ガラフォルド®カプセル 123 mg
に関する資料

本資料に記載された情報に係る権利及び内容についての責任は Amicus Therapeutics 株式会社に帰属するものであり、当該情報を適正使用以外の営利目的に利用することはできません。

Amicus Therapeutics 株式会社

ガラフォルド®カプセル 123mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.4　非臨床試験の概括評価

Amicus Therapeutics 株式会社

目次

1　非臨床試験の概括評価 7
1.1　序文 7
1.2　非臨床開発プログラム 8
2　薬理試験 10
2.1　効力を裏付ける試験 10
2.2　副次的薬理試験 11
2.3　安全性薬理試験 12
2.4　薬力学的薬物相互作用 12
3　薬物動態 13
3.1　分析法 13
3.2　吸収 13
3.3　分布 14
3.4　代謝 14
3.5　排泄 14
3.6　薬物動態学的薬物相互作用 14
4　毒性試験 16
4.1　単回及び反復投与毒性試験 16
4.2　遺伝毒性試験 16
4.3　がん原性試験 17
4.4　生殖発生毒性試験 18
4.5　局所刺激性試験 20
4.6　その他の毒性試験 20
4.6.1　併用投与毒性試験 20
4.6.2　免疫毒性試験 20
4.6.3　代謝物の毒性試験 20
4.6.4　不純物及び分解生成物の評価 20

4.6.5　　光安全性に関する評価 20

5　　総括及び結論 21

6　　参考文献 26

表目次

表 2.4 - 1　マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトでのミガーラスタット塩酸塩経口投与後 血漿中曝露量及び安全域 24

略号及び用語の説明

略号及び用語	日本語	英語
α-Gal A	α-ガラクトシダーゼ A	α-Galactosidase A
AT1001	ミガーラスタット塩酸塩の開発コード	Development code of migalastat hydrochloride
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積	Area under the plasma concentration-time curve
AUC_{0-t}	0 時間から定量可能な最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last quantifiable concentration
BCRP	乳がん耐性タンパク質	Breast cancer resistance protein
BSEP	-	Bile salt export pump
Caco-2	ヒト結腸がん由来の細胞株	Human colonic adenocarcinoma cell line
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum observed plasma concentration
CYP	シトクロム P450	Cytochrome P450
GL-3	グロボトリアオシルセラミド	Globotriaosylceramide
GLA	α- Gal A をエンコードしている遺伝子（ヒト）	Gene that encodes α-Gal A (human)
Gla	マウス α-Gal A 遺伝子	Murine α-Gal A gene
Gla KO マウス	内因性 α-Gal A タンパク質を欠損したファブリー病モデルマウス	Mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein (knockout mice)
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
HEK	ヒト胚腎臓	Human embryonic kidney
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子	Human ether-a-go-go related gene
hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス	マウス *Gla* を欠損し、ヒト R301Q 変異型 *GLA* 導入遺伝子を発現するファブリー病モデルマウス	Mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background
IC_{50}	50%阻害濃度	Half maximal inhibitory concentration
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
K_i	阻害定数	Dissociation constant for binding of inhibitor to enzyme
KO	ノックアウト	Knockout
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LLOQ	定量下限	Lower limit of quantification
lyso-Gb_3	グロボトリアオシルスフィンゴシン	Globotriaosylsphingosine
MATE	-	Multidrug and toxin extrusion protein
MEC	モル吸光係数	Molar extinction coefficient

略号及び用語	日本語	英語
MTD	最大耐量	Maximum tolerated dose
NAGA	α- N -アセチルガラクトサミニダーゼ	α-N-Acetylgalactosaminidase
NOAEL	無毒性量	No-observed-adverse-effect level
OAT	-	Organic anion transporter
OATP	-	Organic anion transporting polypeptide
OCT	-	Organic cation transporter
P-gp	P 糖タンパク質	P-Glycoprotein. This is also known as Multidrug resistance protein 1 (MDR1).
PK	薬物動態	Pharmacokinetics
rhα-Gal A	組換えヒト α-Gal A	Recombinant human α-Gal A
SGLT	ナトリウム・グルコース共役輸送体	Sodium glucose cotransporter
Tg	トランスジェニック	Transgenic
TK	チミジンキナーゼ	Thymidine kinase
TK	トキシコキネティクス	Toxicokinetics
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間	Observed time to reach C_{max}
$t_{1/2}$	消失半減期	Elimination half-life

1　非臨床試験の概括評価

1.1　序文

ファブリー病は男女に発症する進行性の X 染色体連鎖性リソソーム蓄積症であり、有病率は 40000～117000 人に 1 人と推定されている。（Desnick et al, 2001; Meikle et al, 1999; Eurordis, 2005）。新生児スクリーニングでは、α-ガラクトシダーゼ A（α-Gal A）遺伝子（*GLA*）の変異はより高い頻度で検出されているが（Spada et al, 2006; Mechtler et al, 2012）、これら遺伝子変異の罹患率に与える影響はまだ解明されていない。*GLA* 変異の結果、スフィンゴ糖脂質の代謝に必要なリソソーム酵素である α-Gal A 活性が低下する（Brady et al, 1967）。病初期に α-Gal A 活性低下によりグロボトリアオシルセラミド（GL-3）及び血漿中グロボトリアオシルスフィンゴシン（lyso-Gb_3）を含むスフィンゴ糖脂質が蓄積し、その結果、疼痛、胃腸症状、腎不全、心筋症、脳血管イベント及び早期死亡を含むファブリー病の臨床症状及び致死的後遺症が発現する（Germain, 2010）。しかし、疾患の早期に治療を開始し、生涯にわたる治療の継続により疾患進行を遅らせることで、平均寿命を延長できる可能性がある。

ファブリー病はこれまで主に 2 つの表現型、古典型及び遅発型に分けられてきたが、その重症度及び発症年齢には大きなばらつきがある（Desnick et al, 2001; Filoni et al, 2010; Topaloglu et al, 1999; Shabbeer et al, 2002; Shabbeer et al, 2006; Ishii et al, 2007）。古典型は主に男性に発症し、α-Gal A 活性がほとんど又はまったく検出できず、早期より腎臓、心臓及び脳血管に症状が認められる。遅発型も主に男性に発症し、残存 α-Gal A 活性が古典型に比べて高く、疾患症状の発現は古典型より遅い。ヘテロ接合体女性患者は概して遅発型の症状を示すが、X 染色体不活化の程度によっては古典型の症状を示す場合もある。

ファブリー病を引き起こす *GLA* 変異として、900 を超える変異が報告されている（社内データ）。そのうち約 60%はミスセンス変異であり、α-Gal A に単一アミノ酸置換が生じている（Germain, 2010; Gal et al, 2006）。*GLA* のミスセンス変異によって、フォールディングに異常のある不安定な α-Gal A が生じる（Fan et al, 1999; Ishii et al, 2007）。多くの場合、ミスセンス変異は古典型ファブリー病と関連している（Filoni et al, 2010; Topaloglu et al, 1999; Shabbeer et al, 2002; Shabbeer et al, 2006; Ishii et al, 2007）。小胞体の正常な細胞内品質管理機構は、このような異常タンパク質のリソソームへの輸送を阻止し、これらを早期に分解、排除する。多くのミスセンス変異体は残存活性を有しており、α-Gal A 特異的な薬理学的シャペロンであるミガーラスタットの標的となる（Yam et al, 2005; Yam et al, 2006; Benjamin et al, 2009）。

低分子イミノ糖であるミガーラスタットは α-Gal A の基質 GL-3 から α-Gal A によって切断された末端ガラクトースのアナログである。全ての非臨床試験には、ミガーラスタット塩酸塩（開発コード：AT1001）を用いた。一連の *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床薬理試験において、ミガーラスタットは薬理学的シャペロンとして作用し、野生型 α-Gal A 及び特定の変異型 α-Gal A（感受性変異体）の活性部位に選択的かつ可逆的に、高い親和性で結合することが示されている（Ishii et al, 2007）。小胞体上の変異型 α-Gal A に結合したミガーラスタットは、変異型 α-Gal A を安定化させ、リソソームへの適切な輸送を促進する。リソソーム中でミガーラスタットから解離した α-Gal A は、蓄積した GL-3 及びグロボトリアオシルスフィンゴシン（lyso-Gb_3）を分解することが

できる（Yam et al, 2005; Yam et al, 2006; Aerts et al, 2008; Benjamin et al, 2009; Young-Gqamana et al, 2013）。ファブリー病患者のうち約 35%～50%がミガーラスタット塩酸塩の標的となる感受性変異体であり、感受性変異体に分類されるほとんどは古典型ファブリー病に関連している（Benjamin et al, 2009; Filoni et al, 2010; Germain et al, 2002; Shabbeer et al, 2006）。

