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）

2.6.1　緒言

Amicus Therapeutics 株式会社

目次

1　医薬品の構造及び薬理学的特性に関する簡潔な情報 5

2　申請する効能・効果 6

3　申請する用法・用量 6

4　参考文献 7

図目次

図 2.6.1 - 1　ミガーラスタット塩酸塩の化学構造..... 5

略号及び用語の説明

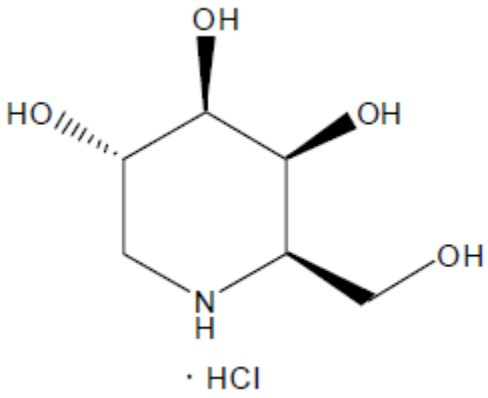
略号及び用語	日本語	英語
α-Gal A	α-ガラクトシダーゼ A	α-Galactosidase A
AT1001	ミガーラスタット塩酸塩の開発コード	Development code of migalastat hydrochloride
GL-3	グロボトリアオシルセラミド	Globotriaosylceramide
GLA	α-Gal A をエンコードしている遺伝子	Gene that encodes α-Gal A

1　医薬品の構造及び薬理学的特性に関する簡潔な情報

ファブリー病は、リソソーム加水分解酵素の α-ガラクトシダーゼ A（α-Gal A）をエンコードしている遺伝子（*GLA*）の変異によって生じる X 染色体連鎖性リソソーム蓄積症である。α-Gal A 活性が欠乏すると、末端に α-ガラクトース構造を有するスフィンゴ糖脂質［主にグロボトリアオシルセラミド（GL-3）］が皮膚、心臓、腎臓、脳及びその他の組織細胞のリソソーム及びリソソーム以外のコンパートメントに蓄積し（Brady et al, 1967; Desnick et al, 2001）、本疾患を惹起する一因となる（Askari et al, 2007）。

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。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 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（Garman and Garboczi, 2002; Garman and Garboczi, 2004; Garman, 2007; Benjamin et al, 2009; Lieberman et al, 2009; Khanna et al, 2010; Germain, 2010; Giugliani et al, 2013）。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 及びその他の基質を分解することができる（Yam et al, 2005; Ishii et al, 2007; Khanna et al, 2010）。ミガーラスタット塩酸塩（(*2R,3S,4R,5S*)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol monohydrochloride）の化学構造を図 2.6.1 - 1 に示す。

図 2.6.1 - 1 ミガーラスタット塩酸塩の化学構造



The molecular formula is $C_6H_{13}NO_4 \cdot HCl$
The molecular weight is 199.63

2　申請する効能・効果

本剤に反応性のある *GLA* 遺伝子変異を伴うファブリー病

3　申請する用法・用量

通常、成人にはミガーラスタットとして 1 回 123 mg を食事の前後 2 時間を避けて空腹時に隔日経口投与する。投与時刻は毎回一定とする。

4　参考文献

Askari H, Kaneski CR, Semino-Mora C, Desai P, Ang A, Kleiner DE, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. Virchows Arch. 2007 Oct;451(4):823-34. (4.3.3)

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)

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)

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. New York: McGraw-Hill, 2001, 3733-74. (4.3.11)

Garman SC, Garboczi DN. Structural basis of Fabry disease. Mol Genet Metab. 2002 Sep-Oct;77(1-2):3-11. (4.3.23)

Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. J Mol Biol. 2004 Mar 19;337(2):319-35. (4.3.24)

Garman SC. Structure-function relationships in alpha-galactosidase A. Acta Paediatr. 2007 Apr;96(455):6-16. (4.3.25)

Germain DP. Fabry disease. Orphanet J Rare Dis. 2010;5:30. (4.3.28)

Giugliani R, Waldek S, Germain DP, Nicholls K, Bichet DG, Simosky JK, et al. A Phase 2 study of migalastat hydrochloride in females with Fabry disease: selection of population, safety and pharmacodynamic effects. Mol Genet Metab. 2013 May;109(1):86-92. (4.3.29)

Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, et al. Mutant alpha-galacatosidase 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)

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)

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)

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)

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）

2.6.2　薬理試験の概要文

Amicus Therapeutics 株式会社

目次

1　まとめ 8

2　効力を裏付ける試験 11

2.1　*In vitro* 試験 11

2.1.1　rhα-Gal A 及び野生型 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の結合性及び安定化作用 11

2.1.2　各動物種 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の結合親和性 16

2.1.3　野生型及び各種変異型 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の結合親和性 17

2.1.4　ミガーラスタット塩酸塩と培養後の健康成人及びファブリー病患者由来リンパ芽球 における野生型及び変異型 α-Gal A 活性の $t_{1/2}$ 17

2.1.5　ファブリー病患者由来線維芽細胞中 GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用 19

2.1.6　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 $t_{1/2}$ に対するミガーラスタット塩酸塩の作用 20

2.1.7　ミガーラスタット塩酸塩反応性変異型 α-Gal A の同定 22

2.2　*In vivo* 試験 26

2.2.1　C57BL/6 マウス組織中 α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の作用 26

2.2.2　hR301Q α-Gal A Tg/KO 及び *Gla* KO マウス組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用 27

2.2.3　ミガーラスタット塩酸塩休薬後の hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性 推移 31

2.2.4　長期投与時の組織中 GL-3 濃度に対する投与頻度の影響 32

3　副次的薬理試験 40

3.1　受容体及び酵素スクリーニング 40

3.2　他のリソソーム酵素に及ぼす影響 40

3.3　ヒト赤血球でのガラクトース代謝（ルロワール経路）関連酵素に及ぼす影響 40

3.4　正常ヒト線維芽細胞又はヒト肝細胞に及ぼす影響 41

4　安全性薬理試験 42

4.1　中枢神経系 42

4.2　心血管系 42

4.2.1　*In vitro* 試験 42

4.2.2　*In vivo* 試験 43

4.3　呼吸器系 43

5　薬力学的薬物相互作用試験 44

5.1　*In vitro* 試験：酵素補充療法との併用作用 44

5.1.1　α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ／ミガーラスタット塩酸塩併用作用 44

5.1.2　α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ アルファ 又はアガルシダーゼ ベータ／ミガーラスタット塩酸塩併用作用 48

5.2　*In vivo* 試験：酵素補充療法との併用作用 49

5.2.1　ラット及び *Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータ／ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 50

5.2.2　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ 及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 55

5.2.3　*Gla* KO マウスでの組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対する アガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 61

6　考察及び結論 66

7　参考文献 68

表目次

表 2.6.2- 1　アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ アルファに対する ミガーラスタット塩酸塩の K_i 値 11

表 2.6.2- 2　各動物種の α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の IC_{50} 及び K_i 値 17

表 2.6.2- 3　ミガーラスタット塩酸塩と培養後の 健康成人及びファブリー病患者由来リンパ芽球における α-Gal A 活性の $t_{1/2}$ 19

表 2.6.2- 4　ミガーラスタット塩酸塩の hERG カリウムチャネル電流に及ぼす影響 43

表 2.6.2- 5　各ファブリー病患者由来線維芽細胞株における α-Gal A タンパク質量及び酵素活性並びに GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 46

図目次

図 2.6.2- 1　薬理学的シャペロン – 作用機序 8

図 2.6.2- 2　アガルシダーゼ ベータ及び内因性 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の活性阻害作用 12

図 2.6.2- 3　ミガーラスタット塩酸塩の NAGA 及び α-Gal A に対する活性阻害作用 13

図 2.6.2- 4　ミガーラスタット塩酸塩のアガルシダーゼ ベータに対する安定化作用 14

図 2.6.2- 5　ミガーラスタット塩酸塩のアガルシダーゼ アルファに対する安定化作用 14

図 2.6.2- 6　アガルシダーゼ ベータ変性に対するミガーラスタット塩酸塩の影響（pH 7.4） 15

図 2.6.2- 7　ヒト全血でのアガルシダーゼ ベータ不活化に対するミガーラスタット塩酸塩の影響 16

図 2.6.2- 8　ミガーラスタット塩酸塩と培養後の 健康成人又はファブリー病患者由来リンパ芽球における α-Gal A 活性推移 18

図 2.6.2- 9　ファブリー病患者由来線維芽細胞でのミガーラスタット塩酸塩による GL-3 濃度低下作用 20

図 2.6.2- 10　ミガーラスタット塩酸塩添加基質ローディング後の野生型ヒト線維芽細胞における GL-3 ターンオーバーの経時推移 21

図 2.6.2- 11　アガルシダーゼ ベータをプレローディングしたミガーラスタット塩酸塩添加基質ローディング後の野生型ヒト線維芽細胞における GL-3 ターンオーバーの経時推移 22

図 2.6.2- 12　臨床表現型によるミガーラスタット塩酸塩に対する反応性の違い 24

図 2.6.2- 13　C57BL/6 マウス組織中 α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の作用 27

図 2.6.2- 14　週齢の異なる hR301Q α-Gal A Tg/KO 及び *Gla* KO マウス組織中での GL-3 濃度 28

図 2.6.2- 15　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用 30

図 2.6.2- 16　ミガーラスタット塩酸塩休薬後の hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性の経時推移 32

図 2.6.2- 17　ミガーラスタット塩酸塩連日投与及び 4-on/3-off 投与レジメンによる hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対する作用の比較 33

図 2.6.2- 18　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対する投与頻度の影響 34

図 2.6.2- 19　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩及びアガルシダーゼ ベータの作用 36

図 2.6.2- 20　幼若 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 に対する ミガーラスタット塩酸塩長期（24 週間）投与の作用 38

図 2.6.2- 21　成熟 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 に対する ミガーラスタット塩酸塩長期（12 及び 24 週間）投与の作用 39

図 2.6.2- 22　ファブリー病患者由来線維芽細胞中 α-Gal A タンパク質量及び酵素活性に対する アガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 45

図 2.6.2- 23　ファブリー病患者由来線維芽細胞中 GL-3 濃度に対する アガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 48

図 2.6.2- 24　ラットの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及び ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 51

図 2.6.2- 25　ラットの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ及び ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 52

図 2.6.2- 26　*Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 53

図 2.6.2- 27　*Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ及び ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 54

図 2.6.2- 28　アガルシダーゼ アルファの血漿中薬物動態に対する ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 55

図 2.6.2- 29　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 56

図 2.6.2- 30　*Gla* KO マウスの組織中 GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ及び ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 57

図 2.6.2- 31　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 58

図 2.6.2- 32　*Gla* KO マウスにおけるミガーラスタット塩酸塩併用投与による アガルシダーゼ ベータ投与後の組織中 GL-3 濃度低下増加作用 60

図 2.6.2- 33　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ及び ミガーラスタット塩酸塩の併用作用 63

図 2.6.2- 34　*Gla* KO マウスの組織中 GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用 64

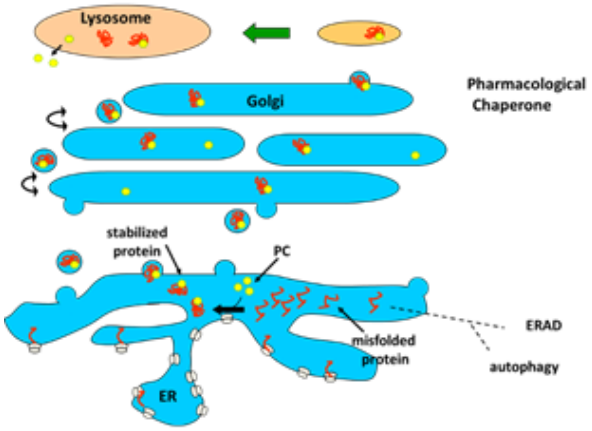
略号及び用語の説明

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
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	Chinese hamster ovary
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum observed plasma concentration
EC_{50}	50%有効濃度	Concentration yielding 50% of the maximal effect
GAA	酸性 α-グルコシダーゼ	Acid α-glucosidase
GCase	酸性 β-グルコシダーゼ	Acid β-glucosidase
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 Practices
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
K_i	阻害定数	Dissociation constant for binding of inhibitor to enzyme
K_m	ミカエリス定数	Michaelis constant; concentration of substrate that leads to half-maximal velocity of an enzyme's activity
KO	ノックアウト	Knockout
lyso-Gb_3	グロボトリアオシルスフィンゴシン	Globotriaosylsphingosine
NAGA	α- N -アセチルガラクトサミニダーゼ	α-N-acetylgalactosaminidase
rhα-Gal A	組換えヒト α-Gal A	Recombinant human α-Gal A
$t_{1/2}$	消失半減期	Elimination half-life
TK	トキシコキネティクス	Toxicokinetics
T_m	融点	Melting temperature
UDP	ウリジン二リン酸	Uridine diphosphate
UMP	ウリジン一リン酸塩	Uridine monophosphate

1　まとめ

ファブリー病は、リソソーム加水分解酵素の α-ガラクトシダーゼ A（α-Gal A）をエンコードしている遺伝子（*GLA*）の変異によって生じる X 染色体連鎖性リソソーム蓄積症である。α-Gal A 活性が欠乏すると、末端に α-ガラクトース構造を有するスフィンゴ糖脂質［主にグロボトリアオシルセラミド（GL-3）及びグロボトリアオシルスフィンゴシン（lyso-Gb_3）］が皮膚、心臓、腎臓、脳及びその他の組織細胞のリソソーム及びリソソーム以外のコンパートメントに蓄積し（Brady et al, 1967; Desnick et al, 2001）、本疾患を惹起する一因となる（Askari et al, 2007）。ファブリー病の治療には、薬理学的シャペロン療法が推奨されている（Fan and Ishii, 2003; Shin et al, 2007）。薬理学的シャペロンは小胞体上で特定の変異型 α-Gal A と選択的に結合して安定化させ、リソソームへの適切な輸送を促進して、リソソーム酵素活性を増加させる（Fan et al, 1999; Fan and Ishii, 2003; Benjamin et al, 2009）（図 2.6.2- 1）。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。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。ミガーラスタットは、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（Garman and Garboczi, 2002; Garman and Garboczi, 2004; Garman, 2007; Benjamin et al, 2009; Lieberman et al, 2009; Khanna et al, 2010; Germain, 2010; Giugliani et al, 2013）。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、培養細胞及び *in vivo* で蓄積した GL-3 を分解することができる（Yam et al, 2005; Ishii et al, 2007; Khanna et al, 2010）。

図 2.6.2- 1　薬理学的シャペロン – 作用機序



Lysosomal enzymes are responsible for the degradation of a wide variety of substrates. Inherited mutations in the genes that encode these proteins can lead to reduced stability of newly synthesized lysosomal enzymes. While often catalytically competent, the mutated enzymes are often unable to efficiently pass the quality control mechanisms of the endoplasmic reticulum, resulting in reduced lysosomal trafficking, substrate accumulation, and cellular dysfunction. Pharmacological chaperones are small molecules that bind and stabilize mutant lysosomal enzymes, thereby allowing proper cellular translocation. Such compounds have been shown to increase enzyme activity and reduce substrate burden in a number of preclinical models and clinical studies.
PC = pharmacological chaperone, ER = endoplasmic reticulum, ERAD = endoplasmic reticulum-associated degradation

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（Gal et al, 2006; Benjamin et al, 2017）。多くの場合 *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）。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の標的となる（Yam et al, 2005; Shin et al, 2008; Benjamin et al, 2009; Wu et al, 2011）。*GLA* 変異体の約 35%～50%が、ミガーラスタットの標的となる感受性変異体である。

ミガーラスタット塩酸塩の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* 及び *in vivo* モデルを用いて評価した。*In vitro* 酵素阻害アッセイにより、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®）］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。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。ミガーラスタットの結合は、α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ（NAGA）を含む他のリソソーム加水分解酵素及びガラクトース経路酵素と比較して、α-Gal A に選択的であった。ミガーラスタットとの結合により、アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ 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 の変性並びに *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。

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（リンパ芽球及び線維芽細胞等）を用いて評価した。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 及び評価した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。ミガーラスタット塩酸塩による α-Gal A 活性増加は濃度依存性で、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。

ミガーラスタット塩酸塩の *in vivo* 活性をマウス 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。同マウスモデルに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、脳及び血漿中における α-Gal A 活性は有意かつ用量依存的に上昇し、GL-3 濃度は低下した（Khanna et al, 2010）。ミガーラスタット塩酸塩を 24 週間自由飲水投与した結果、より短い投与期間（12 週間）の場合と比較して組織中 GL-3 濃度はより大きく低下した。ミガーラスタットの組織中消失半減期（$t_{1/2}$）（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。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低下によりリソソーム内の 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。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。

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 100 mg/kg までの単回強制経口投与で、中枢神経系（ラット）、心血管系（イヌ）及び呼吸器系（ラット）に対していずれも影響しなかった。ま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。

In vitro 及び *in vivo* 薬理学的薬物相互作用試験において、ミガーラスタット塩酸塩と酵素補充療法の併用により、酵素安定性、組織取り込み及び GL-3 濃度低下作用等の有益な相互作用が生じることが示された。

全ての *in vivo* 試験の投与溶媒として、ミガーラスタット塩酸塩には水を、アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ アルファには生理食塩液を用いた。

2　効力を裏付ける試験

2.1　*In vitro* 試験

2.1.1　rhα-Gal A 及び野生型 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の結合性及び安定化作用

（試験番号 RR1001-01、添付資料番号 4.2.1.1.1、評価資料）

本試験は、ミガーラスタット塩酸塩の α-Gal A への結合及び安定化並びに選択性を評価するため、以下を目的として実施した。

- ミガーラスタット塩酸塩の rhα-Gal A（アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ アルファ）に対する結合の K_i 値を pH の関数として求める。
- ミガーラスタット塩酸塩の他のリソソーム加水分解酵素及び市販されている他の酵素に対する選択性を検討する。
- アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ アルファの物理的安定性に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を検討する。

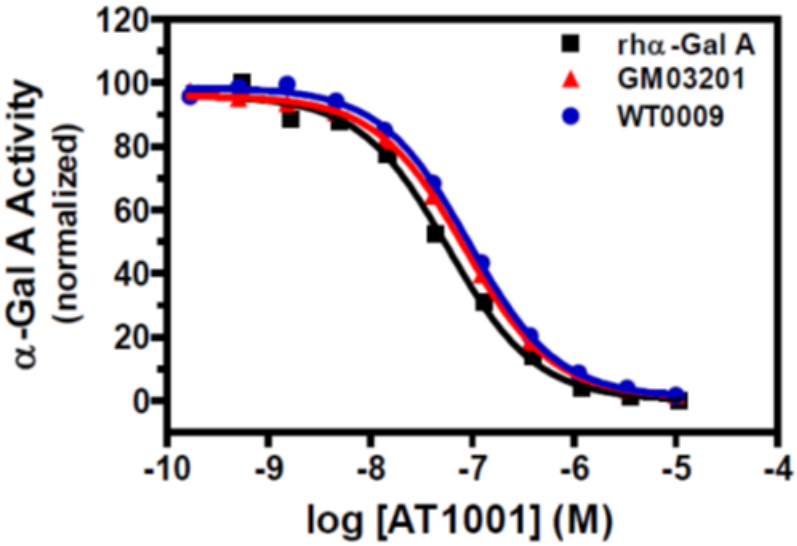
標的とする補充ヒト酵素（アガルシダーゼ アルファ及びアガルシダーゼ ベータ）を用いたこれら試験により、ミガーラスタット塩酸塩は中性 pH（小胞体内類似条件）及び酸性 pH（リソソーム内類似条件）のいずれでも、外因性 α-Gal A に結合することが明らかになった（表 2.6.2-1）。また、正常ヒトリンパ芽球由来粗溶解物を用いて pH 4.6 で実施した別の阻害試験では、ミガーラスタット塩酸塩は、外因性 α-Gal A と同様に、内因性 α-Gal A とも結合することが示された（図 2.6.2- 2）。

表 2.6.2- 1　アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ アルファに対するミガーラスタット塩酸塩の K_i 値

	Agalsidase beta		Agalsidase alfa	
pH	n	K_i (nmol/L) mean ± SD	n	K_i (nmol/L) mean ± SD
4.6	7	27.5 ± 7.4	Not determined	
5.2	2	10.6 ± 0.4	2	10.9 ± 0.6
7.0	3	16.1 ± 1.0	3	16.5 ± 1.8

n = number, Ki = dissociation constant for binding of inhibitor to enzyme, SD = standard deviations.
Source: Study RR1001-01, Table 2 and Table3

図 2.6.2- 2　アガルシダーゼ ベータ及び内因性 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の活性阻害作用



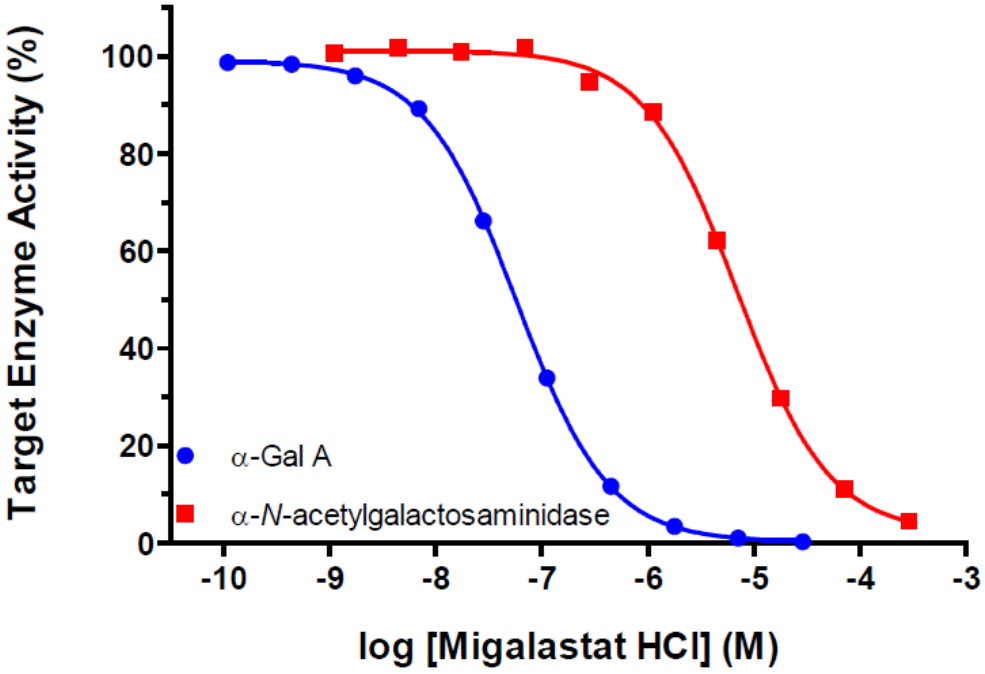
Migalastat HCl (AT1001) inhibits the activity of rhα-Gal A (agalsidase beta) and the activity of α-Gal A in lysates prepared from two different normal human lymphoblast cell lines (GM03201 and WT0009). In the experiments shown, the IC_{50} values for inhibition of α-Gal A activity at pH 4.6 were 58 nmol/L, 83 nmol/L, and 93 nmol/L for rhα-Gal A, GM03201 lysates, and WT0009 lysates, respectively. Each point represents the mean of duplicate determinations. The rhα-Gal A inhibition curve is representative of five independent experiments; the GM03201 and WT0009 inhibition curves are representative of four and five independent experiments, respectively. Data were normalized to the α-Gal A activity in the absence (100% value) and presence of 10 µmol/L migalastat HCl (0% value).
HCl = hydrochloride, rhα-Gal A = recombinant human α-Gal A, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration
Source: Study RR1001-01, Figure 1

ミガーラスタット塩酸塩の α-Gal A に対する選択性を評価するため、他のリソソーム加水分解酵素活性に対するミガーラスタット塩酸塩の阻害作用を検討した。正常ヒト線維芽細胞から調製した粗溶解物を、濃度 10 µmol/L のミガーラスタット塩酸塩の存在下及び非存在下に 10 種のリソソーム加水分解酵素（α-Gal A、酸性 α-グルコシダーゼ［GAA］、酸性 β-グルコシダーゼ［GCase］、β-ガラクトシダーゼ、α-マンノシダーゼ、β-マンノシダーゼ、β-N-アセチルグルコサミニダーゼ［β-ヘキソサミニダーゼ A］、β-グルクロニダーゼ、α-L-フコシダーゼ、NAGA）の基質と pH 4.6 でインキュベーションした。ミガーラスタット塩酸塩は、α-Gal A（95%阻害）、NAGA（63%阻害）及び β-ガラクトシダーゼ（25%阻害）を除き、いずれの酵素においてもほとんど又は全く阻害作用を示さなかった。

培養正常ヒト線維芽細胞由来溶解物中の NAGA 及び α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の *in vitro* 阻害作用を図 2.6.2- 3 に示した。ミガーラスタット塩酸塩の NAGA 及び α-Gal A 活性に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 6.94 µmol/L 及び 57.7 nmol/L であり、NAGA に対するミガーラスタットの親和性は α-Gal A に対する親和性の約 1/120 であった。NAGA は糖タンパク質及び糖脂質から α-N-アセチルガラクトサミニル部分を取り除くリソソーム酵素である。極めて稀な常染色体性劣性遺伝疾患であるシンドラー病は、NAGA の著しい欠損（98%の持続的活性消失）を特徴とする。本疾患では、神経変性及び精神運動障害に関連する徴候が認められる。ミガーラスタット塩酸塩を投与した患者が NAGA 活性阻害に関連する有害作用を生じるリスクは

低いと考えられる。本結論は、ミガーラスタット塩酸塩の NAGA 阻害作用は標的酵素である α-Gal A に対する阻害作用と比較してはるかに弱く（図 2.6.2- 3）、また、ミガーラスタット塩酸塩の投与により 6 ヵ月以上治療を受けた患者でファブリー病の悪化が認められなかったという所見に基づくものである（2.7.3.2 項）。さらに、ヒトでのミガーラスタットのクリアランスは比較的迅速であること及び本剤は隔日投与されることから、NAGA 酵素阻害作用は一時的で、投与期間の大半では正常レベルの酵素活性が維持されると考えられる。

図 2.6.2- 3　ミガーラスタット塩酸塩の NAGA 及び α-Gal A に対する活性阻害作用

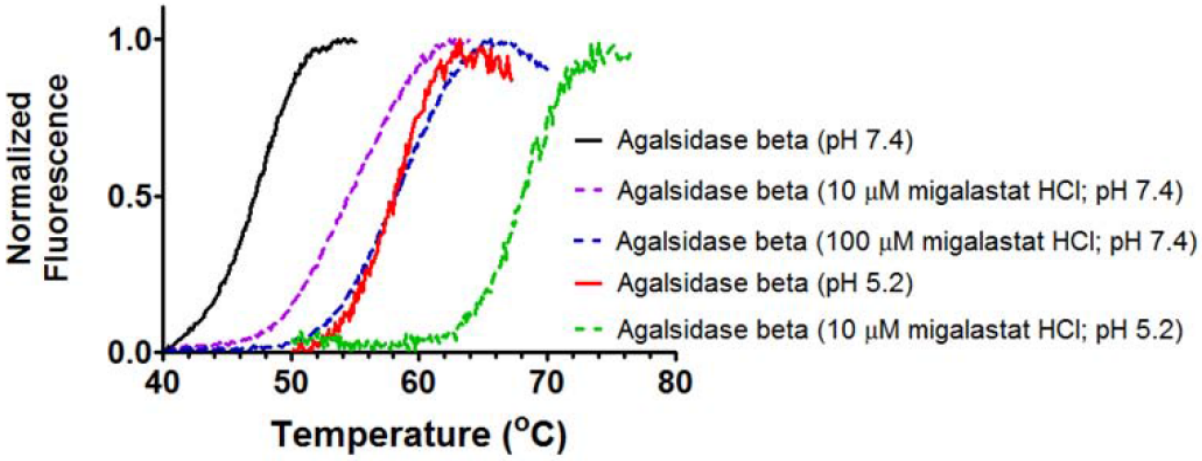


Lysates from a normal human fibroblast cell line (CRL2076) were used to determine the activity of α-N-acetylgalactosaminidase (NAGA; red curve) or α-Gal A (blue curve). Enzyme activity was determined by hydrolysis of artificial fluorescent substrates in the presence of varying concentrations of migalastat HCl. Data were normalized to the enzyme activity in the absence of migalastat HCl, and plotted as a function of migalastat HCl concentration. Nonlinear regression analysis was used to determine IC_{50} values.
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration
Source: Study RR1001-01, Figure 2

アガルシダーゼ ベータ及びアガルシダーゼ アルファの物理的安定性に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を、熱安定性試験で評価した。α-Gal A タンパク質の安定性は、改良蛍光熱安定性アッセイにて中性（pH 7.4）又は酸性（pH 5.2）条件下で、SYPRO Orange を用いて測定した。SYPRO Orange は、変性タンパク質の疎水性アミノ酸に結合すると、蛍光寿命及び量子収量が増大する環境に配慮した蛍光試薬である。図 2.6.2- 4 に示す通り、ミガーラスタット塩酸塩は、アガルシダーゼ ベータの融点（T_m）を pH 7.4 で 47°C から 58°C に上昇させた。リソソーム酵素で予期される通り、アガルシダーゼ ベータは低い pH でより安定であり（pH 5.2 で T_m は 58°C）、ミガーラスタット塩酸塩の存在下では熱変性に対して更に高い抵抗性を示した。アガルシダーゼ アルファについても同様の結果が認められ（図 2.6.2- 5）、ミガーラスタットはアガルシダーゼ

