

審査報告書

平成 18 年 8 月 8 日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

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

記

[販 売 名]	リプラガル点滴静注用 3.5mg (リプレガル点滴静注用 3.5mg に変更予定)
[一 般 名]	アガルシダーゼ アルファ (遺伝子組換え)
[申 請 者]	住友製薬株式会社 (現 大日本住友製薬株式会社)
[申請年月日]	平成 14 年 11 月 11 日
[剤型・含量]	1 バイアル中アガルシダーゼ アルファ (遺伝子組換え) 3.5mg を含有する 静注用製剤
[申 請 区 分]	医療用医薬品 (1) 新有効成分含有医薬品
[化学構造式]	
構造式	別紙
本 質	
(日本名)	アルファガラクトシダーゼ A 遺伝子の増幅によってアルファガラクトシダーゼ A の発現が増加しているヒト線維肉腫細胞株 (HT-1080) 由来細胞株により産生される 398 個のアミノ酸残基 ($C_{2029}H_{3080}N_{544}O_{587}S_{27}$; 分子量: 45,351.21, 1 個又は 2 個の C 末端アミノ酸残基が欠落しているものを含む) からなるサブユニット 2 つより構成される糖タンパク質 (分子量: 約 102,000)
(英 名)	Glycoprotein (molecular weight: ca. 102,000) consisting of two subunits containing 398 amino acid residues ($C_{2029}H_{3080}N_{544}O_{587}S_{27}$; molecular weight: 45,351.21, including molecules lacking one or two C-terminal amino acid residues), produced in a human fibrosarcoma cell line (HT-1080)-derived cell line in which the expression of alfa galactosidase A is increased by amplification of the alfa galactosidase A gene
[特 記 事 項]	希少疾病用医薬品
[審査担当部]	新薬審査第三部

[構造式]

アミノ酸配列

1	11	21	31	41
LDNGL	ARTPT	MGWLH	WERFM	CNLDC
QEEP	DC	SE	KLFME	MAELM
VSEGW				
51	61	71	81	91
KDAGY	EYLCI	DDCWM	APQRD	SEGRL
QADPQ	RFPHG	IRQLA	NYVHS	KGLKL
101	111	121	131	141
GIYAD	VGN ^N KT	CAGFP	GSFGY	YDIDA
QTFAD	WGVDL	LKFDG	CYCDS	LENLA
151	161	171	181	191
DGYKH	MSLAL	N ^N RTGR	SIVYS	CEWPL
YMWPF	QKP ^N NY	TEIRQ	YCNHW	RNFAD
201	211	221	231	241
IDDSW	KSIKS	ILDWT	SFNQE	RIVDV
AGPGG	WNDPD	MLVIG	NFGLS	WNQQV
251	261	271	281	291
TQMAL	WAIMA	APLFM	SNDLR	HISPQ
AKALL	QDKDV	IAINQ	DPLGK	QGYQL
301	311	321	331	341
RQGDN	FEVWE	RPLSG	LAWAV	AMINR
QEIGG	PRSYT	IAVAS	LGKGV	ACNPA
351	361	371	381	391
CFITQ	LLPVK	RKLGf	YEWTS	RLRSH
INPTG	TVLLQ	LENTM	QMSLK	DLL

^N : N結合型糖鎖を結合していると予測されるアスパラギン

[主要な糖鎖構造]

組成	構造
Man ₇ GlcNAc ₂ (PO ₃) ₂	ハイマンノース型
Man ₇ GlcNAc ₂ (PO ₃)	ハイマンノース型
Man ₇ GlcNAc ₂	ハイマンノース型
Man ₆ GlcNAc ₂ (PO ₃)	ハイマンノース型
Man ₆ GlcNAc ₂	ハイマンノース型
Man ₅ GlcNAc ₂	ハイマンノース型
NeuAcGal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄	コンプレックス型
NeuAc ₂ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄	コンプレックス型
NeuAcGal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc	コンプレックス型
NeuAc ₂ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc	コンプレックス型
NeuAcGal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc	コンプレックス型
NeuAc ₂ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc	コンプレックス型
NeuAc ₃ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc	コンプレックス型
NeuAcGal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆ Fuc	コンプレックス型
NeuAc ₂ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆ Fuc	コンプレックス型
NeuAc ₃ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆ Fuc	コンプレックス型
NeuAc ₄ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆ Fuc	コンプレックス型

Man : マンノース
 GlcNAc : N-アセチルグルコサミン
 NeuAc : N-アセチルノイラミン酸
 Gal : ガラクトース
 Fuc : フコース
 PO₃ : リン酸基