1.2　非臨床開発プログラム

ミガーラスタットの非臨床試験を日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）によって定められたガイドラインに従って実施した。主要な安全性薬理試験及びトキシコキネティクス（TK）を含む毒性試験について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。全ての非臨床試験でミガーラスタット塩酸塩を用いた。これは最終製剤の製造で使用される原薬である。全ての非臨床試験で溶媒として水（静脈内投与の場合は生理食塩液）を用いた。動物でのミガーラスタットの消失半減期（$t_{1/2}$）は 9 時間未満と比較的短いことから、ほとんどの非臨床試験では、曝露量を増やすために投与間隔を約 6 時間とした 1 日 2 回投与レジメンを用いた。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験では、様々な *in vitro* 試験及びマウス *in vivo* モデルを用いて評価した。これらの試験計画で考慮した重要な点は、1）ファブリー病患者で検出されている多数の α-Gal A 変異のうち、どの変異がミガーラスタット塩酸塩に感受性を示すのかを明らかにすること、2）ミガーラスタット塩酸塩の作用は他のリソソーム酵素と比較して標的酵素に選択的であるかを評価すること、3）より強力な組織中 α-Gal A 活性増加作用及び基質（GL-3 及び lyso-Gb_3）低下作用をもたらすミガーラスタット塩酸塩投与レジメンの最適化である。*In vitro* 試験では、組換えヒト α-Gal A［rhα-Gal A、アガルシダーゼ ベータ（ファブラザイム®）及びアガルシダーゼ アルファ（リプレガル®）］を用いた酵素阻害試験や健康成人及びファブリー病患者由来の培養細胞株（リンパ芽球及び線維芽細胞）を用いたセルベースアッセイを実施した。ミガーラスタット塩酸塩の *in vivo* 作用は、マウス α-Gal A 遺伝子（*Gla*）ノックアウト（KO）マウスにヒト変異型 α-Gal A 導入遺伝子（ファブリー病に関連する R301Q）を発現させたファブリー病マウスモデル（hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス）を用いて評価した。安全性薬理試験では、QT 延長及びその他の心血管系パラメーター、中枢神経系及び呼吸器系に対するミガーラスタット塩酸塩の影響を評価した。

ミガーラスタット塩酸塩の吸収、分布、代謝及び排泄プロファイルはげっ歯類及び非げっ歯類で評価した。ミガーラスタット塩酸塩の吸収機序を考察するために、細胞透過性を *in vitro* 試験で評価した。ミガーラスタット塩酸塩の血漿タンパク結合及び肝細胞における *in vitro* 代謝については、非臨床試験で用いた動物種とヒトを比較した。また、主要なヒトシトクロム P450（CYP）に対する阻害作用並びにヒト肝細胞を用いて CYP1A2、CYP2B6 並びに CYP3A4 に対する誘導作用を評価した。包括的な取り込みトランスポーター及び排出トランスポーターのパネルを用いて、ミガーラスタット塩酸塩とトランスポーターとの相互作用を評価した。

ミガーラスタット塩酸塩の臨床評価をサポートするため、包括的な非臨床毒性試験を実施した。ミガーラスタット塩酸塩の反復投与毒性試験は、ラットで 6 ヵ月まで、サルで 9 ヵ月までの試験で評価した。いずれの動物種も α-Gal A に対する高い親和性が確認されている（2.6.2.2.1.2

項）。細菌を用いた復帰突然変異試験、哺乳類の細胞を用いた変異試験及び *in vivo* ラット骨髄小核試験を含む、一連の標準的な遺伝毒性試験では、ミガーラスタット塩酸塩の限界用量まで検討した。ミガーラスタット塩酸塩のがん原性は、トランスジェニック（Tg）.rasH2 マウスを用いた 26 週間試験及び従来のラット 104 週間がん原性試験で検討した。生殖発生毒性プロファイルは、ラット及びウサギで評価した。標準的な生殖発生毒性試験に加えて、初期の受胎能試験で観察された所見に基づき、それぞれ雄又は雌のみの受胎能を評価する試験を実施した。TK 試験では、血漿中及び乳汁中ミガーラスタット濃度をバリデーション済みの液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）法により測定した。バリデーションは全て GLP を遵守して実施した。TK パラメーターは WinNonLin 又は PhAST® 2.3-001 のノンコンパートメント解析により算出した。その他の毒性試験として、*Gla* KO マウスを用いたミガーラスタット塩酸塩及びアガルシダーゼ ベータの 28 日間反復併用投与毒性試験を実施した。

2　薬理試験

2.1　効力を裏付ける試験

ミガーラスタット塩酸塩の薬理作用を各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。*In vitro* 酵素阻害アッセイにより、アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファに対するミガーラスタットの結合は、可逆的かつ高親和性であり、阻害定数（K_i）は低ナノモルレベルであることが示された（試験番号 RR1001-01；2.6.2.2.1.1 項）。ミガーラスタット塩酸塩の K_i 値は、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトの肝ホモジネート α-Gal A において動物種間で類似していた（試験番号 RR1001-72；2.6.2.2.1.2 項）。ミガーラスタットとの結合により、アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファの物理的安定性が顕著かつ濃度依存的に増加し、時間、温度及び pH による α-Gal A の変性及び *ex vivo* でヒト全血中での α-Gal A の急速な不活性化を阻止した（試験番号 RR1001-01；2.6.2.2.1.1 項）.

ミガーラスタットが小胞体膜を通過し、野生型及び変異型の α-Gal A に結合し、安定化させる作用について、健常ドナー及び男性ファブリー病患者から採取した培養細胞株（リンパ芽球）を用いて評価した（試験番号 RR1001-29；2.6.2.2.1.3 項）。ミガーラスタット塩酸塩と 5 日間継続培養することで、野生型 α-Gal A 及び大半のミスセンス変異型 α-Gal A（n=49/75）の細胞中濃度及び活性が増加した（試験番号 RR1001-02；2.6.2.2.1.7.1 項）。ヒトリンパ芽球細胞株（健康成人又は 17 種のミスセンス変異を有する男性ファブリー病患者由来）における変異型 α-Gal A の活性上昇は、ミガーラスタット塩酸塩を培養培地から除去した後も持続した（試験番号 RR1001-04；2.6.2.2.1.4 項）。これらのデータから、活性を有する α-Gal A 変異体は、ミガーラスタット塩酸塩の除去後も、基質のターンオーバーが生じている間は上昇した活性が維持されていることが示唆された。

ミガーラスタットによる α-Gal A 活性上昇は濃度依存性で、同じ変異を有する個々の患者の細胞株及び細胞型で一貫して認められ、古典型及び遅発型ファブリー病と関連する変異型 α-Gal A で確認されている。これらの所見に基づいて、ヒト胚腎臓（HEK）細胞を用いた *in vitro* アッセイを開発し（preliminary HEK アッセイ又は clinical trial HEK アッセイ）、各 α-Gal A 変異体をミガーラスタット感受性又は非感受性のいずれかに分類した（試験番号 RR1001-19；2.6.2.2.1.7.2 項）。

本剤のウォッシュアウトに必要な時間を十分設けてミガーラスタットによる α-Gal A 活性阻害を最小限にすれば、ファブリー病患者の線維芽細胞において、ミガーラスタットによる α-Gal A 活性増加作用により GL-3 濃度を減少させることが示された（試験番号 RR1001-03；2.6.2.2.1.5 項）。GL-3 の異化に必要な α-Gal A がリソソーム内に輸送された時に α-Gal A 活性を阻害しないため、ミガーラスタットと α-Gal A との結合は可逆的であることが重要である。ミガーラスタットの細胞内 α-Gal A 活性阻害作用の可逆性を明らかにするため、細胞を用いた測定系をデザインし、基質ローディング後の正常ヒト線維芽細胞における GL-3 ターンオーバーの $t_{1/2}$ を測定した（試験番号 RR1001-28；2.6.2.2.1.6 項）。本試験系において、GL-3 ターンオーバーはかなり短い時間（数時間単位）で生じ、十分な最大 GL-3 クリアランス（ほぼベースライン値）が得られる

ことが示され、ミガーラスタット塩酸塩による細胞中 α-Gal A 活性阻害は薬剤除去後、迅速かつ完全に消失することが示唆された。

ミガーラスタット塩酸塩の *in vivo* 活性を *Gla* KO マウスにヒト変異型 α-Gal A 導入遺伝子を発現させた hR301Q α-Gal A Tg/KO マウスを用いて評価した。同マウスにおいて、週齢に依存したファブリー病関連組織中 GL-3 の蓄積が認められた（試験番号 RR1001-14；2.6.2.2.2.2.1 項）。ミガーラスタット塩酸塩を 4 週間自由飲水投与した結果、皮膚、心臓、腎臓、脳及び血漿における α-Gal A 濃度は有意かつ用量依存的に上昇し、GL-3 濃度は低下した（試験番号 RR1001-06；2.6.2.2.2.2.2 項、Khanna et al, 2010）。ミガーラスタット塩酸塩を 24 週間投与した結果、組織中 GL-3 濃度は 12 週間投与と比較してより大きく低下した（試験番号 RR1001-13；2.6.2.2.2.4.2 項）。ミガーラスタットの組織中 $t_{1/2}$（数時間）は、R301Q 変異型 α-Gal A 活性の $t_{1/2}$（数日）と比較して明らかに短かった（試験番号 RR1001-07；2.6.2.2.2.3 項）。このように $t_{1/2}$ に差があることから、ミガーラスタット塩酸塩投与直後の組織中薬剤濃度が高い時に小胞体で α-Gal A との結合及び安定化が得られ、リソソームへの輸送が促進され、その後、組織中ミガーラスタット濃度が低下してリソソーム内の α-Gal A 活性及び基質ターンオーバーが最大となると考えられる。そのため、投与回数を減らしたレジメン（隔日投与又は 4 日間の投与後 3 日間休薬する投与レジメン等）を用いてミガーラスタット塩酸塩を投与した結果、GL-3 濃度低下作用は連日投与よりも大きいことが示された（試験番号 RR1001-10；2.6.2.2.2.4.1 項）。投与回数を減らした 4 週間投与レジメンでは、アガルシダーゼ ベータ（1 mg/kg）の週 1 回投与時と同程度の GL-3 濃度低下作用が認められた。機能性内因性 α-Gal A タンパク質を欠損させたファブリー病マウスモデル（*Gla* KO）を用いてミガーラスタット塩酸塩の作用特異性を評価した（試験番号 RR1001-12；2.6.2.2.2.2.3 項）。同モデルにおいて組織中 α-Gal A 活性の有意な増加又は GL-3 濃度の低下は認められなかったことから、ミガーラスタット塩酸塩の作用は、野生型及び hR301Q α-Gal A Tg/KO マウスの α-Gal A に特異的であることが示された。