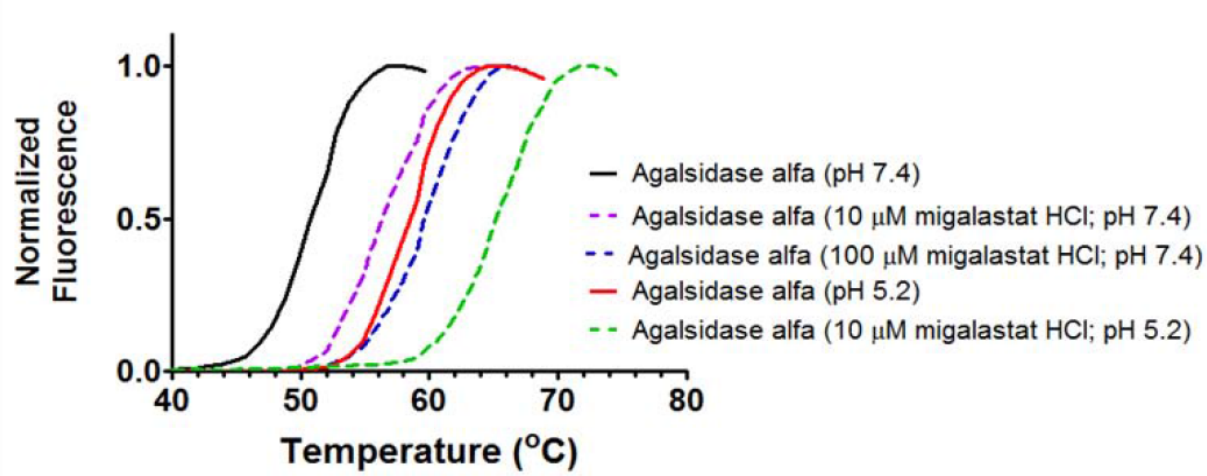
アルファの物理的安定性を高めることが示された。また、ミガーラスタットのエナンチオマーである 1-デオキシノジリマイシンはアガルシダーゼ ベータの活性を阻害せず、その T_m にも影響を及ぼさなかったことから（データ省略）、ミガーラスタットによる安定化にはアガルシダーゼ ベータとの選択的な結合が必要であることが示された。

図 2.6.2- 4　ミガーラスタット塩酸塩のアガルシダーゼ ベータに対する安定化作用



Representative thermal stability scans of agalsidase beta in the absence and presence of varying concentrations of migalastat HCl. Thermal stability scans were performed at neutral and acidic pH values of 7.4 and 5.2, respectively. Denaturation and unfolding of agalsidase beta was monitored using SYPRO Orange fluorescence changes (y-axis) as a function of increasing temperature (x-axis). The data shown are representative of three independent experiments. HCl = hydrochloride
Source: Study RR1001-01, Figure 3

図 2.6.2- 5　ミガーラスタット塩酸塩のアガルシダーゼ アルファに対する安定化作用

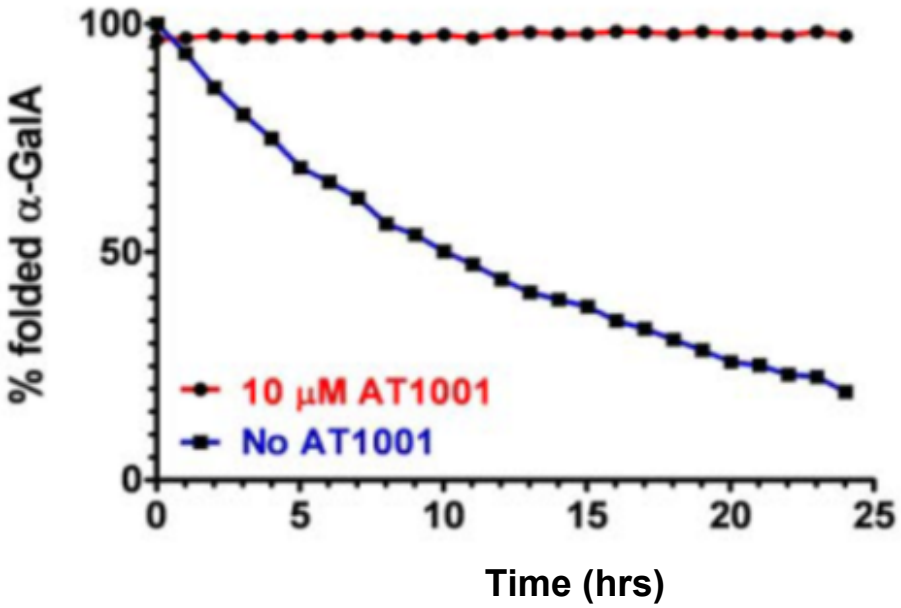


Representative thermal stability scans of agalsidase alfa in the absence and presence of varying concentrations of migalastat HCl. Thermal stability scans were performed at neutral and acidic pH values of 7.4 and 5.2, respectively. Denaturation and unfolding of agalsidase alfa was monitored using SYPRO Orange fluorescence changes (y-axis) as a function of increasing temperature (x-axis). HCl = hydrochloride
Source: Study RR1001-01, Figure 4

アガルシダーゼ ベータの物理的安定性に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響については、経時的なタンパク質変性及び酵素不活性化を検討したアッセイでも評価した。アガルシダーゼ ベータを中性 pH／37°C でインキュベーションした結果、経時的にアガルシダーゼ ベータの変性

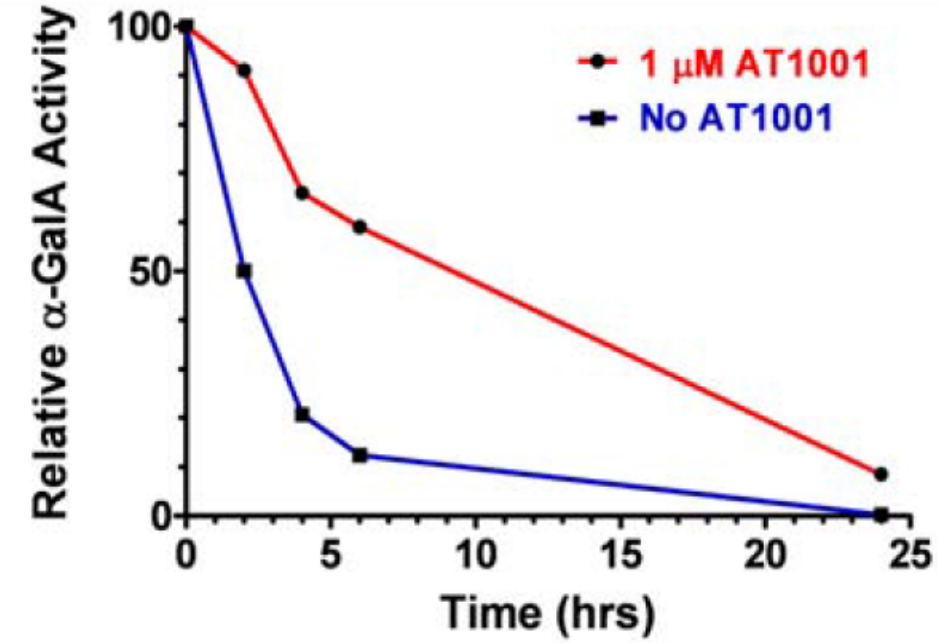
が生じ、活性の $t_{1/2}$ は約 9 時間であった（図 2.6.2- 6）。しかし、ミガーラスタット塩酸塩（10 µmol/L）の存在下又は酸性緩衝液中でのインキュベーションにより、アガルシダーゼ ベータの変性は最大 24 時間抑制された。また、アガルシダーゼ ベータをヒト全血とインキュベーションすると経時的に活性が減弱し、その $t_{1/2}$ は約 2 時間であった（図 2.6.2- 7）。しかし、ミガーラスタット塩酸塩（1 µmol/L）とのインキュベーションにより、血中でのアガルシダーゼ ベータ活性の $t_{1/2}$ は約 8 時間まで延長した。これらの結果から、ミガーラスタットは pH、時間及び温度依存的にアガルシダーゼ ベータの変性及び不活化を抑制し、安定化させることが示唆された。

図 2.6.2- 6　アガルシダーゼ ベータ変性に対するミガーラスタット塩酸塩の影響（pH 7.4）



Time course of rhα-Gal A (agalsidase beta) unfolding in neutral buffer (pH 7.4) at 37°C in the absence and presence of 10 µmol/L migalastat HCl (AT1001). Unfolding of rhα-Gal A was monitored by changes in the fluorescence of SYPRO Orange as a function of time.
rhα-Gal A = recombinant human α Gal A, HCl = hydrochloride
Source: Study RR1001-01, Figure 5

図 2.6.2- 7　ヒト全血でのアガルシダーゼ ベータ不活化に対するミガーラスタット塩酸塩の影響



Time course of rhα-Gal A (agalsidase beta) inactivation in human whole blood at 37°C *ex vivo* in the absence and presence of 1 µmol/L migalastat HCl (AT1001). rhα-Gal A activity was determined at the indicated time points using 4-methylumbeliferryl-α-D-galactopyranoside. To obtain relative enzyme activity levels, measurements at the various time points were normalized to the activity at time zero.
rhα-Gal A = recombinant human α Gal A, HCl = hydrochloride
Source: Study RR1001-01, Figure 6

2.1.2　　各動物種 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の結合親和性

（試験番号 RR1001-72、添付資料番号 4.2.1.1.2、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩の α-Gal A に対する IC_{50} 及び K_i 値を評価するため、マウス（C57BL/6）、ラット（Sprague-Dawley）、ウサギ（New Zealand White）、サル（cynomolgus Macaca fascicularis）及びヒト（白人）の肝組織抽出物を用いて検討した。マウスでは組織特異性の有無を検討するために腎組織抽出物についても検討した。

いずれの動物種においてもミガーラスタットの高い結合親和性が認められ、IC_{50} 及び K_i 値は低ナノモルレベルであった（表 2.6.2- 2）。さらに、マウスの肝臓と腎臓の α-Gal A に対する親和性が類似していることから、結合親和性に関して組織特異性は無いと示唆される。

表 2.6.2- 2　各動物種の α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の IC_{50} 及び K_i 値

Tissue	IC_{50} (nmol/L) mean (95% CI)	K_i (nmol/L) mean (95% CI)
Mouse Liver	22 (20 - 24)	10.6 (9.8 – 11.6)
Mouse Kidney	19 (16 - 21)	9.3 (8.4 – 10.2)
Rat Liver	18 (17 - 20)	7.7 (7.2 – 8.2)
Rabbit Liver	19 (17 - 21)	9.4 (8.7 – 10.1)
Monkey Liver	21 (18 - 23)	11.4 (10.6 – 12.4)
Human Liver	19 (17 - 22)	11.3 (10.0 – 12.1)

Note: Log (IC_{50}) and K_m values were normally distributed, but the resulting K_i values were not, therefore the confidence intervals for the K_i values are asymmetrical.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration, Ki = dissociation constant for binding of inhibitor to enzyme, CI = confidence interval, K_m=Michaelis constant; concentration of substrate that leads to half-maximal velocity of an enzyme's activity
Source: Study RR1001-72, the table in page 9

2.1.3　野生型及び各種変異型 α-Gal A に対するミガーラスタット塩酸塩の結合親和性

（試験番号 RR1001-29、添付資料番号 4.2.1.1.3、評価資料）

本試験では、男性ファブリー病患者 29 例のリンパ芽球細胞株から調製した溶解物中の α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の阻害作用を検討した。ミガーラスタット塩酸塩の IC_{50} 値を、これら 29 例の細胞株における 26 種のミスセンス変異型 α-Gal A について算出した（T41I、A143T 及び N215S の 3 変異体は 2 細胞株で検討した）。IC_{50} 値は、正常リンパ芽球細胞株の野生型 α-Gal A についても求めた。合成蛍光発生基質である 4-メチルウンベリフェリル-α-D-ガラクトピラノシドに対する親和性が α-Gal A 変異体によって異なる可能性があったため、基質のミカエリス定数（K_m）も算出した。算出した K_m 値及び IC_{50} 値を用いて、ミガーラスタット塩酸塩の各 α-Gal A 変異体に対する K_i 値を算出した。その結果、ミガーラスタット塩酸塩の K_i 値は、検討したファブリー病患者由来のリンパ芽球細胞株の大多数（n=23/29）の変異体では 19～85 nmol/L であり、一方、野生型 α-Gal A では 21 nmol/L であることが示された。残り 6 細胞株での α-Gal A 変異体に対する K_i 値は 105～254 nmol/L であった。

2.1.4　ミガーラスタット塩酸塩と培養後の健康成人及びファブリー病患者由来リンパ芽球における野生型及び変異型 α-Gal A 活性の $t_{1/2}$

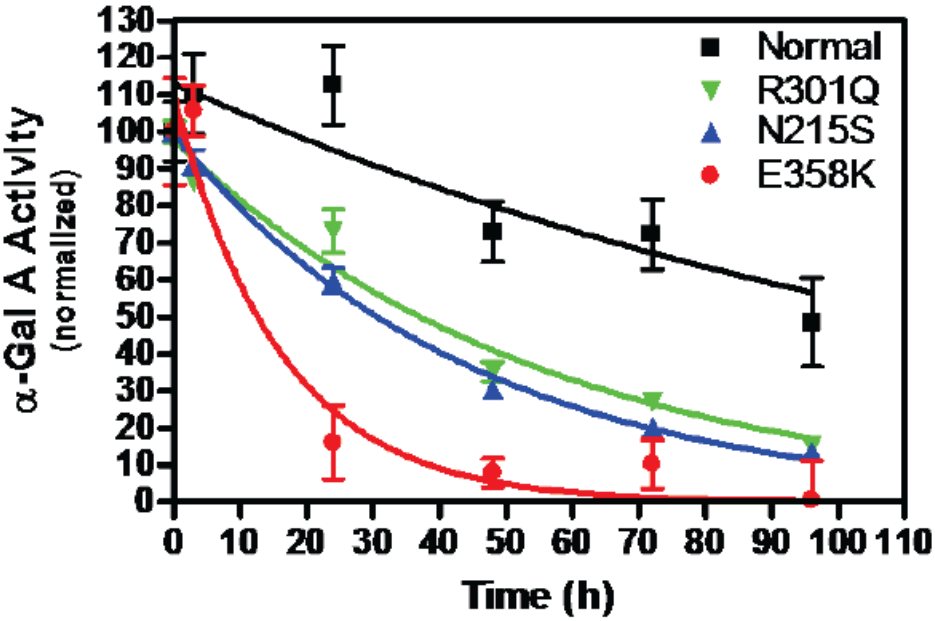
（試験番号 RR1001-04、添付資料番号 4.2.1.1.4、評価資料）

本試験では、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 α-Gal A 変異体の活性上昇が、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するか否かを検討した。ミガーラスタット塩酸塩との培養（濃度 100 µmol/L で 5 日間）後の α-Gal A 活性を薬剤除去後の時間の関数として測定した。

大半の変異体で α-Gal A 活性は薬剤除去 2 日後の時点でも投与前値を超えた明らかな上昇を維持しており、正常リンパ芽球では薬剤除去 4 日後でも投与前値まで戻らなかった（図 2.6.2-8）。ファブリー病患者由来リンパ芽球での上昇した α-Gal A 活性の $t_{1/2}$ は、ミスセンス変異体で異なり、10 時間（E358K 変異体）から 120 時間以上（R112H 及び R363H 変異体）の範囲であった（表 2.6.2- 3）。R112H 及び R363H 変異体を除いた変異体細胞株で、上昇した α-Gal A 活性の

$t_{1/2}$ は 0.5～3 日であった。正常対照細胞で測定した $t_{1/2}$ は 110～120 時間（約 5 日）の範囲であった。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る。

図 2.6.2- 8　ミガーラスタット塩酸塩と培養後の
健康成人又はファブリー病患者由来リンパ芽球における α-Gal A 活性推移



Normal or Fabry lymphoblasts were incubated with 100 µmol/L migalastat HCl for 5 days, followed by washout, then maintained for various times in culture prior to α-Gal A activity assay. Data were normalized to the average change in α-Gal A activity (Δ nmol/mg protein/hr) measured at the 0-hour time point. Data points are the mean ± SEM of 3-28 independent experiments. Experimental data were fit to a one-phase exponential decay curve to calculate the $t_{1/2}$.
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, SEM = standard error of the mean, $t_{1/2}$ = elimination half-life
Source: Study RR1001-04, Figure 1

表 2.6.2- 3　ミガーラスタット塩酸塩と培養後の
健康成人及びファブリー病患者由来リンパ芽球における α-Gal A 活性の $t_{1/2}$

Genotype	$t_{½}$ (hours)	n
Normal-1	120 ± 20	15
Normal-2	110 ± 40	4
Normal-3	110 ± 20	4
N34S	50 ± 10	4
E59K	60 ± 8	4
I91T	70 ± 8	4
A97V	60 ± 10	3
R112H-1	140 ± 20	3
R112H-2	150 ± 20	3
N215S-1	30 ± 2	7
N215S-2	40 ± 3	3
N215S-3	30 ± 4	3
D244N	50 ± 8	3
N263S	30 ± 4	4
I289F	60 ± 10	3
M296I	60 ± 9	3
M296V	60 ± 10	6
L300P	40 ± 3	4
R301Q	40 ± 3	28
R356W	50 ± 3	4
E358K	10 ± 1	3
R363H	120 ± 30	3
P409A	20 ± 2	4

Normal or Fabry patient lymphoblasts were incubated with 100 µmol/L migalastat HCl (AT1001) (except I289F which was incubated with 1 mmol/L migalastat HCl) for 5 days, followed by washout, then maintained for various times prior to the measurement of α-Gal A activity. Data were normalized to the average change in α-Gal A activity (Δ nmol/mg protein/hr) measured at the 0-hour time point. Data points are the mean ± SEM of n independent experiments. Experimental data were fitted to a one-phase exponential decay curve to calculate $t_{1/2}$. Three different normal cell lines, and three or two different N215S or R112H cell lines showed similar results, respectively.
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, SEM = standard error of the mean, $t_{1/2}$ = elimination half-life
Source: Study RR1001-04, Table 2

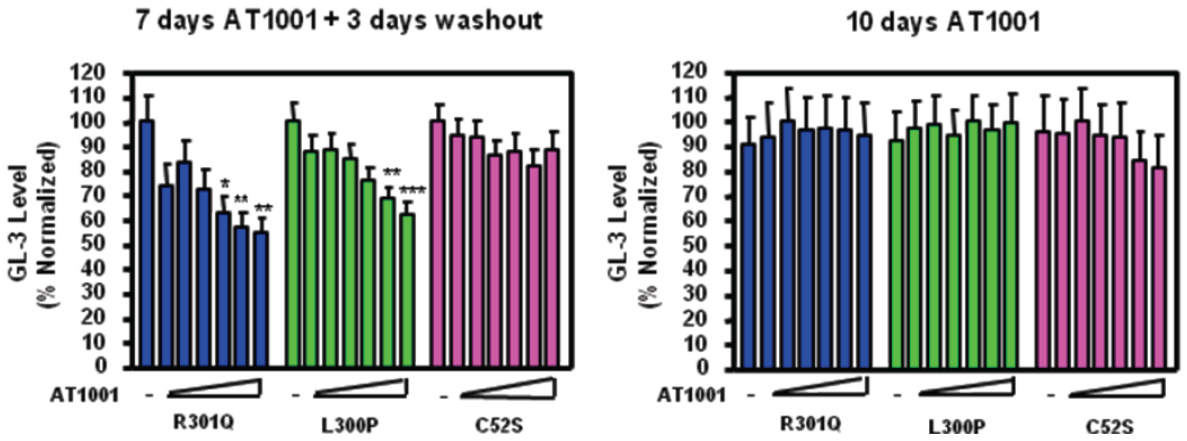
2.1.5　ファブリー病患者由来線維芽細胞中 GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用

（試験番号 RR1001-03、添付資料番号 4.2.1.1.5、評価資料）

本試験では、男性ファブリー病患者由来の 3 つの線維芽細胞株で蓄積した GL-3 に対する α-Gal A 活性増加の影響を評価した。これらの細胞株のうち、R301Q 及び L300P 変異体では、ミガーラスタット塩酸塩とのインキュベーション後に α-Gal A 活性が顕著かつ濃度依存的に上昇したが、C52S 変異体では、ベースライン時及びミガーラスタット塩酸塩とのインキュベーション後のいずれでも全く α-Gal A 活性を示さなかった。

ベースライン時の GL-3 濃度は、正常線維芽細胞と比較して、α-Gal A の R301Q、L300P 又は C52S 変異体を発現していたファブリー病患者由来線維芽細胞で高く、正常線維芽細胞中 GL-3 濃度のそれぞれ 5.3 ± 0.6（n=11）、4.9 ± 0.6（n=11）及び 7.5 ± 1.0（n=6）倍であった。R301Q 及び L300P 変異細胞株をミガーラスタット塩酸塩と 7 日間インキュベーションし、その後 3 日間休薬させると、GL-3 濃度は有意かつ濃度依存的に低下し、最大低下率はそれぞれ 45 ± 6%（n=4）及び 38 ± 5%（n=4）であった（図 2.6.2- 9、左）。しかし、ミガーラスタット塩酸塩と 10 日間連続インキュベーションした場合には、これらの変異細胞株で GL-3 濃度の有意な低下は認められなかった（図 2.6.2- 9、右）。非反応性の C52S 変異細胞株では、ミガーラスタット塩酸塩とのインキュベーション後、GL-3 濃度の低下は認められなかった。これらのデータは、本剤のウォッシュアウトに必要な十分な時間を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 活性増加は GL-3 濃度を低下させることを示している。

図 2.6.2- 9　ファブリー病患者由来線維芽細胞でのミガーラスタット塩酸塩による GL-3 濃度低下作用



Fabry fibroblasts were incubated with migalastat HCl (AT1001) using two treatment regimens as follows: 7 days followed by 3 days of washout (left graph) or 10 days (right graph). The concentrations of migalastat HCl tested were 0, 4, 12, 37, 111, 333, and 1000 µmol/L. Data from each graph are the average of 4 independent experiments. Differences in GL-3 level were determined by one-way ANOVA followed by Bonferonni multiple comparisons (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005).
HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, ANOVA = analysis of variance
Source: Study RR1001-03, Figure 1

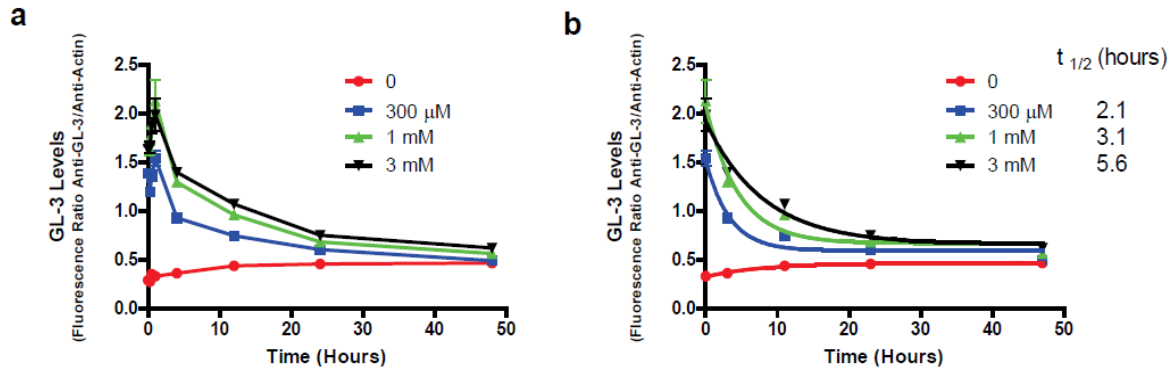
2.1.6　基質ローディング後の正常ヒト線維芽細胞における GL-3 ターンオーバーの $t_{1/2}$ に対するミガーラスタット塩酸塩の作用

（試験番号 RR1001-28、添付資料番号 4.2.1.1.6、評価資料）

リソソームでの GL-3 の異化に必要な α-Gal A がリソソーム内に輸送されると、ミガーラスタットとの結合は不要となるため、ミガーラスタットの α-Gal A 活性阻害作用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。初期実験で野生型ヒト線維芽細胞を高濃度ミガーラスタット塩

酸塩（300 µmol/L、1 mmol/L 及び 3 mmol/L）と 7 日間インキュベーションした結果、細胞中 GL-3 濃度は上昇した。その後、ミガーラスタット塩酸塩を除去し、GL-3 濃度を薬剤除去後の時間の関数として測定した。$t_{1/2}$ は 2.1～5.6 時間であった（図 2.6.2- 10）。最高濃度（3 mmol/L）のミガーラスタット塩酸塩とインキュベーションした細胞では、ベースライン GL-3 濃度までの回復に最も時間がかかった。

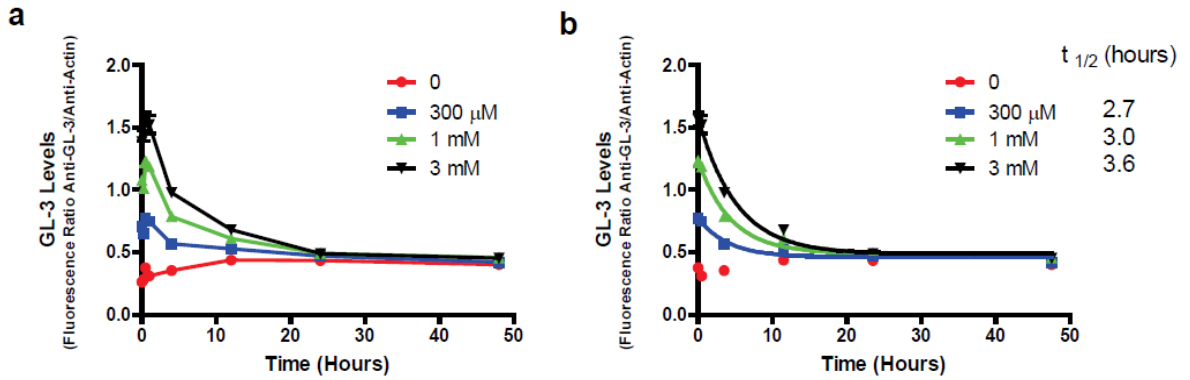
図 2.6.2- 10　ミガーラスタット塩酸塩添加基質ローディング後の野生型ヒト線維芽細胞における GL-3 ターンオーバーの経時推移



(a) The measured GL-3 levels at every time point. (b) One-phase exponential decay analysis after adjusting for the initial increase in GL-3 levels in the first 60 minutes. Each point represents the mean ± SEM of 3 data points.
GL-3 = globotriaosylceramide, $t_{1/2}$ = elimination half-life, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-28, Figure 1

リソソーム中 α-Gal A 濃度を高くすることで、より迅速又はより完全な GL-3 ターンオーバーが生じるか否かを検討するため、ミガーラスタット塩酸塩の除去前に同様の線維芽細胞にアガルシダーゼ ベータ（100 nmol/L）を 48 時間プレローディングした。その結果、アガルシダーゼ ベータのプレローディングの有無に関わらず、GL-3 濃度は 48 時間以内にベースライン濃度付近まで低下した。$t_{1/2}$ は 2.7～3.6 時間で、最高濃度（3 mmol/L）のミガーラスタット塩酸塩で最も半減期が長かった（図 2.6.2- 11）。

図 2.6.2- 11　アガルシダーゼ ベータをプレローディングしたミガーラスタット塩酸塩添加基質ローディング後の野生型ヒト線維芽細胞における GL-3 ターンオーバーの経時推移



(a) The measured GL-3 levels at every time point. (b) One-phase exponential decay analysis after adjusting for the initial increase in GL-3 levels in the first 30 minutes. Each point represents the mean ± SEM of 3 data points.
GL-3 = globotriaosylceramide, $t_{1/2}$ = elimination half-life, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-28, Figure 2

これらの結果から、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、本細胞モデルでは、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。

2.1.7　ミガーラスタット塩酸塩反応性変異型 α-Gal A の同定

900 を超える変異がファブリー病を引き起こすことが報告されており、そのうちの約 60%はミスセンス変異で、この変異型の α-Gal A では単一アミノ酸置換が生じている。これまでミガーラスタット塩酸塩に反応する変異型 α-Gal A を同定するためのアッセイ法を開発し、数々の変異型 α-Gal A の試験を行ってきた。これらの試験では主に本酵素のミスセンス変異体に重点を置いている。それは、単一アミノ酸置換を有する酵素では触媒活性を有している可能性があるが、小胞体からの放出効率が低く、また物理的に不安定で細胞輸送能が低いと考えられるためである。このように、酵素構造又は機能により大きな影響を及ぼす変異（フレームシフト変異、切断変異、挿入変異、欠失変異等）を有する変異型 α-Gal A と比較して、ミスセンス変異体はミガーラスタットと結合し、反応する可能性が高い。ただし、小インフレーム変異は、酵素構造又は機能に及ぼす影響は比較的わずかである場合があり、ミガーラスタットによって安定化されやすい触媒作用を有する変異体が生成される可能性もある。