審査結果

平成 18 年 8 月 8 日

〔販 売 名〕	リプラガル点滴静注用 3.5mg(リプレガル点滴静注用 3.5mg に変更予定)
〔一 般 名〕	アガルシダーゼ アルファ (遺伝子組換え)
〔申 請 者〕	住友製薬株式会社 (現 大日本住友製薬株式会社)
〔申請年月日〕	平成 14 年 11 月 11 日
〔特 記 事 項〕	希少疾病用医薬品

〔審査結果〕

有効性については、18 歳以上の日本人男性ファブリー病患者 12 例を対象とした非盲検非対照試験において、本薬 0.2 mg/kg を 2 週間に 1 回、12 回 (22 週間) 静脈内投与したとき、主要評価項目である血漿中セラミドトリヘキシシド (CTH) 濃度及び尿沈渣中 CTH 量について、投与前値と比べて有意な低下が認められ、抗てんかん薬等非服用下での疼痛スコアについては、低下したが統計学的な有意差は認められなかった。

安全性については、本邦において、重篤な有害事象が 12 例中 2 例 (17%) に 2 件発現し、そのうち 1 例が因果関係ありとされた。この 1 例では、投与中のアレルギー反応 (呼吸困難、膨疹及びそう痒 (症)) が認められたが、投与中止後ステロイド剤の処置により消失した。抗 α GALIgG 抗体は 2 例が 8 週後に陽性となったが、その後抗体価は低下し陰性化した。投与時反応に関しては、抗ヒスタミン剤や副腎皮質ホルモン剤等を投与するなどについて添付文書において注意喚起することとされた。その他問題となる副作用は認められなかった。

提出された資料から、本薬の有効性及び安全性が示されたと判断する。

以上、医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目については、下記の承認条件を付した上で、以下の効能・効果、用法・用量で承認して差し支えないと判断した。

【効能・効果】 ファブリー病

【用法・用量】 通常、アガルシダーゼ アルファ (遺伝子組換え) として、1 回体重 1 kg あたり 0.2mg を隔週、点滴静注する。

【承認条件】

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

審査報告（１）

平成 16 年 8 月 27 日作成

1. 申請品目

〔販売名〕	リプラガル点滴静注用 3.5mg
〔一般名〕	アガルシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）
〔申請年月日〕	平成 14 年 11 月 11 日
〔申請者〕	住友製薬株式会社
〔申請時効能・効果〕	ファブリー病に対する長期酵素補充療法
〔申請時用法・用量〕	アガルシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）として 0.2mg/kg を 100mL の日局生理食塩液に希釈し、2 週間に 1 回、40 分以上かけて点滴静注する。
〔特記事項〕	希少疾病用医薬品

2. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構における審査の概要

イ. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

ファブリー病は、細胞内リソソーム中の加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼ A（以下、 α GAL）の活性が先天的に欠損あるいは低下する X 染色体性劣性の先天代謝異常症である。本疾患においては、本来分解されるべきスフィンゴ糖脂質の蓄積がみられ、主としてセラミドトリヘキシンド（以下、CTH）が様々な細胞や組織内に進行性に蓄積し、血管の内皮、外皮及び平滑筋細胞、腎上皮細胞、心筋細胞、背側根神経節及び自律神経系が選択的に障害される。典型例においては、学童期あるいは青年期に、四肢の激しい疼痛、被角血管腫とよばれる特徴的な皮膚疾患及び明瞭な角膜混濁などが発現し、年齢を重ねるに従って重要な器官が障害を受けるようになり、通常 30 歳代から 40 歳代に腎疾患、心疾患あるいは脳血管障害により死亡する。本邦においては、本疾患は特定疾患治療研究事業対象疾患に指定されており、2001 年末までに 177 名の患者が認定されている。

なお、本申請資料中ではファブリー病の α GAL 欠損によって体内に蓄積する基質をセラミドトリヘキシンドと呼称し CTH と略しているが、これはグロボトリアオシルセラミド（GL-3）と同義である。

α GAL は、リソソーム中に運ばれてその機能を発揮するが、細胞外に分泌される α GAL もあり、その糖鎖部分のマンノース-6-リン酸（以下、M6P）残基が細胞表面の M6P レセプターに結合することによって捕捉され、再び細胞内に取り込まれてリソソームに送られることが知られている（Kornfeld, S. and Mellman, I. Ann. Rev. Cell Biology 1989;5:483-525）。そこで、 α GAL を静脈内に投与することにより、ファブリー病患者の細胞内リソソームに到達させることが可能と考えられ、1970 年代より補充療法が検討されてきている。本邦においては、遺伝子組換え技術によりチャイニーズハムスター卵巣細胞（以下、CHO 細胞）から産生される α GAL を有効成分とするアガルシダーゼベータ（遺伝子組換え）（販売名：ファブラザイム）が 2004 年 1 月に承認されている。

