tau}$ は、0.05～0.5 mg/kg/日間及び 3～20 mg/kg/日間では用量に比例して、0.5～3 mg/kg/日間ではやや用量比を上回って増加した。妊娠 13 日／7 日の $AUC_{0-\tau}$ 比は 0.714（3 mg/kg/日）～1.27（20 mg/kg/日）であり、蓄積性はほとんど認められなかった。

サブグループ B の妊娠 13 日の $AUC_{0-\tau}$ は、0.05～10 mg/kg/日間では用量比を上回って増加し、10～20 mg/kg/日間では用量比を下回って増加した。妊娠 19 日の $AUC_{0-\tau}$ は、0.05～0.5 mg/kg/日間及び 10～20 mg/kg/日間では用量に比例して増加し、0.5～10 mg/kg/日間ではわずかに用量比を上回って増加した。妊娠 19 日／13 日の $AUC_{0-\tau}$ 比は 0.564（3 mg/kg/日）～0.877（0.05 mg/kg/日）であり、蓄積性は認められなかった。

投与初日又は 2 日から用量依存的な摂餌量の減少が認められた。3 mg/kg/日以上の群及びサブ

グループ B の 0.5 mg/kg/日群では、摂餌量の著しい減少又は無摂餌が持続した。妊娠 13 日で 3 mg/kg/日以上の群では体重が対照群より 14%以上減少し、妊娠 20 日で 0.5 mg/kg/日以上の群では 12%以上の体重減少が認められた。

剖検では、サブグループ B の 3 及び 10 mg/kg/日群の雌各 1 例、並びに 20 mg/kg/日群の雌全例で投与部位の肥厚が認められた。

サブグループ A では、3、10 及び 20 mg/kg/日群のそれぞれ 1/3、2/2 及び 3/3 例で全胚吸収が認められ、これにより 3 mg/kg/日以上の群で着床後胚損失率の増加、3 mg/kg/日群では生存胎児数の減少が見られ、10 及び 20 mg/kg/日群では生存胎児は認められなかった。サブグループ B では、0.5、10 及び 20 mg/kg/日群のそれぞれ 2/3、1/3 及び 2/3 例で全胚吸収が認められた。また、0.5、3、10 及び 20 mg/kg/日群のそれぞれ 1/3、1/3、2/3 及び 1/3 例が流産した。これらの所見は、長期間にわたる摂餌量の減少又は無摂餌に起因する可能性がある。全胚吸収が認められた雌では、0.5 mg/kg/日以上の群で着床後胚損失率の増加、3 mg/kg/日群で生存胎児数の減少が見られ、0.5、10 及び 20 mg/kg/日群では生存胎児は認められなかった。

胎児体重に明らかな影響は認められなかった。投与群に複数の胎児異常が観察されたが、生存胎児を有する各サブグループの胎児数が少ないことから、胎児異常に関する明確な結論は、忍容性のある用量で実施した本試験の完了を待つ必要がある。

忍容性試験では、妊娠 7～13 日に setmelanotide/mPEG-DSPE を 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日の用量を 1 mg/mL の濃度で皮下投与した。用量設定試験では、妊娠 7～13 日又は 13～19 日に、setmelanotide/希釈 mPEG-DSPE（1 mg/mL）を 0.05、0.5、3 及び 10 mg/kg/日の用量で、setmelanotide/未希釈 mPEG-DSPE（10 mg/mL）を 20 mg/kg/日の用量で投与した。Setmelanotide を投与した全ての用量群で薬理作用に起因する摂餌量の顕著な減少が認められ、0.5 mg/kg/日以上の群では体重減少が認められた。妊娠 7～13 日群（サブグループ A）では、3 mg/kg/日以上の群で全胚吸収を伴う雌に関連して着床後胚損失率の増加が見られた。妊娠 13～19 日群（サブグループ B）では、0.5 mg/kg/日以上の群で流産の発現率が上昇し、用量依存的に着床後胚損失率が増加した。これらは主に全胚吸収に関連していた。

これらの結果に基づき、setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤（1 mg/mL）の胚・胎児発生毒性試験（2.6.6.6.2.3 項）における高用量は、0.5 mg/kg/日未満とすることが推奨された。用量設定においては分割投与デザインが推奨され、妊娠ウサギの器官形成期全体にわたる影響を評価するため、妊娠 7～13 日又は 13～19 日に setmelanotide を投与することが推奨される。これにより、薬理作用に起因する摂餌量減少の影響を最小限に抑えつつ、母動物、妊娠状態及び胎児発達への影響を適切に評価することが可能となる。

### 2.6.6.6.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

RM-493-TOX-031 試験（4.2.3.5.2-2）

Setmelanotide/mPEG-DSPE の着床から硬口蓋閉鎖までの曝露による妊娠 NZW ウサギに対する有害作用及び胚・胎児発生への影響を評価し、setmelanotide の TK 及び免疫原性も評価した。本試験は、ICH S5(R2)ガイドラインにおける生殖発生ステージ C 及び D を対象とした。妊娠 5 日（GD5）時点の動物は 6 ヵ月齢で、体重は 2.8～3.7 kg であった。試験デザインの概要を表

2.6.6-49 に示す。

表 2.6.6-49 RM-493-TOX-031 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dosage Level [a] (mg/kg/day) | Dosage Concentration [a] (mg/mL) | Dosage Volume (mL/kg) | No. of Main Study Animals |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Vehicle control | 0 | 0 | 0.2 | 20 [b] |
| 2 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.05 | 1 | 0.05 | 20 [b] |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.05 | 1 | 0.05 | 20 [b] |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.1 | 1 | 0.1 | 22 [b] |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.2 | 1 | 0.2 | 20 [b] |
| 6 | RM-493 in mPEG-DSPE 1:10 | 0.2 | 1 | 0.2 | 22 [b] |

mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.
a Dose level and concentration were expressed as net peptide content. The dose of mPEG-DSPE was 2 mg/kg/day (10 mg/mL × 0.2 mL/kg).
b Group 1 was dosed from gestation day (GD) 7 to 19, Groups 2 and 5 from GD 7 to 13, and Groups 3, 4, and 6 from GD 13 to 19.
Note: RM-493=setmelanotide

被験物質（setmelanotide/mPEG-DSPE、5%マンニトール希釈）及び対照物質（setmelanotide/mPEG-DSPE プラセボ、5%マンニトール希釈）を、肩甲骨間、背部上部、背部中部及び腰部に皮下投与した。1 群には妊娠 7～19 日、2 及び 5 群には妊娠 7～13 日、並びに 3、4 及び 6 群には妊娠 13～19 日に投与した。

本試験における評価項目は一般状態、体重、摂餌量、ADA 検査、TK パラメーター、卵巣及び子宮検査、母動物の剖検所見、胎児検査（体重、外表、内臓及び骨格検査）とした。

試験期間中に死亡例はなく、setmelanotide に関連する肉眼的異常所見も認められなかった。

Setmelanotide 投与群では、全群で投与期間中に摂餌量及び体重減少／体重増加量の減少が認められ、妊娠 13 日に 0.05 mg/kg/日（2 群）及び 0.2 mg/kg/日（5 群）、妊娠 20 日に 0.05 mg/kg/日（3 群）及び 0.1 mg/kg/日（4 群）、妊娠 20 及び 23 日に 0.2 mg/kg/日（6 群）で体重の低値が認められた。摂餌量の減少は setmelanotide の予測された薬理作用であり、同時に糞の量及びサイズの減少も観察された。妊娠 25～29 日には、対照群と比較して 0.05 mg/kg/日群（2 群）を除く全ての投与群で摂餌量が増加した。

ADA 産生は見られず、setmelanotide の曝露量は、おおむね用量に比例して増加した（表 2.6.6-50）。

表 2.6.6-50 雌ウサギにおける setmelanotide 皮下投与後の TK パラメーター

| GD | Parameter | 0.05 (mg/kg/day) | 0.05 (mg/kg/day) | 0.1 (mg/kg/day) | 0.2 (mg/kg/day) | 0.2 (mg/kg/day) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GD 7 to 13 | GD 13 to 19 | GD 13 to 19 | GD 7 to 13 | GD 13 to 19 |
| Day 7 | $C_{max}$ (ng/mL) | 60.7 | NA | NA | 244 | NA |
| Day 7 | $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 149 | NA | NA | 958 | NA |
| Day 13 | $C_{max}$ (ng/mL) | 77.9 | 88.8 | 152 | 212 | 319 |
| Day 13 | $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | 214 | 223 | 524 | 941 | 1160 |
| Day 19 | $C_{max}$ (ng/mL) | NA | 53.0 | 139 | NA | 242 |
| Day 19 | $AUC_{0-\tau}$ (ng*hr/mL) | NA | 206 | 436 | NA | 862 |

$AUC_{0-\tau}$ = area under the plasma concentration-time curve during a time interval; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; GD = gestation day; NA = not applicable.