2.2　副次的薬理試験

ミガーラスタットはガラクトースと類似した構造を有するため、リソソームの内外で標的以外の酵素を阻害する可能性を検討した結果、いずれもオフターゲット作用は認められなかった。ミガーラスタットの α-Gal A に対する結合性は、他の 9 つのリソソーム加水分解酵素と比較して選択的であった（試験番号 RR1001-01；2.6.2.2.1.1 項）。ミガーラスタット塩酸塩により、明らかな阻害を受けた酵素は α- N -アセチルガラクトサミニダーゼ（NAGA）のみであった（10 µmol/L で 63%阻害）。ミガーラスタット塩酸塩の NAGA 及び α-Gal A に対する 50%阻害濃度（IC_{50} 値）はそれぞれ 6.94 µmol/L 及び 57.7 nmol/L で、NAGA に対する親和性は α-Gal A に対する親和性の約 120 分の 1 であった。また、ミガーラスタット塩酸塩（10 µmol/L）は、83 の受容体及び酵素に対して顕著な活性（50%以上の阻害又は促進）を示さず、α-Gal A と選択的に結合することが示された（試験番号 1080607；2.6.2.3.1 項）。ポンペ病及びゴーシュ病患者由来線維芽細胞株を用いた *in vitro* 試験（試験番号 RR1001-02；2.6.2.2.1.7.1 項）及び C57BL/6 マウスを用いた *in vivo* 試験（試験番号 RR1001-05；2.6.2.2.2.1 項）において、ミガーラスタット塩酸塩は酸性 α-グルコシダーゼ及び酸性 β-グルコシダーゼと比較して α-Gal A に選択的に作用することが示唆された。

ミガーラスタット塩酸塩は、ガラクトース代謝（ルロワール経路）に関与する酵素に影響を与えないことが示された（試験番号 2012N137381_00；2.6.2.3.3 項）。

ミガーラスタット塩酸塩は、正常ヒト線維芽細胞（CRL2076）及びヒト肝細胞（HepG2）に対して有意な細胞毒性作用を示さなかった（試験番号 RR1001-09；2.6.2.3.4 項）。

2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するミガーラスタット塩酸塩の影響を評価した。ミガーラスタット塩酸塩はヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャネル電流の活動電位に対して 47.5 µmol/L まで阻害作用を示さなかった（試験番号 1748/AMI/03；2.6.2.4.2.1 項）。ミガーラスタット塩酸塩の心血管系に対する作用をテレメトリー装着覚醒ビーグル犬にて検討した結果、100 mg/kg までの単回経口投与で有意な影響は認められなかった（試験番号 247/003；2.6.2.4.2.2 項）。ミガーラスタット塩酸塩の呼吸器系及び中枢神経系に対する作用を、それぞれラットを用いた空気圧式全身プレチスモグラフィ（試験番号 247/005；2.6.2.4.3 項）及び Irwin 試験（試験番号 247/004；2.6.2.4.1 項）にて検討した結果、いずれも 100 mg/kg までの単回経口投与で有意な影響は認められなかった。

2.4　薬力学的薬物相互作用

アガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータの定期的投与（酵素補充療法）はファブリー病治療の第一選択であり、臨床的有効性が認められている。しかし、これらの酵素は中性 pH で不安定である（Lieberman et al, 2009）、$t_{1/2}$ が短い（Eng et al, 2001a）、いくつかの細胞型や組織ではその取り込みが非効率でばらつきが大きい（Eng et al, 2001b; Germain et al, 2007; Germain, 2010; Keslová-Veselíková et al, 2008; Schiffmann et al, 2006）といった制限がある。近年、薬理学的シャペロンがリソソーム蓄積症の治療に使用される rhα-Gal A など複数の外因性酵素の安定化を促進し、細胞及び組織内取り込みを改善することが明らかにされている（Porto et al, 2009; Shen et al, 2008; Flanagan et al, 2009; Kornhaber et al, 2008; Benjamin et al, 2012）。一連の非臨床試験において、ミガーラスタットのアガルシダーゼ アルファ及びアガルシダーゼ ベータへの結合による中性 pH 緩衝液及びヒト血液中（*ex vivo*）での各酵素の物理的安定性の顕著な増加、並びに *in vivo* での各酵素の組織取り込み増加及び GL-3 減少が観察された（Benjamin et al, 2012、試験番号 RR1001-17、RR1001-37、RR1001-16、RR1001-20、RR1001-18、RR1001-21 及び RR1001-31；2.6.2.5 項）。ただし、ミガーラスタット塩酸塩の投与を受ける患者でのアガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータの使用は想定されていない。

3　薬物動態

3.1　分析法

薬物動態（PK）／TK 試験は、ミガーラスタット塩酸塩水溶液（静脈内投与では生理食塩液）を用いて実施した。マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサル血漿中ミガーラスタット濃度は、LC-MS/MS 法により 0.025 mL の血漿を用いて測定した（マウス：試験番号 AA94546-01 及び試験番号 AA95776-01、ラット：試験番号 AA03717-01、ウサギ：試験番号 AA26519-01、イヌ：試験番号 AA05331-01、サル：試験番号 AA19858-01；いずれも 2.6.4.2.1.1 項）。定量下限（LLOQ）は動物種で異なり、29.4～50.0 ng/mL であった。血漿試料の定量法として開発及びバリデートされた LC-MS/MS 法を用いて、ラット乳汁中ミガーラスタット濃度測定法のバリデーション試験を実施した。0.025 mL の乳汁を用いた際の LLOQ は 29.4 ng/mL であった（試験番号 AA95411-01；2.6.4.2.1.2 項）。

3.2　吸収

ヒト結腸がん由来の細胞株（Caco-2）細胞を用いた *in vitro* 細胞透過性試験より、ミガーラスタットは傍細胞経路を介して吸収されることが示唆された（試験番号 7AMICP1；2.6.4.3.1.1.1 項及び試験番号 9AMICP2；2.6.4.3.1.1.2 項）。

ミガーラスタット塩酸塩の単回及び反復投与による PK/TK 評価では、マウス、ラット、ウサギ、イヌ並びにサルを用いた。これらは、本剤の薬理学的及び毒性学的評価で用いた動物種・系統であった（マウス：試験番号 RR1001-08、試験番号 RR1001-35、試験番号 ITR70575 及び試験番号 ITR70576、ラット：試験番号 ITR5881、試験番号 ITR5850、試験番号 AA31159、試験番号 AA17017 及び試験番号 G4970、ウサギ：試験番号 AA26552、イヌ：試験番号 ITR6003 及び試験番号 ITR2978、サル：試験番号 AA17225 及び試験番号 AA17227、いずれも 2.6.4.3.2 項）。TK 評価は、1 日 1 回又は 2 回の経口投与による毒性試験の裏付けとして実施した。

In vivo の PK/TK 試験では、全ての動物種において、ミガーラスタットは経口投与後に速やかに吸収され、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は概して投与後 0.5～2 時間であった。その後、血漿中ミガーラスタット濃度は速やかに低下し、$t_{1/2}$ の平均値は 9 時間未満であった。この $t_{1/2}$ と一致して、反復投与による血漿中ミガーラスタットの蓄積は認められなかった。マウスでは、バイオアベイラビリティは約 50%以上と高かった。全ての動物種において、ミガーラスタットの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）の増加率は高用量において用量比を下回ったが、検討した用量範囲ではミガーラスタットの経口吸収の飽和を示唆する所見は認められなかった。ヒトでは、本剤の申請用量であるミガーラスタット塩酸塩 150 mg（ミガーラスタットとして 123 mg）を含む 75～1250 mg の用量範囲では $AUC_{0\text{-}t}$ は概して用量比例的に増加し、ミガーラスタットの経口吸収の飽和を示唆する所見は認められなかった（FAB-CL-101 試験；2.7.2.2.1.2 項及び FAB-CL-104 試験；2.7.2.2.1.3 項）。TK データから、様々な毒性試験で検討した全ての用量で、ミガーラスタットの十分な血漿中曝露量が得られていたことが確認された。ミガーラスタットの PK に一貫した性差は認められなかった。