本申請品目は、米国 Transkaryotic Therapies 社（以下、TKT 社）により開発され、ヒト線維肉腫細胞株を用いて、 α GAL 遺伝子の [] に [] 配列及び [] 配列を挿入した遺伝子活性化技術

により産生される内因性 α GAL を有効成分とする製剤である。米国においては、19 年 月からファブリー病患者を対象とした臨床試験が開始されている。本邦においては、申請者である住友製薬株式会社が 1998 年 7 月に TKT 社と契約を締結し、開発に着手した。なお、本薬は 2001 年 8 月に EU で承認を取得したのを初めとして、2004 年 8 月現在 34 カ国で承認されている。

ロ．物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法に関する資料

本薬は、ヒト線維肉腫由来細胞株に 配列及びヒト 配列の一部を含む遺伝子活性化ベクターを導入することにより、ヒト α GAL 遺伝子座の で相同組換えを起こし、宿主細胞の内在性 α GAL 遺伝子が活性化されることにより生産される糖たんぱく質である。 α GAL はスフィンゴ糖脂質の末端 α -ガラクトースを遊離させる酵素である。

(1) 原薬

① 製法変更の経緯について

本薬の開発過程で、原薬の製造方法は 3 回変更されている。開発初期には、ヒト 細胞 を宿主細胞としてヒト α GAL のアミノ酸配列をコードするプラスミドを組み込んで樹立した細胞株より生産された α GAL (以下、A 製法品*) を用いて米国第 I 相試験 (TKT001) が実施された。その後、TKT 社が新たに樹立した遺伝子活性化法による細胞株より生産される本薬を用いて臨床試験及び非臨床試験が実施された。本薬は、はじめ TKT 社の委託先である B 社* により製造され (B 製法品*)、非臨床試験の一部及び米国第 II 相試験 (TKT003) の一部に使用された。その後 C 社* に委託先が変更されると共に製造方法が一部変更され (C 製法品*)、米国第 II 相試験 (TKT003) の一部及び本邦での試験を含むその他の臨床試験並びに非臨床試験の一部に使用された。

TKT 社はこれらの試験成績に基づき、C*社における製造方法 (C*製法) を申請製法として欧州等に申請、2001 年 8 月に欧州において承認されている。承認後、TKT 社は生産性の増大と品質の向上を目的として自社設備による製造方法 (D*製法) を開発し、2003 年 2 月には欧州において製造方法の一部変更承認申請を行い、同年 7 月に承認を得ている。

(機構注：製法の違いにより、本薬には A*、B*、C*及び D*の 4 種類の実薬及びそれに相当する製剤が存在する。後述するように製法が一部異なるものの、各種の規格試験及び臨床試験結果から、製剤の特性に特段の相違はないと考えられる。このため、本報告書における試験に使用された実薬及び製剤についての記載は、製法の相違について言及する場合を除き「本薬」として記載した。)

申請者は、本邦における承認申請にあたり、国内臨床試験に使用した C*製法で申請し、承認取得後一部変更承認申請を行い、D*製法に切り替える予定としていた。しかしながら、C*製法で製造された実薬では生産用培地にカナダ産のウシ由来原料が使用されていたことから、平成 15 年 5 月 22 日付け医薬発第 0522002 号医薬局長通知「カナダ産のウシ等由来物を原材料として製造される医薬品、医療用具等の品質及び安全性確保について」を受け、申請者は申請製法をカナダ産のウシ由来原料を使用していない D*製法に変更したいと申し出るとともに、D*製法に関する資料、両製造法の工程比較、生産された実薬の物理的・化学的特性及び品質の比較、並びに薬物動態学的性質の比較結果を提出した。

機構は、現有の C*実薬が全てカナダ産のウシ由来原料を使用して製造されており今後 C*実薬

が製造される予定はないことから、生物由来原材料に係る安全確保の点を考慮すると、申請製法を D*製法に変更することは妥当であると考え。しかしながら、D*原薬は非臨床及び臨床試験に使用されたものではないことから、両製法による原薬の同等性を評価した上で、申請製法の妥当性について判断することとした。