0.1 mg/kg/日以上の群で、setmelanotide に関連した生存胎児数の減少、吸収胚数及び着床後胚損失率の増加が認められた。0.1、0.2（妊娠 7～13 日投与）及び 0.2（妊娠 13～19 日投与）mg/kg/日群の各群 1 例に全胚吸収が認められた。

0.2 mg/kg/日群で、妊娠 13～19 日の胎児体重が対照群より 6.6%低く、成長への影響（胎児毒性）が示唆された。これは、投与期間中の母動物の摂餌量低下が一因である可能性がある。

胎児の外表、内臓及び骨格異常及び変異に、setmelanotide に関連する明らかな影響は認められなかった。

結論として、setmelanotide/mPEG-DSPE（5%マンニトール希釈）を妊娠 NZW ウサギの妊娠 7～13 日に 0.05 及び 0.2 mg/kg/日、又は妊娠 13～19 日に 0.05、0.1 及び 0.2 mg/kg/日の用量で皮下投与した結果、全用量で setmelanotide の薬理作用に起因する摂餌量の減少及び体重低下が認められたが、死亡例や肉眼的異常所見は認められなかった。

0.1 mg/kg/日以上では吸収胚数及び着床後胚損失率の増加が認められ、setmelanotide に関連する胚致死性が示唆された。0.2 mg/kg/日群では胎児体重（妊娠 13～19 日）の低下が認められ、成長に対する影響（胎児毒性）が示されたが、これは母動物の摂餌量低下が一因である可能性がある。催奇形性に関する明らかな証拠は認められなかった。

これらの結果に基づき、本試験における無毒性量は 0.05 mg/kg/日と判断され、妊娠 7～13 日及び妊娠 13～19 日の投与期間終了時における AUC はそれぞれ 214 及び 206 ng*hr/mL、$C_{max}$ はそれぞれ 77.9 及び 53.0 ng/mL であった。

無毒性量における setmelanotide の曝露量は、最大臨床用量である 3 mg 皮下投与時の AUC の約 0.4 倍、$C_{max}$ の約 1.4 倍であった（表 2.6.6-61）。

### 2.6.6.6.3 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

RM-493-TOX-033 試験（4.2.3.5.3-1）

雌 SD ラットの妊娠、分娩及び授乳期間中に、setmelanotide /mPEG-DSPE を連日投与したときの毒性を評価し、妊娠 6 日～分娩後 21 日における出生児の発達、生存、身体的発達、行動及び生殖能に対する影響を評価した。本試験では、ICH S5(R2)ガイドラインの生殖発生ステージ C～F（着床～性成熟）を評価した。さらに、妊娠中及び授乳中の母動物及び出生児の血漿中及び母動物の乳汁中の setmelanotide 濃度を測定した。投与開始時の動物は 73～87 日齢で、体重は 235～336 g であった。試験デザインを表 2.6.6-51 に示す。

表 2.6.6-51 RM-493-TOX-033 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dosage Level [a] (mg/kg/day) | Dosage Conc. [a] (mg/mL) | Dosage Volume (mL/kg) | No. of $F_0$ Females (Main Study) | No. of $F_0$ Females (TK Study) [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Vehicle control | 0 | 0 | 5 | 22 | 4 |
| 2 | Saline control | 0 | 0 | 5 | 22 | 4 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.5 | 1 | 0.5 | 22 | 8 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 1 | 3 | 22 | 8 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 5 | 1 | 5 | 22 | 8 |

Conc = concentration; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.
a Dose level and concentration were expressed as net peptide content. The dose of mPEG-DSPE was 50 mg/kg/day (10 mg/mL × 5 mL/kg).
b TK animals were used for TK evaluation only.
Note: RM-493=setmelanotide

Setmelanotide/mPEG-DSPE、mPEG-DSPE 媒体対照（いずれも 5%マンニトールで 1:10 に希釈）及び生理食塩液（0.9% NaCl）対照を、肩甲部、背部中央部及び腰部に皮下投与した。

F0 世代の評価項目は死亡、一般状態、体重、摂餌量、妊娠成績及び剖検所見、F1 世代の評価項目は生存率、一般状態、体重、摂餌量、視覚機能（瞳孔閉鎖及び視覚性置き直し）、身体的発達（膣開口及び包皮分離）、行動発達（活動性試験、聴覚驚愕及び馴化）、学習及び記憶（Cincinnati 水迷路）、生殖能（発情周期、交尾能及び受胎能の評価）、帝王切開（妊娠 13 日）及び剖検所見とした。

分娩後 10 日の $C_{max}$ は、0.5～3 mg/kg/日間では用量に比例して増加し、3～5 mg/kg/日間ではわずかに用量比を上回って増加した（表 2.6.6-52）。分娩後 10 日の 0.5～5 mg/kg/日間の $AUC_{0-\tau}$ は用量比を上回って増加した。投与量で補正した $C_{max}$ は、setmelanotide の 0.5、3 及び 5 mg/kg/日群でそれぞれ 142、142 及び 198 kg*ng/mL/mg であった。投与量で補正した $AUC_{last}$ は、setmelanotide の 0.5、3 及び 5 mg/kg/日でそれぞれ 495、781 及び 869 (ng*hr/mL)/(mg/kg)であった。

表 2.6.6-52 Setmelanotide を F0 雌ラットに皮下投与したときの TK パラメーター（妊娠 20 日及び分娩後 10 日）

| Sampling Day | Parameter | 0.5 mg/kg/day | 3 mg/kg/day | 5 mg/kg/day |
|---|---|---|---|---|
| Day 20 pc | $C_{max}$ (ng/mL) | 101 | 541 | 744 |
| LD 10 | $C_{max}$ (ng/mL) | 71.2 | 427 | 990 |
| Day 20 pc | $AUC_{last}$ (ng*hr/mL) | 231 | 2,050 | 4,140 |
| LD 10 | $AUC_{last}$ (ng*hr/mL) | 247 | 2,340 | 4,340 |

$AUC_{last}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; LD = lactation day; pc = postcoitum.

全用量群の F0 母動物の分娩後 11 日の乳汁中に setmelanotide が検出され、乳汁中 setmelanotide 濃度は 12.0 ng/mL（0.5 mg/kg/日）～106 ng/mL（5 mg/kg/日）であった。投与後 2 時間の乳汁／血漿比は、0.5、3 及び 5 mg/kg/日群でそれぞれ 0.39、0.21 及び 0.17 であった。全用量群において、生後 11 日の出生児の血漿中には setmelanotide は検出されなかった。

Setmelanotide に関連する母動物の死亡や一般状態の変化は認められなかった。投与に関連する

母動物の体重増加量及び摂餌量の減少が用量依存的に認められ、これは setmelanotide の予想された薬理作用である。5.0 mg/kg/日群では、妊娠期間中（GD 6～21）及び授乳期間中（LD 0 及び 14）の摂餌量は、生理食塩液対照群と比較してそれぞれ 16%及び 22%低値であった。3 mg/kg/日群では、妊娠期間及び授乳期間中の摂餌量は、それぞれ生理食塩液対照群と比較して 10%及び 11%低値であった。0.5 mg/kg/日群では、妊娠及び授乳期間中の摂餌量は生理食塩液対照群と比較して 7%低値であった。その結果、母動物の体重は 5 mg/kg/日群では妊娠 9 日～分娩後 21 日、3 mg/kg/日群では妊娠 15 日～分娩後 21 日及び 0.5 mg/kg/日群では分娩後 0 日に生理食塩液及び／又は媒体対照群と比較して有意に低値であった。

mPEG-DSPE 媒体対照群及び 3 mg/kg/日以上の群の投与部位では、皮膚の表面に暗色痂皮、淡色痂皮及び／又は被毛の薄化、並びに皮下組織に暗色斑、腫脹及び／又は肥厚が見られた。同じ投与容量（5 mL/kg）で、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）投与母動物では、mPEG-DSPE（1:10）投与母動物と比較して変化の発現率が低かった。局所刺激性変化は主に媒体の投与に関連し、setmelanotide の同時投与により軽減作用が認められた。したがって、setmelanotide の用量依存的な変化は、主に媒体である mPEG-DSPE の増加によるものであると考えられた。

F0 母動物の妊娠成績、F1 出生児の生存率及び一般状態に setmelanotide 投与の影響は見られなかった。出生時の出生児体重は、3 及び 5 mg/kg/日群で生理食塩液対照群より 9%低値で、妊娠期間中の母動物の摂餌量の減少による可能性が高い。離乳前期間中、3 及び 5 mg/kg/日群の出生児体重が生理食塩液群及び／又は媒体対照群と比較して用量依存的に低値であった。これらの F1 世代の体重変化は、授乳期間中の母動物の摂餌量の減少に二次的かつ比例して生じたものであり、setmelanotide が F1 出生児の成長に直接影響を及ぼしたものではないと考えられた。

F1 動物において、setmelanotide に関連する死亡や一般症状は認められなかった。F1 世代の体重、摂餌量、視覚機能、性成熟（膣開口及び包皮分離）、聴覚驚愕馴化、活動性、遊泳能力、学習及び記憶（Cincinnati 水迷路）、発情周期及び親動物の生殖能に対する setmelanotide の影響は認められなかった。F1 世代の雌雄で setmelanotide に関連する剖検所見は認められず、setmelanotide 投与群の卵巣及び子宮パラメーター（黄体数、着床部位、生存胚、死亡胚及び初期吸収）は生理食塩液群及び媒体対照群と比較して同程度であり、精巣及び精巣上体重量に setmelanotide 関連の変化は認められなかった。