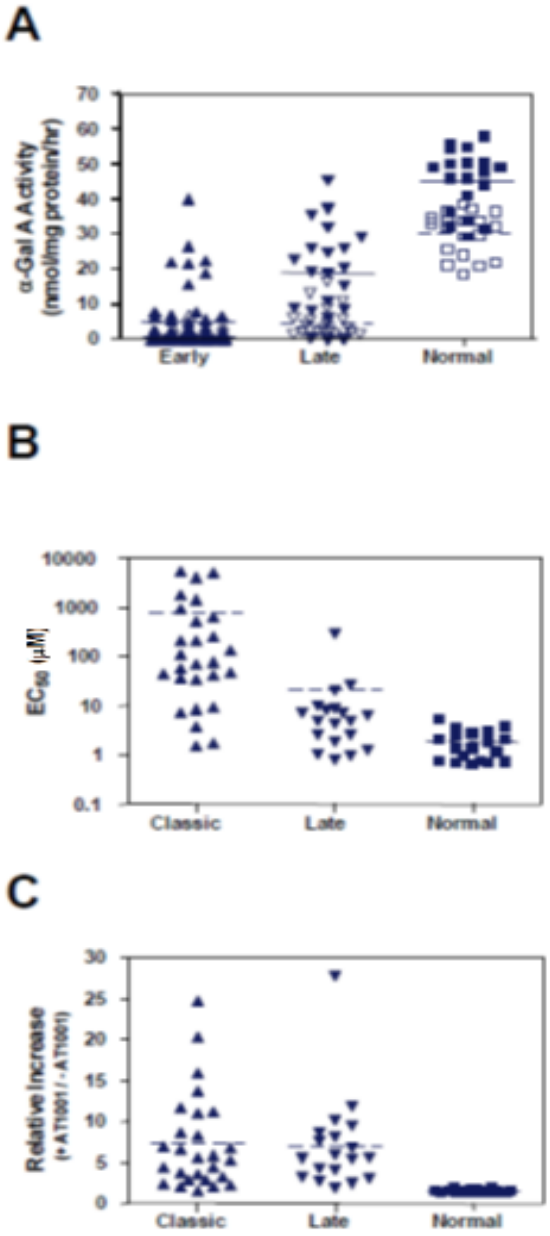
2.1.7.1　ファブリー病患者由来リンパ芽球及び線維芽細胞を用いたアッセイ

（試験番号 RR1001-02、添付資料番号 4.2.1.1.7、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩反応性の変異型 α-Gal A を特定するため、75 種類のミスセンス変異、1 つの挿入変異及び 1 つのスプライス部位変異を発現している男性ファブリー病患者由来の培養リンパ芽球において、ミガーラスタット塩酸塩の α-Gal A 活性に及ぼす影響を検討した。ベース

ライン時の α-Gal A 活性は、正常値の 0%～52%であった。ミガーラスタット塩酸塩（5 nmol/L～100 µmol/L）との 5 日間連続インキュベーションにより 49 種類のミスセンス変異体で、α-Gal A 活性はミガーラスタット塩酸塩濃度に依存して増加し（1.5～28 倍）、50%有効濃度（EC_{50}）は 0.8 µmol/L～1 mmol/L 超であった。同じ変異を有する個々の患者由来のリンパ芽球で同様の結果が得られたため、ミガーラスタット塩酸塩に対する反応性の違いは、主に α-Gal A の表現型に依存していると考えられた。反応性細胞株とミガーラスタット塩酸塩とのインキュベーション後、α-Gal A 濃度上昇がウェスタンブロット法によって確認され、酵素活性アッセイで認められた α-Gal A 活性増加が裏付けられた。古典型（早発性）ファブリー病に関連するミスセンス変異体の半数及び遅発型ファブリー病に関連するミスセンス変異体の約 90%がミガーラスタット塩酸塩反応性であった（図 2.6.2- 12）。本試験では、各種濃度のミガーラスタット塩酸塩とファブリー病患者由来細胞をインキュベーションしたときの最大 α-Gal A 活性と薬剤非存在下での α-Gal A 活性を比較し、統計学的に有意な α-Gal A 活性の増大が認められた場合にその変異型を“反応性あり”、そうでない場合を“反応性なし”と定義した。統計解析には、対応のある両側 Student’s-t 検定（$p<0.05$）を用いた。

図 2.6.2- 12　臨床表現型によるミガーラスタット塩酸塩に対する反応性の違い



Panel A. α-Gal A activity was measured in lymphoblast lysates from normals (male and female) or males with Fabry disease, following incubation of cells in the absence or presence of migalastat HCl (AT1001). Data are grouped based on the clinical phenotype of early-onset (classic) or later-onset Fabry disease. Open symbols represent baseline α-Gal A levels, with the average for each group denoted by dotted lines. Filled symbols represent maximal α-Gal A levels after migalastat HCl incubation, with the average for each group denoted by solid lines. Both patient phenotypes as well as normals showed elevated α-Gal A levels in response to migalastat HCl. **Panel B**. Migalastat HCl EC_{50} values were calculated from the concentration-response curves for increased α-Gal A activity as measured in cell lysates and are grouped as detailed in panel A. Dotted lines denote the average for each group. **Panel C.** Migalastat HCl relative increase, defined as the maximum α-Gal A activity in the presence of migalastat HCl divided by the α-Gal A activity in the absence of migalastat HCl, is plotted and grouped as detailed in panel A. Dotted lines denote the average for each group.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, HCl = hydrochloride, EC_{50} = concentration yielding 50% of the maximal effect
Source: Study RR1001-02, Figure 3

また、ミガーラスタット塩酸塩に対する反応は、心型ファブリー病と関連する IVS4＋919G→A スプライス部位変異を有する男性ファブリー病患者由来リンパ芽球及び野生型 *GLA* を

有する正常リンパ芽球でも認められた。古典型ファブリー病に関連する c.82insG ナンセンス変異（α-Gal A タンパク質の完全欠損が予測される）を有する男性ファブリー病患者由来リンパ芽球細胞株では、ベースライン α-Gal A 活性は測定不能であり、ミガーラスタット塩酸塩への反応は観察されなかった。

異なる 4 種のミスセンス変異を発現している男性ファブリー病患者由来の培養線維芽細胞では、ミガーラスタット塩酸塩に対する反応は、同じ変異を有するリンパ芽球細胞と同程度であり、反応が細胞型に依存しないことが示唆された。

またミガーラスタット塩酸塩は、他の 2 つの変異リソソーム加水分解酵素（ポンペ病又はゴーシェ病患者由来線維芽細胞株中の GAA 又は GCase）には作用せず、α-Gal A に選択的に作用することが示唆された。これは *in vitro* で検討した様々な正常リソソーム加水分解酵素においてミガーラスタット塩酸塩の影響が認められなかったことと一致する（2.1.1 項）。

2.1.7.2　　各種ファブリー病関連 *GLA* 変異導入 HEK-293 細胞を用いたアッセイ

（試験番号 RR1001-19、添付資料番号 4.2.1.1.8、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩による各種変異型 α-Gal A 活性増加作用を、異種発現系を用いて更に検討した。ファブリー病を引き起こすことが知られているミスセンス変異、カルボキシ末端ナンセンス変異、小インフレーム変異、欠失変異及び複合変異を有する合計 531 の変異型 α-Gal A を培養 HEK-293 細胞（Grip Tite 293 MSR）に発現させ、ミガーラスタット塩酸塩に対する反応性を評価した。これら 531 の既知変異は、ヒト遺伝子突然変異データベース（2011 年 8 月 31 日以前のもの）、Shire Human Genetic Therapies Fabry Outcome Survey レジストリ（Dr. Derralynn Hughes 提供）、ミガーラスタット塩酸塩の臨床試験及びその他公表の情報源により特定した。次に、各変異を部位特異的突然変異誘発法により、哺乳類の発現ベクターに存在するヒト α-Gal A の cDNA に導入し、各変異型 α-Gal A をエンコードする組換えコンストラクトを作成した。各変異型又は野生型 α-Gal A コンストラクトは HEK-293 細胞に導入した。ミガーラスタット塩酸塩による α-Gal A 活性増加作用の統計解析には、対応のある両側 t-検定（$P<0.05$）を用い、ミガーラスタット塩酸塩非存在下での各変異型 α-Gal A の酵素活性と、ミガーラスタット塩酸塩存在下での最大酵素活性を比較した。ベースラインで α-Gal A 活性が野生型の 10%以上であった変異体のうち、ミガーラスタット塩酸塩の臨床濃度（10 µmol/L）で“反応性”の判定基準を満たさなかった変異体については、酵素アッセイの前に変異導入細胞の溶解物を非導入 HEK-293 細胞溶解物で 10～50 倍に希釈する変法アッセイにより再試験を実施した。追加した希釈手順により、高いベースラインを有する変異体のミガーラスタット塩酸塩に対する反応を高感度に検出できることがデータで示されている。

合計 316 の変異体（検討した変異体の約 60%）では、ミガーラスタット塩酸塩とのインキュベーション（5 nmol/L～20 mmol/L で 4～5 日間）により、統計学的に有意な反応が認められた。ベースライン α-Gal A 活性は各変異型 α-Gal A によって異なり、その範囲は野生型 α-Gal A 活性の 0%～100%超であった。同様に、ミガーラスタット塩酸塩とのインキュベーション後に認められた最大 α-Gal A 活性も異なっていた。EC_{50} 値の範囲は、0.29 µmol/L（L16H 変異体）から 1 mmol/L 超（S148N、A292V、D299G 及び T410P 変異体）であった。316 の反応性変異体には 1

つの欠失変異体と 3 つの小インフレーム変異体が含まれ、ミスセンス変異体以外の変異体でも反応性となりうることが示唆された。また、臨床濃度（10 µmol/L）のミガーラスタット塩酸塩に対する反応（絶対及び相対的活性増加）を、316 全ての反応性変異体について算出した。これらの結果を用いて、*in vitro* で反応性を示す変異型 α-Gal A 及び男女ファブリー病患者でミガーラスタット塩酸塩による治療反応性を示す可能性が高い変異型 α-Gal A を特定することができると考えられる。

2.2　*In vivo* 試験

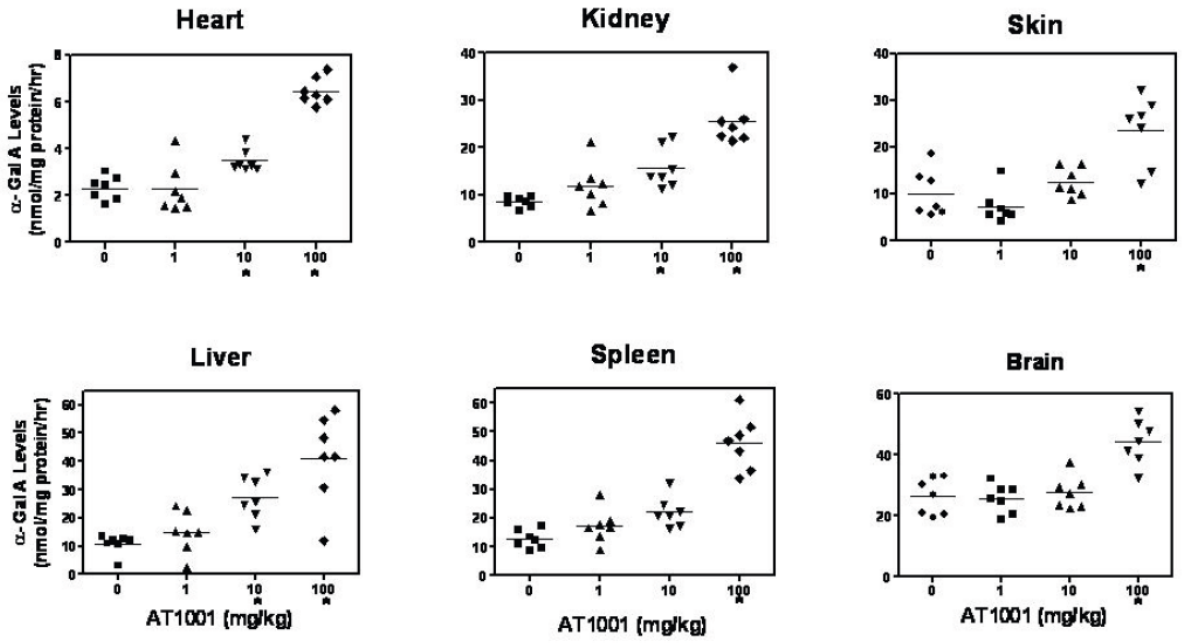
2.2.1　　C57BL/6 マウス組織中 α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の作用

（試験番号 RR1001-05、添付資料番号 4.2.1.1.9、評価資料）

雄 C57BL/6 マウス（8 週齢）を用いて、*in vivo* での野生型 α-Gal A 活性に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を検討した。マウスは 4 群に分け（グループ 1 及び 4：各 42 匹、グループ 2 及び 3：各 7 匹）、グループ 1 は陰性対照群として飲料水を 28 日間自由飲水させた。グループ 2、3 及び 4 には、それぞれ 1、10 及び 100 mg/kg/日（遊離塩基換算）のミガーラスタット塩酸塩を 28 日間自由飲水投与した。投与 28 日目に各群 7 匹のマウスを屠殺した。グループ 1 及び 4 の残りのマウスには飲料水のみをさらに 14 日間摂取させ（休薬期間）、各群 7 匹を投与 29、31、33、35 及び 42 日目に屠殺した。血漿及び組織サンプル（心臓、腎臓、皮膚、脾臓、肝臓及び脳）を採取し、α-Gal A、GCase 及び GAA 活性を測定した。

ミガーラスタット塩酸塩の 28 日間自由飲水投与により、マウスの心臓、腎臓、皮膚、肝臓、脾臓及び脳を含むファブリー病関連組織中の α-Gal A 活性は、陰性対照群と比較して有意かつ用量依存的に増加した（図 2.6.2- 13）。ミガーラスタット塩酸塩 100 mg/kg/日投与により、心臓、腎臓、皮膚、肝臓、脾臓及び脳での α-Gal A 活性は、最大でそれぞれ 3.0 ± 0.3、3.0 ± 0.2、2.5 ± 0.3、4.0 ± 0.5、3.6 ± 0.3 及び 1.7 ± 0.1 倍増加した。各組織中 α-Gal A 活性は、休薬 7 日目まで高値を維持していた。増加した α-Gal A 活性の $t_{1/2}$ は、心臓、腎臓及び皮膚でそれぞれ 2.7、3.3 及び 4.0 日と算出された。検討した他の 2 つのリソソーム酵素（GCase 及び GAA）の各組織内活性に変化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 α-Gal A に選択的であると考えられた。以上より、ミガーラスタット塩酸塩は経口投与が可能で、脳を含む広範な組織に分布し、α-Gal A 活性を選択的に増加させることが示された。

図 2.6.2- 13　C57BL/6 マウス組織中 α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の作用



Eight-week old male C57BL/6 mice were administered migalastat HCl (AT1001) *ad libitum* in drinking water for 28 days at the indicated free base dose equivalents. Scatter plots show individual activity levels of mice in each group (7 mice/group) analyzed in triplicate. Dose-dependent and significant increases in α-Gal A activity (*p<0.05 vs. untreated, t-test) were seen in all tissues tested. The effect was also found significant for a linear trend (post hoc analysis).
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A
Source: Study RR1001-05, Figure 1

2.2.2　hR301Q α-Gal A Tg/KO 及び *Gla* KO マウス組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用

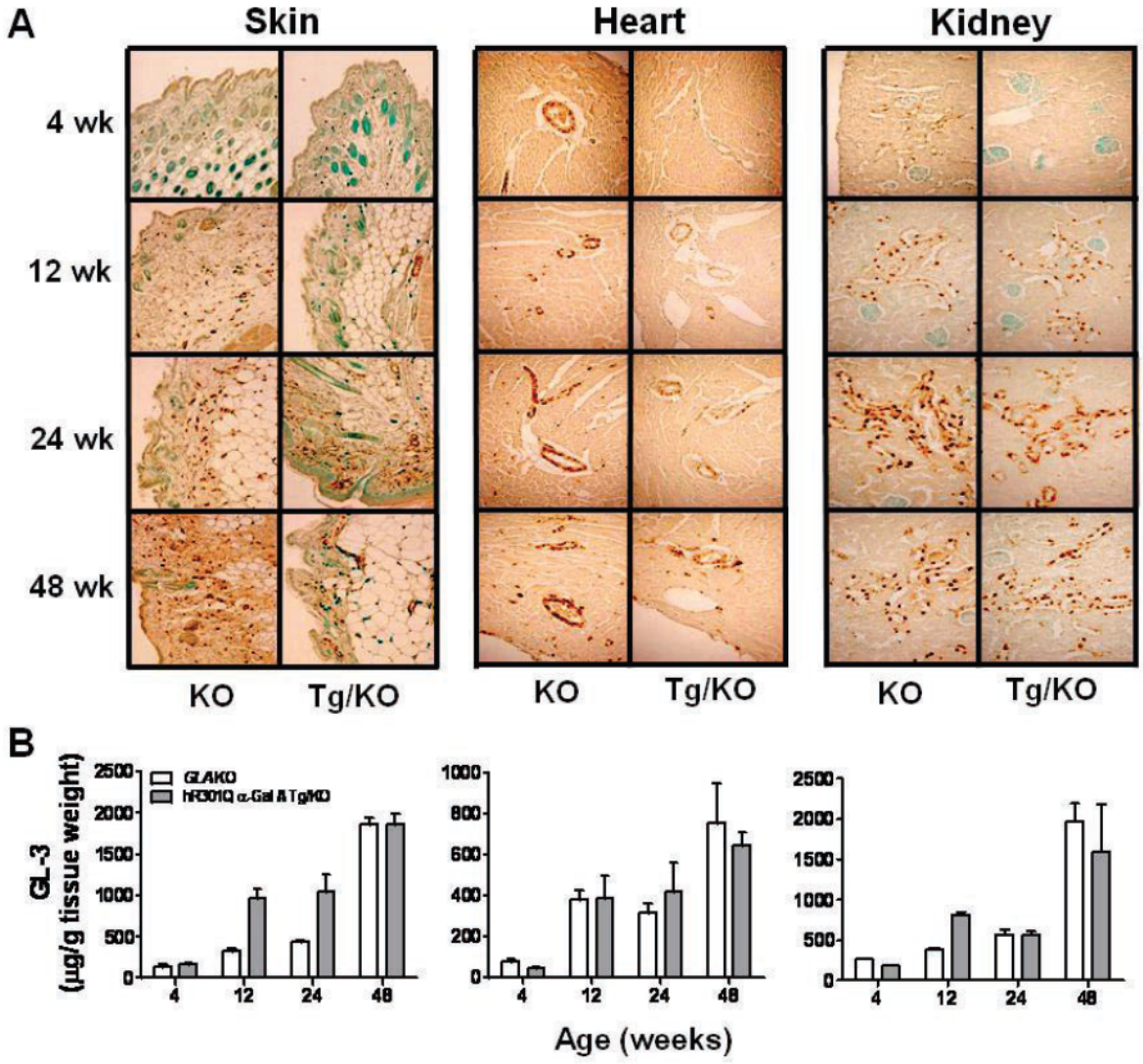
内因性マウス α-Gal A 遺伝子（*Gla*）を欠損し、ヒト R301Q 変異型 *GLA* 導入遺伝子を発現するファブリー病モデルマウス（hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス）において、ミガーラスタット塩酸塩の作用を検討した。本モデルでは加齢に伴い皮膚、心臓、腎臓、脳及び血漿の疾患関連組織に GL-3 の蓄積が認められる（Khanna et al, 2010）。さらに、機能性内因性 α-Gal A タンパク質を欠損したファブリー病モデルマウス（*Gla* KO マウス）を用いて、ミガーラスタット塩酸塩の特異性を評価した。

2.2.2.1　hR301Q α-Gal A Tg/KO 及び *Gla* KO マウス組織中 GL-3 濃度の週齢依存性

（試験番号 RR1001-14、添付資料番号 4.2.1.1.10、評価資料）

hR301Q α-Gal A Tg/KO 及び *Gla* KO マウスにおいて、ファブリー病関連の組織中 GL-3 濃度がマウスの週齢によって異なるか否かを検討した。雄マウス（7 匹／群）を 4、12、24 及び 48 週齢で剖検し、皮膚、心臓及び腎臓中の GL-3 濃度及び組織中 GL-3 蓄積の細胞型特異性を評価した。両マウスの組織中 GL-3 濃度は、週齢の増加に伴って同程度増加した（図 2.6.2- 14）。免疫組織化学的アッセイにより、皮膚の線維芽細胞、皮膚及び心臓の血管壁平滑筋細胞、並びに腎臓皮質の遠位尿細管上皮細胞において特異的な GL-3 染色の増加が認められた。

図 2.6.2- 14　週齢の異なる hR301Q α-Gal A Tg/KO 及び *Gla* KO マウス組織中での GL-3 濃度



GL-3 levels in 4-, 12-, 24-, and 48-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice were determined by immunohistochemistry and LC-MS/MS in skin, heart, and kidney.

Panel A: GL-3 staining (represented as dark red spots) increases with age (in both quantity and intensity) in skin fibroblasts, smooth muscle cells of blood vessel walls of the skin and heart, and distal tubular epithelial cells of the kidney cortex. The data shown are representative photomicrographs from 4-5 hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice/age group (magnification: 20X).

Panel B: Quantitative increases in tissue GL-3 levels were seen with age in both hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice. Each bar represents the mean ± SEM of 5 mice/age group.

hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, *Gla* KO mice= mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean

Source: Study RR1001-14, Figure 1

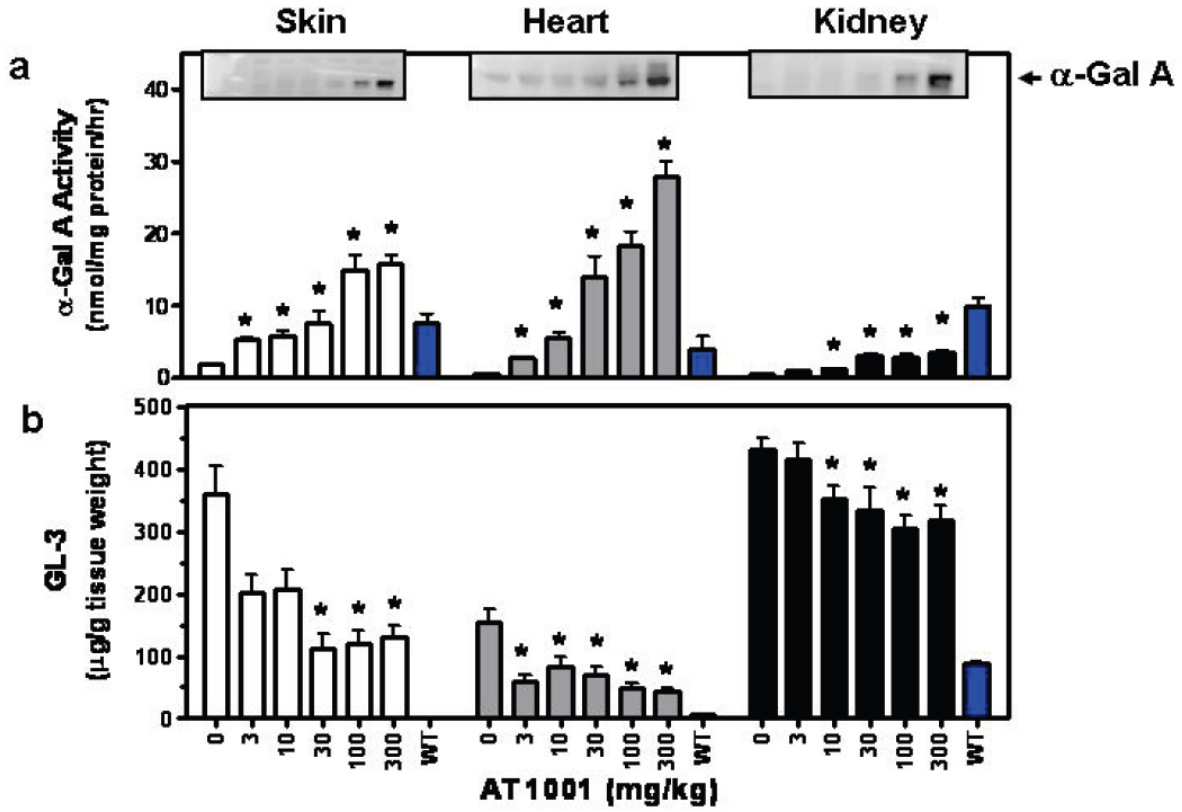
2.2.2.2　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用

（試験番号 RR1001-06、添付資料番号 4.2.1.1.11、評価資料）

雄 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス（8 週齢）及び野生型マウス（12 週齢）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、3、10、30、100 及び 300 mg/kg/日）を自由飲水投与した。投与 2 及び 4 週目にマウスを安楽死させ、心臓、腎臓及び皮膚を採取して α-Gal A 活性を測定した。ミガーラスタット塩酸塩投与 2 及び 4 週目のいずれでも検討した全ての組織において、無処置群と比較して α-Gal A 活性は用量依存的に有意に増加した。α-Gal A 活性の増加は、2 週目と比較して 4 週目でより顕著であった。300 mg/kg/日の投与 4 週目において、皮膚、心臓及び腎臓組織中 α-Gal A 活性は、それぞれ最大 9 ± 2.0、50 ± 7.0 及び 8 ± 1.0 倍増加した（図 2.6.2- 15a）。30 及び 10 mg/kg/日の投与 4 週目において、それぞれ皮膚及び心臓の α-Gal A 活性は同週齢の野生型（C57BL/6）マウスと同程度であった。300 mg/kg/日投与後、腎臓の α-Gal A 活性は同週齢野生型マウスの約 40%であった。またウェスタンブロット法により、ミガーラスタット塩酸塩投与後に、上記組織中で 46 kDa の成熟型 α-Gal A が用量依存的に増加することが示され（図 2.6.2- 15a）、α-Gal A 活性増加と一致した。

ミガーラスタット塩酸塩は、α-Gal A 活性を増加させるとともに、各組織（皮膚、心臓及び腎臓）中の GL-3 濃度を低下させた（図 2.6.2- 15b）。ミガーラスタット塩酸塩の至適用量は 30 mg/kg/日と判断された。本用量では、全ての組織において無処置群と比較して α-Gal A 活性の有意な増加及び GL-3 濃度の低下が認められた。より高用量でも、更なる GL-3 濃度の低下は認められなかった。100 mg/kg/日群では、免疫組織化学的アッセイにより、皮膚の線維芽細胞、皮膚及び心臓の血管壁平滑筋細胞、並びに腎臓の遠位尿細管上皮細胞中で GL-3 濃度の顕著な低下が示された。300 mg/kg/日群でも、同様の結果が認められた。低用量群での免疫組織化学的アッセイによる解析は実施しなかった。

図 2.6.2- 15　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用



Eight-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered migalastat HCl (AT1001) *ad libitum* in drinking water for four weeks at the indicated free base dose equivalents. Lysates from skin, heart, and kidney were subsequently tested for (a) α-Gal A activity and (b) GL-3 levels. **(a)** Significant increases in α-Gal A activity were seen in all three tissues (*p<0.05 vs. untreated, t-test). The effect was also significant for a linear trend, indicating a dose-dependent increase in α-Gal A activity (post-hoc analysis, p<0.05). **Insets**. Tissue α-Gal A protein levels were determined by Western blotting. A dose-dependent increase in the 46 kDa mature form of α-Gal A was seen in all tissues. Each lane on the blot contains tissue lysate from a single animal. The Western blots shown are representative of two experiments. **(b)** Significant reductions in GL-3 levels were seen in all three tissues as measured by LC-MS/MS (*p<0.05 vs. untreated, t-test). Blue bars (a, b) represent α-Gal A and GL-3 levels from age-matched untreated wild-type C57BL/6 mice. Each bar represents pooled data from three independent studies with the mean ± SEM of 7-21 hR301Q α-Gal A Tg/KO mice/group or seven untreated wild-type mice, all analyzed in triplicate.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, WT = wild type mice, HCl = hydrochloride, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-06, Figure 1

また雄 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス（8 週齢）を用いて、ミガーラスタット塩酸塩（30 mg/kg/日）を 1 日 1 回 4 週間強制経口投与した時の作用を評価した。ミガーラスタット塩酸塩投与群の全ての組織において、無処置群と比較して α-Gal A 活性の有意な増加とともに GL-3 濃度低下が認められた。皮膚、心臓及び腎臓組織中の α-Gal A 活性はそれぞれ最大 6 ± 1.0、25 ± 5.0 及び 8 ± 1.0 倍増加し、GL-3 濃度はそれぞれ 71 ± 4%、52 ± 7%及び 30 ± 7%低下した。この結果は、同用量のミガーラスタット塩酸塩を 4 週間自由飲水投与した時の結果と同程度であり、これら 2 種類の投与経路（自由飲水投与と強制経口投与）により同様の結果が得られることが示された。

以上の結果から、ミガーラスタットは *in vivo* で変異型 α-Gal A と結合して安定化させることにより、リソソーム中の酵素活性及びタンパク質濃度を増加させ、様々な組織の細胞で基質濃度を低下させることが示唆された。

2.2.2.3　*Gla* KO マウス組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用

（試験番号 RR1001-12、添付資料番号 4.2.1.1.12、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩の作用特異性について、機能性内因性 α-Gal A タンパク質を欠損させた *Gla* KO マウスを用いて評価した。雄 *Gla* KO マウス（8 週齢、7 匹／群）に、ミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0 及び 100 mg/kg/day）を 4 週間自由飲水投与した。血漿、心臓、腎臓及び皮膚を採取して、α-Gal A 活性及び GL-3 濃度を測定した（血漿は GL-3 濃度のみ）。

Gla KO マウスでは、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ず、ミガーラスタット塩酸塩の作用は、野生型マウス及び 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。