② 原薬の製造について

原薬は、TKT 社で製造される。B*、C*及び D*原薬は同一のマスターセルバンク（以下、MCB）より製造されているが、ワーキングセルバンク（以下、WCB）、培養工程及び精製工程が変更されている。以下の製造法に関する記載については、D*製法を中心とし、変更部分については後述した。

i) 製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析

製造のための宿主細胞としてヒト線維肉腫由来細胞株 HT-1080 が使用された。HT-1080 については特性解析が実施されている。宿主細胞のヒト α GAL 遺伝子の [] に [] を挿入する目的で遺伝子活性化プラスミド [] が調製された。[] は機能配列として [] 及び [] 配列の一部、標的配列として [] 配列等をプラスミド [] に組み込んで構築され、全塩基配列が明らかにされた。決定された塩基配列と GenBank の塩基配列データベースに公表されている配列との間に [] 塩基の差異が認められたが、いずれも [] の遺伝子活性化機能には影響を与えない変化若しくは部位であると考察されている。[] を制限酵素で消化して得られた DNA 断片を [] により宿主細胞 HT-1080 に導入することにより、宿主細胞 [] のヒト α GAL 遺伝子座の [] で相同組換えが起こり、ベクター内に含まれる [] 配列が宿主細胞のヒト α GAL 遺伝子座の [] に挿入される。活性化されたヒト α GAL 遺伝子座では [] から転写がはじまり、mRNA からヒト α GAL の前駆体が翻訳され、分泌に伴ってシグナル配列が切断され、可溶性の本薬が分泌生産される。選択培養を行い樹立した種細胞株 [] より MCB が、MCB より WCB が調製された。

MCB について、細胞特性試験が実施されている。微生物及びウイルスに関する試験として、細菌及びマイコプラズマ並びにウイルスについては非特異的な電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性、*in vitro* 及び *in vivo* 接種試験のほか、ヒト及びサル感染性の 16 種のウイルスの特異的検出、ウシ及びブタ由来ウイルスの試験が実施され、いずれの因子も検出されなかった。また、アイズアイム及び染色体分析による細胞の確認試験、細胞形態、増殖特性、本薬生産能、培養安定性、構造遺伝子配列及び本薬遺伝子コピー数について検討された。さらに、MCB より調製した相補的 DNA より、構造遺伝子配列が GenBank のヒト α GAL の塩基配列と一致することが確認された。

WCB 及び生産培養終了後の細胞（以下、EPC）について、微生物及びウイルスに関する試験（ウイルス粒子観察、細菌・真菌・ウイルス等に関する試験）、細胞特性試験（細胞の確認試験、細胞形態、増殖特性、本薬生産能、培養安定性、構造遺伝子配列及び本薬遺伝子コピー数）が実施され、培養工程中で汚染が認められず、また本薬遺伝子座の遺伝子構造が MCB の分析結果と一致したことから、培養期間を通じて遺伝的に安定であることが確認された。

EPC について、微生物及びウイルスに関する試験が実施され、汚染が認められないこと、また

細胞の同定及び本薬遺伝子構造の分析の結果、製造中安定に保たれていることが確認された。EPC より生産された EPC 由来精製バルク（■回のハーベストまでが原薬となるため、■回目のハーベストから精製されたもの）について構造及び機能に関する分析が実施された結果、■などの糖鎖の修飾の程度及び MALDI-TOF による分子量の主ピークにわずかな違いが認められており、製造期間を超えた培養によりリン酸化等の糖鎖の修飾に差が生じたとされ、比活性、細胞内取り込み活性等は標準品と同等であったことから、有効性及び安全性に影響を与える変化ではないと考察されている。

MCB と WCB について定期的な安定性モニタリングが定められており、MCB では生存率、サザンブロットによる分析及び本薬コード領域の塩基配列の確認について、また、WCB については細胞数、細胞倍化時間、細胞生存率、本薬生産能及び生産された本薬のウェスタンブロットによる確認について、それぞれ許容基準が設定されている。

ii) 培養及び精製工程 (D*製法)

本薬の製造工程は、培養工程と精製工程により構成される。細胞培養工程では WCB から順次スケールアップし、拡大培養、生産培養を経て本薬を含む培養上清が得られる。培養工程について、WCB 解凍、拡大培養工程、全ての未加工バルク、■回目ハーベストの培養上清及び未精製バルクについてそれぞれ管理試験が設定され、許容基準及び処置基準が定められている。

精製工程では、■クロマトグラフィー、■クロマトグラフィー、■クロマトグラフィー、■イオン交換クロマトグラフィー、■クロマトグラフィー及びナノフィルトレーション工程を経て原薬が調製される。

精製工程における工程由来不純物の挙動について検討され、■、ウシ血清アルブミン（以下、BSA）、■、宿主細胞 DNA について D*製法における除去効率が検討されている。