3.3　分布

ミガーラスタットの血漿タンパク結合率は極めて低く、動物（マウス、ラット及びサル）及びヒトでは広範な血漿中濃度範囲で非結合率は 88%～122%であった（試験番号 0332-145-02；2.6.4.4.1.1.1 項）。^{14}C-ミガーラスタット塩酸塩を用いたラットの組織分布試験では、放射能は全身に広く分布し、血漿中に比べて血液中からの消失は遅かった（試験番号 XBL08605；2.6.4.4.2.2 項）。同試験で、脳中濃度は投与 4 時間後に最大値を示し、投与 1 時間後に血液中濃度の約 13%まで達したことから、ミガーラスタットは血液－脳関門を通過することが示唆された。また、出生前及び出生後の発生に関する試験では、ラットで胎盤通過性が認められたが、投与 1 時間後の胎児の血漿中濃度は母動物の血漿中濃度の 6%～11%であった（試験番号 AA94762；2.6.4.4.2.3 項）。

3.4　代謝

In vitro で、ミガーラスタットはラット、サル又はヒトの肝細胞中で代謝的に安定であった（試験番号 0332-145-01；2.6.4.5.1.1 項）。^{14}C-ミガーラスタット塩酸塩を用いた *in vivo* 代謝プロファイル試験により、種々の代謝物が検出されたものの、ラット血漿、尿及び糞中の主要な放射能成分は未変化体であることが確認された（試験番号 XBL08605；2.6.4.5.2.1 項）。いずれの試料中でも代謝物ピークはわずかしか検出されず、投与量の 4.3%を超えるものはなかった。

3.5　排泄

ラットにおける ^{14}C-ミガーラスタット塩酸塩の単回経口投与後、放射能は 24～48 時間以内に主に糞中及び尿中にそれぞれ投与放射能の 51%～67%及び 17%～38%が排泄され、ミガーラスタットの主要排泄経路は糞中であることが示された（試験番号 XBL08605；2.6.4.6.1.1 項及び試験番号 XBL07625；2.6.4.6.1.2 項）。これらの結果から、ミガーラスタットの消失に対する代謝の寄与はわずかであると結論付けられた。

また、ラットで乳汁移行性が認められ、投与 4 時間後の乳汁中濃度は血漿中濃度に比べて 2.5～8.1 倍高かった（試験番号 AA94762；2.6.4.6.1.3 項）。

3.6　薬物動態学的薬物相互作用

ミガーラスタットは、ヒト肝ミクロソームにおいて CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 を *in vitro* で著しく阻害せず（試験番号 XT115084；2.6.4.7.1.3 項）、ヒト肝細胞において CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 を誘導しなかった（CYP1A2 及び CYP3A4：XBL07624；2.6.4.7.1.1 項、CYP2B6：XBL15798；2.6.4.7.1.2 項）。また、ミガーラスタットはヒト肝細胞中で代謝的に安定であったことから、CYP によって代謝されないことが示唆された。これらの結果から、肝臓での CYP を介した臨床的に重要な薬物間相互作用は生じないことが示唆された。ミガーラスタットは、排出トランスポーターである乳がん耐性タンパク質（BCRP）、P 糖タンパク質（P-gp、別名：MDR1）及び Bile salt export pump（BSEP）並びに取り込みトランスポーターである Organic anion transporting polypeptide

（OATP）1B1、OATP1B3、Organic anion transporter（OAT）1、OAT3、Organic cation transporter（OCT）1、OCT2、Multidrug and toxin extrusion protein（MATE）1 及び MATE2-K を阻害しなかった（試験番号 Amicus-01-02Dec2014；2.6.4.7.2.1 項）。また、ミガーラスタットは BCRP、P-gp、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 又は OCT2 の基質ではなかった（試験番号 Amicus-02-28Apr2015 及び試験番号 Amicus-04-03Nov2015；いずれも 2.6.4.7.2.2 項）。さらに、ミガーラスタットは、消化管のグルコース吸収を制御するナトリウム・グルコース共役輸送体（SGLT）である SGLT1 に対して低親和性ではあるものの基質／阻害剤であることが示された（試験番号 2011N125700_00；2.6.4.7.2.3 項及び試験番号 2011N125739_00；2.6.4.7.2.4 項）一方、SGLT2 の基質／阻害剤ではなかった（試験番号 OPT-2015-091；2.6.4.7.2.5 項及び試験番号 OPT-2015-090；2.6.4.7.2.6 項）。これらの結果から、トランスポーターを介した臨床的に重要な薬物間相互作用は生じないことが示唆された。

4　毒性試験

4.1　単回及び反復投与毒性試験

単回及び反復投与毒性試験において、ミガーラスタット塩酸塩の忍容性は良好であった。ミガーラスタット塩酸塩を、ラットに 1500 mg/kg（試験番号 ITR5879；2.6.6.2.1 項）及びビーグル犬に 316 mg/kg（試験番号 ITR6001；2.6.6.2.2 項）をそれぞれ単回経口投与したとき、いずれも忍容性は良好であり、概略の致死量はそれぞれ 1500 mg/kg 超及び 316 mg/kg 超であった。

Tg.rasH2 マウスを用いたがん原性試験の用量選択のため、CByB6F1 マウスを用いた 28 日間反復投与試験を実施し、ミガーラスタット塩酸塩（0、500、1000 及び 2000 mg/kg/日、遊離塩基換算）を 1 日 1 回経口投与した（試験番号 ITR70575；2.6.6.3.1.1 項）。投与に関連する唯一の所見は、1000 及び 2000 mg/kg/日を投与した雌並びに 2000 mg/kg/日を投与した雄での大腸（盲腸、結腸及び直腸）の軽微～軽度の急性びまん性粘膜炎症であった。本試験で用いた投与液の濃度が高かったことから、本局所刺激所見に臨床的意義はないものと考えられる。本試験の結果に基づき、マウス 26 週間がん原性試験の高用量には雄で 1000 mg/kg/日、雌で 500 mg/kg/日を選択した。

ラット 14 日間反復投与試験では、最高用量 1500 mg/kg/日までミガーラスタット塩酸塩の忍容性は良好であった（試験番号 ITR5850；2.6.6.3.2.2 項）。ラット 26 週間反復投与毒性試験では、ミガーラスタット塩酸塩 0、100、500 及び 1500 mg/kg/日（投与間隔は約 6 時間、1 回投与量：0、50、250 及び 750 mg/kg）を 1 日 2 回経口投与した。1500 mg/kg/日で軟便が認められた。病理組織学的検査では、脾臓のリンパ濾胞の軽微～軽度増加が全投薬群の雌雄で認められた（試験番号 AA17017；2.6.6.3.2.3 項）。1500 mg/kg/日では、脾臓重量の増加も認められた。免疫毒性作用は認められず、ラット 104 週間がん原性試験では、検討した 800/1200 mg/kg/日までのいずれの用量においても、脾臓に投薬関連所見は認められなかった（試験番号 G4970；2.6.6.5.2 項）。ラット 104 週間がん原性試験における最高用量での曝露量（第 37 週の $AUC_{0\text{-}t}$：176000 ng•hr/mL）は、ラット 26 週間がん原性試験で検討した最高用量である 1500 mg/kg/日での曝露量（第 181 日の $AUC_{0\text{-}t}$：248355 ng•hr/mL）よりもわずかに低いが、より長期間（2 年及び 6 ヵ月）の投与後でも脾臓に投薬関連所見は認められなかった。したがって、本試験で観察された脾臓での所見は有害所見とみなさず、NOAEL は、500 mg/kg/日と判断した。

サル 39 週間反復投与試験では、検討した最高用量 500 mg/kg/日（第 267/268 日の $AUC_{0\text{-}t}$：305823 ng•hr/mL）まで投薬に関連する影響は認められなかった（試験番号 AA17227；2.6.6.3.4.2 項）。

4.2　遺伝毒性試験

ミガーラスタット塩酸塩は、細菌を用いる復帰突然変異試験（代謝活性化の存在下又は非存在下、最高濃度 5000 µg/プレート：試験番号 247/001；2.6.6.4.1.1 項）、マウスリンフォーマ *TK* 試験（代謝活性化の存在下又は非存在下、最高濃度 5000 µg/mL：試験番号 247/002；2.6.6.4.1.2 項）及び *in vivo* ラット骨髄小核試験（2000 mg/kg/日で 2 日間経口投与：試験番号 AA18463；