2.2.3　ミガーラスタット塩酸塩休薬後の hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性推移

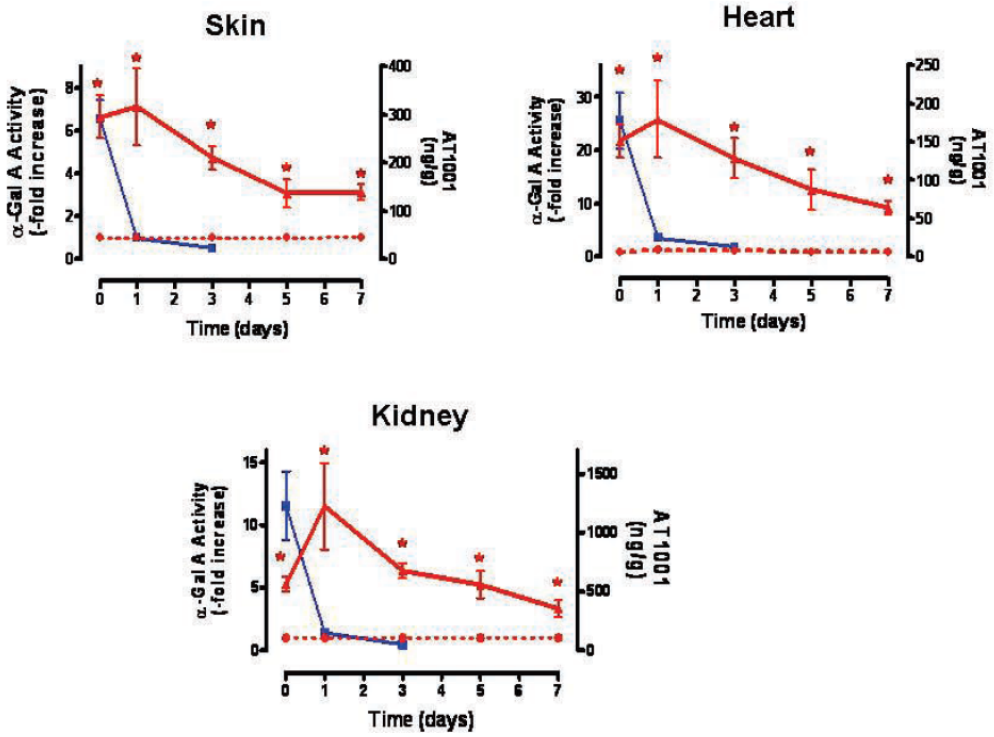
（試験番号 RR1001-07、添付資料番号 4.2.1.1.13、評価資料）

hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中で増加した α-Gal A 活性及びミガーラスタットの $t_{1/2}$ を評価した。雄 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス（8 週齢、7 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0 及び 100 mg/kg/日）を 28 日間自由飲水投与した。その後休薬し、飲料水のみを 7 日間自由飲水させた。休薬 0、1、3、5 及び 7 日目にマウスを安楽死させ、組織中 α-Gal A 活性（各群 7 匹）及びミガーラスタット濃度（各群 5 匹）を測定した。

休薬 0 日目（ミガーラスタット塩酸塩投与 28 日目）において、皮膚、心臓及び腎臓の α-Gal A 活性は、ベースラインと比較して有意に増加しており、それぞれ約 6、22 及び 5 倍増加した（図 2.6.2- 16）。休薬 1 日目の組織中 α-Gal A 活性がより高かったことから、休薬 0 日目の組織検体中に残留したミガーラスタットが酵素活性アッセイで α-Gal A を阻害した可能性が示唆された（図 2.6.2- 16）。これら全ての組織では、休薬 7 日目まで高い α-Gal A 活性を維持していた（図 2.6.2- 16）。α-Gal A 活性の $t_{1/2}$ は、皮膚、心臓及び腎臓でそれぞれ 2.4、2.2 及び 2.0 日と推定された（α-Gal A 活性の最大増加が認められた休薬 1 日目を起点として算出）。

休薬 0 日目の皮膚、心臓及び腎臓中ミガーラスタット濃度は、それぞれ 1.8 ± 0.2、1.1 ± 0.2 及び 7.5 ± 1.8 µmol/L であった。検討した全ての組織のミガーラスタット濃度は、休薬 1 日目までに約 90%低下し、休薬 3 日目までにさらに低下した（図 2.6.2- 16）。これらのデータから、組織中ミガーラスタットの濃度が極めて低くても、変異型 α-Gal A 活性の増加は維持されることが示唆された。

図 2.6.2- 16　ミガーラスタット塩酸塩休薬後の hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 α-Gal A 活性の経時推移



Eight-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered drinking water only (red dotted lines) or migalastat HCl (AT1001) (100 mg/kg/day free base dose equivalent (red solid lines)) *ad libitum* in drinking water for four weeks, followed by a withdrawal period (drinking water only) for up to 7 days. Groups of mice were then euthanized on Day 0, 1, 3, 5, or 7 after withdrawal. Skin, heart, and kidney were collected at each time point and α-Gal A activity and migalastat HCl levels (blue lines) were measured in tissue lysates. Significantly increased α-Gal A activity was sustained in all three tissues for up to seven days (*p<0.05 vs. untreated, t-test). For the α-Gal A activity, each data point represents the mean ± SEM of 7 mice analyzed in triplicate. Data were normalized to untreated levels. Baseline α-Gal A levels were 1.4 ± 0.1, 0.6 ± 0.1, and 0.5 ± 0.04 nmol/mg protein/hr, in skin, heart, and kidney, respectively. For tissue migalastat HCl levels, each data point represents the mean ± SEM for 5 mice. The limit of quantitation for migalastat HCl in skin, heart, and kidney was 6, 4, and 10 ng/g, respectively.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, HCl = hydrochloride, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-07, Figure 1

2.2.4　長期投与時の組織中 GL-3 濃度に対する投与頻度の影響

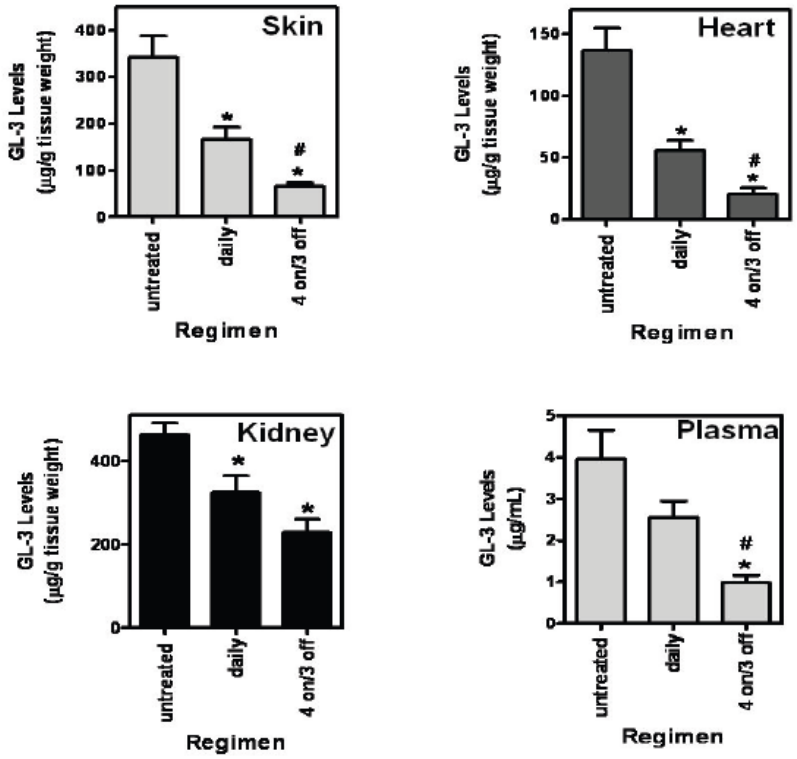
2.2.4.1　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩投与頻度の影響

（試験番号 RR1001-10、添付資料番号 4.2.1.1.14、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩の投与頻度を減らした投与レジメンでの GL-3 濃度の低下作用を検討し、連日投与レジメンでの場合と比較した。雄 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス（8 週齢、7 匹/群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0 及び 300 mg/kg/日）を 4 日間自由飲水投与した後、飲料水のみを 3 日間自由飲水させるサイクル（「4-on/3-off」）で 4 週間投与した。連日投与レジメンと比較して、「4-on/3-off」投与レジメンによる GL-3 濃度は有意に低下した。皮膚、心

臓、腎臓及び血漿中 GL-3 濃度は、「4-on/3-off」投与レジメンではそれぞれ 82 ± 2%、87 ± 3%、46 ± 7%及び 66 ± 5%低下し、連日投与レジメンではそれぞれ 64 ± 6%、72 ± 4%、26 ± 6%及び 41 ± 8%低下した（図 2.6.2- 17）。また、免疫組織化学的アッセイにおいて、連日投与レジメンと比較して「4-on/3-off」投与レジメンでは、皮膚、心臓及び腎臓で細胞型特異的な GL-3 染色の減少が認められた。

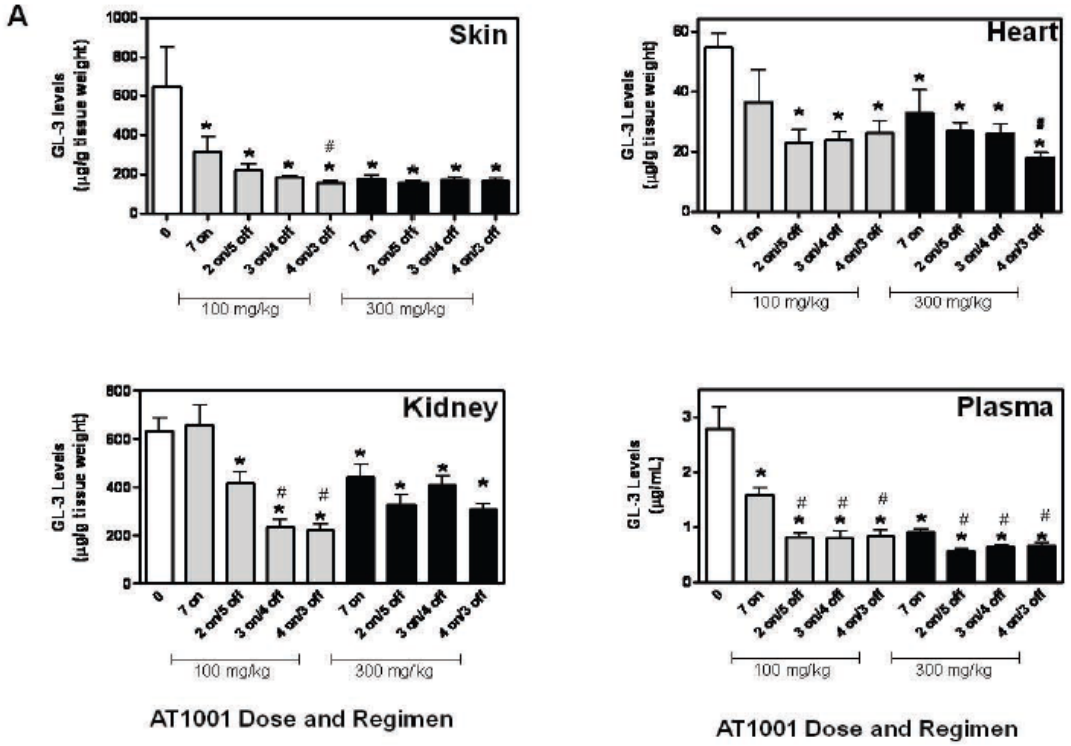
図 2.6.2- 17　ミガーラスタット塩酸塩連日投与及び 4-on/3-off 投与レジメンによる hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対する作用の比較



Eight-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered migalastat HCl (AT1001) (300 mg/kg/day free base) *ad libitum* in drinking water for four weeks either daily or less-frequently using four cycles of a 4 on/3 off regimen. Significant reductions in GL-3 levels were seen in tissues and plasma (*p<0.05 vs. untreated, t-test). In addition, GL-3 levels showed significantly greater reductions with less-frequent administration compared to daily administration (#p<0.05 daily vs. 4 on/3 off, t-test). The data represent the mean ± SEM of 7 mice/group analyzed in triplicate.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-10, Figure 1

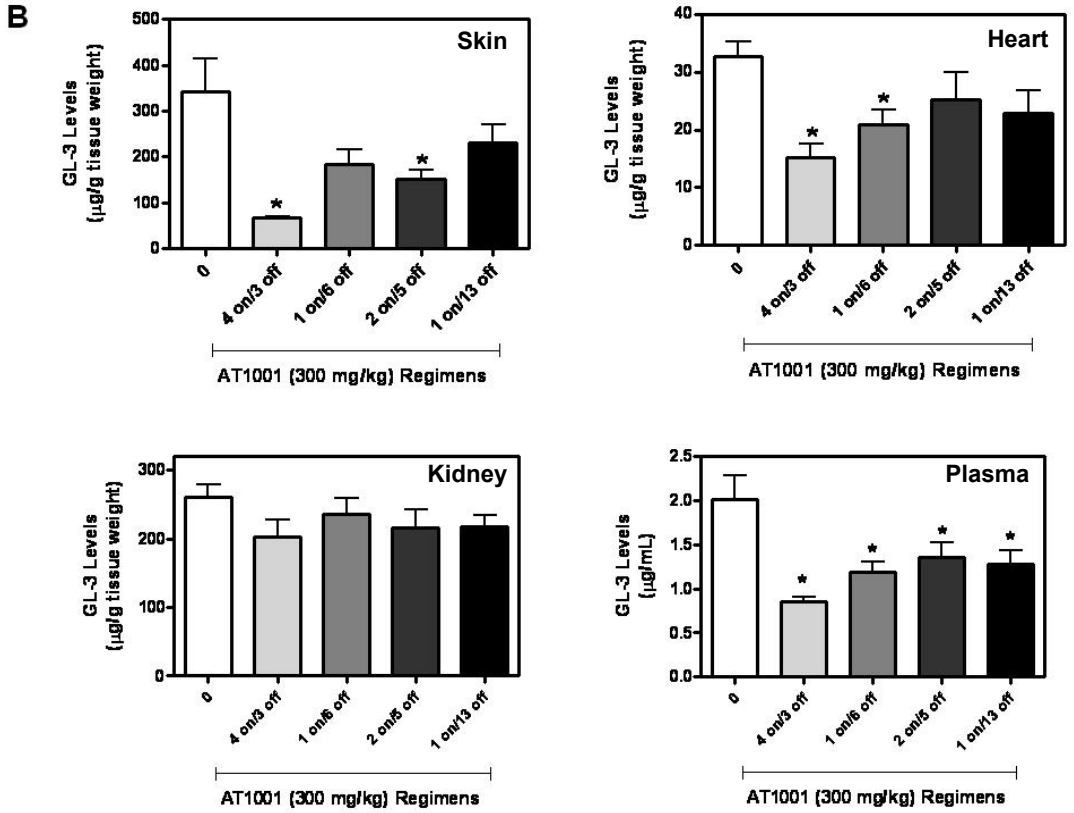
別試験では、2-on/5-off、3-on/4-off 及び 4-on/3-off の投与頻度を減らして 4 週間投与するレジメンと連日投与レジメン（7-on）を比較した（遊離塩基換算で 0、100 及び 300 mg/kg/日）。300 mg/kg/日群では、100 mg/kg/日群と比較して GL-3 濃度はさらにある程度低下したが、連日投与レジメンと比較して、投与頻度を減らしたレジメンの大半での GL-3 濃度低下作用は同程度又はより大きく（図 2.6.2- 18A）、ミガーラスタットの総曝露量が低くても基質を同程度又はより減少させることが示された。さらに別試験において、4-on/3-off、1-on/6-off、2-on（月曜、木曜）/5-off 及び 1-on/13-off での 4 週間投与レジメン（遊離塩基換算で 0 及び 300 mg/kg/日）の作用を評価した結果、4-on/3-off レジメンで最大の GL-3 濃度低下作用が認められた（図 2.6.2- 18B）。

図 2.6.2- 18　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対する投与頻度の影響



Panel A: Eight-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered migalastat HCl (AT1001) (100 or 300 mg/kg/day free base) *ad libitum* in drinking water for four weeks either daily or less-frequently using four cycles of either a 2 on/5 off, 3 on/4 off, or 4 on/3 off regimen. Significant reductions in GL-3 levels were seen in all tissues examined (*p<0.05 vs. untreated, t-test). The majority of the less-frequent administration regimens resulted in greater or comparable GL-3 reduction compared to daily administration (#p<0.05 vs. daily, t-test).

図 2.6.2- 18　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対する投与頻度の影響（続き）

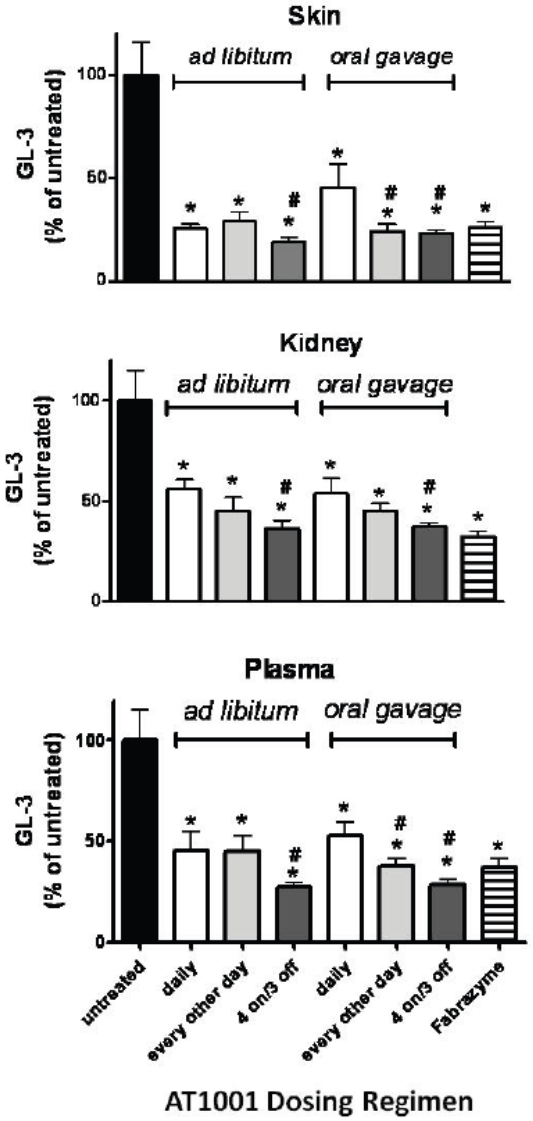


Panel B: Twelve-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered migalastat HCl (AT1001) (300 mg/kg/day free base) *ad libitum* in drinking water for four weeks, using four cycles of either a 4 on/3 off, 1 on/6 off, 2 on (Mon and Thu)/5 off, or 2 cycles of 1 on/13 off regimen. GL-3 levels were subsequently measured in tissues (skin, heart, kidney) and plasma. The data represent the mean ± SEM of 7 mice/group analyzed in triplicate.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-10, Figure 3

また、ミガーラスタット塩酸塩の投与頻度を減らしたレジメンでの GL-3 濃度の低下作用は、アガルシダーゼ ベータで得られた作用と同程度であった。雄 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス（8 週齢、7 匹/群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 300 mg/kg/日）を 4 週間強制経口投与又は自由飲水投与した。連日投与、隔日投与及び 4-on/3-off レジメンを検討した。比較のため、アガルシダーゼ ベータ（1 mg/kg）を週 1 回 4 週間静脈内投与した。全ての投与レジメンで、皮膚、腎臓及び血漿中 GL-3 濃度は無処置と比較して有意に低下したが、連日投与と比較して投与頻度を減らした隔日投与レジメン及び 4-on/3-off 投与レジメンでの基質濃度低下作用はより大きい傾向が認められた。また、強制経口投与と自由飲水投与による違いは認められなかった。ミガーラスタット塩酸塩の投与頻度を減らしたレジメンによるマウスの組織及び血漿中 GL-3 濃度低下作用は、アガルシダーゼ ベータ投与時と同程度であった（図 2.6.2- 19）。心臓の GL-3 濃度は免疫組織化学的アッセイでも評価し、細胞型特異的 GL-3 染色の減少が認められた。

以上の結果は、1 週間あたりの曝露量を減らした投与頻度の少ない「on-off」投与レジメンは、連日投与と比較して基質の蓄積をより減少させることを示している。

図 2.6.2- 19　hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩及びアガルシダーゼ ベータの作用



Eight-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were orally administered migalastat HCl (AT1001) (300 mg/kg/day free base) *ad libitum* in drinking water or by gavage for four weeks. Migalastat HCl was administered either daily or less-frequently using four cycles of a 4 on/3 off regimen or an every-other-day regimen. A separate group of mice was given a once-per-week tail vein injection of 1 mg/kg agalsidase beta (Fabrazyme®) for four weeks and GL-3 was measured. Significant reductions in GL-3 levels were seen in all tissues examined (*$p<0.05$ vs. untreated, t-test). Less-frequent migalastat HCl administration was as effective as agalsidase beta in reducing GL-3 in tissues and plasma in these mice (#$p<0.05$ vs. daily, t-test). The data represent the mean ± SEM of 7 mice/group analyzed in triplicate.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-10, Figure 4

2.2.4.2　幼若及び成熟 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対する長期投与の作用

（試験番号 RR1001-13、添付資料番号 4.2.1.1.15、評価資料）

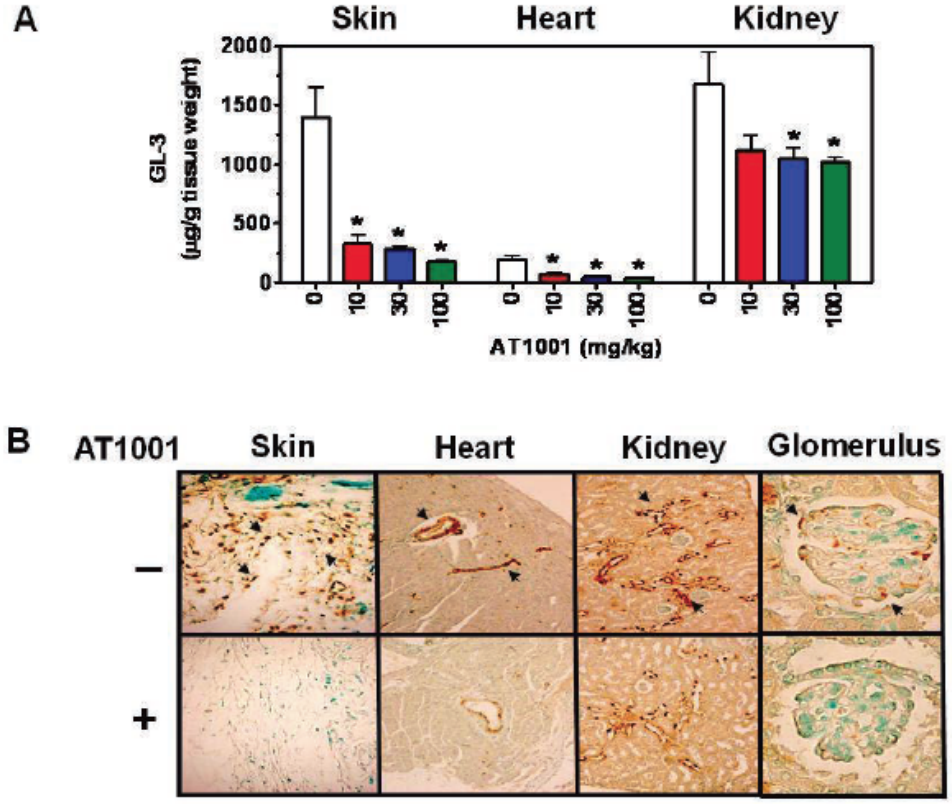
幼若及び成熟雄 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の作用を比較検討した。幼若マウス（試験開始時 4 週齢、8 匹／群）に、ミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、10、30 及び 100 mg/kg/日）を 24 週間連日自由飲水投与した。成熟マウス（試験開始時 24 週齢、14 匹／群）には、ミガーラスタット塩酸塩［遊離塩基換算で 0（連日投与のみ）、10、30、100 及び 300 mg/kg/日］を連日投与又は投与頻度を減らした 4-on/3-off 投与レジメンで、12 又は 24 週間自由飲水投与した。血漿、皮膚、心臓、腎臓及び脳（脳は 12 週間投与群の成熟マウスのみ）中の GL-3 濃度測定及び免疫組織化学的アッセイによる組織中の細胞型特異的 GL-3 濃度測定を実施した。組織中細胞型特異的 GL-3 濃度の測定では、皮膚、心臓、腎臓の他に糸球体を対象とした。糸球体への GL-3 蓄積は緩徐で、成熟トランスジェニックマウス及び KO マウスのみで観察されるため、長期投与試験では本組織での評価が特に重要である。

幼若マウスでは、組織中 GL-3 濃度は用量依存的に有意に低下し、皮膚、心臓及び腎臓における最大低下率はそれぞれ 88 ± 1%、78 ± 8%及び 39 ± 2%であった（図 2.6.2- 20A）。また、免疫組織化学的アッセイにより、皮膚、心臓及び腎臓の特定の細胞型で用量依存的な GL-3 濃度の低下が示され、低下の程度は 100 mg/kg/日群で最大であった（図 2.6.2- 20B）。100 mg/kg/日の投与 24 週目では、糸球体でも GL-3 染色細胞の有意な減少が認められた。また、血漿中 GL-3 濃度も有意に低下し、10、30 及び 100 mg/kg/日群での最大低下率はそれぞれ 53 ± 7%、45 ± 7%及び 59 ± 4%であった。

成熟マウスでも、組織中 GL-3 濃度は用量依存的に有意に低下し、皮膚、心臓及び腎臓における最大低下率はそれぞれ 74 ± 4%、67 ± 6%及び 42 ± 7%であった。概して 12 週間投与よりも 24 週間投与での効果が高く、また 4-on/3-off 投与レジメンでの GL-3 濃度低下作用は連日投与より大きかった。4-on/3-off レジメン 24 週間投与において、皮膚、心臓及び腎臓での GL-3 濃度は、最大でそれぞれ 85 ± 3%、90 ± 2%及び 55 ± 4%低下した（図 2.6.2- 21）。血漿中 GL-3 濃度でも同様の結果が得られ、10、30、100 及び 300 mg/kg/日群において、4-on/3-off 投与レジメンでそれぞれ 42 ± 14%、65 ± 4%、72 ± 4%及び 79% ± 3%、連日投与でそれぞれ 41 ± 13%、54 ± 7%、62 ± 4%及び 63 ± 4%低下し、4-on/3-off 投与レジメンでは連日投与と比較して有意な GL-3 濃度低下作用を示した。ミガーラスタット塩酸塩 12 週間投与により、成熟マウス脳内での有意な α-Gal A 活性増加及び GL-3 濃度低下が認められた。

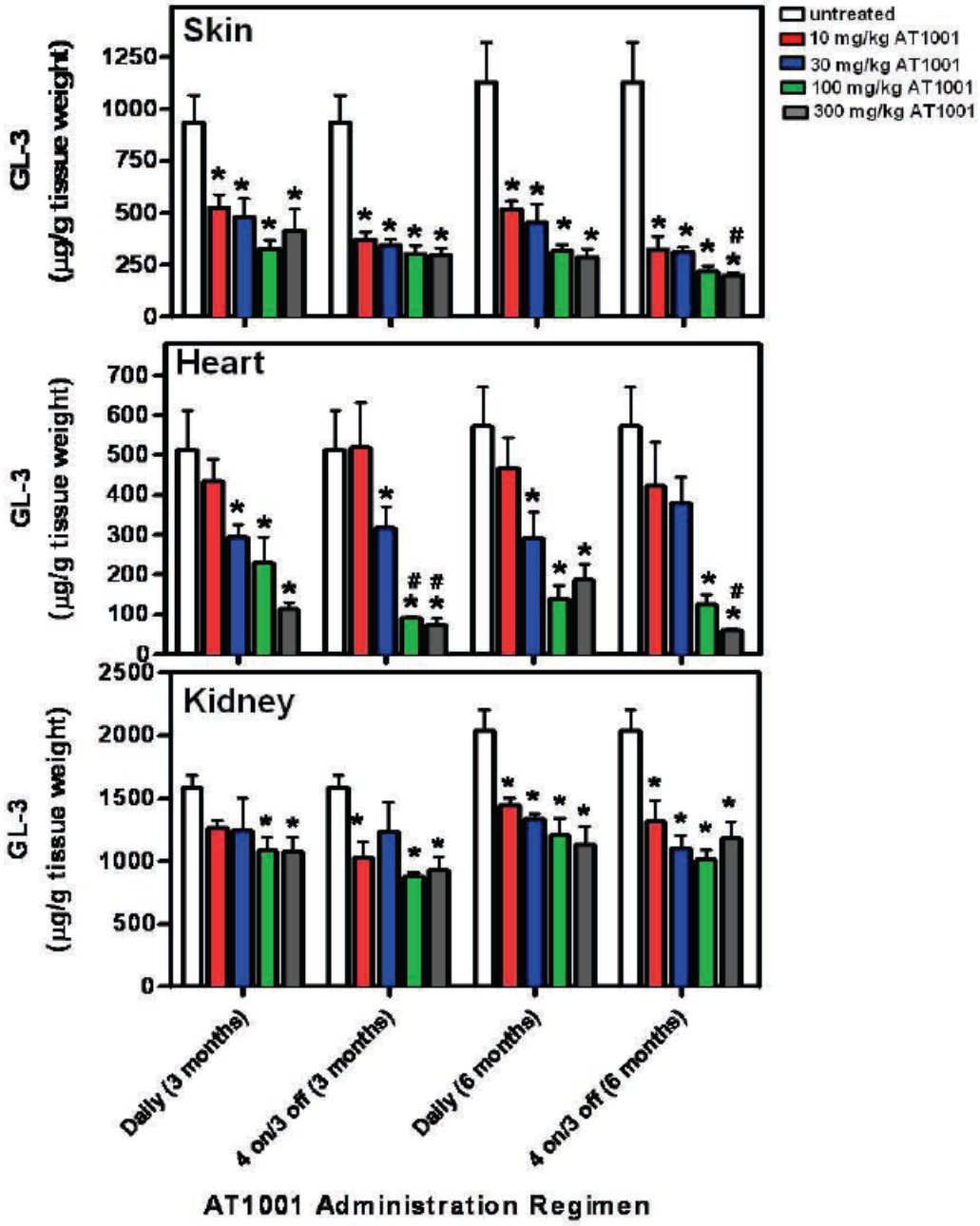
以上の結果より、ミガーラスタット塩酸塩は幼若 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウスでの GL-3 蓄積を予防するだけでなく、成熟マウスでの GL-3 蓄積を減少させることが示唆された。また、ミガーラスタット塩酸塩の投与頻度を減らすことにより、GL-3 蓄積量をさらに低下させることができることが示された。

図 2.6.2- 20　幼若 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 に対する
ミガーラスタット塩酸塩長期（24 週間）投与の作用



Panel A. Four-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered migalastat HCl (AT1001) ad libitum in drinking water for 24 weeks at the indicated doses. GL-3 levels were subsequently measured in skin, heart, and kidney lysates. Significant reductions in GL-3 were seen in all three tissues (*$p<0.05$ vs. untreated, t-test). The effect was also significant for a linear trend, indicating a dose-dependent decrease in GL-3 levels (posthoc analysis, $p<0.05$). Each bar represents the mean ± SEM of 7-8 mice/dose group analyzed in triplicate. **Panel B**. Cell type-specific GL-3 reductions were assessed by immunohistochemistry. GL-3 staining is represented as dark red spots denoted with black arrows; nuclei are counterstained with methyl green. The data shown are representative photomicrographs from 7-8 mice/group (magnification: 20X, except glomeruli: 40X).
HCl = hydrocholoride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-13, Figure 1

図 2.6.2- 21　成熟 hR301Q α-Gal A Tg/KO マウス組織中 GL-3 に対する
ミガーラスタット塩酸塩長期（12 及び 24 週間）投与の作用



Twenty-four-week old male hR301Q α-Gal A Tg/KO mice were administered migalastat HCl (AT1001) *ad libitum* in drinking water for 12 or 24 weeks either daily or less frequently using a 4 on/3 off regimen at the indicated doses. GL-3 levels were measured in lysates of skin, heart, and kidney. Dose-dependent and significant reductions in GL-3 were seen in all three tissues (*$p<0.05$ vs. untreated, t-test). Reduction of GL-3 in skin and heart was significantly greater after less-frequent administration compared to daily administration of 300 mg/kg/day (#$p<0.05$ daily vs. 4 on/3 off, t-test), especially with 24-week administration. Each bar represents the mean ± SEM of 7 mice/group analyzed in triplicate.