本薬はヒト細胞株を宿主細胞として製造されており、製造工程中でも動物由来原材料が使用されていることから、外来性感染性物質に関する安全性評価が実施されている。

MCB、WCB 及び EPC について細胞の同定及びウイルス等に対する外因性・内因性因子試験等が実施され、管理規格が設けられている。培養工程における工程管理試験として、未加工バルクに対する生菌数、マイコプラズマ、逆転写酵素活性、ウシウイルス及び培養細胞による迷入因子試験が定められており、精製工程においては、工程管理試験として生菌数及びエンドトキシン試験が設定されている。

また、宿主細胞はヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 に由来するが、HT-1080 は活性化された N-ras 遺伝子を持つことが報告されていることから (Hall A. Nature 1983; 303: 196-400)、原薬中宿主 DNA 含有量の安全性が検討されている。WHO が提示した、株化細胞を生産基材として医薬品製造に使用する場合の宿主細胞由来 DNA の混入許容値（精製品 1 投与あたり 10ng）(WHO Technical Report 1998; Series No. 878) に対し、原薬中に残存する宿主 DNA のロット分析結果及びスパイク試験等の結果から、本薬精製工程の DNA 除去能は十分であることが確認され、また仮に原薬中に N-ras 遺伝子の混入があったとしても、原薬中の残存量と形質転換の出現頻度から算出される発がんの頻度は極めて低いものであること、原薬中に残存する DNA の分子サイズは N-ras のゲノムサイズよりも小さいことから、混入する宿主細胞由来 DNA に関する安全性は確認されたと考察されている。なお、宿主細胞 DNA の含有量については、原薬で規格限度値が

設定され、管理されることとなっている。

さらに、製造工程のウイルス除去・不活化能についても検討されている。5つのクロマトグラフィー工程及びナノフィルトレーション工程について、ウシウイルス性下痢ウイルス、マウス白血病ウイルス、ブタヘルペスウイルス、ブタパルボウイルスを用いて除去・不活化能力が評価され、これら4種のウイルスについて原薬の精製工程は総合的に高い除去効果を有することが確認されている。

iii) 製造工程の変更について

B*製法からC*製法への主な変更点は、WCBの設定、培養・生産培地の変更並びに精製工程の $\times$ 倍スケールアップ及び各種カラム条件の変更である。

C*製法からD*製法への主な変更点は、培養及び精製工程の $\times$ 倍スケールアップ(B*製法からでは $\times$ 倍スケールアップ)、拡大培養・生産培養培地の変更(生物由来原材料の低減)、培養工程管理試験の変更(の削除、の一部省略)及び精製工程最終段階のナノフィルトレーションの孔径変更(μm から μm)である。

C*製法からD*製法への変更前後での製造法の同等性について検討されている。

培養工程については培地が変更されていることから、EPCの細胞特性解析、拡大培養における総細胞数、細胞生存率及び細胞倍化数(以下、PDL)、並びに培養上清の生菌数、マイコプラズマ及びウイルスの存在及び本薬酵素活性について検討され、細胞の安定性及び生産能等が比較された。その結果、D*製法において製造用細胞の安定性及び微生物学的安全性は保持されており、本薬酵素活性についてもC*原薬と同様であったが、PDLについては、D*製法では拡大培養工程における通算PDLが高いことから生産培養工程に供する細胞の細胞齢が高いことが確認された。しかしながらEPCの細胞特性解析によりD*製法においても製造用細胞は製造期間中安定に保たれていることなどから、細胞齢の上昇は製造期間中の細胞特性に影響を与えていないと判断されている。

精製工程については、本薬の収率、工程由来不純物の除去効率について各製法3ロットの実測値が比較され、同様な精製効率及び不純物除去効率を有していることが確認された。

③ 原薬の特性について

本申請にあたり特性結果が示されたのは主としてC*原薬によるものであり、B*原薬については一部の解析結果が比較検討されたのみである。なお、申請後申請製法が変更されたことから、D*製法による原薬の特性試験成績とC*原薬と比較した結果が追加提出された。それについては後段で記載する。

i) C*原薬の特性解析結果について

本薬の構造について、たんぱく質の一次構造(アミノ酸組成分析、N末端アミノ酸分析、ペプチドマップ、アミノ酸配列分析)、糖鎖構造(糖鎖消化酵素処理品のSDS-PAGE及びIEF、糖鎖マッピング、糖組成分析、各単糖結合位置の解析、MALDI-TOFによる糖鎖構造解析)に関する分析が実施され、物理的・化学的性質としては電気泳動的性質(SDS-PAGE、IEF)、液体クロマトグラフパターン(サイズ排除高速クロマトグラフィー(SE-HPLC)、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC))、分子量(SDS-PAGE、SE-HPLC、MALDI-TOF質量分析)、免疫化学的性