2.6.6.4.2.1 項）を含む一連の標準的な遺伝毒性試験において、いずれも最高用量まで遺伝毒性を示さなかった。

4.3　がん原性試験

Tg.rasH2 マウスの雄に 0、100、300 及び 1000 mg/kg/日、雌に 0、50、150 及び 500 mg/kg/日（遊離塩基換算）のミガーラスタット塩酸塩を 1 日 1 回 26 週間経口投与し、がん原性を検討した（試験番号 ITR70576；2.6.6.5.1 項）。本試験の用量は、CByB6F1 マウスを用いた 28 日間用量設定試験に基づいて選択した。マウス 26 週間がん原性試験において、生存率、腫瘍発現率及び検討した組織での増殖性病変の発現率に対し、ミガーラスタット塩酸塩投与に関連した影響は認められなかった。一方、陽性対照であるウレタン投与群では、溶媒投与群と比較して有意な生存率の低下及び腫瘍発現率の増加が認められ、本試験系の既知の発がん性物質への反応性が確認された。

ミガーラスタット塩酸塩の発がん性は、ラット 104 週間がん原性試験でも評価した（試験番号 G4970；2.6.6.5.2 項）。当初の投与用量は 50、200 及び 800 mg/kg/日（投与間隔は約 6 時間、1 回投与量：25、100 及び 400 mg/kg、1 日 2 回）とし、高用量は、ヒトにミガーラスタット塩酸塩を 150 mg の用量で隔日投与した際の曝露量（推定臨床曝露量）に基づき、25 倍の安全域を得ることができる用量として設定した。高用量群には第 1 週から第 35 週まで 800 mg/kg/日を投与したが、第 1 日及び第 29 週の AUC が推定臨床曝露量の 25 倍未満であったため、第 36 週以降は用量を 1200 mg/kg/日に増量した。増量後の曝露量は、推定臨床曝露量の 39.0 倍となり、目標安全域である 25 倍を大幅に上回った。本試験では、高用量群（800/1200 mg/kg/日）の雄で膵島細胞腺腫の発現率（20%）が対照群（6%）と比較して増加した。この差は、対比較では統計学的に有意（p=0.0056）であり、本試験に使用した Harlan Sprague-Dawley ラットで報告されている自然発生率を超えていた。しかし、以下で考察する科学的根拠の重要度に基づく評価（weight-of-evidence アプローチ）の結果、本所見と投与との関連性はないと判断した。

対比較で統計学的有意差が認められたが、ラットで通常よくみられるこの良性腫瘍の発現率が用量依存性の線形増加を示すか否かを検討した傾向検定では、統計学的有意差は認められなかった。膵島細胞の過形成、がん腫並びに腺腫及びがん腫の合計の発現率に投薬に関連した増加は認められず、腺腫の発現促進を示唆する所見も認められなかった。また、これらの腫瘍が、試験で早期に死亡した動物の死因又は疾病の原因とは考えられなかった。さらに、雌の膵島細胞腺腫の病理組織学的所見は、全投薬群で同様であった。高用量群の雌のミガーラスタット曝露量は雄と同程度であったが、膵島細胞腺腫の発現率増加は認められなかった。ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（それぞれ 26 週間及び 39 週間）における曝露量は、本ラットがん原性試験の高用量群の雄の曝露量を超えていたが、病理組織学的検査又は剖検で膵臓に変化は認められなかった。また、Tg.rasH2 マウス 26 週間がん原性試験では、がん原性を示唆する所見は認められなかった。

ラット 104 週間がん原性試験報告書によると、1996 年～2002 年までに本試験に使用した Harlan Sprague-Dawley ラットを用いて実施したがん原性試験はわずか 3 件であり、これら試験で得られた背景値に基づいて、薬剤投与と雄の膵島細胞腺腫との関連性を判定している。本試験報

告書に記載されている背景値での発現率は、本試験の対照群で報告された発現率（6%）未満であった。 本知見及び Harlan 社から入手可能な Sprague-Dawley ラットに関する背景値が限られていることから、Charles River 社の Sprague-Dawley（Crl SD）ラットの背景値も用いて、weight-of-evidence アプローチを行った。重要なのは研究所の所在地がヨーロッパであるか、米国であるかに関わらず、Sprague-Dawley ラットのコロニーの大半では、自由摂餌させた場合に膵島細胞腺腫の発現率が高くなることである（Anver et al, 1982; Greaves and Faccini, 1992; Dillberger, 1994; Molon-Noblot et al, 2001）。24 ヵ月試験で報告されている発現率は様々であるが、全体として雄の 10%～20%強で認められている（Greaves and Faccini, 1992; Dillberger, 1994）。これら腫瘍は一般的に雌と比較して雄でよく見られ、遅発性に発現し、24 ヵ月試験の終了時付近で急激に増加することが多い（Anver et al, 1982; Dillberger, 1994）。膵島細胞腫瘍は雌ラットでも発現するが、発現率は雄の半分程度である。しかし、変動が大きく、試験内で群間差が認められる可能性がある（Molon-Noblot et al, 2001; Baldrick, 2005）。Harlan Sprague-Dawley ラットにおける雄の膵島細胞腫瘍の発現率（10%、Harlan Laboratories, Study C11963）は、他の供給先からの Sprague-Dawley ラットと比較して、わずかに低いとは言えないものの同程度であると考えられる。

当初、本試験で認められた高用量群の雄における膵島細胞腺腫の発現率は高いと考えられたが、雄全体での発現率は約 10%（250 匹中 26 匹）であり、この系統のラットでは典型的な値の範囲内である。用量依存的な統計学的有意差は認められなかったこと、また同程度の曝露量が得られた雌（$AUC_{0\text{-}t}$ は雌で 168000 ng•hr/mL、雄で 184000 ng•hr/mL）で同様の影響が認められなかったことから、高用量群の雄で報告された本腫瘍発現率増加は偶発的である可能性が高く、投薬との関連性はないと判断した。腺腫の発現時期及びその病理組織学的所見は全群で同様であり、本腫瘍が自然発生的なものであるという結論を裏付けている。また、膵島細胞腺腫と膵島細胞がんを併せた発現率に統計学的有意な群間差は認められず、膵島細胞がんの発現率にも、統計学的有意な群間差は認められなかった。

以上より、weight-of-evidence アプローチから、104 週間がん原性試験で雄の Harlan Sprague-Dawley ラットに発現した膵島細胞腺腫は投薬に関連しないことが示された。本腫瘍は高齢の Sprague-Dawley ラット（特に雄）で高頻度かつ自然発生する腫瘍であり、ヒトでのがんリスク評価での重要性は低い。膵島細胞腫瘍は Sprague-Dawley ラットで高頻度に発現するが、ヒトでは極めてまれである（Frankel, 2006）。比較病理学の観点から、ラットの試験で非遺伝毒性異物投与後に発現する膵島細胞腫瘍などの内分泌腺腫瘍は、ヒトでの安全性評価ではそれほど重要ではないと考えられる（Capen et al, 2001; Edler et al, 2014）。外部の専門家による病理学的検討でも、高用量群の雄ラットにおける膵島細胞腺腫と投薬との関連性はないことが裏付けられている（RR1001-64）。

4.4　生殖発生毒性試験

雌雄ラット受胎能試験において処置雄と処置又は無処置雌を交配させた際、ミガーラスタット塩酸塩 100、500 及び 1500 mg/kg/日（投与間隔は約 6 時間、1 回投与量：50、250 及び 750 mg/kg、1 日 2 回）投与により受胎能の有意な低下が認められた（試験番号 AA26533；2.6.6.6.1.1 項）。自動精子解析では、精子の総数、形態又は運動率に投薬に関連する影響は示さ

れなかった。また、雄ラットの生殖器官の病理組織学的検査では、投与による変化は認められなかった。4 週間の休薬期間後、全投薬群において、低下した受胎能は完全に回復した。雄ラットの受胎能低下に対する NOAEL を求めるため、2 回目の受胎能試験を実施し、ミガーラスタット塩酸塩 0、2.5、10 及び 25 mg/kg/日（投与間隔は約 6 時間、0、1.25、5 及び 12.5 mg/kg の 1 回用量で 1 日 2 回）を雄ラットに投与した（試験番号 AA31159；2.6.6.6.1.2 項）。25 mg/kg/日群の雄の受胎能に投薬に関連する明らかな低下が認められた。中及び低用量群の受胎能パラメーターは、用量依存性は認められなかったが背景値の下限値であるか、又はそれをわずかに下回った。高用量群での結果を考慮して、中及び低用量群での所見は、おそらく投薬に関連すると判断した。本試験における雄の受胎能に関する NOAEL は 2.5 mg/kg/日未満であった。次に実施した雌の受胎能試験では、ミガーラスタット塩酸塩を 0、10、100 及び 1000 mg/kg/日（投与間隔は約 6 時間、0、5、50 及び 500 mg/kg の 1 回用量で 1 日 2 回）の用量で雌ラットに投与し、未処置の雄ラットと交配させた（試験番号 AA93208；2.6.6.6.1.3 項）。本試験でミガーラスタット塩酸塩の有害作用は認められなかった（NOAEL は 1000 mg/kg/日）。以上 3 つの受胎能試験より、ミガーラスタット塩酸塩は雄ラットの受胎能を低下させるが、雌ラットの受胎能に影響を及ぼさないことが確認された。器官重量、精巣又は付属器官の病理組織学的検査所見及び精子パラメーター（総数、運動率及び形態）に投薬に関連する影響は観察されず、ミガーラスタット塩酸塩は、精子形成ではなく、成熟精子に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。4 週間の休薬期間後、処置雄の 90%～100%は交配に成功しており、また雌が妊娠していることから、観察された受胎能低下は比較的速やかかつ完全に回復することが示された。別のイミノ糖であるミグルスタット（N-ブチルデオキシノジリマイシン、ブレーザベス®）は、日本ではニーマン・ピック病 C 型治療薬として承認されているが、これまで雄げっ歯類での受胎能低下が報告されており（van der Spoel et al, 2002; Walden et al, 2006）、ミガーラスタット塩酸塩による雄の受胎能低下作用は全く予想外というわけではない。