結論として、妊娠、分娩及び授乳期間中に 0.5、3 及び 5 mg/kg/日の用量で雌ラットに setmelanotide を皮下投与した結果、F0 母動物の摂餌量及び体重増加量が用量依存的に減少した。これらの変化は setmelanotide の薬理作用であると考えられた。一般状態観察及び剖検で投与部位に認められた局所刺激性は、媒体（5%マンニトールで 1:10 に希釈した mPEG-DSPE）の投与に関連し、setmelanotide の同時投与に関連する軽減作用が見られた。分娩後 11 日に、全用量で F0 母動物の乳汁中に定量可能な setmelanotide 濃度が観察された。全身的な母動物毒性は認められなかったため、母動物の無毒性量は 5 mg/kg/日と考えられた（妊娠 20 日及び分娩後 10 日でそれぞれ $C_{max}$ 744 及び 990 ng/mL、$AUC_{last}$ 4,140 及び 4,340 ng*hr/mL）。F1 世代の生存、成長、成熟、視覚機能、神経行動及び生殖能に対する setmelanotide 関連の有害な影響は認められなかったため、F1 世代の無毒性量も 5.0 mg/kg/日と考えられた。

無毒性量での妊娠 20 日における setmelanotide の曝露量は、最大臨床用量の 3 mg 投与時のヒ

ト AUC の約 7 倍及びヒト $C_{max}$ の約 20 倍に相当する（表 2.6.6-61）。

### 2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験

小児患者への投与をサポートするために、setmelanotide/mPEG-DSPE を幼若ラットの生後 7～55 日に投与して毒性を評価した。試験の要約を以下に示す。

#### 2.6.6.6.4.1 幼若ラットを用いた用量設定試験

RM-493-TOX-034 試験（4.2.3.5.4-1）

幼若ラットの毒性試験に使用する用量を選定するための情報を提供する目的で、MC4R 作動薬である setmelanotide の幼若 SD ラットへの影響を予備的に評価し、幼若ラットにおける setmelanotide の TK 特性を検討した。投与開始時の動物は 7 日齢で体重は 12.4～22.5 g、又は 21 日齢（忍容性試験のみ）で体重は 51～69 g であった。試験デザインを表 2.6.6-53 及び表 2.6.6-54 に示す。

表 2.6.6-53 RM-493-TOX-034 試験の忍容性試験（フェーズ I）の試験デザイン

| Group No. | Test Material [a] | Dose Level (mg/kg/day) [b] | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc. (mg/mL) [b] | No. of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Subset A Day 7 pp | | Subset B Day 21 pp | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 1 | RM-493 in Saline | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 2 | RM-493 in Saline | 5 | 2 | 2.5 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | mPEG-DSPE vehicle | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 4 | 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 6 | RM-493 in Saline | 15 | 2 | 7.5 | 2 | 2 | 2 | 2 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; pp = postpartum.
a mPEG-DSPE vehicle and RM-493 in mPEG-DSPE formulations diluted 10-fold with 5% mannitol.
b Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-54 RM-493-TOX-034 試験の用量設定試験（フェーズ II）の試験デザイン

| Group No. | Test Material[a] | Dose Level (mg/kg/day) [b] | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc. (mg/mL) [b] | No. of Animals [c] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main | | TK | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 7 | mPEG-DSPE vehicle | 0 | 5 | 0 | 8 | 8 | 2 | 2 |
| 8 | RM-493 in mPEG-DSPE | 1 | 1 | 1 | 8 | 8 | 6 | 6 |
| 9 | RM-493 in mPEG-DSPE | 2.5 | 2.5 | 1 | 8 | 8 | 6 | 6 |
| 10 | RM-493 in mPEG-DSPE | 5 | 5 | 1 | 8 | 8 | 6 | 6 |
| 11 | RM-493 in Saline | 15 | 2 | 7.5 | 8 | 8 | 6 | 6 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.
a mPEG-DSPE vehicle and RM-493 in mPEG-DSPE formulations diluted 10-fold with 5% mannitol.
b Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
c TK animals were used for TK evaluation only.
Note: RM-493=setmelanotide

被験物質及び媒体を、忍容性試験（フェーズ I）のサブセット A では生後 7～16 日に肩甲間部

及び背部中央部に皮下投与し、忍容性試験（フェーズ I）のサブセット B では生後 21～30 日に、及び用量設定試験（フェーズ II）では生後 7～34 日に肩甲間部、背部中央部及び腰部に皮下投与した。

本試験の評価項目は一般状態、体重、摂餌量、TK パラメーター及び剖検所見とした。

死亡例及び setmelanotide に関連する剖検所見は認められなかった。

忍容性試験では、setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日及び setmelanotide/希釈 mPEG-DSPE（1 mg/mL）4 mg/kg/日まで、忍容性は良好であった。Setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群の全例で投与部位皮膚の発赤及び／又は痂皮が投与開始後数日間のみ観察され、全 setmelanotide 投与群の雌雄で生後 7～10 日（サブセット A）及び 21～31 日（サブセット B）に用量に依存しない体重増加量の低下が見られた。

28 日間投与の用量設定試験では、setmelanotide/mPEG-DSPE（1 mg/mL）5 mg/kg/日群の体重は対照群と比較して低値（雄 17%、雌 15%）であり、生後 24～34 日に対照群と比較して摂餌量の減少（雄 14%、雌 12%）が観察された。また、setmelanotide/mPEG-DSPE 2.5 mg/kg/日群及び setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群で生後 24～34 日に摂餌量の軽度（5～8%）減少が認められた。Setmelanotide に関連する一般状態の変化は観察されなかった。Setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群ではわずかな体重減少が見られたが、setmelanotide に関連する剖検所見が見られなかったことから、投与部位における忍容性は良好であった。

生後 7 及び 34 日の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ は、setmelanotide/mPEG-DSPE（1 mg/mL）の 1～5 mg/kg/日間で用量に比例して増加した。$C_{max}$ は生後 7 日（1,690 ng/mL）と比較して生後 34 日（5,300 ng/mL）で高値であった。両日の $AUC_{0-\tau}$ は同程度であった。

結論として、setmelanotide/mPEG-DSPE（1 mg/mL）の 1、2.5 及び 5 mg/kg/日並びに setmelanotide/生理食塩液の 15 mg/kg/日を生後 7～34 日に皮下投与した結果、setmelanotide/mPEG-DSPE の 5 mg/kg/日群で顕著な体重及び摂餌量の減少が見られ、setmelanotide/生理食塩液の 15 mg/kg/日群で軽度の体重及び摂餌量の減少が認められた。これらの結果に基づき、setmelanotide/mPEG-DSPE の 5 mg/kg/日は MTD を超えていると考えられた。したがって、幼若ラットの 7 週間皮下投与毒性試験（2.6.6.6.4.2 項）の高用量として 3 mg/kg/日が推奨された。この用量では体重及び摂餌量の減少が 28 日間投与の用量設定試験よりも軽度であると予想された。また、setmelanotide の最大の全身曝露量を得るために setmelanotide/生理食塩液の 15 mg/kg/日群の追加も推奨された。

### 2.6.6.6.4.2 幼若ラットを用いた 7 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

RM-493-TOX-035 試験（4.2.3.5.4-2）

幼若 SD ラットに setmelanotide を 7 週間（生後 7～55 日）皮下投与したときの毒性を評価して、変化の可逆性を評価し、setmelanotide の TK 評価を実施した。非臨床 mPEG-DSPE 製剤は、投与したラットで投与部位反応が観察されたため 1:10 に希釈した。最大の全身曝露量を得るために setmelanotide/生理食塩液 15 mg/kg/日群を設定した。動物は入荷時に 3 日齢、投与開始時に 7 日齢であり、体重は 9.6～24.6 g であった。試験デザインを表 2.6.6-55 及び表 2.6.6-56 に示す。

表 2.6.6-55 RM-493-TOX-035 試験の試験デザイン（サブセット A 及び B）

| Group No. | Test Material | Dose Level (mg/kg/day)[a] | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc. (mg/mL)[a] | Number of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Main (Subset A) | | Recovery (Subset B) | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 1 | mPEG-DSPE vehicle | 0 | 3 | 0 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 2 | Saline Control | 0 | 3 | 0 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.5 | 0.5 | 1 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 1.5 | 1.5 | 1 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 3 | 1 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 6 | RM-493 in Saline | 15 | 3 | 5 | 12 | 12 | 12 | 12 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.
a Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
Note: RM-493=setmelanotide

表 2.6.6-56 RM-493-TOX-035 試験の試験デザイン（サブセット C 及び D）

| Group No. | Test Material | Dose Level (mg/kg/day)[a] | Dose Volume (mL/kg) | Dose Conc. (mg/mL)[a] | Number of Animals | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Neuro/Repro (Subset C) | | TK[b] (Subset D) | |
| | | | | | M | F | M | F |
| 1 | mPEG-DSPE vehicle | 0 | 3 | 0 | 20 | 20 | 8 | 8 |
| 2 | Saline vehicle | 0 | 3 | 0 | 20 | 20 | 4 | 4 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE | 0.5 | 0.5 | 1 | 20 | 20 | 36 | 36 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE | 1.5 | 1.5 | 1 | 20 | 20 | 36 | 36 |
| 5 | RM-493 in mPEG-DSPE | 3 | 3 | 1 | 20 | 20 | 36 | 36 |
| 6 | RM-493 in Saline | 15 | 3 | 5 | 20 | 20 | 36 | 36 |

F = females; M = males; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; TK = toxicokinetic.
a Dose level and concentration are expressed as net peptide content.
b TK animals were used for TK evaluation only.
Note: RM-493=setmelanotide

本試験における評価項目は、死亡、一般状態、体重、摂餌量、生育測定（頭殿長）、性成熟（包皮分離、膣開口）、行動機能評価（機能観察総合評価、自発運動量、聴覚驚愕反応、水迷路）、雌の発情周期、交尾／受胎能、眼科学的検査、臨床病理検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査）、TK パラメーター（生後 7 及び 55 日）、器官重量及び剖検所見、交尾成立雌の卵巣及び子宮検査、並びに病理組織学的検査とした。