質、生物学的性質（細胞内取り込み活性、酵素比活性）、低分子量グリコフォームの構造解析等が実施されている。

たんぱく質の一次構造について、N 末端の 15 残基はヒト α GAL の遺伝子配列より予想される配列からシグナルペプチドが切断されたものと一致し、C 末端には不均一性が認められた。遺伝子配列から予想されたもの（398 残基のアミノ酸）と比較して C 末端のロイシン残基が欠落したものが主たる成分であり、完全長のもの及び C 末端が 2 残基欠落したものも少量存在していた。

糖鎖構造について、108 位、161 位及び 184 位の 3 カ所のアスパラギン残基に N 結合型糖鎖が結合していることが確認され、各種糖鎖消化酵素処理後の SDS-PAGE 及びクロマトグラフィーを行った結果より、高マンノース型、ハイブリッド型及びコンプレックス型糖鎖の存在、並びにシアル酸及びリン酸化された糖鎖を有していることが示唆された。 α GAL の細胞内への取り込みに重要であるとされる M6P の存在比は、マンノース ■mol あたり ■mol であり、本薬 1 分子あたり少なくとも ■個以上の割合で結合していると推測された。また、同様の存在比としてシアル酸は本薬の単量体あたり ■mol であった。MALDI-TOF 質量分析の結果推定された糖鎖及びその含量は、ハイマンノース型糖鎖 ■%以下、マンノース及びフコースからなる中性の骨格構造の糖鎖 ■%以下、ハイブリッド型糖鎖 ■%以下、2~4 本鎖のコンプレックス型糖鎖 ■%以下であった。コンプレックス型糖鎖のほとんどにフコースが付加しており、約 ■%にはシアル酸が付加していた。

ジスルフィド結合について、本薬は 12 個のシステイン残基を有しているが、分子内に 5 カ所の結合が確認されており、2 残基については遊離のチオールである可能性が示唆されている。

電気泳動的性質として、還元後 SDS-PAGE により分子量 45,000Da 付近のブロードな主バンドと直下の糖鎖結合量の違いによる副バンドが認められ、分子量は 43,000~68,000Da の範囲であった。IEF の結果、pI ■~■の範囲に約 ■本のバンドが検出され、報告されている h α GAL の等電点（血漿由来 4.1~4.4、脾臓由来 4.4~4.9、胎盤由来 5.0 及び 5.13）（Bishop DF and Desnick RJ. J Biol Chem 1981; 256: 1307-1316、Bishop DF and Sweeley CC. Biochem Biophys Acta 1978; 525: 399-409）と比較すると、■由来及び■由来のものと類似していると考察された。

分子量について、MALDI-TOF 質量分析では 50,777Da を頂点とする約 46,000~約 55,000Da の範囲にブロードなピークが認められ、約 48,000Da 付近に低分子量グリコフォームに相当するピークも認められた。本薬のアミノ酸組成から求められる理論分子量は 45,400Da であり、測定された分子量の差は糖鎖の分子量とされた。また、SE-HPLC による見かけの分子量（ホモ二量体として）は、標準たんぱく質で作成した検量線から約 141,300Da と見積もられた。

生物学的性質として、本薬をヒト ■細胞と共に培養したところ細胞内への取り込みが確認され、この取り込みは遊離の M6P の共存により ■%以上阻害されたことから、本薬の細胞内への取り込みは細胞の M6P レセプターを介したものであることが示唆された。

酵素としての活性は、4-メチルウンベリフェリル- α -ガラクトピラノシドを基質として、1 時間に 4-メチルウンベリフェロンを 1nmol 遊離させる酵素量を 1 単位 (U) としたとき、原薬の比活性は ■~■U/mg であった。この値はヒト組織由来ヒト α GAL の報告値と同程度であった（脾臓由来： 4.07×10^6 U/mg、血漿由来 2.06×10^6 U/mg）（Bishop D.F. et al. PNAS 1986; 83: 4859-4864）。

SDS-PAGE における主・副泳動帯は糖鎖消化酵素処理により 1 本の泳動帯となることから、糖鎖の違いに起因していることが示唆されており、副泳動帯である低分子量グリコフォームについて検討が行われている。低分子量グリコフォームは中性の骨格構造糖鎖及びハイマンノース型糖鎖の

割合が比較的高く、シアル酸及びリン酸の付加が少ない等電点の最も高いグループであり、酵素活性はほぼ同等であるがヒト██████細胞への取り込みが低い（約██%）ことが確認された。低分子量グリコフォームは生産培養におけるハーベスト回数の増加に従って増加する傾向にあり、培養期間が長くなるほど増加することが示された。これは培養期間が長くなると細胞が溶解し、リソソーム内で一部糖鎖消化を受けた本薬が培養上清中に放出される割合が増加するためと考察されている。本薬中の低分子量グリコフォームの割合は約██%とされている。