α-Gal A = alpha-galactosidase A, hR301Q α-Gal A Tg/KO mice = mouse model of Fabry disease that expresses a human mutant α-Gal A transgene (R301Q, found in Fabry) on a mouse *Gla* knockout background, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean

Source: Study RR1001-13, Figure 3

3　副次的薬理試験

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。ガラクトースと類似した構造を有するため、理論的には、リソソームの内外で標的以外の酵素を阻害する可能性がある。現在までに酵素選択性に関する以下のアッセイが実施されている。

3.1　受容体及び酵素スクリーニング

（試験番号 1080607、添付資料番号 4.2.1.2.1、参考資料）

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。

3.2　他のリソソーム酵素に及ぼす影響

効力を裏付ける試験において、α-Gal A 以外のリソソーム酵素に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討し、ミガーラスタット塩酸塩の α-Gal A に対する選択性を確認した。これらの試験には、9 つのリソソーム加水分解酵素（試験番号 RR1001-01、2.1.1 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 *iv vitro* 試験での GAA 及び GCase の評価（試験番号 RR1001-02、2.1.7.1 項）、並びに野生型 C57BL/6 マウスを用いた *in vivo* 試験（試験番号 RR1001-05、2.2.1 項）が含まれる。ミガーラスタット塩酸塩（10 µmol/L）は、NAGA（63%阻害）及び β-ガラクトシダーゼ（25%阻害）を除くその他のリソソーム酵素に対して、阻害作用を示さなかった。ミガーラスタット塩酸塩の NAGA 及び α-Gal A に対する IC_{50} 値はそれぞれ 6.94 µmol/L 及び 57.7 nmol/L で、NAGA に対するミガーラスタットの親和性は α-Gal A に対する親和性の約 120 分の 1 であった（図 2.6.2- 3）。

3.3　ヒト赤血球でのガラクトース代謝（ルロワール経路）関連酵素に及ぼす影響

（試験番号 2012N137381_00、添付資料番号 4.2.1.2.2、参考資料）

ガラクトース代謝（ルロワール経路）では、まずガラクトキナーゼの触媒作用によりガラクトースがガラクトース-1-リン酸に変換される。次に、ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼによってウリジン二リン酸（UDP）-グルコースからウリジン一リン酸塩（UMP）基がガラクトース-1-リン酸へ転移し、グルコース-1-リン酸及び UDP-ガラクトースが生成する。最後に、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼにより、UDP-ガラクトースが UDP-グルコースに可逆的に転換される。本試験では、ルロワール代謝経路に関与する 3 酵素（ガラクトキナーゼ、ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ）に及ぼすミガーラスタット塩酸塩（0、3、10、30 及び 100 µmol/L）の影響を、ヒト赤血球溶解物を用いて生化学的手法により評価した。

100 µmol/L までのミガーラスタット塩酸塩は、各基質の至適濃度又はミカエリス定数（K_m）に近い濃度条件下でガラクトキナーゼ、ガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ及び UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼの活性に影響しなかった。また、ミガーラスタット塩酸塩

100 µmol/L を 30 分間プレインキュベーションした場合でも、これら酵素活性に影響は認められなかった。以上の結果から、ミガーラスタットは、ルロワール経路に関与する酵素を不可逆的又は競合的に阻害しないことが示された。

3.4　正常ヒト線維芽細胞又はヒト肝細胞に及ぼす影響

（試験番号 RR1001-09、添付資料番号 4.2.1.2.3、評価資料）

肝細胞のミトコンドリア還元酵素活性を測定する *in vitro* 細胞増殖アッセイ（アラマーブルー法）を用いて、正常ヒト線維芽細胞（CRL2076）及びヒト肝細胞（HepG2）の細胞増殖に対するミガーラスタット塩酸塩の作用を検討した。正常ヒト線維芽細胞にミガーラスタット塩酸塩（1 mmol/L 以下）を添加して 5 日間培養したが、有意な細胞毒性作用は認められなかった。同様に、ヒト肝細胞にミガーラスタット塩酸塩（1 mmol/L 以下）を添加して 24 時間培養したが、有意な細胞毒性作用は認められなかった。陽性対照のスタウロスポリンでは、両細胞に対して細胞毒性が認められた。

4　安全性薬理試験

全ての安全性薬理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）に準拠して実施された。一連の *in vivo* 及び *in vitro* 安全性薬試験結果から、ミガーラスタット塩酸塩が中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対して影響を与える可能性は低いことが示唆された。

4.1　中枢神経系

（試験番号 247/004、添付資料番号 4.2.1.3.1、評価資料）

Irwin 試験を用いて主な中枢・末梢神経系機能評価を行い、様々な行動及び生理学的パラメータに及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を検討した。雄 Sprague-Dawley ラット（約 8 週齢、6 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩を水に溶解し、0（無処置）、0（溶媒）、3、30 及び 100 mg/kg で単回強制経口投与した。投与前及び投与後 0.5、1、2、5 及び 24 時間に Irwin 試験を実施した。

ミガーラスタット塩酸塩は 100 mg/kg/日までの強制経口投与において、自発運動、興奮性、知覚、運動、自律神経系、神経筋及び生理学的パラメータに無処置又は溶媒投与と比較して有意な変化を示さなかった。概してラットの主な中枢・末梢神経系機能に対してミガーラスタット塩酸塩による有意な作用は認められなかった。

4.2　心血管系

4.2.1　*In vitro* 試験

（試験番号 1748/AMI/03、添付資料番号 4.2.1.3.2、評価資料）

hERG カリウムチャネル電流に対するミガーラスタット塩酸塩の影響を、安定的に形質転換させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）-K1/hERG 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法（30°C）にて検討した。陽性対照として E-4031（3 µmol/L）を使用した。電圧固定した CHO-K1/hERG 細胞の電流トレースから測定したテール電流の最大振幅により阻害作用を評価した。ミガーラスタット塩酸塩の濃度は、0.00475、0.0475、0.475、4.75 及び 47.5 µmol/L とした。かん流液を用いた対照実験後、ミガーラスタット塩酸塩を低濃度から順にそれぞれ 5 個の細胞に曝露後、ウォッシュアウトした。また 3 個の細胞を陽性対照 E-4031 に曝露後、ウォッシュアウトした。

表 2.6.2- 4 に示す通り、ミガーラスタット塩酸塩は hERG カリウムチャネル電流に顕著な影響を及ぼさなかった。

表 2.6.2- 4　ミガーラスタット塩酸塩の hERG カリウムチャネル電流に及ぼす影響

	I_{tail}							
	Migalastat HCl						E-4031	
Concentration (μmol/L) (number of cells)	0.00475 (n=5)	0.0475 (n=5)	0.475 (n=5)	4.75 (n=5)	47.5 (n=5)	Wash (n=4)	3 (n=3)	Wash (n=2)
% of control current	101 ± 1	93 ± 6	101 ± 4	98 ± 2	95 ± 2	98 ± 5	2 ± 1	12 ± 5
% inhibition	-1	7	-1	2	5	2	98	88

I_{tail} = the tail current, HCl = hydrochloride. Data expressed as mean ± standard error of the mean
Source: Study 1748/AMI/03, Table 1 and Table 2

4.2.2　*In vivo* 試験

（試験番号 247/003、添付資料番号 4.2.1.3.3、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩の心血管系に対する影響を、テレメトリー装着覚醒ビーグル犬にて検討した。雌雄各 3 匹（8 ヵ月齢）のビーグル犬にミガーラスタット塩酸塩［0（溶媒）、3、30 及び 100 mg/kg］を水に溶解し、ラテン方格法により強制経口投与した。各投与間では、2 日間以上の休薬期間を設定した。測定は少なくとも投与前 2 時間から投与後 24 時間まで行った。

ミガーラスタット塩酸塩は行動及びその他の一般状態に影響を与えず、動脈圧（平均、拡張期及び収縮期）、心拍数、QT 間隔及び補正 QT 間隔（Bazett 法又は Fridericia 法）を含む心電図パラメータ並びに体温に、溶媒と比較して有意な作用を示さなかった。

4.3　呼吸器系

（試験番号 247/005、添付資料番号 4.2.1.3.4、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩の呼吸器系に対する影響を、覚醒無拘束ラットを用いた空気圧式全身プレチスモグラフィにて検討した。雄 Sprague-Dawley ラット（約 8 週齢、8 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩［0（溶媒）、3、30 及び 100 mg/kg］を水に溶解し、単回強制経口投与した。さらに、別のラット 8 匹に陽性対照としてヒスタミン二塩酸塩（0.05 mg/kg）を静脈内投与した。少なくとも 30 分間プレチスモグラフィーチャンバーに入れて馴化させた後、ベースライン値として投与前 30 分間、及び投与 240 分後まで、呼吸器パラメータ［呼吸数、1 回換気量、分時換気量、吸気時間、呼気時間、最大呼気流量、最大吸気流量、緩和時間及び PenH（エンハンスドポーズ；気管支収縮の指標）］を測定した。

ミガーラスタット塩酸塩は、溶媒対照と比較していずれの呼吸器パラメータにも有意な影響を示さなかった。一方、ヒスタミン二塩酸塩は気管支収縮を惹起し、呼吸数を増加させると同時に吸気時間を短縮させ、緩和時間を一過性に延長させた。この頻呼吸は 1 回換気量の増加を伴っており、結果として分時換気量が増加した。陽性対照の試験結果から、本試験の妥当性が確認された。

5　薬力学的薬物相互作用試験

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）。ミガーラスタットがアガルシダーゼ アルファ及びアガルシダーゼ ベータに結合することで、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が顕著に増加した（Benjamin et al. 2012）。本項では、アガルシダーゼ アルファ及びアガルシダーゼ ベータに及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響について、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を用いてさらに評価した。

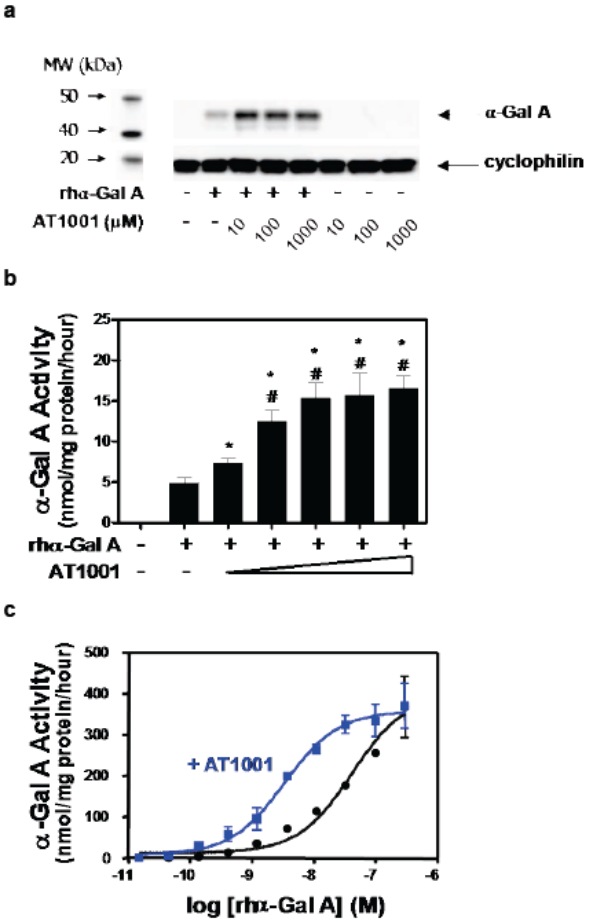
5.1　*In vitro* 試験：酵素補充療法との併用作用

5.1.1　α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ／ミガーラスタット塩酸塩併用作用

（試験番号 RR1001-17、添付資料番号 4.2.1.4.1、評価資料）

アガルシダーゼ ベータとミガーラスタット塩酸塩との併用作用を、ファブリー病患者由来線維芽細胞株 R301Q、L300P 及び C52S（C52S 変異体はミガーラスタット塩酸塩反応性ではない。2.1.5 項）を用いて検討した。これら細胞株の GL-3 濃度はアガルシダーゼ ベータ単独により有意に低下した。また、これら細胞株をアガルシダーゼ ベータ（0.5 nmol/L）及びミガーラスタット塩酸塩（10～1000 µmol/L）の併用下で 5 時間培養した結果、アガルシダーゼ ベータ単独と比較して 2 日後に細胞中 α-Gal A タンパク質濃度は 4.1～5.6 倍増加した。一方、ミガーラスタット塩酸塩単独による影響は認められなかった（図 2.6.2- 22a 及び表 2.6.2- 5）。同様に、アガルシダーゼ ベータ（0.5 nmol/L）及びミガーラスタット塩酸塩（0.1～1000 µmol/L）を併用した細胞の α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ ベータ単独と比較して約 3 倍増加した（図 2.6.2- 22b）。ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ ベータの併用による α-Gal A 活性に対する EC_{50} 値は、アガルシダーゼ ベータ単独時の約 10 分の 1 であり（4.6 ± 1.3 nmol/L vs. 48 ± 14 nmol/L、t-検定で $P<0.05$）（図 2.6.2- 22c）、アガルシダーゼ ベータの取り込みは、ミガーラスタット塩酸塩との併用により促進されることが示された。アガルシダーゼ ベータ単独では、最高濃度（300 nmol/L）で α-Gal A 活性は最大となり、ミガーラスタット塩酸塩との併用による活性の増加は認められなかった。

図 2.6.2- 22　ファブリー病患者由来線維芽細胞中 α-Gal A タンパク質量及び酵素活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用



(a) Fabry fibroblasts expressing C52S α-Gal A were incubated with rhα-Gal A (agalsidase beta) (0.5 nmol/L) alone or in the presence of increasing concentrations of migalastat HCl (AT1001) (10, 100, or 1000 μmol/L) for 5 hours. α-Gal A protein levels in cell lysates were measured by Western blot 2 days later. The data shown are representative of four independent experiments. Similar effects of co-incubation were seen in R301Q and L300P fibroblasts. **(b)** C52S Fabry fibroblasts were incubated with rhα-Gal A (0.5 nmol/L) alone or in the presence of increasing concentrations of migalastat HCl (0.1, 1, 10, 100, or 1000 μmol/L) for 5 hours. α-Gal A activity in cell lysates was measured 2 days later. The data points shown are the mean ± SEM of four wells tested in parallel from one representative of three independent experiments. *p<0.05 compared to baseline; #p<0.05 compared to rhα-Gal A alone; one-way ANOVA with Bonferroni posthoc analysis. Similar effects of co-incubation were seen in R301Q and L300P fibroblasts. **(c)** C52S Fabry fibroblasts were incubated with increasing concentrations of rhα-Gal A alone or in the presence of 1 mmol/L migalastat HCl for 5 hours. α-Gal A activity in cell lysates was measured 2 days later. The data points shown are the mean ± SEM of four wells tested in parallel from one representative experiment.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, rhα-Gal A = recombinant human α-Gal A, HCl = hydrochloride, ANOVA= analysis of variance, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-17, Figure 3

表 2.6.2- 5　各ファブリー病患者由来線維芽細胞株における α-Gal A タンパク質量及び酵素活性並びに GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用

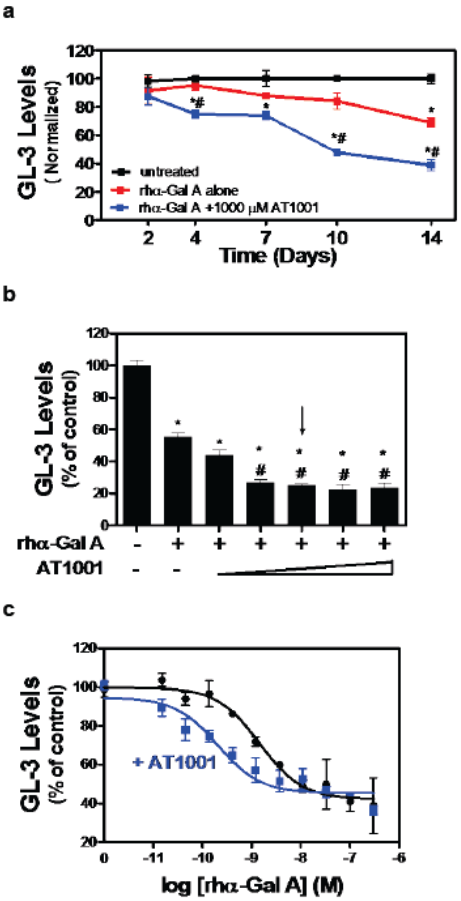
Fibroblast Genotype	rhα-Gal A (nmol/L)	AT1001 (μmol/L)	α-Gal A Protein (Increase Relative to rhα-Gal A Alone)	α-Gal A Activity (nmol/mg/hr)	GL-3 Levels (% of control)
C52S (c.155 G>C)	0	0	nd	0 ± 1	100 ± 6
	0.5	0	1	8 ± 3	67 ± 7*
		0.1	nt	14 ± 6*	56 ± 8*
		1.0	nt	20 ± 6*	44 ± 9*#
		10	4.4 ± 1.1*#	20 ± 5*	40 ± 8*#
		100	4.7 ± 1.5*#	22 ± 8*#	37 ± 10*#
		1000	5.6 ± 2.0*#	25 ± 11*#	39 ± 8*#
R301Q (c.902 G>A)	0	0	nd	1 ± 1	100 ± 4
	0.5	0	1*	7 ± 3	67 ± 10*
		0.1	nt	8 ± 3	67 ± 9*
		1.0	nt	14 ± 3*	51 ± 9*
		10	4.8 ± 1.5*#	14 ± 4*	39 ± 9*#
		100	5.0 ± 1.6*#	22 ± 4*#	38 ± 8*#
		1000	4.7 ± 1.5*#	23 ± 9*#	36 ± 7*#
L300P (c.899 T>C)	0	0	nd	0.4 ± 0.5	100 ± 4
	0.5	0	1	6 ± 2	84 ± 8
		0.1	nt	8 ± 3*	79 ± 9*
		1.0	nt	14 ± 5*#	67 ± 9*
		10	4.1 ± 0.9*	16 ± 4*#	62 ± 10*#
		100	4.5 ± 1.3*#	18 ± 4*#	58 ± 8*#
		1000	4.2 ± 1.3*#	18 ± 5*#	60 ± 7*#

Three different male Fabry patient-derived fibroblast cell lines (with the indicated genotypes) were incubated with rhα-Gal A (0.5 nmol/L) alone or in the presence of increasing concentrations of migalastat HCl (AT1001) for 5 hours. α-Gal A protein levels (expressed as the measured amount of α-Gal A protein after co-incubation divided by that measured after rhα-Gal A incubation alone) and α-Gal A activity (expressed as nmoles of free 4-MU released per milligram of protein per hour) were measured in cell lysates two days later. Cellular GL-3 levels (expressed as the percentage of untreated Fabry fibroblast GL-3 levels) were measured 10 days later. Data represent the mean ± SEM of three or more independent experiments. *p<0.05 compared to baseline; #p<0.05 compared to rhα-Gal A incubation alone; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis. α-Gal A = alpha-galactosidase A, rhα-Gal A = recombinant human α-Gal A, HCl = hydrochloride, 4-MU = 4-methyl-umbelliferone, GL-3 = globotriaosylceramide, ANOVA= analysis of variance, SEM = standard error of the mean, nd = not detectable, nt = not tested.
Source: Study RR1001-17, Table 2

アガルシダーゼ ベータ（0.5 nmol/L）とミガーラスタット塩酸塩（1000 μmol/L）との併用下でファブリー病患者由来線維芽細胞を 5 時間培養した。培養後 10 日及び 14 日目の細胞中 GL-3 濃度は、無処置の細胞中 GL-3 濃度と比べてそれぞれ 1/2.3 及び 1/2.2 に低下したが、アガルシダーゼ ベータ単独の場合、それぞれ 1/1.4 及び 1/1.5 の低下作用であった（図 2.6.2- 23a）。アガルシダーゼ ベータとミガーラスタット塩酸塩との併用により、アガルシダーゼ ベータ単独と比較し

て GL-3 濃度は最大 31%低下した（図 2.6.2- 23b 及び表 2.6.2- 5）。ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ ベータの併用による GL-3 濃度に対する EC_{50} 値は、アガルシダーゼ ベータ単独時より低く（0.12 ± 0.03 nmol/L vs. 0.7 ± 0.3 nmol/L、t-検定で $P<0.05$）（図 2.6.2- 23c）、アガルシダーゼ ベータによる GL-3 低下作用は、ミガーラスタット塩酸塩との併用により促進されることが示された。0.5 nmol/L よりはるかに高い濃度（3.7～300 nmol/L）のアガルシダーゼ ベータは単独で GL-3 濃度低下作用が最大となり、ミガーラスタット塩酸塩との併用による作用の増大は認められなかった。アガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用による α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対する作用は、培地に両薬剤を同時添加した際に認められた。

図 2.6.2- 23　ファブリー病患者由来線維芽細胞中 GL-3 濃度に対する
アガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用



(a) C52S Fabry fibroblasts were incubated with rhα-Gal A (agalsidase beta) (0.5 nmol/L) alone or in the presence of 1000 µmol/L migalastat HCl (AT1001) for 5 hours, followed by measurement of GL-3 levels at the indicated time points. The data points shown are the mean ± SEM of three wells tested in parallel from one representative experiment. *p<0.05 compared to baseline; #p<0.05 compared to rhα-Gal A alone; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis. **(b)** C52S Fabry fibroblasts were incubated with rhα-Gal A (0.5 nmol/L) alone or in the presence of increasing concentrations of migalastat HCl (0.1, 1, 10, 100, or 1000 µmol/L) for 5 hours. GL-3 levels were then measured 10 days later. The data points shown are the mean ± SEM of three wells tested in parallel from one representative of three independent experiments. *p<0.05 compared to baseline; #p<0.05 compared to rhα-Gal A alone; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis. Similar effects after co-incubation were seen in R301Q and L300P fibroblasts. **(c)** C52S Fabry fibroblasts were incubated with increasing concentrations of rhα-Gal A alone or in the presence of 1 mmol/L migalastat HCl for 5 hours. GL-3 levels were then measured 10 days later. The data points shown are the mean ± SEM of four wells tested in parallel from one representative experiment.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, rhα-Gal A = recombinant human α-Gal A, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, ANOVA= analysis of variance, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-17, Figure 4

5.1.2　α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータ／ミガーラスタット塩酸塩併用作用

（試験番号 RR1001-37、添付資料番号 4.2.1.4.2、評価資料）

5.1.1 項と同様に、ファブリー病患者由来線維芽細胞（C52S）を用いてアガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータの活性に対するミガーラスタット塩酸塩の作用を評価した。

ファブリー病患者由来線維芽細胞をアガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータ（85 nmol 4-メチルウンベリフェロン/mL/hr）とミガーラスタット塩酸塩（0.1、1.0 及び 10 µmol/L）の併用で 5 時間培養した。培養 2 日目にいずれかの酵素単独と比較して細胞中 α-Gal A 活性は 2.7～4.0 倍増加した。ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ アルファの併用による α-Gal A 活性に対する EC_{50} 値は、アガルシダーゼ アルファ単独時の約 1/2 であった（7.5 ± 1.0 nmol/L vs. 16.7 ± 1.2 nmol/L、対応のない両側 t-検定で $P<0.05$）。この併用作用は、アガルシダーゼ ベータと併用した場合と同程度であった（アガルシダーゼ ベータ単独で 13.7 ± 2.7 nmol/L、ミガーラスタット塩酸塩との併用で 4.7 ± 0.4 nmol/L）。

ファブリー病患者由来線維芽細胞をアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩との併用で 5 時間培養後、GL-3 濃度は 29%～37%低下した。一方、アガルシダーゼ アルファ単独では 14%低下した。一方、アガルシダーゼ ベータとミガーラスタット塩酸塩を同条件下で併用した結果、両薬剤併用時の GL-3 濃度低下作用は酵素単独時と比較してやや大きかった（アガルシダーゼ ベータ単独で 18%、ミガーラスタット塩酸塩との併用で 40%～48%）。ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ アルファの併用による GL-3 濃度に対する EC_{50} 値は、アガルシダーゼ アルファ単独時の約 1/3 であった（アガルシダーゼ アルファ単独で 0.73 ± 0.14 nmol/L、ミガーラスタット塩酸塩との併用で 0.29 ± 0.12 nmol/L、対応のない両側 t-検定で $P<0.05$）。0.5 nmol/L よりはるかに高い濃度（5.6～50 nmol/L）のアガルシダーゼ アルファは、単独で GL-3 濃度低下作用が最大となり、ミガーラスタット塩酸塩との併用による作用の増大は認められなかった。この併用作用は、アガルシダーゼ ベータと併用した場合と同程度であった。その EC_{50} 値は約 1/3 であった（アガルシダーゼ ベータ単独で 0.47 ± 0.16 nmol/L、ミガーラスタット塩酸塩との併用で 0.14 ± 0.07 nmol/L。対応のない両側 t-検定で P<0.05）。

本試験は 5.1.1 項の結果を再現した。またミガーラスタット塩酸塩と酵素の併用作用は、アガルシダーゼ酵素型（アガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータ）に依存しないという新たな知見も得られた。

5.2　*In vivo* 試験：酵素補充療法との併用作用

Gla KO マウス及び Sprague-Dawley ラットを用いた *in vivo* 試験で、ミガーラスタット塩酸塩と酵素補充療法（アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファ）との相互作用の可能性を検討した。ミガーラスタット塩酸塩単独の作用を評価した試験に使用した hR301Q α-Gal A Tg/KO マウスと異なり、*Gla* KO マウスは機能性内因性 α-Gal A タンパク質を欠損しており、ミガーラスタット塩酸塩単独ではこれらの動物に作用しない（2.2.2.3 項）。*Gla* KO マウスを使用することにより、アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファの活性に及ぼすミガーラスタット塩酸塩の影響を容易に判断することができる。

