レブコビ筋注 2.4mg

製造販売承認申請

2.4　非臨床試験の概括評価

帝人ファーマ株式会社

目次

2.4　非臨床試験の概括評価 4
2.4.1　非臨床試験計画概略 4
2.4.2　薬理試験 5
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1　血中 ADA 活性上昇作用 5
2.4.2.1.2　血漿中 ADA 活性トラフ値上昇作用 5
2.4.2.1.3　BALF 中アデノシン濃度増加抑制作用 5
2.4.2.1.4　胸腺及び脾臓中アデノシン及びデオキシアデノシン濃度、細胞数、器官重量の改善作用 5
2.4.2.1.5　脾臓における脾臓細胞数、T 及び B 細胞数の減少抑制作用 6
2.4.2.1.6　体重減少抑制作用 6
2.4.2.1.7　生存率改善作用 6
2.4.2.2　副次的薬理試験 7
2.4.2.3　安全性薬理試験 7
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験 7
2.4.3　薬物動態試験 7
2.4.3.1　吸収及び分布 7
2.4.3.2　代謝 8
2.4.3.3　排泄 8
2.4.3.4　薬物動態学的薬物相互作用 8
2.4.4　毒性試験 9
2.4.5　総括及び結論 11
2.4.6　参考文献 13

略号一覧表

略号	英名	日本語
ADA	Adenosine deaminase	アデノシンデアミナーゼ
rADA	Recombinant adenosine deaminase	遺伝子組換えアデノシンデアミナーゼ類縁体 （天然型ウシ腸由来 ADA の Cys74 が Ser へ置換された ADA）
AUC	Area under the drug concentration-time curve	血中濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{inf}	AUC through infinity	無限大時間までの AUC
$AUC_{0\text{-}72h}$	AUC from time zero to time 72 hour	投与 0 時から 72 時間までの AUC
B	Bronchoalveolar lavage fluid	気管支肺胞洗浄液
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	気管支肺胞洗浄液
CL	Clearance	クリアランス（全身クリアランス）
CL/F	Apparent clearance	見かけのクリアランス
C_{max}	Maximum observed concentration	最高血中濃度
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
SC	Succinimidyl succinate	スクシンイミジルカルバメート
SS	Succinimidyl succinate	スクシンイミジルスクシナート
$t_{1/2}$	Time of elimination half-life calculated as ln(2) /elimination rate constant: kel	消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
V_{SS}	Volume of distribution at steady state	定常状態分布容積
不純物 A	－	[redacted]

略号一覧表（製剤・有効成分）

略号	英名	日本語・定義
ADAGEN®	SS-PEG-ADA,PEG-ADA, PEGylated ADA	一般名：pegademase bovine 米国で承認されている（日本では未承認）の ADA 欠損症治療薬の販売名
EZN-2279	PEGylated recombinant bovine ADA with SC linker（SC-PEG-rADA）, PEG-rADA	STM-279 の米国の治験成分記号 一般名：elapegademase 販売名：REVCOVI®
STM-279	PEGylated recombinant bovine ADA with SC linker（SC-PEG-rADA）, PEG-rADA	日本での治験成分記号 一般名:エラペグアデマーゼ（遺伝子組換え） 販売名：レブコビ®筋注 2.4mg
PEG-ADA	PEGylated bovine ADA with SS linker（SS-PEG-ADA）	ポリエチレングリコール修飾ウシアデノシンデアミナーゼ。 ADAGEN®の有効成分。
PEG-rADA	PEGylated recombinant bovine ADA with SC linker（SC-PEG-rADA）	ポリエチレングリコール修飾遺伝子組換えウシアデノシンデアミナーゼ類縁体。 STM-279 又は EZN-2279 の有効成分。

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

EZN-2279 は、大腸菌より産生される遺伝子組換えウシ ADA の類縁体（rADA）に PEG を共有結合させた修飾タンパク質（PEG-rADA）を含む注射剤であり、米国で ADAGEN®の置き換え品として開発された ADA 欠損症のための酵素補充療法剤である。

ADAGEN®は、天然型ウシ腸由来 ADA に PEG を共有結合させた修飾タンパク質（PEG-ADA）を含む注射剤である。ADAGEN®は ADA 欠損症のための酵素補充療法剤として 1990 年に米国で製造販売承認された。ADAGEN®投与により免疫機能の改善、感染のコントロール、発育の回復といった臨床症状の改善が報告されている [1)]。また、ADAGEN®には海外での 25 年以上の臨床使用における安全性情報が存在する [2)]。