また、シアル酸の結合様式は α 2,6結合のものが α 2,3結合のものの約██倍存在しているとされており、CHO細胞由来遺伝子組換えヒト α ガラクトシダーゼでは、 α 2,3結合のみしか見られないことが報告されている。

ii) 異なる製法で製造された原薬における特性の比較について

B*原薬及びC*原薬については、特性試験結果が比較されている。免疫学的性質、N末端アミノ酸配列、MALDI-TOF質量分析、ペプチドマップ、電気泳動的性質（糖鎖関連酵素消化処理）、クロマトグラフィー的性質、製造工程由来不純物、比活性、細胞内取り込み活性、バイオバーデン及びエンドトキシンについて比較されており、特性として両者は同様であると判断されている。

申請後、原薬の製法が変更されたことに伴い、D*原薬についての特性試験成績が提出された。D*原薬はN末端アミノ酸分析、ペプチドマップ及び主要なピークの同定結果よりC*原薬と同様なたんぱく質の一次構造を有することが示され、生理条件下における遊離SH基は両者とも単量体あたり0.2個未満であった。

糖鎖関連酵素消化物のSDS-PAGE及びウェスタンブロットによる分析において両原薬は同様な挙動を示し、糖鎖に係る電気泳動的性質は同様であると判断されている。

シアル酸及びM6Pについて、ノイラミニダーゼ及びホスファターゼ消化物のIEF・ウェスタンブロットによる試験を行ったところ、いずれの消化物も両原薬及びその混合物で同様な挙動を示したことから、シアル酸及びリン酸による修飾の程度は同様であると判断された。

██████で切り出した糖鎖の糖鎖マップでは、両原薬とも糖鎖の多様性に基づく多数のピークを与え、いくつかのピーク面積に若干の差が認められたが、パターンとしては同様であったことから、両原薬は同等と判断されている。また、糖組成についてもほぼ同程度であると判断されている。

その他、SDS-PAGE、SE-HPLC、RP-HPLC、MALDI-TOF質量分析、遠紫外円偏光二色性スペクトル、免疫化学的性質、細胞内取り込み活性、比活性について両原薬の成績が比較され、いずれも自主適合基準を満たし同様であったと判断されている。また、原薬の規格試験法についても、両原薬はいずれも設定された規格に適合した。

機構は、C*原薬とD*原薬の特性の比較において、糖組成、RP-HPLCクロマトグラム、MALDI-TOFのピークパターンに若干相違が認められることについて、両者を「同程度」と判断した根拠を尋ねた。申請者は、C*原薬及びD*原薬についてそれぞれ3~4ロットの結果を提示した上で、これらの測定値及びクロマトグラムは同じ原薬でもロット毎にある程度変動し、また試験法自体もある程度の変動を示すものであるとして、試験結果の変動の範囲には両原薬で差が認められていないと説明した。機構は回答を了承した。

機構は、本薬のC末端は予想されるアミノ酸配列から1残基欠落したものが主成分であると説明されていることについて、生物活性との関係及びそれぞれの分子種の含量について尋ねた。申

本薬の C 末端欠損体含量を定量した結果はないが、C 末端アミノ酸が 2~10 残基欠損した α GAL は完全長の約 2~6 倍の酵素活性を示し 12 又は 17 残基欠失したものでは酵素活性は消失することが報告されている (Miyamura N, et al. J Clin Invest 1996; 98: 1809-1817) ことから、1 又は 2 残基の欠損では酵素活性は低下していないと考えられる。また、細胞内への取り込みは M6P レセプターを介するものであり C 末端欠損の影響はないと考えられることから、本薬における C 末端欠損は生物活性に影響しないと考える。また、■残基以上の C 末端が欠損した場合、ペプチドマップ上に新たなピークが出現すると考えられることから、■残基以上の欠損体の存在については設定した規格試験で管理できると考えている。機構は回答を了承した。

申請者は、いずれの変更時にも物理的・化学的特性の検討を行うとともに、A*から B*原薬への変更の際にはラット、B*から C*原薬への変更の際にはサル単回投与時の薬物動態による評価を実施したと回答した。また、臨床試験に使用した C*と D*原薬の同等性については、カンクイザルでの薬物動態学的試験とともに、ヒトにおける生物学的同等性試験の結果が追加提出された。カンクイザルに単回投与したときの薬物動態パラメータの 90%信頼区間は $C_{\max}/\text{Dose}$ については、[0.91, 1.15]、 $AUC_{\text{last}}/\text{Dose}$ については、[0.78, 0.99]であり、 $C_{\max}/\text{Dose}$ については生物学的同等性の判断基準である 0.8~1.25 の範囲内であり、 $AUC_{\text{last}}/\text{Dose}$ についてもその逸脱が軽微であったことから、両製剤で同程度の全身暴露が得られると判断されている。また、ヒトでの生物学的同等性試験では、 $C_{\max}/\text{Dose}$ 及び $AUC_{\text{last}}/\text{Dose}$ の 90%信頼区間はそれぞれ、[0.99, 1.04] 及び [0.88, 0.93] でありいずれも生物学的に同等と判断されている。