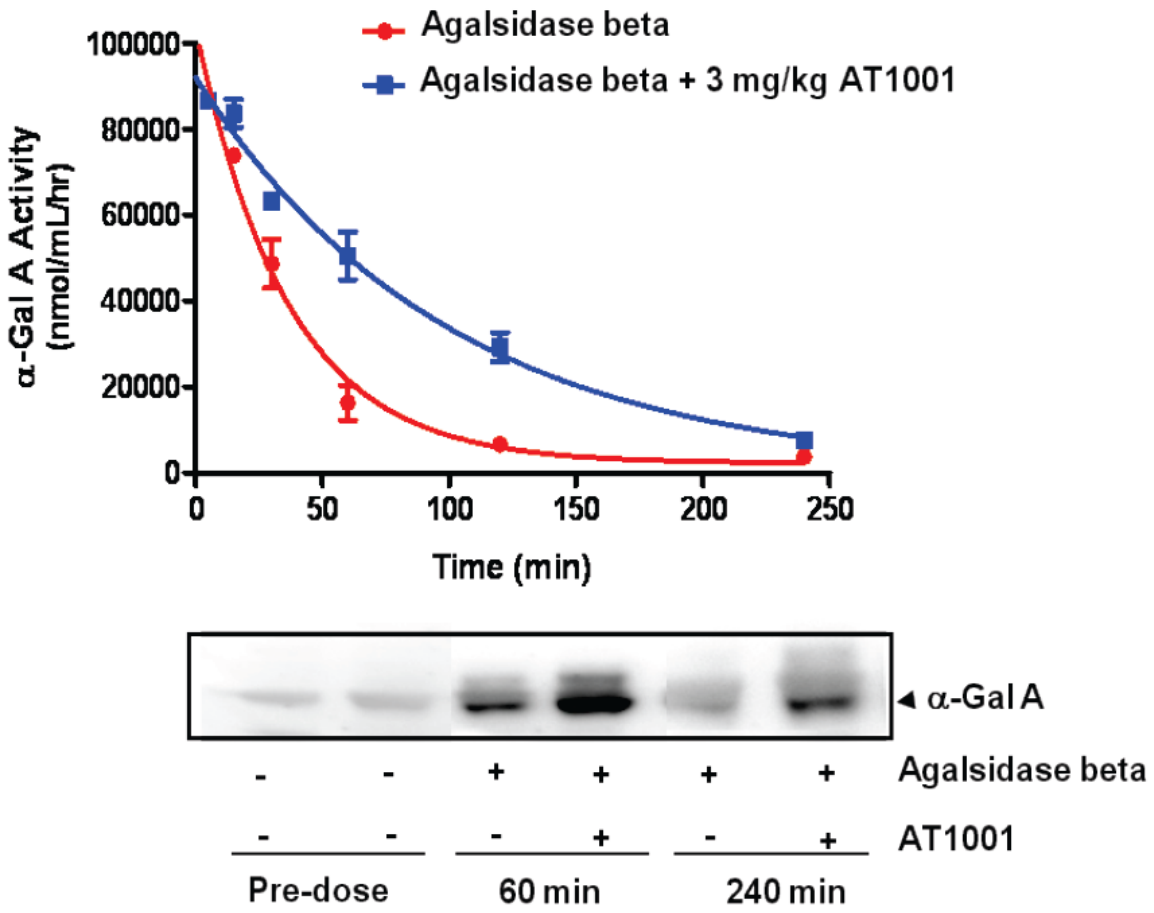
5.2.1　ラット及び *Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ又はアガルシダーゼ ベータ／ミガーラスタット塩酸塩の併用作用

（試験番号 RR1001-16、添付資料番号 4.2.1.4.3、評価資料）
（試験番号 RR1001-31、添付資料番号 4.2.1.4.4、評価資料）

アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファ（静脈内投与）による血漿中 α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩（強制経口投与）の影響を、ラット及び *Gla* KO マウスを用いて検討した（試験番号 RR1001-16）。雄 Sprague-Dawley ラット（8 週齢、3 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0 及び 3 mg/kg）を単回強制経口投与し、血中で最大の物理的薬物相互作用が得られる（すなわち、ミガーラスタットの最高血漿中濃度到達時間）投与 30 分後にアガルシダーゼ ベータ（10 mg/kg）を静脈内投与した。同様に、別の雄 Sprague-Dawley ラット（8 週齢、3 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、1、3、10 及び 30 mg/kg）を単回強制経口投与し、30 分後にアガルシダーゼ アルファ（0.2 mg/kg）を静脈内投与した。アガルシダーゼ ベータ投与では投与後 24 時間まで、アガルシダーゼ アルファ投与では投与後 48 時間までの全ての検体採取時点で、血漿中 α-Gal A 活性を測定した。一方、α-Gal A タンパク質濃度は、投与後 48 時間までの複数の時点で測定した。

ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ ベータとの併用投与により、ラット血漿中 α-Gal A 活性の $t_{1/2}$ は約 2.6 倍に増加した。アガルシダーゼ ベータ単独投与時、血漿中 α-Gal A 活性は速やかに低下し、その $t_{1/2}$ は約 24 分であったのに対し、ミガーラスタット塩酸塩併用投与での $t_{1/2}$ は約 63 分であった。アガルシダーゼ ベータ投与 60 及び 240 分後に採取したサンプルをウェスタンブロット法で解析した結果、アガルシダーゼ ベータ単独投与時と比較してミガーラスタット塩酸塩併用投与では血漿中 α-Gal A タンパク質濃度が増加している（それぞれ 2.5 及び 1.5 倍）ことが示された（図 2.6.2- 24）。

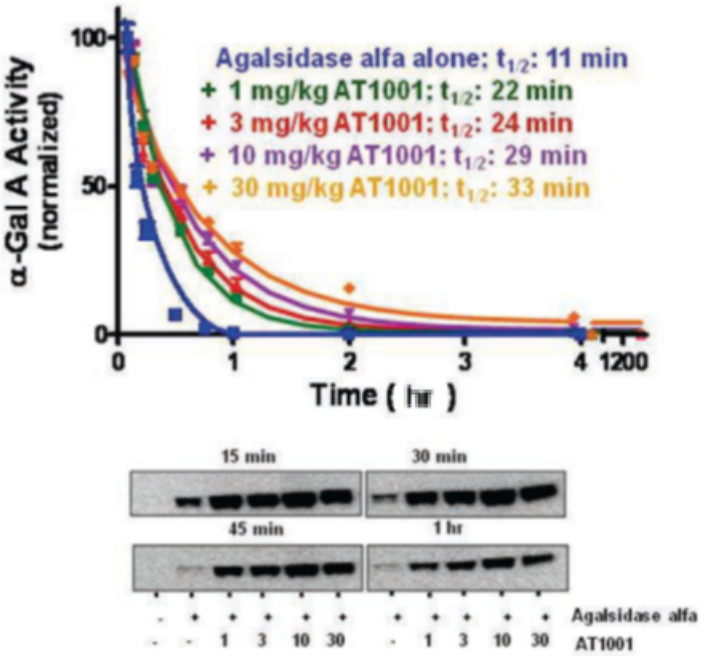
図 2.6.2- 24　ラットの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及び
ミガーラスタット塩酸塩の併用作用



Eight-week-old male Sprague-Dawley rats were administered vehicle or a single oral gavage dose of 3.66 mg/kg migalastat HCl (AT1001) (equivalent to 3 mg/kg of free base), followed 30 minutes later by a tail vein injection of 10 mg/kg agalsidase beta. Blood was collected at the indicated time points and α-Gal A activity and protein levels were measured in plasma by activity and Western blotting, respectively. **Upper Panel**: Plasma α-Gal A activity plotted as a function of time after administration of agalsidase beta. The data presented have been normalized to pre-dose levels and represent mean ± SEM of the activity measured in plasma from 3 rats per time point. **Lower Panel**: α-Gal A protein levels were determined in pre-dose, 60-, and 240-minute plasma samples by Western blotting. Each lane on the Western blot contains plasma from a single rat and the Western blot shown is representative of two experiments.
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-16, Figure 1

アガルシダーゼ アルファ単独投与時、血漿中 α-Gal A 活性は速やかに低下し、その $t_{1/2}$ は約 11 分であったが、ミガーラスタット塩酸塩併用投与時の $t_{1/2}$ は用量依存的に顕著に増加し、最大で 33 分と 3 倍に延長した。特定の測定時点で採取したサンプルをウェスタンブロット法で解析した結果、アガルシダーゼ アルファ単独投与と比較してミガーラスタット塩酸塩併用投与では、血漿中 α-Gal A タンパク質濃度が顕著に増加していることが示された（図 2.6.2- 25）。

図 2.6.2- 25　ラットの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用

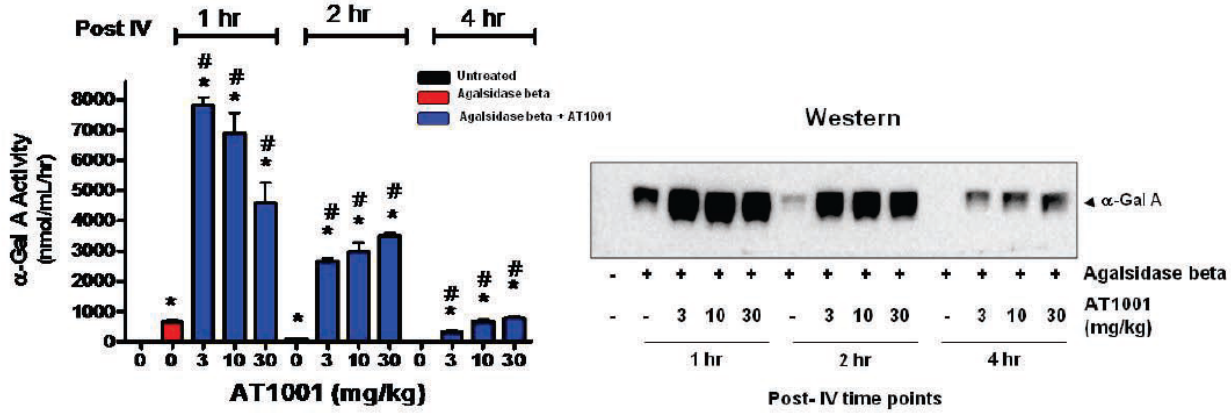


Eight-week-old male Sprague-Dawley rats were administered a single oral gavage dose of 3.66 mg/kg migalastat HCl (AT1001) (equivalent to 3 mg/kg of free base), followed 30 minutes later by a tail vein injection of 0.2 mg/kg agalsidase alfa. Blood was collected at the indicated time points and α-Gal A activity and protein levels were measured in plasma by activity and Western blotting, respectively. **Upper Panel**: Plasma α-Gal A activity plotted as a function of time after administration of agalsidase alfa. The data presented have been normalized to pre-dose levels and represent the mean ± SEM of the activity measured in plasma from 3 rats per time point. Pre-dose plasma α-Gal A activity was approximately 30 nmol/mL/hr. **Lower Panel:** α-Gal A protein levels were determined by Western blotting at the indicated time points. Each lane on the Western blot contains plasma from a single rat and the Western blot shown is representative of two experiments.
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-16, Figure 3

Gla KO マウスを用いて、アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩との併用作用を検討した。雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、5 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、3、10 及び 30 mg/kg）を単回強制経口投与し、その 30 分後にアガルシダーゼ ベータ（1 mg/kg）を静脈内投与した。同様に、別の雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、7 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、1、3、10 及び 30 mg/kg）を単回強制経口投与し、その 30 分後にアガルシダーゼ アルファ（0.2 mg/kg）を静脈内投与した。血漿中 α-Gal A 活性及びタンパク質濃度を投与 1、2 及び 4 時間後に測定した。

アガルシダーゼ ベータ投与 30 分前にミガーラスタット塩酸塩を強制経口投与することで、*Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性は有意に上昇した。アガルシダーゼ ベータ単独投与 4 時間後の血漿中 α-Gal A 活性は検出限界付近であった。一方、ミガーラスタット塩酸塩併用投与時アガルシダーゼ ベータ投与 1、2 及び 4 時間後の α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ ベータ単独投与と比較してそれぞれ 12、40 及び 90 倍増加した。またウェスタンブロット法により、ミガーラスタット塩酸塩併用投与時の *Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A タンパク質濃度は増加し、高値で維持されることが確認された（図 2.6.2- 26）。

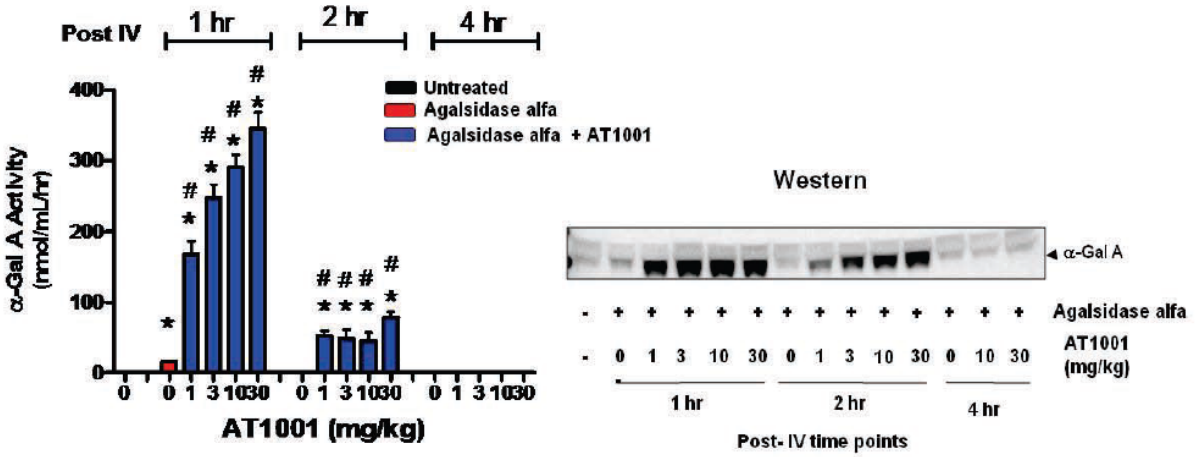
図 2.6.2- 26　*Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用



Twelve-week-old male *Gla* KO mice were administered a single oral gavage dose of 3.66, 12.2, or 36.6 mg/kg migalastat HCl (AT1001) (equivalent to 3, 10, and 30 mg/kg of free base respectively), followed 30 minutes later by a tail vein injection of 1 mg/kg agalsidase beta. Blood was collected at the indicated time points and α-Gal A activity and protein levels were measured in plasma by activity or Western blotting, respectively. **Left Panel:** Plasma α-Gal A activity plotted as a function of time after administration of agalsidase beta. The data presented are the mean ± SEM of the activity measured in plasma from 5 mice per time point (*p<0.05 compared to baseline, t-test; #p<0.05 compared to agalsidase beta alone, t-test). **Right Panel**: α-Gal A protein levels were determined in pre-dose, 1-, 2- and 4-hr plasma samples by Western blotting. Each lane on the Western blot contains plasma from a single mouse and the Western blot shown is representative of two experiments.
HCl = hydrochloride, α-Gal A = alpha-galactosidase A, *Gla* KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-16, Figure 2

同様に、アガルシダーゼ アルファ静脈内投与前 30 分にミガーラスタット塩酸塩を強制経口投与した場合でも、*Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性は有意に上昇した。アガルシダーゼ アルファ単独投与では、投与 2 時間後の血漿中 α-Gal A 活性は検出限界付近であった。一方、ミガーラスタット塩酸塩併用投与時アガルシダーゼ アルファ投与 1 及び 2 時間後の α-Gal A 活性は用量依存的に増加し、アガルシダーゼ アルファ単独投与時と比較して最大 21.5 倍（投与 1 時間後）まで増加した。またウェスタンブロット法により、ミガーラスタット塩酸塩併用投与時の *Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A タンパク質濃度は増加し、高値で維持されることが確認された（図 2.6.2- 27）。

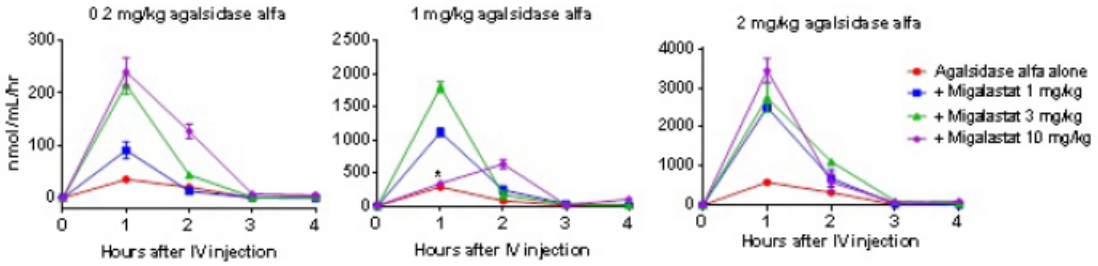
図 2.6.2- 27　*Gla* KO マウスの血漿中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用



Twelve-week-old male *Gla* KO mice were administered a single oral gavage dose of 1.22, 3.66, 12.2, or 36.6 mg/kg migalastat HCl (AT1001) (equivalent to 1, 3, 10, and 30 mg/kg of free base, respectively), followed 30 minutes later by a tail vein injection of 0.2 mg/kg agalsidase alfa. Blood was collected at the indicated time points and α-Gal A activity and protein levels were measured in plasma by activity and Western blotting, respectively. **Left Panel**: Plasma α-Gal A activity plotted as a function of time after administration of agalsidase alfa. The data presented are the mean ± SEM of the activity measured in plasma from 7 mice per time point (*p<0.05 compared to baseline, t-test; #p<0.05 compared to agalsidase alfa alone, t-test). **Right Panel**: α-Gal A protein levels were determined in pre-dose, 1-, 2- and 4-hr plasma samples by Western blotting. Each lane on the Western blot contains plasma from a single mouse and the Western blot shown is representative of two experiments.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, *Gla* KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, HCl = hydrochloride, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-16, Figure 4

アガルシダーゼ アルファ（0.2、1 及び 2 mg/kg、週 1 回、静脈内投与）及びミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 1、3 及び 10 mg/kg、アガルシダーゼ アルファ投与 30 分前に強制経口投与）を 4 週間併用投与した場合の血漿中アガルシダーゼ アルファ濃度に及ぼす影響を、*Gla* KO マウス（12 週齢、6 匹／群）を用いて検討した（試験番号 RR1001-31）。血漿中アガルシダーゼ アルファ濃度は、静脈内投与 1、2、3 及び 4 時間後の α-Gal A 活性から算出した。血漿中濃度は、アガルシダーゼ アルファの用量増加に比例して増加した。一方、ミガーラスタット塩酸塩との併用投与では、アガルシダーゼ アルファの単独投与時と比較して α-Gal A 活性は明らかに高く、本作用はミガーラスタット塩酸塩の用量に依存した（図 2.6.2- 28）。

図 2.6.2- 28　アガルシダーゼ アルファの血漿中薬物動態に対する
ミガーラスタット塩酸塩の併用作用



Plasma α-Gal A activity in the first four hours after IV injection of agalsidase alfa. *Sampling time point error at 1 hour in migalastat HCl 10 mg/kg group. Doses of migalastat HCl are given in free base equivalents.
α-Gal A = alpha-galactosidase A, IV = intravenous, HCl = hydrochloride
Source: Study RR1001-31, Figure 5

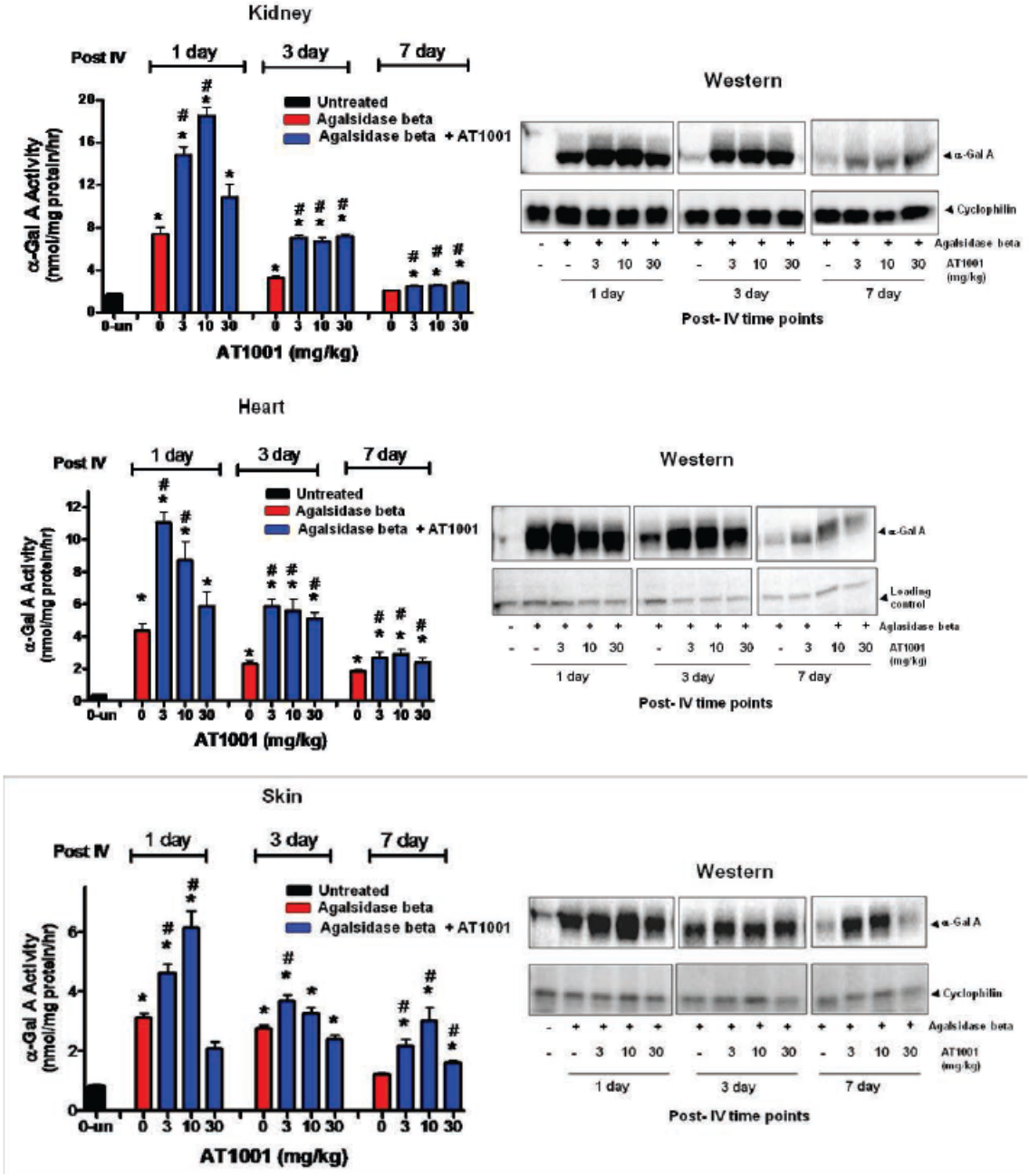
5.2.2　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用

（試験番号 RR1001-20、添付資料番号 4.2.1.4.5、評価資料）
（試験番号 RR1001-18、添付資料番号 4.2.1.4.6、評価資料）
（試験番号 RR1001-21、添付資料番号 4.2.1.4.7、評価資料）

アガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファによる組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するミガーラスタット塩酸塩の影響を、*Gla* KO マウスを用いて検討した（試験番号 RR1001-20）。アガルシダーゼ アルファの結果については、5.2.3 項で考察する。雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、5 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、3、10 及び 30 mg/kg）を単回強制経口投与し、その 30 分後にアガルシダーゼ ベータ（0 及び 1 mg/kg）を静脈内投与した。アガルシダーゼ ベータ投与 1、3 及び 7 日後にマウスを安楽死させ、皮膚、心臓、腎臓及び血漿中の α-Gal A 活性、α-Gal A タンパク質濃度及び GL-3 濃度を測定した。だたし、血漿中での測定は GL-3 濃度のみとした。

ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ ベータとの併用投与により、投与 1 日後の皮膚、心臓及び腎臓での α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ ベータ単独投与時のそれぞれ約 2.3、約 2.6 及び約 2.5 倍に増加した。併用投与 3 及び 7 日後の α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ ベータ単独投与と比較して有意に高かった（図 2.6.2- 29）。投与 1、3 及び 7 日後の組織中 α-Gal A 活性は経時的に減少したが、アガルシダーゼ ベータ単独投与と比較してミガーラスタット塩酸塩との併用投与では有意に高く、長期にわたって高値が持続した。アガルシダーゼ ベータの単独投与と比較してミガーラスタット塩酸塩との併用投与では、全ての組織中 α-Gal A タンパク質濃度が有意に増加した。併用投与 7 日後の皮膚、心臓及び腎臓における GL-3 濃度低下作用は、アガルシダーゼ ベータ単独投与時のそれぞれ約 4.0、約 2.5 及び約 2.0 倍となった（図 2.6.2- 30）。概して、組織及び血漿中 GL-3 濃度低下作用は経時的に増大し（投与 7 日後＞3 日後＞1 日後）、アガルシダーゼ ベータ単独投与と比較してミガーラスタット塩酸塩との併用投与による作用は有意に増大した。

図 2.6.2- 29　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用

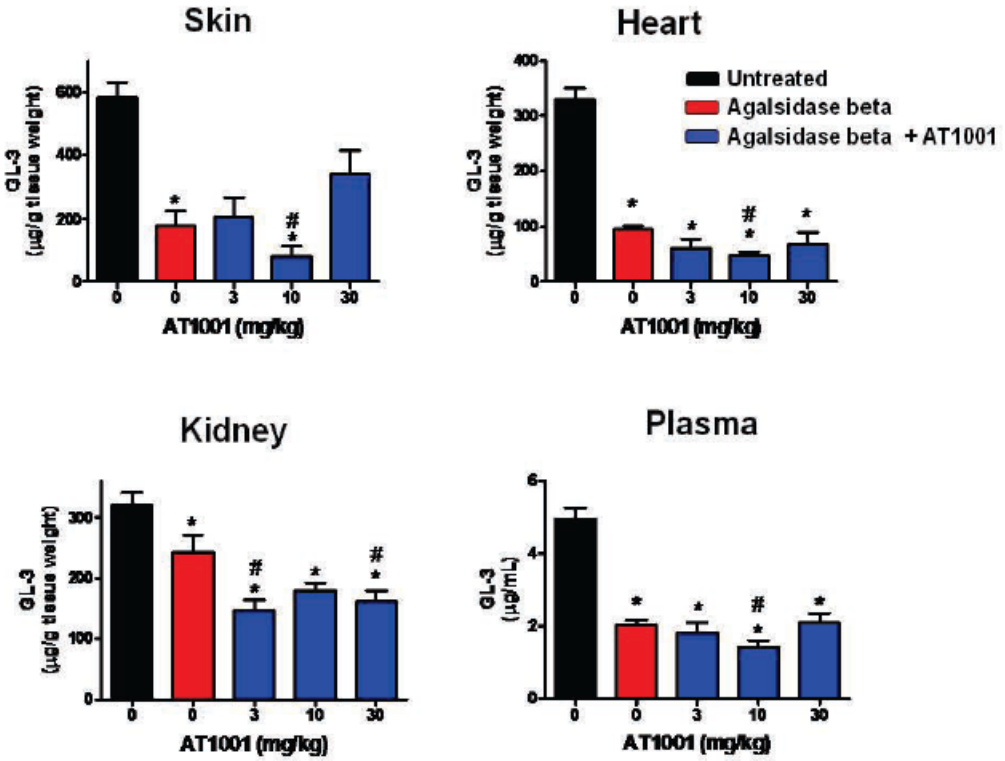


Twelve-week-old male *Gla* KO mice were given a single oral administration of migalastat HCl (AT1001) (3, 10, or 30 mg/kg free base), thirty minutes prior to 1 mg/kg agalsidase beta bolus tail vein IV injection. Mice were euthanized 1, 3, and 7 days post-agalsidase beta injection to measure tissue α-Gal A activity and protein levels. Co-administration of migalastat HCl resulted in significantly greater tissue α-Gal A activity and protein compared to administration of agalsidase beta alone. The bars on each graph represent the mean ± SEM for 5 mice per group. *p<0.05 compared to untreated, t-test; #p<0.05, compared to agalsidase beta administration alone, t-test. Each lane on the Western blots contains plasma from a single mouse, and is representative of two mice in each group.