Setmelanotide/希釈 mPEG-DSPE の 3 mg/kg/日まで、及び setmelanotide/生理食塩液の 15 mg/kg/日では忍容性は良好であった。Setmelanotide に関連する死亡や有害な臨床症状は見られず、性成熟、眼科学的所見、成長パラメーター、行動機能評価、学習及び記憶、並びに生殖能に影響は見られなかった。投与期間中に 1.5 mg/kg/日以上の用量で予想される薬理作用として摂餌量及び体重増加量の減少が観察された。mPEG-DSPE 及び／又は setmelanotide に関連する標的臓器に対する影響は投与部位（出血、炎症細胞浸潤及び／又は筋線維の変性／再生）に限定していた。これらの変化は回復期間中に可逆性を示した。いずれの群でも全身性の臓器への影響は観察されなかった。

これらの結果に基づき、setmelanotidem/PEG-DSPE の無毒性量は 3 mg/kg/日（生後 55 日の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ はそれぞれ 805 ng/mL 及び 3,840 ng*hr/mL）、setmelanotide/生理食塩液の無毒性量は 15 mg/kg/日（生後 55 日の $C_{max}$ 及び $AUC_{0-\tau}$ はそれぞれ 3,560 ng/mL 及び 18,800 ng*hr/mL）であった。

無毒性量 3 mg/kg/日の曝露量は、setmelanotide の最大臨床用量 3 mg/日のヒト $C_{max}$ 及び AUC のそれぞれ 21 倍及び 7 倍であった（表 2.6.6-61）。

## 2.6.6.7 局所刺激性試験

### 2.6.6.7.1 ラットを用いた setmelanotide 製剤の 7 日間皮下投与局所刺激性試験及び 7 日間回復性試験

RM-493-TOX-022 試験（4.2.3.6-1）

持続放出型 setmelanotide を mPEG-DSPE で調製し、SD ラットに 7 日間連続 1 日 1 回皮下投与したときの局所毒性を評価した。被験物質及び対照物質は受領した状態のまま皮下投与した。無処置の雄 SD ラット 10 匹/群（試験開始時の年齢は 10～11 週齢）を各群に割り付けた（表 2.6.6-57）。

表 2.6.6-57 RM-493-TOX-022 試験の試験デザイン

| Group No. | Test Material | Dose Level[a] (mg/kg/day) | Concentration[a] (mg/mL) | Dose Volume (mL/kg) | No. of Male Animals[b] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Saline | 0 | 0 | 1.0 | 10 |
| 2 | mPEG-DSPE vehicle | 0 | 0 | 1.0 | 10 |
| 3 | RM-493 in mPEG-DSPE/CMC | 5 | 10 | 0.5 | 10 |
| 4 | RM-493 in mPEG-DSPE/CMC | 10 | 10 | 1.0 | 10 |

mPEG-DSPE/CMC = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine/Carboxymethylcellulose.
a Dose levels and concentrations are expressed as peptide content.
b On Day 8, six animals/sex/group were euthanized. The surviving animals remained on study, untreated, for a one-week recovery.
Note: RM-493=setmelanotide.

動物に 7 日間連続して 1 日 1 回皮下投与し、その後 1 週間の回復期間を設けた。生死／瀕死状態の観察を毎日実施した。一般状態観察は投与前に 1 回、投与日は投与後 3～4 時間に 1 回、非投与日には 1 日 1 回実施した。投与日の投与前及び投与後 3～4 時間の 2 回、以降は Day 8 まで 1 日 1 回、回復群は Day 11 及び 14 に投与部位を Draize 法に従い評価した。体重は、Day 1 の投与前、Day 4 及び 7 に全動物について測定し、回復群は Day 13 にも測定した。摂餌量は週 1 回測定した。血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査用の血液サンプル、及び尿検査用の尿サンプルを、Day 8 又は 14 の剖検前に全動物から採取した。Day 8 又は 14 の末梢血採取後に全例を安楽死させた。指定した組織を剖検時に採取し、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

mPEG-DSPE 媒体対照群並びに setmelanotide/mPEG-DSPE 5 及び 10 mg/kg 群の雄ラットにおいて、投与部位及びその周辺組織における一般状態の変化が認められた。これらの局所的な変化

は主に mPEG-DSPE に起因し、有効成分である setmelanotide によるものではないと考えられた。一般状態観察及び Draize スコアのデータにより、媒体群及び setmelanotide 投与群の投与部位で、軽微～軽度の浮腫、軽度～中等度の皮下腫脹及び／又は皮膚肥厚が認められたが、これらの所見の重篤性及び発現頻度と setmelanotide の用量との間に明確な関連性は認められなかった。これらの腫脹／浮腫は mPEG-DSPE の影響によるものと考えられた。多くの場合、腫脹の発現は setmelanotide 投与群の方が mPEG-DSPE 対照群よりもやや早く、setmelanotide 群では投与後 3～4 時間以内に腫脹／浮腫が認められたのに対し、媒体対照群では投与翌日に認められた。この早期の腫脹／浮腫の発現は、setmelanotide の影響による可能性がある。投与部位に加えて、setmelanotide 群及び mPEG-DSPE 対照群の動物の側部及び背部にも軽度～中等度の腫脹が認められたが、これも媒体の影響によるものであると考えられた。mPEG-DSPE/CMC 製剤による腫脹／浮腫の全ての徴候は、回復期間終了時までに消失した。

mPEG-DSPE/CMC 製剤は、白血球数、血小板数、好中球数、好酸球数、絶対好中球数、AST 及びコレステロールの軽微な上昇、並びにリンパ球数、単球数、総タンパク及びアルブミンの減少と関連していた。これらの所見は回復期間中に消失した。ヘマトクリットの低下は mPEG-DSPE 対照群のみに認められ、媒体の影響によるものと考えられた。これらの変化は投与部位の炎症と相関し、また mPEG-DSPE の脂質含量に関連していると考えられた。

剖検時に認められた肉眼的病変には、白色線状条痕、皮下組織の肥厚、皮下組織の白色及び／又は赤色変色、皮膚表面の痂皮形成が含まれ、mPEG-DSPE 対照群及び setmelanotide 群の両方で認められ、媒体の影響によるものと考えられた。

器官重量には、投与に関連する影響は認められなかった。

本試験条件下において、setmelanotide は、7 日間投与したラットの投与部位において、肉眼的又は病理組織学的変化を引き起こさなかった。Setmelanotide の有無にかかわらず mPEG-DSPE 媒体の皮下投与により、投与部位に変化が見られた。mPEG-DSPE 単独、及び低用量又は高用量の setmelanotide との併用投与により、主に皮下組織における軽微～中等度の炎症及び投与部位の筋線維の軽度変性が引き起こされた。1 週間の回復期間後も、mPEG-DSPE によって誘発された変化は皮下組織に残存していた。

### 2.6.6.8 その他の毒性試験

Setmelanotide/mPEG-DSPE のその他の毒性試験は実施していない。以下の項に示した全ての毒性データは、前項に記載した試験の一部として得たものである。

#### 2.6.6.8.1 免疫毒性及び抗原性

Setmelanotide/mPEG-DSPE を用いたラット（2.6.6.3.1.3 項）及びサル（2.6.6.3.2.2 項）の反復投与毒性試験を含め、setmelanotide のいずれの試験においても免疫毒性は認められなかった。

ADA 測定では、ラット、ウサギ、サルを用いた毒性試験において、抗原性は認められなかった。rasH2-Tg マウスの溶媒対照群 1 例及び低用量群 1 例の血清試料で、RM-493-TOX-042 試験（4.2.3.4.2-3）における陽性判定のカットポイントをわずかに上回っていた（2.6.6.5.3 項）。対照

群の動物は setmelanotide に曝露されていないこと、両動物の値はカットポイント近くであったこと、及び他のいずれの setmelanotide 投与群のマウスでも陽性を示さなかったことを考慮すると、これらの結果は偽陽性である可能性が高い。rasH2-Tg マウスを用いたフォローアップがん原性試験（RM-493-TOX-044 試験［4.2.3.4.2-4］）の血清試料は、抗 RM-493 抗体陰性であった（2.6.6.5.4 項）。また、3 試験目のがん原性試験（RM-493-TOX-045 試験［4.2.3.4.2-5］）における ADA 測定では、ADA 陽性動物は認められなかった（2.6.6.5.5 項）。

### 2.6.6.8.2 不純物の安全性確認

Setmelanotide 原薬及び製剤の不純物に関する規格及び試験方法の妥当性について、以下の項で考察する。追加情報は 3.2.S.4.5 及び 3.2.P.5.6 に記載する。

#### 2.6.6.8.2.1 原薬の不純物

原薬の規格及び試験方法は、毒性試験、臨床試験及び安定性試験に用いた原薬のロット分析（出荷試験）及び安定性試験のデータに基づいて妥当性が確認されている（3.2.S.4.1）。これらのデータに加えて、原薬（ペプチド分子）の性質、製造工程及び分析技術も規格設定において考慮された。該当する ICH ガイドラインも考慮されている。

##### 2.6.6.8.2.1.1 ペプチド類縁物質

超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）によりペプチド類縁物質を分析する。UHPLC 法は、出荷試験と安定性試験の両方に用いられる。この試験では、ペプチド類縁物質量のピーク面積を測定し定量する。報告の閾値は[redacted]%である。判定基準は、1）特定された個々のペプチド類縁物質、2）未特定の個々のペプチド類縁物質、3）総ペプチド類縁物質（特定された及び未特定のペプチド類縁物質の合計量が[redacted]%超）について設定されている。