機構は上記試験成績及び回答を了承し、D*原薬の C*原薬との同等性に関して問題はないものと判断した。

原薬の規格及び試験方法として、性状、確認試験（ペプチドマップ、糖鎖マップ）、pH、純度試験（SDS-PAGE、RP-HPLC 法、SE-HPLC 法、宿主細胞 DNA、宿主細胞たんぱく質、BIgG、BSA）、エンドトキシン、生菌数試験、細胞内取り込み活性試験、比活性、定量法（紫外可視吸光度測定法）が設定され、資料が提出された。

12

本薬の薬物動態及び細胞内への取り込みに影響する糖鎖の恒常性を定量的に管理する試験として設定されている。

比活性は、4-メチルウンベリフェリル・ α -D-ガラクトピラノシドを基質としてたんぱく質量当たりの酵素活性を求めるものである。

確認試験のペプチドマップについて、ピーク面積比が規格に設定されているため、システム再現性を設定するよう求め、対応されたのでこれを了承した。

純度試験の SDS-PAGE は、本薬製造時に使用しているウシ血清等のウシ由来たんぱく質の混入を広く検出することを目的として設定されている。判定基準が「標準品に添加した不純物 (BSA) の泳動帯より染色強度の強い新たな不純物の泳動帯を認めない」とされていることについて、機構は、デンストメトリーによる定量的な評価を実施することはできないか、また個々の不純物の染色強度だけでなく種類や総量に関する規格も設定する必要はないか申請者に尋ねた。申請者は、設定した規格は限度試験の規格としては十分ではないと考えられることから、染色強度の指標となる不純物の標準品への添加をやめ、「本品の [] 及び [] の [] 及び [] は標準品と同様であり、かつ、[] を認めない」に変更すると回答した。機構は回答を了承した。

純度試験の RP-HPLC、SEC-HPLC、BSA 及び B1gG について、D*原薬の実測値も踏まえて規格値を厳密に設定するよう求め、対応されたのでこれを了承した。

純度試験の宿主細胞たんぱく質は SDS-PAGE で泳動した後ウェスタンブロットにより検出を行うものであるが、特定ロットの原薬を「アガルシダーゼアルファ対照品」としてポジティブコントロールに設定することにより、規格は「アガルシダーゼアルファ対照品に認められる泳動帯以外の新たな泳動帯を認めない」とされている。これについて機構は、対照品の定義が「検出される可能性のある不純物を全て含むロット」とのみされていて明確ではないこと、規格が「新たな泳動帯を認めない」とするのみで含量に関する規定がないことから、設定された対照品の妥当性（臨床使用経験があり有効性及び安全性が確認されたロットであるかどうか）並びに対照品の定義及び規格の設定について申請者に検討を求めた。

申請者は以下のように回答した。原薬中に検出される宿主由来たんぱく質について、ほとんどが BSA 及び B1gG に由来するものであるが、未同定のバンドもあるため対照品を用いて位置を確認する必要がある。また、染色に使用する抗体は複数のたんぱく質を抗原として作成されたものであり、染色強度は不純物の含量を必ずしも反映していないことから、対照品を同時に泳動して比較することが必要である。しかしながら、現在の規格には不純物含量に関する規定がないことから、対照品を用いて [] を規格に定めることとし、[] を対照品 2 として追加することにより、対照品 1 又は 2 のいずれか濃いほうの [] とすることとする。対照品 1 は C*原薬であるが、臨床的には Compassionate Use に使用されたロットである。対照品 2 は D*原薬であり、臨床試験には使用していないが、臨床試験に使用したロット（製剤ロット番号 F*）と比較したときに、対照品 2 に含まれる全ての泳動帯がロット F*で検出され、染色強度も全てロット F*より薄いことを確認している。ロット F*を使用した臨床試験において本ロットの安全性及び有効性に問題は指摘されていない。また、対照品の定義については、「これらの対照品を更新する際には、「リブラガル原薬」の宿主細胞たんぱく質の規格に適合するロットを新しい対照品として更新する」と変更する。

機構は回答を了承した。