ラットに 1500 mg/kg/日まで（試験番号 AA26551；2.6.6.6.2.1 項）、またウサギに 750 mg/kg/日（試験番号 AA26552；2.6.6.6.2.3 項）までミガーラスタット塩酸塩を投与した胚・胎児毒性試験では、催奇形性を示唆する所見は認められなかった。ラットにおける母動物及び胚・胎児毒性に関する NOAEL は 1500 mg/kg/日と判断した。ウサギ胚・胎児毒性試験の用量は、非妊娠ウサギでの最大耐量（MTD）を検討した試験結果を基に（試験番号 AA27674；2.6.6.6.2.2 項）0、120、300 及び 750 mg/kg/日とした。本試験では、300 及び 750 mg/kg/日を投与した妊娠ウサギで、投与期間中、中等度～顕著な摂餌量低下及び明らかな体重減少（750 mg/kg/日）又は体重増加抑制傾向（300 mg/kg/日）が認められた。母動物毒性の認められた 300 及び 750 mg/kg/日群では、対照群と比較して用量依存的な胚・胎児死亡数の増加、胎児体重低下並びに骨化遅延及び軽度の骨格変異の頻度増加が認められた。ウサギの母動物及び胚・胎児毒性に関する NOAEL は 120 mg/kg/日と判断した。ラットの出生前及び出生後の発生、並びに出生児の生殖能に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を検討した結果、1000 mg/kg/日までいずれも影響は観察されなかった（試験番号 AA94762；2.6.6.6.3.1 項）。

幼若動物を用いた試験は実施していない。

4.5　局所刺激性試験

ミガーラスタット塩酸塩の毒性試験は、臨床での予定投与経路である経口投与で実施されていることから、独立した局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性は実施された毒性試験で評価されている。

4.6　その他の毒性試験

4.6.1　併用投与毒性試験

Gla KO マウスを用いてミガーラスタット塩酸塩及びアガルシダーゼ ベータを 28 日間反復併用投与した結果、忍容性プロファイルに対する併用投与の影響はいずれも認められなかった（試験番号 RR1001-11；2.6.6.8.1 項）。溶媒対照群、ミガーラスタット塩酸塩 3.66 mg/kg／アガルシダーゼ ベータ併用群又はアガルシダーゼ ベータ単独群と比較して、ミガーラスタット塩酸塩 36.6 mg/kg 群（アガルシダーゼ ベータの静脈内投与 30 分前又は 3 時間後）での死亡率は高い傾向にあり、併用投与による影響である可能性を完全には否定できなかった。しかし、死亡は低用量群及び溶媒対照群を含む全群で静脈内投与後早期に観察されたことから、ストレス及び／又は過剰な拘束に起因すると考えられた。これは、げっ歯類にアガルシダーゼ ベータ又はミガーラスタット塩酸塩を単独投与した際に毒性を示唆する所見は認められないこと、さらに本試験の溶媒対照群でも死亡が認められたことからも支持されるが、死因の詳細は不明である。

4.6.2　免疫毒性試験

ミガーラスタット塩酸塩の反復投与毒性試験の結果から、免疫毒性は示唆されなかった。

4.6.3　代謝物の毒性試験

ミガーラスタットのクリアランスに代謝の寄与は少なく、ヒトに特異的な代謝物もないため、代謝物に関する独立した毒性試験は実施しなかった。

4.6.4　不純物及び分解生成物の評価

不純物及び分解生成物を用いた毒性試験は実施しなかった。ICH ガイドライン Q3A（R2）「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」及び Q3B（R2）「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」で規定する閾値を超える不純物又は分解物は、原薬又は製剤中に存在しない。

4.6.5　光安全性に関する評価

ミガーラスタット塩酸塩は、検討した最高濃度である 1 cm セル中 0.05 mol/L でも波長 290～700 nm の光を吸収しなかった（試験番号 RR1001-65；2.6.6.8.2 項）。モル吸光係数（MEC）はこの波長域で 1000 L mol^{-1} cm^{-1} 未満であることから、ミガーラスタット塩酸塩は光反応性ではなく、光毒性を有しないと考えられる。したがって、ICH ガイドライン S10「医薬品の光安全性評価ガイドラインについて」に基づき、非臨床光安全性試験は実施しなかった。

5　総括及び結論

低分子イミノ糖であるミガーラスタットは GL-3 の末端ガラクトースのアナログである。一連の *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床薬理試験において、ミガーラスタットは薬理学的シャペロンとして作用し、野生型 α-Gal A 及び特定の変異型 α-Gal A（感受性変異体）の活性部位に選択的かつ可逆的に、高い親和性で結合することが示された。ミガーラスタットの小胞体上変異型 α-Gal A に対する結合及び安定化は酵素のリソソームへの輸送を促進し、リソソーム中でミガーラスタットから解離した α-Gal A は蓄積した GL-3 を分解することができる。

In vitro 及び *in vivo* 薬理試験において、ミガーラスタット塩酸塩による α-Gal A 活性の増加は休薬後も持続し、上昇した変異酵素活性の $t_{1/2}$ はミガーラスタットの組織中 $t_{1/2}$ よりも明らかに長いことが示されている。この $t_{1/2}$ の違いにより、投与頻度の少ないレジメンはより高いリソソーム内 α-Gal A 活性の増加（すなわち、リソソーム内の α-Gal A 活性及び GL-3 減少を最大にするために、存在するミガーラスタットとそのクリアランスとの最適バランスを得ること）をもたらす。この知見は hR301Q α-Gal A Tg/KO マウスを用いた試験で明らかにされており、組織中 GL-3 濃度は、連日投与より投与頻度を減らして投与（隔日投与又は 4 日間の投与後 3 日間休薬する投与サイクル等）した場合により大きく低下した。臨床でミガーラスタット塩酸塩の隔日投与レジメンを選択した理由の一つは、非臨床試験で連日投与と比較して投与頻度を減らして投与した場合に GL-3 濃度低下作用はより大きいことが一貫して示されたためである。

第 3 相臨床試験でミガーラスタット塩酸塩 150 mg の隔日投与を選択した理由の一つとして、ファブリー病マウスモデルである hR301Q α-Gal A Tg/KO マウスを用いた非臨床薬理試験結果が挙げられる。本モデルではミガーラスタット塩酸塩の至適用量は 30 mg/kg（遊離塩基換算）であり、同用量では検討した全ての組織において無処置群と比較して有意な α-Gal A 活性増加及び GL-3 減少が観察された。より高用量でも更なる効果の増大は認められなかった。マウスとヒトでの曝露量の比較検討において、マウスにミガーラスタット塩酸塩を遊離塩基換算で 30 mg/kg 単回経口投与した時の曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$：18400 ng•hr/mL；試験番号 RR1001-08）は、第 2 相試験でヒトにミガーラスタット塩酸塩 150 mg を単回経口投与した時の曝露量（$AUC_{0\text{-}inf}$：12858 ng•hr/mL）と同程度であった。

ミガーラスタットがリソソームの内外で標的以外の酵素を阻害する可能性を検討した結果、いずれもオフターゲット作用は認められなかった。ミガーラスタットにより、明らかな阻害を受けた酵素は NAGA のみであった（10 μmol/L で 63%阻害）。しかし、ヒトで有害作用の兆候が現れるのは、NAGA 活性が持続的かつほぼ完全に損失している場合に限られることから、臨床投与レジメンに従って投与されたミガーラスタット塩酸塩によって NAGA 活性阻害に関連した有害作用が生じる可能性は極めて低い。

ミガーラスタット塩酸塩の PK/TK は、毒性試験で用いられた動物種において十分に評価されている。マウス及びヒトでは、経口投与後に速やかに吸収され、バイオアベイラビリティは約 50%以上と高かった。ラットに ^{14}C-ミガーラスタット塩酸塩を投与後の放射能は全身に広く分布し、24 時間以内に大半が消失した。ミガーラスタットは、ラットにおいて胎盤通過性及び乳汁移行性を有することが示された。ミガーラスタットの血漿タンパク結合率は、検討されたいずれ