申請した製造工程により、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）に準拠して製造された原薬は、ロット分析データ（3.2.S.4.4）から明らかなように、全てのロットにおいて特定された既知の個々のペプチド類縁物質、未特定の個々のペプチド類縁物質及びペプチド類縁物質の合計量の規格に適合していることが確認されている。ペプチド類縁物質の限度値の設定根拠については、以下に詳細に示す。

###### 2.6.6.8.2.1.1.1 特定された既知のペプチド類縁物質

UHPLC 法の特異性は、合成中間体、不純物及び強制分解生成物に対して実証されている。この仕様は、追加データが収集されると定期的に再評価される。

既知のペプチド類縁物質の判定基準として、[redacted]%以下を設定する。バッチ分析データに加えて、提案されている規格値は、ラット（RM-493-TOX-016 試験［4.2.3.7.7-1］）及びカニクイザル（RM-493-TOX-015 試験［4.2.3.7.7-2］）を用いて setmelanotide（原薬 Lot [redacted]）を 24 時間/日、13 週間持続皮下投与した毒性試験によって裏付けられている。これらの試験から、無毒性量はラットで 30 mg/kg/日、サルで 25 mg/kg/日と推定された（2.6.7.17）。

原薬 Lot [redacted] を用いた 13 週間毒性試験を実施した。不純物の安全域を算出するため、ラット及びサルの無毒性量における各不純物の用量を、最大臨床用量を 3.0 mg/日、ヒトの体重を 60 kg と仮定して、規格案[redacted]%以下における各不純物の理論臨床用量で割った。原薬中の不純物の安全域を表 2.6.6-58 に示す。

ペプチド類縁物質の[redacted]%以下の規格案は、無毒性量での毒性試験バッチ中の不純物レベルと比較して、110～420 倍の安全域がある。全体として、これらの安全性が確認されているペプチド類縁物質（毒性試験のロットで認められた不純物）については、[redacted]%以下の許容限界値を設定することは可能であり、これらのペプチド類縁物質については、最大臨床用量 3.0 mg/日を投与しても毒性の大きなリスクはないことが、利用可能なデータから示唆される。

**表 2.6.6-58 ラット及びサルの 13 週間皮下持続投与毒性試験（Lot [redacted]）と規格値[redacted]%以下との比較に基づく、Setmelanotide 原薬の不純物に関する安全域**

| Toxicology Study (Number / Location in CTD) | NOAEL (mg/kg/day) | Drug Substance Impurities | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ~RRT | Toxicology Lot ([redacted]) | | Clinical Specifications | | |
| | | | Area % | Impurity Dose at NOAEL (mg/kg/day) | Area % | Impurity Dose at 3.0 mg Clinical Dose (mg/kg/day)[a] | Safety Margin[b] |
| 13-Week Continuous SC Infusion in Rats (RM-493-TOX-016 / 4.2.3.7.7-1) | 30 | 不純物A* | 0.24 | 0.072 | 0.50 | 0.00025 | 288 |
| | 30 | 不純物B* | 0.35 | 0.105 | 0.50 | 0.00025 | 420 |
| | 30 | 不純物C* | 0.186 | 0.048 | 0.50 | 0.00025 | 192 |
| | 30 | 不純物D* | 0.29 | 0.087 | 0.50 | 0.00025 | 348 |
| | 30 | 不純物E* | 0.2 | 0.06 | 0.50 | 0.00025 | 240 |
| | 30 | 不純物F* | 0.24 | 0.072 | 0.50 | 0.00025 | 288 |
| | 30 | 不純物G* | 0.16 | 0.048 | 0.50 | 0.00025 | 192 |
| | 30 | 不純物H* | 0.16 | 0.048 | 0.50 | 0.00025 | 192 |
| | 30 | 不純物I* | 0.11 | 0.033 | 0.50 | 0.00025 | 132 |
| | 30 | 不純物J* | 0.24 | 0.072 | 0.50 | 0.00025 | 288 |
| 13-Week Continuous SC Infusion in Monkeys (RM-493-TOX-015 / 4.2.3.7.7-2) | 25 | 不純物A* | 0.24 | 0.06 | 0.50 | 0.00025 | 240 |
| | 25 | 不純物B* | 0.35 | 0.0875 | 0.50 | 0.00025 | 350 |
| | 25 | 不純物C* | 0.16 | 0.04 | 0.50 | 0.00025 | 160 |
| | 25 | 不純物D* | 0.29 | 0.0725 | 0.50 | 0.00025 | 290 |
| | 25 | 不純物E* | 0.2 | 0.05 | 0.50 | 0.00025 | 200 |
| | 25 | 不純物F* | 0.24 | 0.06 | 0.50 | 0.00025 | 240 |
| | 25 | 不純物G* | 0.16 | 0.04 | 0.50 | 0.00025 | 160 |
| | 25 | 不純物H* | 0.16 | 0.04 | 0.50 | 0.00025 | 160 |
| | 25 | 不純物I* | 0.11 | 0.0275 | 0.50 | 0.00025 | 110 |
| | 25 | 不純物J* | 0.24 | 0.06 | 0.50 | 0.00025 | 240 |

NOAEL = No observed adverse effect level; RRT = relative retention time; SC = subcutaneous.
a Based on 60 kg subject.
b Animal impurity dose at the NOAEL divided by the maximum human impurity dose based on setmelanotide dose of 3 mg/day.

### 2.6.6.8.2.1.1.2 未特定のペプチド類縁物質

既知のアミノ酸からなるペプチド原薬については、未特定の個々のペプチド類縁物質について、0.15%以下の規格値を設定することが許容されている。申請された製造工程により GMP 下で製造された全原薬ロットについて得られた規格未設定のペプチド類縁物質の値は、一貫して 0.15%以下の規格値を下回っている。

### 2.6.6.8.2.1.1.3 総ペプチド類縁物質

出荷時の総ペプチド類縁物質は[redacted]%である。現在までに得られた安定性試験の結果から、総ペプチド類縁物質は[redacted]%であり、傾向は認められなかった。統計学的手法（Mean + 3 SD）は判定基準[redacted]%を示唆しており、判定基準は[redacted]%以下を提案している。したがって、提示された許容限界値は、これまでの製造経験と一致しており、規格及び試験方法は適切であり、その妥当性を示すものと考えられる。

### 2.6.6.8.2.1.2 非ペプチド不純物

原薬の非ペプチド不純物の一覧とその判定基準案を表 2.6.6-59 にまとめた。

**.表 2.6.6-59 非ペプチド不純物の判定基準**

| Non-Peptide Impurities | Method | Acceptance Limit |
|---|---|---|
| Residual [redacted] | IC | ≤[redacted] ppm |
| Residual [redacted] | IC | ≤[redacted]% w/w |
| Residual [redacted] | HPLC | ≤[redacted]% w/w |
| Residual [redacted] | | ≤[redacted]% w/w |
| Residual [redacted] | HPLC | ≤[redacted]% w/w |
| Residual [redacted] | | ≤[redacted]% w/w |
| Residual [redacted] | TLC | ≤[redacted] ppm |

[redacted]; HPLC = high performance liquid chromatography; IC = ion chromatography; ppm = parts per million; [redacted]; TLC = thin-layer chromatography; [redacted]; w/w = weight/weight.

不純物である[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]の許容限度は[redacted]%w/w 以下で、不純物[redacted]は[redacted]%で管理されており、ICH Q3A(R2)ガイドラインで定められた識別限度に準じている。不純物[redacted]は in-silico 分析でアラート構造が示されたため、潜在的な遺伝毒性不純物（pGTI）として扱われ、[redacted]ppm 以下の許容限度が提案されている。

ICH M7(R2)ガイドラインによれば、長期的に（10 年以上から生涯にわたって）使用される医薬品では、遺伝毒性不純物は 1.5 µg/日未満で管理されるべきである。1 日最大投与量が 3 mg/日の薬剤では、これは 0.05%（又は 500 ppm）に相当する。したがって、[redacted]ppm 以下という許容限度値は、この不純物の濃度を管理するのに十分であり、ICH M7 ガイドラインの基準要件を下回るものである。また、不純物[redacted]は pGTI よりも厳しい[redacted]ppm 以下で管理される。

プロセスリスク評価（3.2.S.2.6）では、中間体[redacted]及び[redacted]の合成における後処理及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による精製を含む下流工程を経ることで、非ペプチド不純物（合成由来の残留試薬及び副生成物）が原薬中に存在するリスクは低いことが示された。代表的な実生産工程により製造された原薬のロット分析データ（3.2.S.4.4）からも各原

薬ロットが非ペプチド不純物の規格を満たしており、その規格の妥当性を支持する結果であることが示されている。

したがって、非ペプチド不純物の規格値及び許容限度値は適切と考えられ、その妥当性も示されている。

### 2.6.6.8.2.2 製剤の不純物

製剤は、3.2.P.5.1 に記載された規格及び試験方法に従い試験を行う。出荷時にのみ実施される試験を記載する。規格及び試験方法の妥当性について、それぞれの試験で選択された方法、規格値／適否の判定基準及びその妥当性を簡潔に記載する。

#### 2.6.6.8.2.2.1 ペプチド類縁物質

Setmelanotide 製剤の関連物質は、逆相 HPLC 法を用いて測定する。不純物は閾値[redacted]%を用いて報告されている。申請予定の規格では、既知のペプチド類縁物質については個々に最大[redacted]～[redacted]%、未知のペプチド類縁物質については個々に最大[redacted]%とされている。製剤中の総不純物量は、原薬中で管理されている工程由来不純物（総量で最大[redacted]%）を含めて、最大[redacted]%に管理されている。