α-Gal A = alpha-galactosidase A, *Gla* KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, HCl = hydrochloride, IV = intravenous, SEM = standard error of the mean

Source: Study RR1001-20, Figure 1

図 2.6.2- 30　*Gla* KO マウスの組織中 GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ ベータ及び ミガーラスタット塩酸塩の併用作用



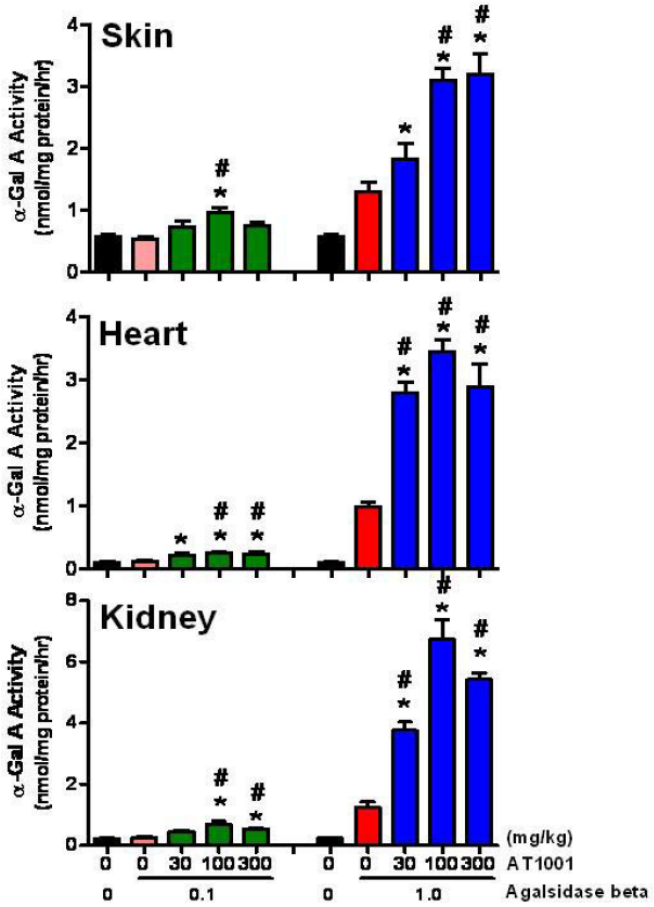
Twelve-week-old male *Gla* KO mice were given a single oral administration of migalastat HCl (AT1001) (3, 10, or 30 mg/kg free base), thirty minutes prior to a 1 mg/kg agalsidase beta bolus tail vein injection. Mice were euthanized 7 days post-agalsidase beta injection to measure tissue GL-3 levels. Co-administration of migalastat HCl resulted in significantly greater tissue GL-3 reduction compared to administration of agalsidase beta alone. The bars on each graph represent the mean ± SEM for 5 mice per group. * $p<0.05$ compared to untreated, t-test; #$p<0.05$, compared to agalsidase beta administration alone, t-tests.
Gla KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, α-Gal A = alpha-galactosidase A, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-20, Figure 2

ミガーラスタット塩酸塩（2 回投与）とアガルシダーゼ ベータ（単回投与）との併用投与による組織中 α-Gal A 及び GL-3 濃度に及ぼす作用を *Gla* KO マウスを用いて検討した（試験番号 RR1001-18）。雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、7 又は 8 匹／群）にアガルシダーゼ ベータ（0、0.03、0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg）を静脈内投与し、その投与 30 分前及び投与 2 時間後にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、30、100 及び 300 mg/kg）を強制経口投与した。アガルシダーゼ ベータ投与 3、7 及び 14 日後にマウスを屠殺し、皮膚、心臓、腎臓及び血漿中の α-Gal A 活性、GL-3 濃度及び細胞型特異的組織中 GL-3 濃度を測定した（血漿中は GL-3 濃度測定のみ）。

アガルシダーゼ ベータ 1 mg/kg 投与 3 日後の皮膚、心臓及び腎臓の α-Gal A 活性は有意に増加し、ベースライン値のそれぞれ最大 2.0、8.5 及び 5.4 倍となった。アガルシダーゼ ベータ投与 30 分前及び 2 時間後にミガーラスタット塩酸塩を併用投与すると、α-Gal A 活性はさらに増大し、皮膚、心臓及び腎臓の α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ ベータ単独投与時のそれぞれ最大 2.7、4.1 及び 5.2 倍となった（図 2.6.2- 31）。一方、1/10 量（0.1 mg/kg）のアガルシダーゼ ベータ単独投与では、α-Gal A 活性にベースライン値からの増加はみられなかったが、ミガーラスタット

塩酸塩の併用投与により、皮膚、心臓及び腎臓中の α-Gal A 活性はベースライン値のそれぞれ 1.6、2.5 及び 3.5 倍に有意に増加した。組織中 α-Gal A 活性に対するミガーラスタット塩酸塩の併用作用は、投与 7 及び 14 日後にも観察され、同様の併用作用はアガルシダーゼ ベータ 0.3 mg/kg 投与時にも認められた。アガルシダーゼ ベータ 1 mg/kg 及びミガーラスタット塩酸塩との併用投与による心臓及び腎臓の α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ ベータ 3 mg/kg 単独投与より有意に増大していたことは注目すべき点である。アガルシダーゼ ベータ 0.03 mg/kg 投与では、単独投与及びミガーラスタット塩酸塩併用投与時とも、ベースライン値からの α-Gal A 活性増加は観察されなかった。

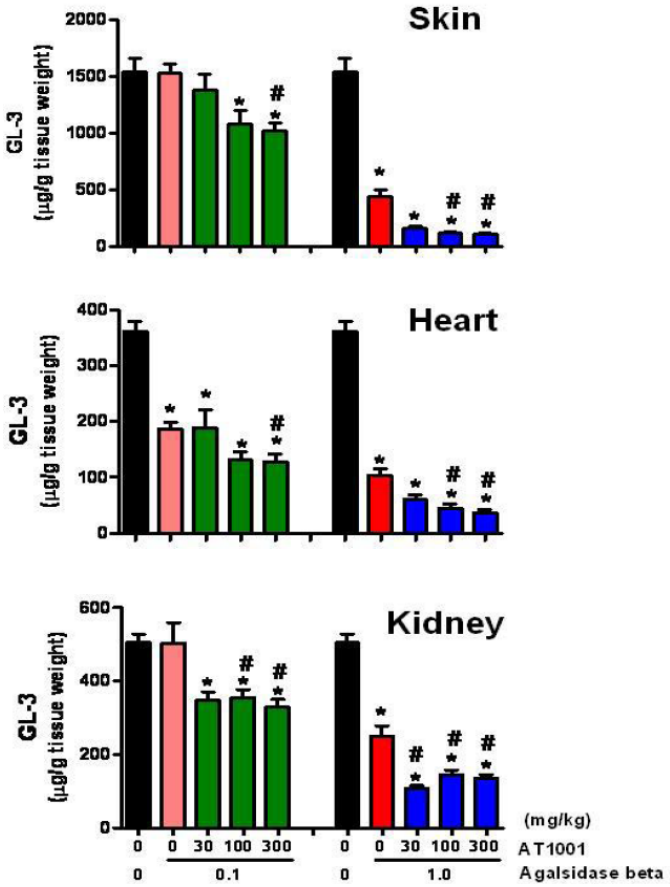
図 2.6.2- 31　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ ベータ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用



Twelve-week-old male *Gla* KO mice were administered 0.1 or 1 mg/kg agalsidase beta via bolus tail vein injection. In addition, migalastat HCl (AT1001) (equivalent to 30, 100, and 300 mg/kg free base) was administered via oral gavage 30 minutes prior to, and 2 hours after, agalsidase beta administration. Mice were euthanized 3 days post-agalsidase beta administration and α-Gal A levels were measured in skin, heart, and kidney lysates. Significant increases in α-Gal A levels in all three tissues were seen only following administration of 1 mg/kg agalsidase beta alone (*p<0.05 compared to baseline; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis). Co-administration with migalastat HCl resulted in significantly higher tissue α-Gal A levels (#p<0.05 compared to agalsidase beta alone; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis). The data represent mean ± SEM for 7-8 mice per group.
Gla KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, α-Gal A = alpha-galactosidase A, HCl = hydrochloride, ANOVA = analysis of variance, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-18, Figure 1

組織中 α-Gal A 活性への作用と同様、ミガーラスタット塩酸塩との併用投与により *Gla* KO マウスの組織中 GL-3 濃度低下作用も増大した（図 2.6.2- 32）。アガルシダーゼ ベータ 1 mg/kg 単独投与 7 日後の皮膚、心臓及び腎臓の GL-3 濃度は、無処置 *Gla* KO マウスと比べ、それぞれ 69 ± 4%、71 ± 3%及び 58 ± 5%低下した。ミガーラスタット塩酸塩（30、100 及び 300 mg/kg、アガルシダーゼ ベータ投与 30 分前及び 2 時間後に強制経口投与）の併用投与により、皮膚、心臓及び腎臓の GL-3 濃度は、無処置 *Gla* KO マウスと比較してそれぞれ 93 ± 2%、94 ± 2%及び 93 ± 3%低下した。この組織中 GL-3 濃度への作用は、投与 14 日後にも観察された。アガルシダーゼ ベータ 1 mg/kg 及びミガーラスタット塩酸塩との併用投与による組織中 GL-3 濃度低下作用が、アガルシダーゼ ベータ 3 mg/kg 単独投与と比較してより増大していたことは注目すべき点である。また、アガルシダーゼ ベータ 0.1 mg/kg 単独投与による組織中 GL-3 濃度は心臓のみで約 1/2 に低下し、皮膚又は腎臓では有意な影響は認められなかったが、ミガーラスタット塩酸塩との併用投与によりこれら 3 つの全ての組織で有意に低下した。同様の併用作用が、アガルシダーゼ ベータ 0.3 mg/kg 投与群でも認められた。

図 2.6.2- 32　*Gla* KO マウスにおけるミガーラスタット塩酸塩併用投与による
アガルシダーゼ ベータ投与後の組織中 GL-3 濃度低下増加作用



Twelve-week-old male *Gla* KO mice were administered 0.1 or 1 mg/kg agalsidase beta via bolus tail vein injection. In addition, migalastat HCl (AT1001) (equivalent to 30, 100, and 300 mg/kg free base) was administered via oral gavage 30 minutes prior to, and 2 hours after, agalsidase beta administration. Mice were euthanized 7 days post-agalsidase beta administration and GL-3 levels were measured by LC-MS/MS. Significant decreases in tissue GL-3 levels were seen in all three tissues following administration of 1 mg/kg agalsidase beta alone as well as in heart after 0.1 mg/kg agalsidase beta alone (*p<0.05 compared to baseline; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis). Co-administration with migalastat HCl resulted in significantly greater reductions in tissue GL-3 levels in all tissues and at both agalsidase beta dose levels (#p<0.05 compared to agalsidase beta alone; one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis). The data represent the mean ± SEM for 14-16 mice per group, with the exception of the 30 mg/kg migalastat HCl group (mean ± SEM for 7-8 mice per group).
Gla KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, α-Gal A = alpha-galactosidase A, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, ANOVA = analysis of variance, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-18, Figure 2

アガルシダーゼ ベータ（1 mg/kg）単独投与 7 日後に実施した免疫組織化学的アッセイで、心室血管壁の平滑筋細胞及び腎臓皮質の遠位尿細管上皮細胞における GL-3 シグナルの量及び強度に顕著な低下が認められた。ミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 100 mg/kg）併用投与による GL-3 減少作用は、アガルシダーゼ ベータ単独投与と比較して増大した。ミガーラスタット塩酸塩及びアガルシダーゼ ベータ 0.1 mg/kg（投与 14 日後）又は 0.3 mg/kg（投与 7 日後）との併用投与でも、アガルシダーゼ ベータ単独投与時より GL-3 減少作用は増大した。

アガルシダーゼ ベータ 0.1 及び 1 mg/kg 単独投与 7 日後の血漿中 GL-3 濃度は、無処置マウスと比較してそれぞれ 32 ± 6%及び 59 ± 5%低下し、ミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で

30、100 及び 300 mg/kg）との併用投与では、それぞれ最大で 51 ± 4%及び 83 ± 1%の低下が認められた。

RR1001-21 試験では、ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ ベータとの反復併用投与による組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に及ぼす作用を、*Gla* KO マウスを用いて探索的安全性試験（2.6.6.8 項）の一環として検討した。雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、24 匹／群）に、ミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、3 及び 30 mg/kg）を月曜日、水曜日及び金曜日に 4 週間強制経口投与した。アガルシダーゼ ベータ（0 及び 1 mg/kg）は、月曜日のミガーラスタット塩酸塩の投与 30 分後又は投与 3 時間前に静脈内投与した。ミガーラスタット塩酸塩及びアガルシダーゼ ベータの最終投与は、5 週目の月曜日とした。アガルシダーゼ ベータの最終投与直前（0 時間後）及び最終投与 1 及び 24 時間後、安全性評価のために各時点各群 8 匹のマウスを安楽死させた（2.6.6.8 項）。組織中 GL-3 濃度は、アガルシダーゼ ベータ投与 30 分前にミガーラスタット塩酸塩を投与した群での投与 0 時間後に採取した皮膚、心臓及び腎臓を用いて測定した。

アガルシダーゼ ベータ 1 mg/kg 単独 4 回目投与後の皮膚、心臓及び腎臓の GL-3 濃度は有意に低下した。全ての組織中 GL-3 濃度は、ミガーラスタット塩酸塩との併用投与により、アガルシダーゼ ベータ単独投与時と比較して有意に低下した。また、皮膚、心臓及び腎臓の α-Gal A 活性はアガルシダーゼ ベータ単独投与で有意に増加したが、ミガーラスタット塩酸塩の併用投与によるそれ以上の増加は認められなかった。

以上の結果から、*Gla* KO マウスにおいて、アガルシダーゼ ベータとミガーラスタット塩酸塩の併用投与は、アガルシダーゼ ベータ単独投与時よりも有意に疾患関連組織中 α-Gal A 活性を増加させ、GL-3 濃度を減少させることができることが示唆された。

5.2.3　*Gla* KO マウスでの組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用

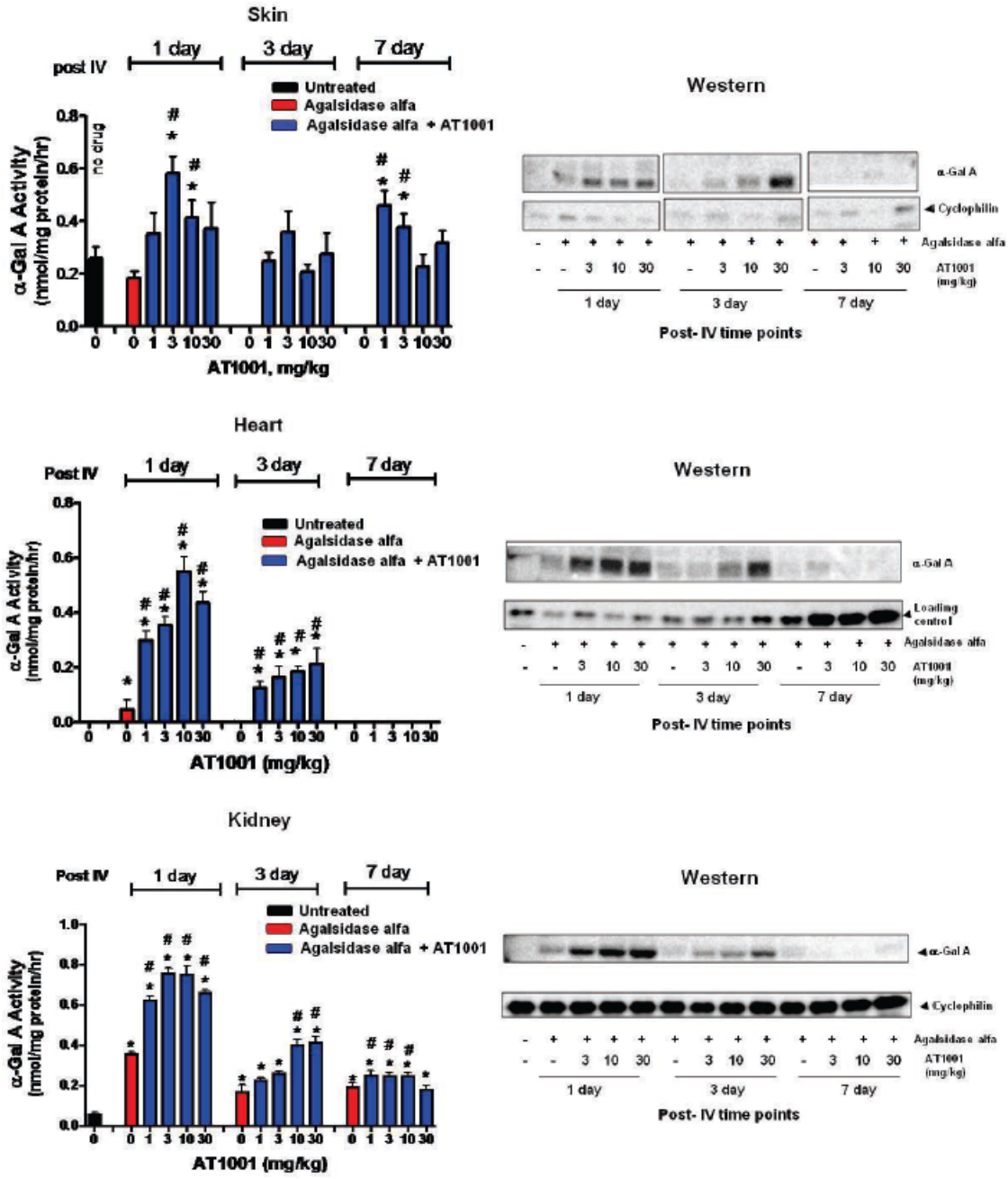
（試験番号 RR1001-20、添付資料番号 4.2.1.4.5、評価資料）
（試験番号 RR1001-31、添付資料番号 4.2.1.4.4、評価資料）

ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ ベータ又はアガルシダーゼ アルファの単回併用投与による組織中 α-Gal A 活性及び GL-3 濃度に及ぼす作用を *Gla* KO マウスを用いて検討した（試験番号 RR1001-20）。アガルシダーゼ ベータの結果については 5.2.2 項で考察した。雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、7 匹／群）にミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、1、3、10 及び 30 mg/kg）を単回強制経口投与し、その 30 分後にアガルシダーゼ アルファ（0 及び 0.2 mg/kg）を静脈内投与した。アガルシダーゼ アルファ投与 1、3 及び 7 日後に安楽死させ、皮膚、心臓、腎臓及び血漿中の α-Gal A 活性、α-Gal A タンパク質濃度及び GL-3 濃度を測定した（血漿中では GL-3 濃度測定のみ）。

アガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩との併用投与により、投与 1 日後の皮膚、心臓及び腎臓での α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ アルファ単独投与時のそれぞれ約 3.0、約 11 及び約 2.1 倍に増加した（図 2.6.2- 33）。併用投与 3 及び 7 日後の α-Gal A 活性は、アガルシダーゼ アルファ単独投与時と比較して有意に高かった。アガルシダーゼ アルファ単独投与と

比較してミガーラスタット塩酸塩との併用投与では、全ての組織中 α-Gal A タンパク質濃度が有意に増加した。投与 1、3 及び 7 日後の組織中 α-Gal A タンパク質濃度は経時的に減少したが、アガルシダーゼ アルファ単独投与と比較してミガーラスタット塩酸塩との併用投与では有意に高く、長期にわたって高値が持続した。併用投与 7 日後の血漿及び腎臓での GL-3 濃度の低下作用は、アガルシダーゼ アルファ単独投与時よりやや増大した（図 2.6.2- 34）。概して、組織中 GL-3 濃度低下作用は経時的に増大し（投与 7 日後＞3 日後＞1 日後）、アガルシダーゼ アルファ単独投与と比較してミガーラスタット塩酸塩との併用投与による作用はやや増大した。

図 2.6.2- 33　*Gla* KO マウスの組織中 α-Gal A 活性に対するアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用

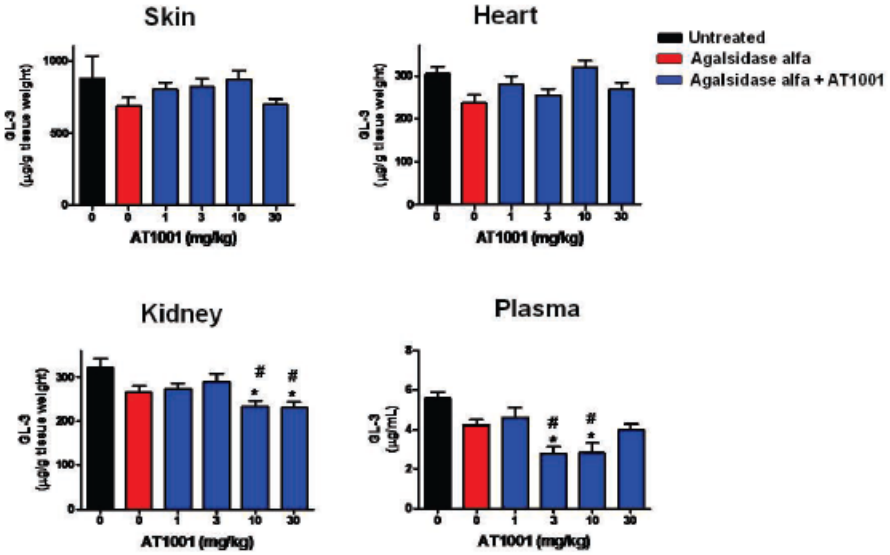


Twelve-week-old male *Gla* KO mice were given a single oral administration of migalastat HCl (AT1001) (1, 3, 10, or 30 mg/kg free base), thirty minutes prior to a 0.2 mg/kg agalsidase alfa bolus tail vein IV injection. Mice were euthanized 1, 3, and 7 days post-agalsidase alfa injection to measure tissue α-Gal A activity and protein levels. Co-administration of migalastat HCl resulted in significantly greater tissue α-Gal A activity and protein compared to administration of agalsidase alfa alone. The bars on each graph represent the mean ± SEM for 7 mice per group. *p<0.05

Gla KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, α-Gal A = alpha-galactosidase A, HCl = hydrochloride, IV = intravenous, SEM = standard error of the mean

Source: Study RR1001-20, Figure 3

図 2.6.2- 34　*Gla* KO マウスの組織中 GL-3 濃度に対するアガルシダーゼ アルファ及びミガーラスタット塩酸塩の併用作用



Twelve-week-old male *Gla* KO mice were given a single oral administration of migalastat HCl (AT1001) (1, 3, 10, or 30 mg/kg free base), thirty minutes prior to a 0.2 mg/kg agalsidase alfa bolus tail vein injection. Mice were euthanized 7 days post-agalsidase alfa injection to measure tissue GL-3 levels. Co-administration of migalastat HCl resulted in modestly, but statistically significantly greater tissue GL-3 reduction in kidney and plasma compared to administration of agalsidase alfa alone. The bars on each graph represent the mean ± SEM for 7 mice per group. * $p<0.05$ compared to untreated, t-test; #$p<0.05$, compared to agalsidase alfa administration alone, t-test.
Gla KO mice = mouse model that lacks functional endogenous α-Gal A protein, α-Gal A = alpha-galactosidase A, HCl = hydrochloride, GL-3 = globotriaosylceramide, SEM = standard error of the mean
Source: Study RR1001-20, Figure 4

アガルシダーゼ アルファ（0、0.2、1 及び 2 mg/kg、静脈内投与）及びミガーラスタット塩酸塩（遊離塩基換算で 0、1、3 及び 10 mg/kg、強制経口投与）を 4 週間併用投与した時の、血漿中アガルシダーゼ アルファ濃度（結果は 5.2.1 項に記載した）、組織取り込み及び基質（GL-3 及び lyso-Gb_3）濃度を雄 *Gla* KO マウス（12 週齢、6 匹／群）を用いて検討した（試験番号 RR1001-31）。アガルシダーゼ アルファ（1 及び 2 mg/kg）単独又はミガーラスタット塩酸塩（1 及び 3 mg/kg）との併用投与 3 及び 4 週間後に動物の死亡が認められたが、アガルシダーゼ アルファ（1 及び 2 mg/kg）と最高用量（10 mg/kg）のミガーラスタット塩酸塩併用投与で死亡した動物はいなかった。

アガルシダーゼ アルファ 4 週間単独投与で、血漿中 GL-3 及び lyso-Gb_3 濃度は用量依存的に低下した。血漿中 GL-3 及び lyso-Gb_3 濃度はアガルシダーゼ アルファ（0.2 mg/kg）単独により約 55%低下し、ミガーラスタット塩酸塩（1、3 及び 10 mg/kg）の併用投与により両基質ともさらに低下し（約 75%）、ミガーラスタット塩酸塩 10 mg/kg との併用投与時にアガルシダーゼ アルファ単独投与と比較して統計学的有意差が認められた。高用量（1 及び 2 mg/kg）のアガルシダーゼ アルファとミガーラスタット塩酸塩（1、3 及び 10 mg/kg）との併用投与で、血漿中 GL-3 及び lyso-Gb_3 濃度はさらに低下する傾向を示したが、アガルシダーゼ アルファ単独投与と比較して統計学的有意差を示したのはいくつかの用量でのみであった。

アガルシダーゼ アルファ単独投与で、組織（心臓、腎臓及び皮膚）中 α-Gal A 活性は用量依存的に増加した。ミガーラスタット塩酸塩との併用投与により α-Gal A 活性はアガルシダーゼ アル

ファ単独投与と比較して有意に増加したが、特にアガルシダーゼ アルファ 1 及び 2 mg/kg でその作用は顕著であった。アガルシダーゼ アルファ単独投与で組織中 GL-3 及び lyso-Gb_3 濃度は用量依存的に低下した。概して、アガルシダーゼ アルファ（0.2 mg/kg）とミガーラスタット塩酸塩併用投与による心臓及び皮膚の GL-3 濃度低下作用はアガルシダーゼ アルファ（0.2 mg/kg）と比較してより大きかったが、いずれも統計学的有意差は認められなかった。腎臓では、ミガーラスタット塩酸塩の影響は認められなかった。高用量（1 及び 2 mg/kg）のアガルシダーゼ アルファとミガーラスタット塩酸塩（1、3 及び 10 mg/kg）との併用で、組織中 GL-3 及び lyso-Gb_3 濃度はさらに低下する傾向を示したが、アガルシダーゼ アルファ単独投与と比較して統計学的有意差を示したのはいくつかの用量でのみであった。これら高用量群では投与 3 週目から死亡が認められたため、統計解析が困難であった。

以上の結果から、*Gla* KO マウスにおいて、ミガーラスタット塩酸塩とアガルシダーゼ アルファの併用投与は、アガルシダーゼ アルファ単独投与時よりも有意に疾患関連組織中の α-Gal A 活性を増加させ、GL-3 及び lyso-Gb_3 濃度を減少させることができることが示唆された。

6　考察及び結論

ミガーラスタットは、ファブリー病で認められる変異酵素 α-Gal A の経口低分子薬理学的シャペロンである。原理的に薬理学的シャペロンは、標的タンパク質（ミガーラスタットの場合はリソソーム酵素 α-Gal A）に結合し、安定させ、適切な細胞輸送を回復させる。「薬理学的シャペロン」の「シャペロン」は、機能を意味している。すなわち、酵素が合成された場所（小胞体）から対象部位（リソソーム）への移動を助ける、という機能である。酵素がリソソームに到達すると、薬理学的シャペロンが解離し、酵素が遊離して基質分子に結合し、分解する。酵素の欠乏によりリソソーム内に基質が過剰に蓄積している場合、薬理学的シャペロンの酵素への再結合は最小限に抑制される。また、リソソーム中の薬理学的シャペロン濃度は拡散により経時的に減少することにより、蓄積した基質はリソソーム酵素によって分解されやすくなる。「薬理学的シャペロン」の「薬理学的」は、分子特異性を意味している。すなわち、シャペロン分子は、対象とする標的タンパク質のみと相互作用し、安定させるようにデザインされており、タンパク質輸送、小胞体での品質管理機構、プロテアソーム機能又は自然発生する生物学的シャペロン（熱ショックタンパク質等）の活性等の一般的な細胞プロセスに影響を及ぼさない。

ミガーラスタットは、低分子量イミノ糖であり、GL-3 の末端ガラクトースのアナログである。ミガーラスタットは α-Gal A の活性部位に結合する。*In vitro* 及び *in vivo* 薬理試験により、ミガーラスタットが薬理学的シャペロンとして、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。ミガーラスタットは、小胞体上の変異型 α-Gal A に結合することによりこれら変異体を安定させ、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が解離することで、α-Gal A は蓄積した GL-3 及び lyso-Gb_3 を分解することができる。ファブリー病治療の目的は、基質 GL-3 を減少させることである。

In vitro 及び i*n 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 活性の増加をもたらす。以上の知見は、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。

リソソームの内外でミガーラスタットが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%）。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。

安全性薬理試験において、ミガーラスタット塩酸塩は最高濃度 47.5 μmol/L まで hERG カリウムチャネル電流に対する明らかな阻害を示さなかった。これは、患者に本剤 150 mg を隔日投与した際の最高血漿中濃度（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（単回強制経口投与）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。これらの試験で曝露量の確認は実施しなかったが、ラットのトキシコキネティクス（TK）データ（ITR5850 試験）から、ミガーラスタット塩酸塩 100 mg/kg 単回強制経口投与時の C_{max} は 9484 ng/mL と推定され、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（単回強制経口投与）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（ITR2978 試験）から、同用量での C_{max} は 38950 ng/mL 以上と推定され、150 mg を隔日投与した患者の C_{max} の約 33 倍以上であった。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。

In vitro 及び *in vivo* 薬理学的薬物相互作用試験において、ミガーラスタット塩酸塩と酵素補充療法の併用により、酵素安定性、組織取り込み及び GL-3 減少作用等の有益な相互作用が生じることが示されている。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。

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。

7　参考文献

Askari H, Kaneski CR, Semino-Mora C, Desai P, Ang A, Kleiner DE, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. Virchows Arch. 2007 Oct;451(4):823-34. (4.3.3)

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)

Benjamin ER, Della Valle MC, Wu X, Katz E, Pruthi F, Bond S, et al. The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. Genet Med. 2017 Apr;19(4):430-8. (4.3.7)

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)

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)

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)

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)

Fan JQ, Ishii S. Cell-based screening of active-site specific chaperone for the treatment of Fabry disease. Methods Enzymol. 2003;363:412-20. (4.3.18)

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)

Gal A, Schäfer 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)

Garman SC, Garboczi DN. Structural basis of Fabry disease. Mol Genet Metab. 2002 Sep-Oct;77(1-2):3-11. (4.3.23)

Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. J Mol Biol. 2004 Mar 19;337(2):319-35. (4.3.24)

Garman SC. Structure-function relationships in alpha-galactosidase A. Acta Paediatr. 2007 Apr;96(455):6-16. (4.3.25)

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 DP. Fabry disease. Orphanet J Rare Dis. 2010;5:30. (4.3.28)

Giugliani R, Waldek S, Germain DP, Nicholls K, Bichet DG, Simosky JK, et al. A Phase 2 study of migalastat hydrochloride in females with Fabry disease: selection of population, safety and pharmacodynamic effects. Mol Genet Metab. 2013 May;109(1):86-92. (4.3.29)

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)

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)

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)

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)

Shin SH, Murray GJ, Kluepfel-Stahl S, Cooney AM, Quirk JM, Schiffmann R, et al. Screening for pharmacological chaperones in Fabry disease. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jul 20;359(1):168-73. (4.3.46)

Shin SH, Kluepfel-Stahl S, Cooney AM, Kaneski CR, Quirk JM, Schiffmann R, et al. Prediction of response of mutated alpha-galactosidase A to a pharmacological chaperone. Pharmacogenet Genomics. 2008 Sep;18(9):773-80. (4.3.47)

Wu X, Katz E, Della Valle MC, Mascioli K, Flanagan JJ, Castelli JP, et al. A pharmacogenetic approach to identify mutant forms of α-galactosidase A that respond to a pharmacological chaperone for Fabry disease. Hum Mutat. 2011 Aug;32(8):965-77. (4.3.53)

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)