の動物種（ヒトも含む）においても非常に低かった。*In vitro* 及び *in vivo* 代謝データによると、ミガーラスタットの全身からの消失に代謝はほとんど寄与せず、大半が糞及び尿中に未変化体として排泄された。ラットの血漿及び排泄物中には種々の代謝物が検出されたが、投与量の 4.3%を超える代謝物はなく、大半が未変化体であった。これは、放射性標識化合物を用いたヒトでの代謝・排泄試験で認められた代謝・排泄プロファイルと同様である（AT1001-014 試験；2.7.2.2.1.5 項）。*In vitro* 試験より、ミガーラスタットは検討したいずれの CYP に対しても阻害能を有さず、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 誘導能も有さなかった。また、ミガーラスタットはヒト肝細胞中で代謝的に安定であったことから、CYP によって代謝されないことが示唆された。ミガーラスタットは、排出トランスポーターである BCRP、P-gp 及び BSEP、並びに取り込みトランスポーターである OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K を阻害しなかった。また、ミガーラスタットは BCRP、P-gp、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 又は OCT2 の基質ではなかった。さらに、ミガーラスタットは SGLT1 に対して低親和性ではあるものの基質／阻害剤であることが示された。一方、SGLT2 の基質／阻害剤ではなかった。これらの結果に基づくと、ミガーラスタットが他の低分子と薬物間相互作用を生じる可能性は低いと考えられた。

安全性薬理試験において、ミガーラスタット塩酸塩は hERG カリウムチャネル電流の活動電位に対して 47.5 µmol/L まで阻害作用を示さなかった。これは、患者にミガーラスタット塩酸塩 150 mg を隔日投与した際の C_{max}（1180 ng/mL=7.23 µmol/L）の約 6.6 倍である。ミガーラスタット塩酸塩（単回経口投与）はいずれも 100 mg/kg までラットの中枢神経系及び呼吸器系に対して影響しなかった。ラットの TK データから、ミガーラスタット塩酸塩 100 mg/kg 単回経口投与時の C_{max} は 9484 ng/mL と推定され、ミガーラスタット塩酸塩 150 mg を隔日投与した患者の C_{max}（1180 ng/mL）の約 8 倍であった。ミガーラスタット塩酸塩（単回経口投与）は 100 mg/kg までイヌの心血管系に対して影響しなかった。イヌの TK データから、同用量での C_{max} は 38950 ng/mL 以上と推定され、ミガーラスタット塩酸塩 150 mg を隔日投与した患者の C_{max} の約 33 倍であった。安全域が大きく安全性薬理試験において有害作用は認められなかったことから、ミガーラスタット塩酸塩を患者に投与した時、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に有害作用が生じるリスクは低いと考えられる。

単回及び反復投与毒性試験において、ミガーラスタット塩酸塩の忍容性は良好であり、AUC に基づく長期投与毒性の安全域は 20 倍以上であった（表 2.4 - 1）。また、試験に用いたいずれの動物種においても、標的器官毒性に一貫した傾向は認められなかった。マウスで認められた標的器官毒性は大腸の粘膜炎症のみであり、28 日間反復投与試験での NOAEL は雌で 500 mg/kg/日、雄で 1000 mg/kg/日（遊離塩基換算）と判断された。本試験で用いた投与液の濃度が高かったことから、本局所刺激所見に臨床的意義はないものと考えられる。ラット 26 週間反復投与試験では、1500 mg/kg/日で軟便が認められた。また、全投薬群（100、500、1500 mg/kg/日）で、病理組織学的検査により脾臓のリンパ濾胞の軽微～軽度増加が認められ、1500 mg/kg/日では、脾臓重量の増加が観察された。本試験で免疫毒性作用は認められなかった。脾臓における投薬関連所見は、ラット 104 週間がん原性試験では最高用量 800/1200 mg/kg/日まで認められなかった。ラット 104 週間がん原性試験での最高用量での曝露量は、ラット 26 週間試験での最高用量での曝露

量よりもわずかに低いが、より長期間（6ヵ月間に対し2年間）の投与後でも脾臓に投薬関連所見は認められなかった。また、サル39週間試験では、曝露量がわずかに高かったにも関わらず、脾臓に投薬関連所見は認められなかった。したがって、ラット26週間反復投与試験で観察された脾臓での所見は有害所見とみなさず、本試験のNOAELは500 mg/kg/日と判断した。サル39週間反復投与毒性試験では、ミガーラスタット塩酸塩は、検討した最高用量である500 mg/kg/日まで有意な作用を示さなかった。

ミガーラスタット塩酸塩は、一連の遺伝毒性試験で、細菌を用いる復帰突然変異試験及び*in vitro*マウスリンフォーマ*TK*試験で遺伝子突然変異を認めず、また、*in vivo*ラット小核試験で染色体損傷を認めなかった。Tgマウスを用いた26週間がん原性試験において、ミガーラスタット塩酸塩はがん原性を示さなかった。Harlan Sprague-Dawleyラットを用いた104週間がん原性試験では、高用量群（800/1200 mg/kg/日、第36週に増量）で膵島細胞腺腫の発現率（20%）が対照群（6%）と比較して増加したが、weight-of-evidenceアプローチで、このラットで通常よく見られる自然発生病変である膵島細胞腺腫の発現率増加は、偶発所見であり、臨床的意義はないことが確認された。

生殖毒性試験では、全用量（2.5 mg/kg/日以上）で受精確認後に雄の受胎能低下が認められた。処置雄と無処置雌を交配させた際の妊娠に同様の影響が認められたことから、この受胎能低下は、雄でのみ認められる影響と結論付けられた。器官重量、精巣又は付属器官の病理所見及び精子パラメーター（総数、運動率及び形態）に投薬の影響は観察されず、ミガーラスタット塩酸塩は精子形成ではなく、成熟精子に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。しかし、4週間の休薬期間後、処置雄の90%～100%は交配に成功しており、また雌が妊娠していることから、観察された受胎能低下は比較的速やかかつ完全に回復することが示された。ミガーラスタットはイミノ糖であり、このクラスの薬剤は、げっ歯類の雄で可逆性の受胎能低下を誘発することが既に報告されている。ミガーラスタット塩酸塩の作用は、男性の可逆的避妊薬として探索的研究されているミグルスタットで報告されている作用と同様であった（Kogan and Wald, 2014）。ミグルスタットの短期及び長期投与により、雄マウスで受胎能が低下したが、6～9週間の休薬期間中に回復している（van der Spoel et al, 2002; Walden et al, 2006）。ミグルスタット投与マウスから採取した精子を解析した結果、精子の総数に変化は認められなかったが、精子の運動率は75%以上低下し、精子及び先体の形態に顕著な異常が観察された。ミグルスタット投与マウスから採取した精子は、*in vitro*試験において、透明帯と適切に結合及び貫通することができず、卵母細胞に受精できないことが示唆されている（Suganuma et al, 2005）。ミガーラスタット及びミグルスタットの受胎能試験でいずれも受胎能低下が認められたことから、ミガーラスタットも精子先体反応阻害作用を有している可能性がある。

表 2.4 - 1　マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトでのミガーラスタット塩酸塩経口投与後血漿中曝露量及び安全域

Type of study	NOAEL (mg/kg/day)	AUC_{0-t} (ng•hr/mL)	Margin of Safety [a] (2xAUC_{0-t} at NOAEL / human AUC_{0-t})	Study number
Repeat Dose Toxicity Studies				
26-Week in Rats	500	96659	21.4	AA17017
39-Week in Monkey	500	305823	67.7	AA17227
Carcinogenicity Study				
Mice	1000 (male) [b] 500 (female) [b]	121000 94400	26.8 20.9	ITR70576
Rats	800/1200	103000 at 800 mg/kg/day and 176000 at 1200 mg/kg/day	22.8/39.0	G4970
Reproductive Development studies				
Male and Female Fertility Study in Rats	<100	19152 [c]	<4.24	AA26533
Male Fertility Study	<2.5	736	<0.163	AA31159
Embryo-Fetal Development Study in Female Rats	1500	116664 [c]	25.8	AA26551
Embryo-Fetal Toxicity Study in Rabbits	120 (female)	334988	74.2	AA26552
Clinical study				
Predicted PK from Study AT1001-011	150 mg QOD (proposed therapeutic dose)	9033		MGM 116016

a　Margins of safety were calculated by doubling the AUC_{0-t} values obtained in the nonclinical toxicity studies and comparing them to the estimated human AUC value since the animals were treated daily whereas the clinical dosing regimen is once every other day.
b　Doses are based on free base equivalents (correction factor: 1.22)
c　AUC_{0-t} based on mean AUC results on Day 14 at a dose level of 100 or 1500 mg/kg/day in the 14-day repeat-dose toxicity study in rats (ITR5850).
NOAEL = no-observed-adverse-effect level; QOD = *quaque altera die* (every other day)

以上、ミガーラスタット塩酸塩に関する一連の薬理試験結果から、本剤はファブリー病で認められる変異酵素 α-Gal A に特異的な薬理学的シャペロンとしての作用機序を有することが裏付けられ、ミガーラスタット塩酸塩は α-Gal A 活性を増加させ、蓄積した基質を減少させることが明らかになった。ラット及びサル反復投与毒性試験結果から、ミガーラスタット塩酸塩は広い安全域を持つことが示唆された。ラット及びサル反復投与毒性試験結果を基にした患者への予定臨床用量／曝露量に対する安全域は 20 倍以上である。ミガーラスタット塩酸塩は、遺伝毒性、がん原性及び催奇形性をいずれも示さない。非臨床毒性試験で唯一認められた臨床的意義のある所見は、雄ラットでの可逆的な受胎能低下であり、同様の所見が他のイミノ糖（ミグルスタット）で