全ての setmelanotide 製剤ロットにおける総ペプチド類縁物質の平均値は[redacted]%であり、いずれの値も申請規格値を下回っている。また、平均値に標準偏差の 3 倍を加算した setmelanotide 製剤ロットの総ペプチド類縁物質の値は[redacted]%であった。Setmelanotide 製剤の 3 ロット（[redacted]、[redacted]及び[redacted]）について、検討した時点（1、3、6、9、12、18、24 及び 36 ヵ月）及び 2 つの保存条件（5°C、25°C/60%相対湿度）で実施した安定性試験では、総ペプチド類縁物質の値は[redacted]～[redacted]%であった。長期保存条件（5°C）では増加傾向は認められなかったが、加速条件（25°C/60%相対湿度）では、9 及び 12 ヵ月間でそれぞれ[redacted]及び[redacted]%のわずかな増加傾向が認められた。

製剤中の不純物の特性及び管理に関する詳細は、3.2.P.5.5 に記載する。長期保存条件（5°C）及び加速条件（25°C/60%相対湿度）において、全ての個々の不純物は規格内であり、保存における安定傾向が見られた。

製剤中の不純物の申請規格には、原薬中で管理されている不純物も含まれており、長期保存条件（5°C）及び加速条件（25°C/60%相対湿度）において安定傾向を示した。

個々のペプチド類縁物質及び総ペプチド類縁物質の試験結果はいずれも申請された限界値を下回っており、個々の不純物については最大[redacted]～[redacted]%、総不純物については最大[redacted]%という申請規格値を支持するものである。これらの許容限界値は ICH Q3B(R2)ガイドラインの原則に従い、ペプチド製剤に対する規制当局の基準と一致している。

#### 2.6.6.8.2.2.2 非ペプチド不純物

非ペプチド不純物は原薬の段階で管理されており、製剤には含まれていない。

### 2.6.6.8.3 光毒性

Setmelanotide はペプチドであるため、ICH S10 ガイドラインに従い、光毒性試験は実施していない。

### 2.6.6.8.4 代謝物

Setmelanotide の単離代謝物の毒性試験は実施しておらず、必要とも考えていない。ヒトにおける結果では、測定可能な尿中代謝物は M19 及び M7 の 2 種類のみである。M19 は C 末端アミドの加水分解によって[redacted]に変換されて生じ、M7 は[redacted]－[redacted]結合の切断及びその後の[redacted]の消失によって生じる。投与量 3 mg/日の M19 は約 2%、M7 は 1%未満と推定されている。

### 2.6.6.8.5 依存性

Setmelanotide を反復投与したときの依存性を評価する特定の試験は実施していない。安全性薬理試験（2.6.2.4.2.1）を含む非臨床安全性試験において、setmelanotide の中枢神経系に及ぼす影響は観察されなかった。また、ラット及びサルを用いた setmelanotide の反復投与毒性試験における一般状態観察で、投与終了後の回復期間中に薬物離脱症状は認められなかった。

### 2.6.6.8.6 新添加剤

日本では mPEG-DSPE の皮下投与は新添加剤に該当する。Setmelanotide の 10 mg 製剤は 100 mg の mPEG-DSPE を含有し、最大臨床用量 3 mg/日投与時の mPEG-DSPE の投与量は約 30 mg/日（体重 60 kg の被験者を想定した場合、0.5 mg/kg/日）である。

以下に示すように、mPEG-DSPE の安全性を、ラット及びサルにおける皮下投与による一般毒性試験及び生殖発生毒性試験により評価し、さらに遺伝毒性及びがん原性についても評価した。その結果、皮下投与による mPEG-DSPE（最高 30 mg/日）の安全性が確認された

**一般毒性**

ラット 26 週間及びサル 39 週間投与毒性試験において、それぞれ 30 mg/kg/日及び 3/10 mg/kg/日（3 mg/kg/日は最初の 8 週間）の mPEG-DSPE を反復皮下投与したところ、いずれの試験においても全身毒性は見られず、mPEG-DSPE に起因すると考えられる投与部位の炎症反応が見られたものの、有害とは判断されなかった。また、ラット及びサルの脳で観察されたメトキシポリエチレングリコール（mPEG）関連の細胞質空胞化の程度は軽微で、脈絡叢上皮細胞（ラット）又はマクロファージ（サル）に局在しており、他の臓器や組織では観察されず、脳組織の変形や変性、炎症及び壊死などの有害な病理組織学的変化は見られず、一般状態観察において機能障害も認められなかった。したがって、この所見は mPEG のクリアランスに関連する適応反応であると考えられ、毒性とは判断されなかった（2.6.6.3.1.3 及び 2.6.6.3.2.2 項参照）。30 mg/kg/日及び 3/10 mg/kg/日は、それぞれ臨床用量（0.5 mg/kg/日）の 60 倍及び 6/20 倍に相当する。

**生殖発生毒性**

生殖発生毒性試験において、mPEG-DSPE（50 mg/kg/日、臨床用量の 100 倍）はラットにおいて全身性の母動物毒性を示さず、発情周期、受胎能及び胚・胎児発生に投与に関連する影響を及ぼさなかった（2.6.6.6.2.1 及び 2.6.6.6.3 項参照）。

**遺伝毒性**

mPEG-DSPE は、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（最高 5,000 µg/plate）及びチャイニーズハムスター肺由来細胞（CHL/IU 細胞）を用いる染色体異常試験（最高 5,000 µg/mL）において、代謝活性の有無にかかわらず遺伝毒性を示さなかった（ヤンセンファーマ株式会社 2009）。

なお、rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験において、mPEG-DSPE（50 mg/kg/日：臨床用量の 100 倍）はがん原性を示さなかった（2.6.6.5.5 項参照）。

**表 2.6.6-60　mPEG-DSPE の毒性試験における最大臨床用量 3 mg/日に対する安全域**

| Study | Dose of mPEG-DSPE in the vehicle control group | mPEG-DSPE Dose Margins [a] |
|---|---|---|
| 6-Month Rat | 30 mg/kg/day | 60 |
| 9-Month Monkey | 3/10 mg/kg/day (3 mg/kg/day from week 1 – 8 / 10 mg/kg/day from week 9 - 39) | 6/20 |
| Female Fertility and EFD in Rats | 50 mg/kg/day | 100 |
| PPD in Rats | 50 mg/kg/day | 100 |
| 26-Week Tg.rasH2 Mouse Carcinogenicity (3) | 50 mg/kg/day | 100 |

EFD = embryo-fetal development; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; PPD = pre/postnatal development

a mPEG-DSPE dose of the vehicle control group in the toxicity study based on the maximum clinical dose of 3 mg/day is 30 mg/day (0.5 mg/kg/day, assuming a 60 kg subject)

## 2.6.6.9　考察及び結論

Setmelanotide の皮下投与による毒性プロファイルは、ラット及びサルの反復投与毒性試験、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、rasH2-Tg マウスのがん原性試験、ラット及びウサギの生殖発生毒性試験、幼若ラットの毒性試験により十分に特徴づけられている。これらの試験は、setmelanotide の MTD 又は最大投与可能用量までの毒性及び TK を評価するために計画された。In vitro 遺伝毒性試験は、ICH S2 ガイドラインにおける上限濃度までの setmelanotide で実施した。Setmelanotide の全ての重要な毒性試験は、経済協力開発機構（OECD）の GLP に準拠して実施した。

初回の setmelanotide/mPEG-DSPE のラット 28 日間皮下投与用量設定試験では、setmelanotide 10 mg/mL 及び mPEG-DSPE 100 mg/mL を含有する未希釈の非臨床用 mPEG-DSPE 製剤に起因する投与部位反応が認められたため、試験を終了した。2 回目のラット 28 日間皮下投与用量設定試験では、非臨床用 setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤（setmelanotide 及びプラセボ）を 5%マンニトールで 10 倍希釈したため忍容性が改善された。これらの結果に基づき、ラット 26 週間毒性試験、幼若ラット毒性試験、ラット及びウサギの生殖発生毒性試験では 10 倍希釈して使用し

た。さらに、サル 9 ヵ月間毒性試験では有害な投与部位反応が認められたため、投与 8 週以降は 5%マンニトールで 10 倍希釈して用いた。これらの重要な試験では、希釈したことにより局所忍容性が改善され、最大臨床用量である 3 mg/日と比較して十分な setmelanotide 及び mPEG-DSPE の曝露量比及び用量比が得られた。