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）

2.6.3　薬理試験概要表

Amicus Therapeutics 株式会社

目次

2.6.3.1　薬理試験 一覧表 3

2.6.3.2　効力を裏付ける試験 8

2.6.3.3　副次的薬理試験 16

2.6.3.4　安全性薬理試験 17

2.6.3.5　薬理学的薬物相互作用試験 18

2.6.3.1　薬理試験　一覧表

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Binding and stabilization of wild-type α-Gal A, thermostability studies	rhα-Gal A (agalsidase beta and agalsidase alfa); Crude lysates from normal human lymphoblast cell lines (GM03201, WT0009) and from normal human fibroblast cell line (CRL2076); Enzyme panels	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-01	4.2.1.1.1
Determination of migalastat HCl K_i towards α-Gal A in mouse, rat, rabbit, monkey, and human tissue; and α-Gal B (NAGA) in rat and human tissue.	Tissue extracts from mouse, rat, rabbit, monkey and human liver, and mouse kidney homogenates as source of α-Gal A; Tissue extracts from rat and human liver homogenates as source of α-Gal B	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-72	4.2.1.1.2
Binding to wild-type and multiple mutant forms of α-Gal A	Normal and Fabry patient lymphoblast lysates (representing 26 different missense mutations)	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-29	4.2.1.1.3
Half-life of increased wild-type and mutant α-Gal A levels in normal and Fabry patient lymphoblasts after incubation with migalastat HCl	Normal and Fabry patient lymphoblasts (representing 17 different missense mutations)	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-04	4.2.1.1.4
Migalastat HCl reduces GL-3 levels in Fabry fibroblasts	3 Fabry fibroblast cell lines [2 α-Gal A responsive to migalastat HCl (R301Q and L300P) and 1 without α-Gal A activity (C52S)] at baseline or with migalastat HCl	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-03	4.2.1.1.5

2.6.3.1　薬理試験　一覧表（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Half-life of GL-3 turnover in normal human fibroblasts after substrate loading with migalastat HCl	Normal human fibroblasts	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-28	4.2.1.1.6
Fabry patient-derived lymphoblast- and fibroblast-based assays to identify mutant forms of α-Gal A that respond to migalastat HCl	Normal and mutant Fabry patient lymphoblasts (representing 75 different missense mutations, 1 insertion, and 1 splice-site mutation), normal and mutant Fabry patient fibroblasts (representing 4 different missense mutations), Pompe and Gaucher patient fibroblasts	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-02	4.2.1.1.7
Cell-based assay to identify mutant forms of α-Gal A that respond to migalastat HCl	HEK-293 cells (GripTite 293 MSR) transiently transfected with mutant forms of α-Gal A (531 total)	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-19	4.2.1.1.8
Administration of migalastat HCl to wild-type mice results in selective, dose-dependent increases in tissue α-Gal A activity	Wild-type C57BL/6 mice	Oral (*ad libitum* in drinking water)	[redacted] USA	RR1001-05	4.2.1.1.9
Age-dependent accumulation of GL-3 in tissues of hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice	Animals not dosed	[redacted] USA	RR1001-14	4.2.1.1.10
Migalastat HCl increases α-Gal A activity and reduces GL-3 levels in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice and wild-type (C57BL/6, 129Sve and B6/129) mice	Oral (*ad libitum* in drinking water) and oral gavage	[redacted] USA [redacted] USA	RR1001-06	4.2.1.1.11

2.6.3.1　薬理試験　一覧表（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Migalastat HCl does not affect tissue α-Gal A activity or GL-3 levels in *Gla* KO mice	*Gla* KO mice (lacking functional endogenous α-Gal A)	Oral (*ad libitum* in drinking water)	[redacted] USA	RR1001-12	4.2.1.1.12
Elevated tissue α-Gal A activity is sustained in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice after migalastat HCl withdrawal	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	Oral (*ad libitum* in drinking water)	[redacted] USA	RR1001-07	4.2.1.1.13
Less-frequent migalastat HCl administration results in greater GL-3 reduction compared to daily administration in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	Oral (*ad libitum* in drinking water) and oral gavage	[redacted] USA [redacted] USA	RR1001-10	4.2.1.1.14
Long-term administration of migalastat HCl reduces GL-3 levels in young and aged hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	Oral (*ad libitum* in drinking water)	[redacted] USA	RR1001-13	4.2.1.1.15
Secondary Pharmacodynamics					
Enzyme screening	Commercial enzyme screen	*In vitro*	[redacted]	1080607	4.2.1.2.1
Effect of migalastat HCl on the activity of the three enzymes catalysing the Leloir pathway of galactose metabolism	Human red blood cells	*In vitro*	[redacted] France	2012N137381_00	4.2.1.2.2
Effects on normal human fibroblasts or human hepatocytes	Normal human fibroblasts (CRL2076), human liver cells (HepG2)	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-09	4.2.1.2.3

2.6.3.1　薬理試験　一覧表（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Safety Pharmacology					
Irwin profile test with migalastat HCl in rats	Sprague-Dawley rats	Oral gavage	[redacted] France	247/004	4.2.1.3.1
Effects of migalastat HCl on hERG K^+ current	CHO-K1/hERG cells	*In vitro*	[redacted] Switzerland	1748/AMI/ 03	4.2.1.3.2
Cardiovascular study with migalastat HCl in conscious telemetered dogs	Beagle dogs	Oral gavage	[redacted] France	247/003	4.2.1.3.3
Respiratory function study with migalastat HCl in rats	Sprague-Dawley rats	Oral gavage	[redacted] France	247/005	4.2.1.3.4
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Increased α-Gal A activity and GL-3 reduction in cells after co-incubation with agalsidase beta and migalastat HCl	Fabry patient-derived fibroblast cell lines (R301Q, L300P, and C52S)	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-17	4.2.1.4.1
Increased α-Gal A activity and greater GL-3 reduction in Fabry fibroblasts after co-incubation with either agalsidase alfa or agalsidase beta and migalastat HCl	Fabry patient-derived fibroblast cell lines (C52S)	*In vitro*	Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ, USA	RR1001-37	4.2.1.4.2

2.6.3.1　薬理試験　一覧表（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Migalastat HCl increases the plasma half-lives of active agalsidase beta and agalsidase alfa	Sprague-Dawley rats *Gla* KO mice	Oral gavage	[redacted] USA [redacted] USA	RR1001-16	4.2.1.4.3
Co-administration of migalastat HCl and agalsidase alfa (single- or repeat-dose) leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage	[redacted] USA	RR1001-31	4.2.1.4.4
Co-administration of single dose of migalastat HCl with agalsidase beta or agalsidase alfa leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage	[redacted] USA	RR1001-20	4.2.1.4.5
Co-administration of two doses of migalastat HCl with agalsidase beta leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage	[redacted] USA	RR1001-18	4.2.1.4.6
Repeat-dose co-administration of migalastat HCl and agalsidase beta leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage	[redacted] USA	RR1001-21	4.2.1.4.7

CHO-K1/hERG = Chinese hamster ovary (CHO)-K1 stably transfected with hERG; α-Gal A = α-galactosidase A; α-Gal B (NAGA) =α-N-acetylgalactosaminidase; GL-3 = globotriaosylceramide; *Gla* KO =α-galactosidase A gene knock-out; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene; PSL = Product Safety Laboratories; rhα-Gal A = recombinant human α-galactosidase A

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number (Location in CTD)
***In Vitro* Primary Pharmacodynamics**						
Binding and stabilization of wild-type α-Gal A, thermostability studies	rhα-Gal A (agalsidase beta and agalsidase alfa); Crude lysates from normal human lymphoblast cell lines (GM03201, WT0009) and from normal human fibroblast cell line (CRL2076); Enzyme panels	*In vitro* (various enzyme and thermo-stability assays)	0.54 nmol/L to 290 µmol/L	NA	Migalastat HCl is a potent inhibitor of α-Gal A. Migalastat HCl (10 µmol/L) showed little-to-no inhibition of other lysosomal acid hydrolases, with the exceptions of α-NAGA and β-Gal: α-Gal A = 95% inhibition GAA = NI GCase = NI β-Gal = 25% inhibition α-mannosidase = NI β-mannosidase = NI β-N-acetylglucosaminidase (β-hexosaminidase A) = NI β-glucuronidase = NI α-L-fucosidase = NI NAGA = 63% inhibition. rhα-Gal A is more stable at acidic pH than at neutral pH. When migalastat HCl was incubated with rhα-Gal A at neutral pH, the thermal stability profile of the inhibitor-bound rhα-Gal A was similar to that of the enzyme alone at acidic pH. Migalastat HCl stabilised rhα-Gal A from unfolding and inactivation at neutral pH and 37°C.	RR1001-01 (4.2.1.1.1)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Determination of migalastat HCl K_i towards α-Gal A in mouse, rat, rabbit, monkey, and human tissue; and α-Gal B (NAGA) in rat and human tissue.	Tissue extracts from mouse, rat, rabbit, monkey and human liver, and mouse kidney homogenates as source of α-Gal A; Tissue extracts from rat and human liver homogenates as source of α-Gal B	*In vitro*	0 –2 mmol/L	NA	The migalastat/α-Gal A mean IC_{50} and K_i values were similar across species. IC_{50} (nmol/L) mean (95% CI) values were: mouse liver 22 (20-24); mouse kidney 19 (16-21); rat liver 18 (17 – 20); rabbit liver 19 (17 – 21); monkey liver 21 (18 – 23); human liver 19 (17 – 22). K_i (nmol/L) mean (95% CI) values were: mouse liver 10.6 (9.8 – 11.6); mouse kidney 9.3 (8.4 – 10.2); rat liver 7.7 (7.2 – 8.2); rabbit liver 9.4 (8.7 – 10.1); monkey liver 11.4 (10.6 – 12.4); human liver 11.3 (10.0 – 11.3). The migalastat/α-Gal B mean IC_{50} and Ki values were similar between rat and human. IC_{50} (µmol/L) mean (95% CI) values were: rat liver 8.5 (7.6 – 9.6); human liver 7.7 (7.0 – 8.5). K_i (µmol/L) mean (95% CI) values were: rat liver 8.4 (8.1 – 8.8); human liver 6.9 (6.0 – 7.7).	RR1001-72 (4.2.1.1.2)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Binding to wild-type and multiple mutant forms of α-Gal A	Normal and Fabry patient lymphoblast lysates (representing 26 different missense mutations)	*In vitro* (incubation with migalastat HCl for 3 days or without migalastat HCl for 5 days followed by 24-hour washout)	100 µmol/L for cell lines with EC_{50} values ≤20 µmol/L; 500 µmol/L for cell lines with EC_{50} values of 20 to 100 µmol/L; 1 mmol/L for cell lines with EC_{50} values of 100 to 500 µmol/L; 5 mmol/L for cell lines with EC_{50} values ≥500 µmol/L	NA	Migalastat HCl Ki value was 21 nmol/L for wild-type α-Gal A. Migalastat HCl Ki values were between 19 and 85 nmol/L for a majority of the mutant forms tested in Fabry lymphoblast cell lines (23 out of 29). Ki values for the remaining 6 cell lines with α-Gal A mutant forms were between 105 and 254 nmol/L	RR1001-29 (4.2.1.1.3)
Half-life of increased wild-type and mutant α-Gal A levels in normal and Fabry patient lymphoblasts after incubation with migalastat HCl	Normal and Fabry patient lymphoblasts (representing 17 different missense mutations)	*In vitro* (incubation with migalastat HCl for 5 days)	100 µmol/L	NA	α-Gal A activity in normal and mutant lymphoblast cell lines after migalastat HCl incubation was measured as a function of time after washout of the drug. The half-life of increased α-Gal A levels was generally longer in normal cells (4 to 5 days) than in mutant cells (0.5 to 3 days), with the exception of R112H and R363H α-Gal A expressing cells which had half-lives equivalent to that of normal cells.	RR1001-04 (4.2.1.1.4)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Migalastat HCl reduces GL-3 levels in Fabry fibroblasts	3 Fabry fibroblast cell lines [2 α-Gal A responsive to migalastat HCl (R301Q and L300P) and 1 without α-Gal A activity (C52S)] at baseline or with migalastat HCl	*In vitro* (incubation with migalastat HCl for 7 days + 3 day washout or for 10 days)	0, 4, 12, 37, 111, 333, and 1000 µmol/L	NA	Seven days of migalastat HCl incubation followed by 3-day washout reduced GL-3 levels significantly in R301Q and L300P α-Gal A expressing fibroblasts, but not in fibroblasts expressing C52S α-Gal A. In contrast, no GL-3 reduction was observed in any of these Fabry fibroblast cell lines after 10 days of constant incubation with migalastat HCl.	RR1001-03 (4.2.1.1.5)
Half-life of GL-3 turnover in normal human fibroblasts after substrate loading with migalastat HCl	Normal human fibroblasts	*In vitro* [incubation with migalastat HCl for 7 days followed by washout with or without rhα-Gal-A (agalsidase beta) pre-loading]	300 µmol/L, 1 mmol/L, 3 mmol/L	NA	The half-life of GL-3 turnover in human wild-type fibroblasts after substrate loading with migalastat HCl was 2.1-5.6 hours, whether or not rhα-Gal A was pre-loaded. The GL-3 turnover rate was short and GL-3 clearance was complete suggesting that migalastat HCl inhibition of cellular α-Gal A activity is rapidly and completely reversed after migalastat HCl washout.	RR1001-28 (4.2.1.1.6)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Fabry patient-derived lymphoblast- and fibroblast-based assays to identify mutant forms of α-Gal A that respond to migalastat HCl	Normal and mutant Fabry patient lymphoblasts (representing 75 different missense mutations, 1 insertion, and 1 splice-site mutation), normal and mutant Fabry patient fibroblasts (representing 4 different missense mutations), Pompe and Gaucher patient fibroblasts	*In vitro* (incubation with migalastat HCl for 5 days)	5 nmol/L to 100 µmol/L	NA	Baseline α-Gal A levels ranged from 0 to 52% of normal. Increases in α-Gal A levels (1.5- to 28-fold) were seen for 49 of 75 different missense mutant forms with varying EC_{50} values (820 nmol/L to >1 mmol/L). Half of the missense mutant forms associated with classic (early-onset) Fabry disease and a majority (90%) associated with later-onset Fabry disease were responsive. Responses were similar in fibroblasts. Migalastat HCl did not increase levels of mutant GAA or GCase in Pompe or Gaucher patient fibroblast lines, respectively.	RR1001-02 (4.2.1.1.7)
Cell-based assay to identify mutant forms of α-Gal A that respond to migalastat HCl	HEK-293 cells (GripTite 293 MSR) transiently transfected with mutant forms of α-Gal A (531 total)	*In vitro* (incubation with migalastat HCl for 4-5 days)	5 nmol/L to 20 mmol/L	NA	531 known Fabry disease-causing mutations have been generated and the corresponding mutant forms of α-Gal A have been assayed for their responses to migalastat HCl in transiently transfected HEK-293 cells. 316 showed a statistically significant increase in α-Gal A activity. The response, in terms of absolute and relative increase, to the clinically-achievable concentration of 10 µmol/L, was calculated for all 316 responsive mutant forms. These results may be used to identify mutant forms of α-Gal A that are most likely to show an increase in levels of the enzyme in male and female Fabry patients treated with migalastat HCl.	RR1001-19 (4.2.1.1.8)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number (Location in CTD)
***In Vivo* Primary Pharmacodynamics**						
Administration of migalastat HCl to wild-type mice results in selective, dose-dependent increases in tissue α-Gal A activity	Wild-type C57BL/6 mice	Oral (*ad libitum* in drinking water) daily for 4 weeks	0, 1, 10, or 100 mg/kg/day (free base equivalents)	7M per time point	Significant, dose-related increases in wild-type α-Gal A activity were observed, with maximal increases of 3.0±0.3, 3.0±0.2, 2.5±0.3, 4.0±0.5, 3.6±0.3, and 1.7±0.1-fold in heart, kidney, skin, liver, spleen, and brain, respectively, after administration of 100 mg/kg/day. Tissue levels remained elevated for up to 7 days after migalastat HCl withdrawal. Half-life of elevated wild-type α-Gal A was estimated to be 2.7, 3.3, and 4.0 days in heart, kidney, and skin, respectively. The effect was selective as the other two lysosomal enzymes tested in the assay, GCase and GAA, were not affected	RR1001-05 (4.2.1.1.9)
Age-dependent accumulation of GL-3 in tissues of hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice	Animals not dosed	NA	7M	Tissue GL-3 levels increased with age (4, 12, 24, and 48 weeks) to a similar extent in both the hR301Q α-Gal A Tg/KO and *Gla* KO mice. Immunohistochemical analyses revealed increased cell-type specific GL-3 staining in skin fibroblasts, smooth muscle cells of blood vessel walls of the skin and heart, and distal tubular epithelial cells of the kidney cortex.	RR1001-14 (4.2.1.1.10)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Migalastat HCl increases α-Gal A activity and reduces GL-3 levels in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice and wild-type (C57BL/6, 129Sve and B6/129) mice	Oral (*ad libitum* in drinking water or oral gavage) daily for 2 or 4 weeks	Drinking water: 0, 3, 10, 30, 100, 300 mg/kg /day (free base equivalents) Oral gavage: 0, 30 mg/kg/ day (free base equivalents)	7M per time point	4-week daily oral administration of migalastat HCl *ad libitum* via drinking water to hR301Q α-Gal A Tg/KO mice resulted in dose-dependent increases in α-Gal A activity and protein levels, with concomitant reductions in GL-3 levels in skin, heart, and kidney. Similar effects were seen when migalastat HCl was administered by oral gavage. Immunohistochemical analyses revealed cell-type specific reduction of GL-3 in skin fibroblasts, smooth muscle cells of blood vessel walls of the skin and heart, and distal tubular epithelial cells of the kidney. Collectively, these data indicate that migalastat HCl stabilises the mutant α-Gal A protein *in vivo*, thereby increasing overall enzyme activity and protein levels leading to substrate reduction in the cells of various tissues.	RR1001-06 (4.2.1.1.11)
Migalastat HCl does not affect tissue α-Gal A activity or GL-3 levels in *Gla* KO mice	*Gla* KO mice (lacking functional endogenous α-Gal A)	Oral (*ad libitum* in drinking water) for 4 weeks	Equivalent to 0, 100 mg/kg/day free base	7M	No significant increase in α-Gal A activity or GL-3 levels in *Gla* KO mice, indicating the specific effect of migalastat HCl on α-Gal A in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice.	RR1001-12 (4.2.1.1.12)

2.6.3.2　効力を裏付ける試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number (Location in CTD)
Elevated tissue α-Gal A activity is sustained in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice after migalastat HCl withdrawal	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	Oral (*ad libitum* in drinking water) for 4 weeks followed by up to 7 days without drug	Equivalent to 0, 100 mg/kg/day free base	7M	Tissue α-Gal A activity remained elevated in skin, heart, and kidney for up to 7 days after withdrawal, indicating a half-life of 2 to 2.5 days. In contrast, migalastat HCl levels dropped 90% within 2 days of withdrawal indicating that α-Gal A activity levels can be sustained in the absence of migalastat HCl, and that the half-life of elevated mutant enzyme is significantly longer than that of chaperone	RR1001-07 (4.2.1.1.13)
Less-frequent migalastat HCl administration results in greater GL-3 reduction compared to daily administration in hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	Oral (*ad libitum* in drinking water or oral gavage) for 4 weeks with varying dosing regimens	Equivalent to 0, 100, 300 mg/kg/day free base	7M	Less-frequent administration regimens showed greater GL-3 reduction compared to daily administration. GL-3 reductions obtained with less-frequent migalastat HCl regimens were comparable to those obtained with once weekly IV injection of agalsidase beta (1 mg/kg).	RR1001-10 (4.2.1.1.14)
Long-term administration of migalastat HCl reduces GL-3 levels in young and aged hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	hR301Q α-Gal A Tg/KO mice	Oral (*ad libitum* in drinking water) Young: *ad libitum* for 24 weeks Aged: *ad libitum*, or 4 on/3 off for 12 or 24 weeks	Young: 0, 10, 30, 100 mg/kg/day (free base equivalents) Aged: 0, 10, 30, 100, 300 mg/kg /day (free base equivalents)	Young: 8M Aged: 14M	24-week migalastat HCl administration resulted in dose-dependent reduction of tissue GL-3 levels (skin, heart, kidney) in "young" and "aged" mice and also in brain of "aged" mice (not evaluated in "young" mice). A less-frequent administration regimen (4 on/3 off) produced greater reduction in GL-3 levels than daily administration	RR1001-13 (4.2.1.1.15)

GAA = acid α-glucosidase; α-Gal A = α-galactosidase A; β-Gal = β-galactosidase; GCase = acid β-glucosidase; GL-3 = globotriaosylceramide; HEK = human embryonic kidney; IV = intravenous; M = male; NA = not applicable; NAGA = α-N-acetylgalactosaminidase; NI = no inhibition; rhα-Gal A = recombinant human α-galactosidase

2.6.3.3　副次的薬理試験

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number (Location in CTD)
***In Vitro* Primary Pharmacodynamics**						
Enzyme screening	Commercial enzyme screen	*In vitro*	10 µmol/L	NA	Migalastat HCl showed no significant activity (≥50% inhibition or stimulation).	1080607 (4.2.1.2.1)
Effect of migalastat HCl on the activity of the three enzymes catalysing the Leloir pathway of galactose metabolism	Human red blood cells	*In vitro* (37°C for 1-2 hours)	0, 3, 10, 30, 100 µmol/L	NA	Migalastat HCl did not modify the activity of galactokinase, galactose-1-phosphate uridyltransferase, or UDP-galactose-4-epimerase under optimal conditions of substrate concentrations or under conditions where the substrates were used at a concentration close to the K_m value. Pre-incubation with migalastat HCl at 100 µmol/L also had no effect on enzyme activity.	2012N137381_00 (4.2.1.2.2)
Effects on normal human fibroblasts or human hepatocytes	Normal human fibroblasts (CRL2076), human liver cells (HepG2)	*In vitro* (incubation for 24 hours or 5 days [fibroblasts only])	51 nmol/L to 1 mmol/L	NA	No significant cytotoxic effect in either cell line, while the positive control, staurosporine, was cytotoxic to both cell types.	RR1001-09 (4.2.1.2.3)

NA = not applicable;; UDP = uridine diphosphate

2.6.3.4　安全性薬理試験

Test Article: Migalastat HCl

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
CNS (Irwin test)	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage (in water)	0 (untreated), 0 (vehicle), 3, 30, 100 mg/kg	6M	No significant effects on spontaneous activity, excitability, sensory, motor, autonomic, neuromuscular, or physiological parameters.	Yes	247/004	4.2.1.3.1
Cardiovascular (hERG K^+ current)	CHO-K1/ hERG cells	*In vitro*	0.00475, 0.0475, 0.475, 4.75 and 47.5 µmol/L	Number of cells = 5	Migalastat HCl had no appreciable effect on hERG K^+ currents (% inhibition ≤7%), while the reference item (E-4031 3 µmol/L) showed 98% inhibition.	Yes	1748/AMI/ 03	4.2.1.3.2
Cardiovascular	Dog/Beagle (telemetered)	Oral gavage (in water)	0 (vehicle), 3, 30, 100 mg/kg	3M/3F (Latin square design)	No effects on clinical signs and no statistically significant effects on mean, diastolic, or systolic arterial blood pressure, heart rate, ECGs, including the QT and QTc intervals (using either Bazett's or Fridericia's formulas), or body temperature.	Yes	247/003	4.2.1.3.3
Respiratory (whole body plethysmo-graphy)	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage (in water)	0 (vehicle), 3, 30, 100 mg/kg	8M	Migalastat HCl did not significantly alter respiratory parameters, while the reference item (histamine dihydrochloride 0.05 mg/kg; intravenous) produced the expected bronchoconstriction and changes in respiratory parameters.	Yes	247/005	4.2.1.3.4

CHO-K1/hERG = Chinese hamster ovary (CHO)-K1 stably transfected with hERG; CNS = central nervous system; ECG = electrocardiogram; F = female; hERG = human ether-a-go-go related gene; M = male; QTc = corrected QT

2.6.3.5　薬理学的薬物相互作用試験

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number (Location in CTD)
***In Vitro* Pharmacodynamic Drug Interactions**						
Increased α-Gal A activity and GL-3 reduction in cells after co-incubation with agalsidase beta and migalastat HCl	Fabry patient-derived fibroblast cell lines (R301Q, L300P, and C52S) that showed rhα-Gal A-dependent reduction of elevated GL-3 levels	*In vitro* (incubation for 5 hours)	0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 µmol/L	NA	Migalastat HCl co-incubation with the rhα-Gal A (agalsidase beta) enzyme resulted in a 4- to 5-fold increase in the amount of α-Gal A protein, a 3-fold increase in α-Gal A activity recovered in cell lysates, up to 31% greater GL-3 reduction than that seen after incubation with rhα-Gal A alone, and lower EC_{50} values for rhα-Gal A cellular uptake and GL-3 reduction. The effect of co-incubation on both α-Gal A and GL-3 levels was dependent upon simultaneous addition of rhα-Gal A and migalastat HCl in the growth media	RR1001-17 (4.2.1.4.1)
Increased α-Gal A activity and greater GL-3 reduction in Fabry fibroblasts after co-incubation with either agalsidase alfa or agalsidase beta and migalastat HCl	Fabry patient-derived fibroblast cell lines (C52S) that showed rhα-Gal A-dependent reduction of elevated GL-3 levels	*In vitro* (incubation for 5 hours)	0, 0.1, 1, 10 µmol/L	NA	Co-incubation of cultured Fabry fibroblasts with agalsidase alfa or agalsidase beta and migalastat HCl resulted in up to 4-fold higher cellular α-Gal A levels and approximately 23% greater GL-3 reduction with agalsidase alfa and 30% greater with agalsidase beta over enzyme alone. The effect of co-incubation was independent of the form of agalsidase enzyme that was used.	RR1001-37 (4.2.1.4.2)

2.6.3.5　　薬理学的薬物相互作用試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	Test System	Method of Admin.	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number (Location in CTD)
***In Vivo* Pharmacodynamic Drug Interactions**						
Migalastat HCl increases the plasma half-lives of active agalsidase beta and agalsidase alfa	Sprague-Dawley rats *Gla* KO mice	Oral gavage (in water)	Equivalent to 0, 1, 3, 10, 30 mg/kg free base	Rat: 3M Mouse: 5M or 7M	Co-administration of migalastat HCl with agalsidase beta (IV) and agalsidase alfa (IV) increased the plasma half-life and protein levels of both enzymes in rats. Similar results were seen in *Gla* KO mice.	RR1001-16 (4.2.1.4.3)
Co-administration of migalastat HCl and agalsidase alfa (single- or repeat-dose) leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage (in water)	Equivalent to 0, 1, 3, 10, 30 mg/kg free base	6M	In these studies, agalsidase alfa was given IV as a single administration of 1 mg/kg, as 2 or 3 weekly administrations of 0.2 mg/kg, or as four weekly administrations of 0.2, 1, or 2 mg/kg, with or without with migalastat HCl. Co-administration with migalastat HCl improved plasma PK and tissue uptake of agalsidase alfa. Repeat administration, especially 4 doses of agalsidase alfa alone, dose-dependently reduced plasma/tissue GL-3 and lyso-Gb_3 with the maximal effect at 2 mg/kg. However, these high agalsidase alfa doses with or without migalastat HCl resulted in significant mortalities. Four administrations of agalsidase alfa (0.2 mg/kg) with migalastat HCl generally resulted in trends of greater GL-3 and lyso-Gb_3 reductions (compared to agalsidase alfa alone), though a statistically significant effect was only achieved in plasma and heart.	RR1001-31 (4.2.1.4.4)

2.6.3.5　薬理学的薬物相互作用試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Co-administration of single dose of migalastat HCl with agalsidase beta or agalsidase alfa leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage (in water)	Equivalent to 0, 1, 3, 10, 30 mg/kg free base	5M or 7M	Co-administration of migalastat HCl 30 minutes prior to either agalsidase beta or agalsidase alfa significantly increased α-Gal A activity and reduced GL-3 levels in disease-relevant tissues (plasma, skin, heart, kidney) to a greater extent than seen following administration of enzyme alone. Tissue GL-3 reduction was only modestly higher following co-administration with migalastat HCl compared to administration of agalsidase alfa alone.	RR1001-20 (4.2.1.4.5)
Co-administration of two doses of migalastat HCl with agalsidase beta leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage (in water)	Equivalent to 0, 30, 100, 300 mg/kg free base	7M or 8M	Co-administration of migalastat HCl 30 minutes prior to and 2 hours after with agalsidase beta increased α-Gal A activity and reduced GL-3 levels in disease-relevant tissues (plasma [only GL-3 measured], skin, heart, kidney) to a greater extent than seen following administration of agalsidase beta alone. Migalastat HCl co-administration not only improved the efficacy of agalsidase beta at a clinically-relevant dose (1 mg/kg), but also increased the potency of a 10-fold lower (0.1 mg/kg) dose.	RR1001-18 (4.2.1.4.6)

2.6.3.5　　薬理学的薬物相互作用試験　（続き）

Test Article: Migalastat HCl

Type of Study	**Test System**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number (Location in CTD)**
Repeat-dose co-administration of migalastat HCl and agalsidase beta leads to greater tissue α-Gal A activity and GL-3 reduction	*Gla* KO mice	Oral gavage (in water) (Monday, Wednesday, Friday for 4 weeks and Monday of week 5). The Monday migalastat HCl dose was given 30 minutes prior to IV agalsidase beta (0 or 1 mg/kg).	Equivalent to 0, 3, 30 mg/kg free base	8M per time point	Significant GL-3 reduction was seen with agalsidase beta alone in skin, heart, and kidney. In all tissues co-administration of migalastat HCl showed significantly greater GL-3 reduction compared to agalsidase beta alone. Significant increases in α-Gal A activity were seen with agalsidase beta alone in skin, heart, and kidney, though co-administration of migalastat HCl did not show any further significant increases.	RR1001-21 (4.2.1.4.7)

α-Gal A = α-galactosidase A; GL-3 = globotriaosylceramide; *Gla* KO = *Gla* knock-out; IV = intravenous; lyso-Gb_3 = globotriaosylsphingosine; NA = not applicable; rhα-Gal A = recombinant human α-galactosidase A