も認められている。ミガーラスタット塩酸塩を用いた一連の非臨床薬理及び安全性評価結果は、本剤のファブリー病治療薬としての承認申請をサポートするものである。

6　参考文献

Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Feb;105(8):2812-7. (4.3.1)

Anver MR, Cohen BJ, Lattuada CP, Foster SJ. Age-associated lesions in barrier-reared male Sprague-Dawley rats: a comparison between Hap: (SD) and Crl:COBS[R]CD[R](SD) stocks. Exp Aging Res. 1982 Spring;8(1 Pt 1):3-24. (4.3.2)

Baldrick P. Carcinogenicity evaluation: Comparison of tumor data from dual control groups in the Sprague–Dawley rat. Toxicol Pathol. 2005;33:283-91. (4.3.4)

Benjamin ER, Flanagan JJ, Schilling A, Chang HH, Agarwal L, Katz E, et al. The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin increases alpha-galactosidase A levels in Fabry patient cell lines. J Inherit Metab Dis. 2009 Jun;32(3):424-40. (4.3.5)

Benjamin ER, Khanna R, Schilling A, Flanagan JJ, Pellegrino LJ, Brignol N, et al. Co-administration with the pharmacological chaperone AT1001 increases recombinant human α-galactosidase A tissue uptake and improves substrate reduction in Fabry mice. Mol Ther. 2012 Apr;20(4):717-26. (4.3.6)

Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease: Ceramidetrihexosidase deficiency. N Engl J Med. 1967 May 25;276(21):1163-7. (4.3.8)

Capen CC, Karbe E, Deschl U, George C, Germann PG, Gopinath C, et al. Endocrine system. In International Classification of Rodent Tumors. The Mouse. Mohr U, editor. Springer Berlin; 2001, 269-322. (4.3.9)

Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α-Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, edited by Scriver C, Beaudet A, Sly W, and Valle D. 8th edition. New York: McGraw-Hill, 2001, 3733-74. (4.3.11)

Dillberger JE. Age-related pancreatic islet changes in Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 1994;22:48-55. (4.3.12)

Edler L, Hart A, Greaves P, Carthew P, Coulet M, Boobis A, et al. Selection of appropriate tumour data sets for Benchmark Dose Modelling (BMD) and derivation of a Margin of Exposure (MoE) for substances that

are genotoxic and carcinogenic: Considerations of biological relevance of tumour type, data quality and uncertainty assessment. Food Chem Toxicol. 2014;70:264-89. (4.3.13)

Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, Goldman M, Phelps R, Kim L, et al. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. Am J Hum Genet. 2001a Mar;68(3):711-22. (4.3.14)

Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. N Engl J Med. 2001b Jul 5;345(1):9-16. (4.3.15)

Eurordis (ECRD Report) 2005. European Conference on Rare Diseases. Luxembourg, Eurordis. (4.3.16)

Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. Nat Med. 1999 Jan;5(1):112-5. (4.3.17)

Filoni C, Caciotti A, Carraresi L, Cavicchi C, Parini R, Antuzzi D, et al. Functional studies of new GLA gene mutations leading to conformational fabry disease. Biochim Biophys Acta. 2010 Feb;1802(2):247-52. (4.3.19)

Flanagan JJ, Rossi B, Tang K, Wu X, Mascioli K, Donaudy F, et al. The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase. Hum Mutat. 2009 Dec;30(12):1683-92. (4.3.20)

Frankel WL. Update on pancreatic endocrine tumors. Arch Pathol Lab Med. 2006;130:963-6. (4.3.21)

Gal A, Schafer E, Rohard I. The genetic basis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford; Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 33. (4.3.22)

Germain DP, Shabbeer J, Cotigny S, Desnick RJ. Fabry disease: twenty novel α-galactosidase A mutations and genotype-phenotype correlations in classical and variant phenotypes. Mol Med. 2002 Jun;8(6):306-12. (4.3.26)

Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, Bushinsky DA, Charrow J, Desnick RJ, et al. Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease. J Am Soc Nephrol. 2007 May;18(5):1547-57. (4.3.27)
Germain D. Fabry disease. Orphanet J Rare Dis. 2010;5:30. (4.3.28)

Greaves P, Faccini JM, editors. Pancreas. A Glossary for use in Toxicity and Carcinogenicity Studies. Elsevier, Amsterdam;1992. p. 118-26. (4.3.30)

Harlan Laboratories, Inc., Generation of Historical Control Data for the Hsd:Sprague Dawley®SD® rat for up to 104 Weeks - Study C11963. (4.3.31)

Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. Biochem J. 2007 Sep 1;406(2):285-95. (4.3.32)

Keslová-Veselíková J, Hůlková H, Dobrovolný R, Asfaw B, Poupětová H, Berná L, et al. Replacement of alpha-galactosidase A in Fabry disease: effect on fibroblast cultures compared with biopsied tissues of treated patients. Virchows Arch. 2008 Jun;452(6):651-65. (4.3.33)

Khanna R, Soska R, Lun Y, Feng J, Frascella M, Young B, et al. The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin reduces tissue globotriaosylceramide levels in a mouse model of Fabry disease. Mol Ther. 2010 Jan;18(1):23-33. (4.3.34)

Kogan P, Wald M. Male Contraception: History and Development. Urol Clin North Am. 2014; 41(1): 145-61. (4.3.35)

Kornhaber GJ, Tropak MB, Maegawa GH, Tuske SJ, Coales SJ, Mahuran DJ, et al. Isofagomine induced stabilization of glucocerebrosidase. Chembiochem. 2008 Nov 3;9(16):2643-9. (4.3.36)

Lieberman RL, D'aquino JA, Ringe D, Petsko GA. Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. Biochemistry. 2009 Jun 9;48(22):4816-27. (4.3.37)

Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. Lancet. 2012 Jan 28;379(9813):335-41. (4.3.38)

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA. 1999 Jan 20;281(3):249-54. (4.3.39)

Molon-Noblot S, Keenan KP, Coleman JB, Hoe CM, Laroque P. The effects of ad libitum overfeeding and moderate and marked dietary restriction on age-related spontaneous pancreatic islet pathology in Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2001 May-Jun;29(3):353-62. (4.3.40)

Porto C, Cardone M, Fontana F, Rossi B, Tuzzi MR, Tarallo A, et al. The pharmacological chaperone N-butyldeoxynojirimycin enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts. Mol Ther. 2009 Jun;17(6):964-71. (4.3.41)

Schiffmann R, Rapkiewicz A, Abu-Asab M, Ries M, Askari H, Tsokos M, et al. Pathological findings in a patient with Fabry disease who died after 2.5 years of enzyme replacement. Virchows Arch. 2006 Mar;448(3):337-43. (4.3.42)

Shabbeer J, Yasuda M, Luca E, Desnick RJ. Fabry disease: 45 novel mutations in the α -galactosidase A gene causing the classical phenotype. Mol Genet Metab. 2002 May;76(1):23-30. (4.3.43)

Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, Desnick RJ. Fabry disease: identification of 50 novel α-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. Hum Genomics. 2006 Mar;2(5):297-309. (4.3.44)

Shen JS, Edwards NJ, Hong YB, Murray GJ. Isofagomine increases lysosomal delivery of exogenous glucocerebrosidase. Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 16;369(4):1071-5. (4.3.45)

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al., High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet. 2006 Jul;79(1):31-40. (4.3.48)

Suganuma R, Walden CM, Butters TD, Platt FM, Dwek RA, Yanagimachi R, et al. Alkylated imino sugars, reversible male infertility-inducing agents, do not affect the genetic integrity of male mouse germ cells during short-term treatment despite induction of sperm deformities. Biol Reprod. 2005 Apr;72(4):805-13. (4.3.49)

Topaloglu AK, Ashley GA, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, et al. Twenty novel mutations in the α-galactosidase A gene causing Fabry disease. Mol Med. 1999 Dec;5(12):806-11. (4.3.50)

van der Spoel AC, Jeyakumar M, Butters TD, Charlton HM, Moore HD, Dwek RA, et al. Reversible infertility in male mice after oral administration of alkylated imino sugars: A nonhormonal approach to male contraception. PNAS. 2002:99(26):17173-8. (4.3.51)

Walden CM, Butters TD, Dwek RA, Platt FM, van der Spoel AC. Long-term non-hormonal male contraception in mice using N-butyldeoxynojirimycin. Hum Reprod. 2006 May;21(5):1309-15. (4.3.52)

Yam GH, Zuber C, Roth J. A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. FASEB J. 2005 Jan;19(1):12-8. (4.3.54)

Yam GH, Bosshard N, Zuber C, Steinmann B, Roth J. Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Apr;290(4):C1076-82. (4.3.55)

Young-Gqamana B, Brignol N, Chang HH, Khanna R, Soska R, Fuller M, et al. Migalastat HCl reduces globotriaosylsphingosine (lyso-Gb_3) in Fabry transgenic mice and in the plasma of Fabry patients. PLoS One. 2013;8(3):e57631. (4.3.56)