希釈 mPEG-DSPE 又は生理食塩液で調製した setmelanotide を、ラット及びサルにそれぞれ最長 6 ヵ月間及び 9 ヵ月間皮下投与したときの忍容性は良好であった。これらの試験では、setmelanotide の全身曝露を最大化させ、最大臨床用量（3 mg/日）投与時のヒト AUC に対して 50 倍の安全域を得るために、setmelanotide/生理食塩液製剤を使用した。mPEG-DSPE 媒体に関連する投与部位の炎症反応が用量制限因子となるため、setmelanotide/生理食塩液ではより高用量の投与が可能であった。これらの試験における有害所見は、主に mPEG-DSPE に関連する投与部位の炎症反応に限られており、高用量では setmelanotide の関与も一部認められた。ラット（上皮細胞）及びサル（マクロファージ）で反復投与後に脈絡叢で認められた mPEG-DSPE 媒体に関連した軽度な空胞化は、PEG のクリアランスに関連する有害ではない適応反応と考えられている（詳細は後述する）。Setmelanotide/生理食塩液及び setmelanotide/mPEG-DSPE のいずれの用量でも、全身毒性は認められなかった。他の MC4R 作動薬とは異なり、サル 39 週間毒性試験では、血圧や心電図に投与に関連する変化は認められなかった。ラット及びサルの反復投与毒性試験での無毒性量における全身曝露量は、最大臨床用量 3 mg/日に対して十分な安全域が得られている。Setmelanotide/生理食塩液の $C_{max}$ 及び AUC に基づく安全域は、ラット試験でそれぞれ 116 倍及び 49 倍、サル試験でそれぞれ 149 倍及び 38 倍であった（Setmelanotide の臨床用量 3 mg/日を皮下投与したときの曝露量は、$C_{max}$ が 37.9 ng/mL、AUC が 576 ng*hr/mL）。

Setmelanotide を用いた毒性試験で最も多く認められた変化は摂餌量及び体重の減少であり、これらは投与部位の炎症反応と同様、setmelanotide の主要な薬理作用に直接関連するものである。投与部位反応は主に mPEG-DSPE に起因し、高用量では setmelanotide の関与も示唆されている。

Setmelanotide/mPEG-DSPE の反復皮下投与毒性試験において、ラット及びサルの脳に軽微な細胞質空胞化が認められた。この所見は、setmelanotide/mPEG-DSPE 製剤及びプラセボ製剤に含まれる mPEG-DSPE の存在に特異的に関連していた。一部の試験で投与部位のマクロファージに空胞化が認められたことを除き、他の組織・器官に空胞化の所見は認められなかった。特に、生後 7～55 日に投与した幼若ラットや、mPEG-DSPE 含有製剤を 6 ヵ月間投与した rasH2-Tg マウスでは、脈絡叢を含むいずれの組織にも空胞化は認められなかった。[$^{14}$C]-mPEG-DSPE を用いた薬物動態試験では、脈絡叢における濃度は、大多数の動物で投与 7 回目の 24 時間後、2 週間後、7 週間後及び 12 週間後のいずれの時点でも定量限界未満であった（2.6.4.4.2.2）。

ラット 26 週間毒性試験では、mPEG-DSPE の投与に関連する病理組織学的所見として、脳の脈絡叢に軽微で限局性の上皮（上衣）細胞空胞化が認められた（他の臓器には認められなかった）が、4 週間の回復期間終了時に完全には回復しなかった。脈絡叢の空胞化は mPEG-DSPE に起因すると考えられ、媒体対照群と setmelanotide/mPEG-DSPE 群間で発現率及び重症度に差は認められなかった。これらの変化は、発現率が非常に低く（媒体対照群及び setmelanotide/mPEG-DSPE 群の合計 117 例中 9 例）、重症度が低く（最小スコア）、限局性の変化であり、脳実質及び

脳室系に変化が見られなかったことから、有害とは判断されなかった。いずれの動物においても脳組織の変形は認められず、変性、炎症及び壊死などの他の病理組織学的変化や脳機能の変化も認められなかった。空胞化は、投与部位におけるマクロファージや慢性活動性炎症に関連する他の細胞型において認められたが、生理食塩液対照群でも観察される背景所見である肝細胞空胞化を除き、他の組織や細胞型では認められなかった。

サル 39 週間毒性試験では、mPEG-DSPE に関連する病理組織学的所見として、媒体対照群と setmelanotide/mPEG-DSPE 投与群の全群で脳の脈絡叢間質に軽微な泡沫状マクロファージ集簇が認められた（他の臓器には認められず、上衣細胞空胞化は認められなかった）。脈絡叢間質における軽微な泡沫状マクロファージ集簇は、重症度が低く限局性であり、脳実質及び脳室に変化が認められなかったことから、有害とは判断されなかった。この所見が認められたいずれのサルの脳にも脳組織の変形は認められず、変性、炎症及び壊死などの他の病理組織学的変化や脳機能の変化も認められなかった。空胞化は、投与部位における慢性活動性炎症に関連するマクロファージなどの細胞型において稀に認められたが、投与期間終了時には他の組織や細胞型には認められなかった。4 週間の回復期間終了時には、mPEG-DSPE 単独又は setmelanotide を併用投与した全例で脈絡叢に軽微なマクロファージ集簇が認められたが、PEG 関連の空胞化は十分な回復期間を設けることで可逆的であることが、総合的な WoE 評価により示されている（Ivens 2015）。

PEG 及び PEG 化バイオ医薬品の非臨床安全性は最近レビューされており（Ivens 2015）、細胞質空胞化は主に貪食細胞に見られるが実質組織にも認められる、毒性試験で観察された唯一の PEG 関連の影響である。一般的に、マクロファージ及び／又は実質組織に顕著な細胞質空胞化が見られても、臓器機能への有害な影響は認められていないことが報告されている。したがって、PEG 投与後に認められる細胞質空胞化は、PEG のクリアランスに関連する適応反応であり、PEG に対する毒性反応ではないと考えられている（Rudmann 2013）。PEG 関連の細胞質空胞化は、1）正常な組織構造の変形がない、2）変性、炎症及び壊死などの病理組織学的変化がない、及び 3）機能障害の証拠がない、の条件を満たす場合には有害ではないと判断される（Ivens 2015）。これらの非有害性の基準は、ラット 26 週間及びサル 39 週間毒性試験における脈絡叢の所見に対して明確に満たされており、投与部位を除く他の組織では同様の病理組織学的変化は認められなかった。

Setmelanotide を皮下投与した全てのサル試験において、全ての用量で口吻部及び眼窩周囲の皮膚の色素沈着が観察され、これはメラニンと一致する表皮色素の増加と病理組織学的に相関していた。他の色素組織（網膜など）には色素沈着は認められなかった。一般的にこの所見は投与開始後約 1 週間で初めて発現し、投与期間終了時まで持続する。S-100 タンパク質（メラノサイトに発現し、ケラチノサイトには発現しない）の免疫組織化学染色を用いて口吻部の皮膚切片を検査した結果、投与群と対照群間で細胞質及び核に S-100 タンパク質陽性を示す表皮細胞数に顕著な差は認められなかった（2.6.7.17）。これらの結果は、setmelanotide による顔面の色素沈着がメラノサイトの細胞増殖によるものではないことを示している。回復期間終了時には、顔面の色素沈着は改善又は消失しており、可逆性が示された。

カニクイザルにおける MC1 受容体の皮膚色調への関与は他の動物種と異なる可能性があるが

（Haitina 2007；Nakayama 2008）、本所見は setmelanotide の過度な薬理作用及び MC1R との交差反応によるものと考えられる。口吻部の暗色化は有害作用とは関連せず、メラノサイトの増殖とも関連せず、投与中止後 6～10 週間以内に可逆的であった。Setmelanotide の臨床試験でも可逆的な皮膚の色素沈着が報告されている。勃起不全の患者を対象とした臨床試験では、MC1R、MC3R 及び MC4R に親和性を有する MCR 作動薬であるブレメラノチドの投与により皮膚の色素沈着が報告されている（Palatin Technologies, Inc. 2007）。Setmelanotide に関連した皮膚の色素沈着については 2.6.2 に記載しており、慢性的な MC1R 活性化のベネフィットとリスクについては、[redacted]（[redacted]；Böhm 2024）において詳細に検討されている。

Setmelanotide の遺伝毒性は、細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo ラット骨髄小核試験により評価された。いずれの試験においても、ICH S2(R1)ガイドラインで規定された上限濃度まで用いたが、変異原性又は染色体異常誘発性の反応は認められなかった。したがって、setmelanotide は遺伝毒性を有していないと判断される。

Setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性は、rasH2-Tg マウスを用いた 3 試験の 26 週間皮下投与試験で評価した。初回試験で技術的問題が発生したため、結果の確認のために 2 試験の追加試験を実施した。これらの試験の用量は、野生型 rasH2-Wt マウスを用いた 28 日間用量設定試験（2.6.6.5.2 項）に基づいて選定した。いずれの試験においても setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性は認められなかった。

初回試験では、rasH2-Tg マウスと野生型マウスが誤って主試験群に無作為化され（平均 rasH2-Tg マウス数：15 匹/性/群、範囲：11～20 匹）、PCR によりトランスジェニックであることが確認されたマウスにおいて、死亡及び腫瘍発現の増加は認められなかった。本試験では、脳切片を含む選択した組織の病理組織学的検査を実施し、追加試験でも同様の組織を評価した。いずれの rasH2-Tg マウスがん原性試験においても、脳組織における被験物質関連の空胞化は認められなかった。初回試験の試験結果を確認するため、2 試験の rasH2-Tg マウスを用いた（野生型マウスは使用せず）26 週間がん原性試験を実施した。2 回目の試験では、給水システムの故障によりケージが浸水し、高用量群の雄 10 例が死亡した。試験を終了させ、3 試験目を異なる施設で実施した。いずれの試験においても、setmelanotide/mPEG-DSPE のがん原性は認められなかった。推定全身曝露量（$C_{max}$ 及び AUC）は、setmelanotide の臨床用量 3 mg/日のヒト曝露量に対してそれぞれ 81 倍及び 17 倍であった。

rasH2-Tg モデルは、setmelanotide による MC1 受容体を介した被毛の暗色化という薬理作用が確認されており、皮膚における化学発がんに対する感受性が高いため、メラノーマのリスク評価に適したモデルである。Setmelanotide は、マウス MC 受容体を介した cAMP 産生を刺激し、MC1R、MC3R 及び MC4R に対する $EC_{50}$ 値はそれぞれ 26、1.3 及び 0.21 nmol/L であった（2.6.2.2.1.1）。MC2R 及び MC5R に対する活性は認められなかった。rasH2-Tg マウス 26 週間がん原性試験において、定常状態における投与 1 時間後の血漿中 setmelanotide 濃度は約 400～2,000 ng/mL（360～1,800 nmol/L）であり、マウス MC 受容体の活性化に必要な $EC_{50}$ 値を大きく上回っていた。rasH2-Tg マウスは非遺伝毒性及び遺伝毒性を有する医薬品の評価に推奨されており、自然発生的な皮膚腫瘍（扁平上皮乳頭腫及び癌）及び化学発がん物質 NMU による皮膚腫

瘍（乳頭腫、ケラトアカントーマ、扁平上皮癌）を発生することが知られている（Nambiar 2012）。ヒトの皮膚ではメラノサイトが表皮－真皮接合部及び毛包内に存在するのに対し、マウスでは主に毛包内に存在する。マウスのメラノサイトの MC1R 活性化により被毛の暗色化が生じ（Beaumont 2011）、これはカニクイザル及びヒトにおける皮膚の暗色化と類似した薬理作用である。rasH2-Tg マウス 26 週間がん原性試験、特に RM-493-TOX-042 試験（4.2.3.4.2-3）及び RM-493-TOX-045 試験（4.2.3.4.2-5）では、用量依存的な被毛の黒色化又は暗色化が認められ、毛包メラノサイトにおける MC1R 活性に関連している可能性が高いと考えられたが、化学発がん物質に反応して皮膚腫瘍を発症することが知られている系統のマウスを用いたこれらの試験において、メラノサイトの増殖、異形成及び腫瘍形成は認められなかった。

総合的な WoE 評価では、setmelanotide/mPEG-DSPE は患者に対して発がんリスクを示さないと判断される。26 週間がん原性試験において、setmelanotide を投与した rasH2-Tg マウスで死亡や腫瘍発現率の増加は認められず、setmelanotide は細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo 小核試験において遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.4 項）。また、ラットの最長 26 週間、サルの最長 39 週間の反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.3 及び 2.6.6.3.2.2 項）、及び生後 7～55 日に投与した幼若ラット試験（2.6.6.6.4.2 項）においても、肥大、過形成及び前がん性などの組織変化の増加は認められていない。これらの試験では、setmelanotide の最大臨床用量 3 mg/日における臨床曝露量（AUC）に対して十分な曝露量比が得られた（表 2.6.6-61）。加えて、mPEG-DSPE 媒体においても、臨床用量に対して高倍率の用量で投与された場合でも、前がん性又は増殖性組織反応は認められていない。したがって、総合的な WoE 評価に基づき、setmelanotide/mPEG-DSPE は発がん性を有していないと判断される。ラットでは、雌雄受胎能に対する setmelanotide に関連した影響は認められず、setmelanotide の曝露量が、臨床用量 3 mg/日のヒト曝露量（$C_{max}$ 及び AUC）に対してそれぞれ 34 倍及び 11 倍でも催奇形性は認められなかった。ウサギでは、胚吸収数及び着床後胚損失率の増加が、ヒト AUC の約 0.4 倍を超える曝露量で認められたが、これは投与期間中の著しい摂餌量の低下に起因する可能性が高く、setmelanotide の主要な薬理作用に対するウサギの感受性の高さを示唆するものである。ウサギにおいても催奇形性は認められなかった。ラットの出生前及び出生後の発生に関する試験では、setmelanotide の曝露量が最大臨床用量のヒト曝露量（$C_{max}$ 及び AUC）に対してそれぞれ 20 倍及び 7 倍でも、母動物毒性及び F1 世代への有害作用は認められなかった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE を 7～55 日齢の幼若ラットに皮下投与したときの忍容性は良好であった。予期どおり薬理作用による摂餌量及び体重増加量の減少が認められた。投与部位の炎症反応は成獣ラットで認められたものと類似していた。いずれの用量でも全身毒性は認められず、性成熟、成長パラメーター、行動、学習・記憶、生殖能、眼科学的検査及び病理組織学的検査において影響は認められなかった。無毒性量における setmelanotide の曝露量は、ヒトの $C_{max}$ 及び AUC に対してそれぞれ 94 倍及び 33 倍であった。本試験は、あらゆる年齢の小児患者への投与を支持する目的で設計したが、現在の臨床データに基づき、4 歳以上の小児への投与が支持される。

原薬及び製剤中の不純物は、ラット及びサルの 13 週間持続皮下投与毒性試験で安全性が確認されているか、ICH の適合性基準を下回る規格値が設定されている。

Setmelanotide の主要な毒性試験の無毒性量において setmelanotide の最大臨床用量 3 mg/日（mPEG-DSPE 30 mg/日）と比較したときの安全域を、表 2.6.6-61 に記載する。ウサギの胚・胎児発生試験を除き、setmelanotide の毒性試験で臨床曝露量に対する十分な安全域が示された。各動物種における MTD（投与部位の忍容性により制限される投与量）までの高用量投与による非常に高い曝露にもかかわらず、これらの試験では全身毒性は認められていない。ウサギにおける胚・胎児毒性は、妊娠期間中の著しい摂餌量低下に関連する過度な薬理作用に起因するものであった。

**表 2.6.6-61 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における最大臨床用量 3 mg/日に対する安全域**

| Study | Setmelanotide Exposure Margins [a] | |
|---|---|---|
| | $C_{max}$ basis | AUC basis |
| 6-Month Rat [b] | 20 | 9 |
| 9-Month Monkey | 32 | 26 |
| Juvenile Rat | 21 | 7 |
| Female Fertility and EFD in Rats | 34 | 11 |
| EFD in Rabbits [c] | 1.4 | 0.4 |
| PPD in Rats | 20 | 7 |
| 26-Week Tg.rasH2 Mouse Carcinogenicity [d] | 81 | 17 |

AUC = area under the plasma concentration-time curve; $C_{max}$ = maximum plasma concentration; EFD = embryo-fetal development; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NOAEL = no observed adverse effect level; PPD = pre/postnatal development; SC = subcutaneous; Tg.rasH2 = transgenic rasH2; TK = toxicokinetic; WT = wild-type.

a Setmelanotide exposure margins are based on $C_{max}$ and AUC (sex-combine for studies with males and females) at the NOAEL for each study and human exposure of 37.9 ng/mL and 576 ng*hr/mL, respectively, following a 3.0 mg SC dose (Clinical Study RM-493-026 [5.3.3.1.4], Cohort 3).

b Includes evaluation of male fertility.

c Embryo-fetal toxicity in this species was related to grossly exaggerated pharmacology related to severe reductions in food consumption during pregnancy.

d Based on TK data from Study RM-493-TOX-041 (4.2.3.4.2-2), a 28-day dose-ranging study in WT rasH2 mice.

本項で要約した試験は、setmelanotide/mPEG-DSPE の包括的な毒性評価を提供するものであり、重要な試験で得られた無毒性量は、setmelanotide に対して十分な安全域を示した。さらに、mPEG-DSPE を 30 mg/日まで皮下投与したときの安全性が確認された。以上の非臨床安全性試験により、setmelanotide/mPEG-DSPE を重度の早期発症型遺伝性肥満及び関連する併存疾患に対する成人及び 4 歳以上の小児への治療薬として承認する根拠を支持するものである。

## 参考文献


- Beaumont KA, Wong SS, Ainger SA, et al. Melanocortin MC1 receptor in human genetics and model systems. Eur J Pharmacol. 2011;660(1):103-10.
- Böhm M, Robert C, Malhotra S, et al. An overview of benefits and risks of chronic melanocortin-1 receptor activation. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2025;39:39-51. Epub 2024; Jul 31.
- Haitina T, Ringholm A, Kelly J, et al. High diversity in functional properties of melanocortin 1 receptor (MC1R) in divergent primate species is more strongly associated with phylogeny than coat color. Mol Biol Evol 2007;24(9):2001-8.
- Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, et al. PEGylated Biopharmaceuticals: Current Experience and Considerations for Nonclinical Development. Toxicol Pathol. 2015;43:959-83.
- Nakayama K, Shotake T, Takeneka O, et al. Variation of the melanocortin 1 receptor gene in the macaques. Am J Primatol 2008;70(8):778-85.
- Nambiar PR, Turnquist SE, Morton D. Spontaneous Tumor Incidence in RasH2 Mice: Review of Internal Data and Published Literature. Toxicol Pathol. 2012;4(4):614-23.
- Palatin Technologies, Inc. Palatin Technologies and King Pharmaceuticals report data showing improvements in sexual relationship and self-esteem in patients with erectile dysfunction treated with bremelanotide. Press Release, 22 May 2007.
- [redacted].
- Rudmann DG, Alston JT, Hanson JC, et al. High Molecular Weight Polyethylene Glycol Cellular Distribution and PEG-associated Cytoplasmic Vacuolation Is Molecular Weight Dependent and Does Not Require Conjugation to Proteins. Toxicol Pathol. 2013;41:970-83.
- ヤンセンファーマ株式会社，ドキシル注 20mg，申請概要, 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表－毒性－, 2009. https://www.pmda.go.jp/drugs/2009/P200900018/index.html（アクセス日：2025 年 9 月 26 日）