EZN-2279 と ADAGEN®の比較を以下に示す。

- 遺伝子組み換えウシ ADA 類縁体のアミノ酸配列は、74 番目アミノ酸残基をシステイン（天然型）からセリンに置換された以外は同一である。
- PEG のリンカーとして、ADAGEN®ではスクシンイミジルスクシナート（SS）リンカーが使用され、EZN-2279 ではより安定なスクシンイミジルカルバメート（SC）リンカーが使用されている。なお、慢性疾患に対する適応で承認されている他のバイオ医薬品でも、同様の SC リンカーを介した PEG の修飾はなされており [3) ,4)]、PEG の修飾に関連した新たな毒性発現はないことが報告されている [5) ,6)]。
- 使用された PEG の分子量及び PEG の結合量は同様である。

以上より、EZN-2279 及び ADAGEN®の類似性から、海外で既に承認され臨床で効果が認められている ADAGEN®同様、EZN-2279 も ADA 欠損症患者における有効性が期待できると考えた。

非臨床における有効性検証のため、効力を裏付ける試験では ADA 欠損マウスを用いて評価した。

非臨床における薬物動態試験は、EZN-2279（非標識）を用いて実施した。薬物動態（血中濃度推移）の評価には薬理試験や毒性試験と同じ動物種のラット及びイヌを使用し、反復筋肉内投与における薬物動態はトキシコキネティクス（TK）（ラット、イヌ）の結果から評価した。

EZN-2279 の主要な毒性試験及び ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験は、GLP 適用試験として実施した。EZN-2279 の毒性試験として、筋肉内投与によるラット及びイヌの単回投与試験、筋肉内投与によるラット及びイヌの 4 週間反復投与毒性試験、筋肉内投与によるラットの胚・胎児発生に関する試験、並びに不純物に関する試験を実施した。TK［血漿中濃度（ADA 活性）を測定］及び抗 EZN-2279 抗体測定は、上記全ての EZN-2279 の毒性試験で実施した。ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験として、腹腔内投与によるマウスの単回投与毒性試験、腹腔内投与によるマウスの 2 週間反復投与毒性試験、筋肉内投与によるラットの 2 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験として、ADA 欠損マウスを用いて、EZN-2279 又は ADAGEN®を同じ投与量（それぞれ 5 U）で腹腔内単回投与又は筋肉内反復投与して病態改善効果を検討した。

2.4.2.1.1　血中 ADA 活性上昇作用

生後 18 日目の ADA 欠損マウス及び ADA 野生型マウスに、EZN-2279 又は ADAGEN®のそれぞれ 5 U を腹腔内に単回投与し、3 日後の生後 21 日目に解剖した。解剖時に血液を採取し、酵素電気泳動を用いて ADA 活性を検討した。その結果、EZN-2279 又は ADAGEN®由来の PEG-ADA が、ADA 欠損マウス及び ADA 野生型マウスの血液サンプルからそれぞれ検出され、その活性は同程度であった。以上より、両剤を同量投与したとき、ADA 欠損マウス又は ADA 野生型マウスいずれにおいても ADA 活性が同程度血中に存在することが示唆された。

2.4.2.1.2　血漿中 ADA 活性トラフ値上昇作用

生後 1 日目の ADA 欠損マウスに、それぞれ 5 U の EZN-2279 又は ADAGEN®を筋肉内に投与し、その後 4 日ごとに生後 21 日目まで、同様に投与を繰り返した。最終投与の直前に血液を採取し、分光光度法で血漿中 ADA 活性トラフ値を測定した。その結果、EZN-2279 又は ADAGEN®投与によりいずれも血漿中 ADA 活性トラフ値は上昇し、その値はいずれも臨床において ADAGEN®を投薬した時の血漿中 ADA 活性の範囲（20～150 μmol/h/mL）であった。なお、EZN-2279 投与時の血漿中 ADA 活性トラフ値が ADAGEN®投与時よりも約 35%高い結果を示したが、統計学的に有意な差ではなかった。

2.4.2.1.3　BALF 中アデノシン濃度増加抑制作用

生後 18 日目の ADA 欠損マウス及び ADA 野生型マウスに、それぞれ 5 U の EZN-2279 又は ADAGEN®を腹腔内に単回投与し、生後 21 日目に解剖した。解剖時に BALF を採取し、逆相 HPLC を用いてアデノシン濃度を測定した。その結果、ADA 欠損マウスでは ADA 野生型マウスに比べ、BALF 中アデノシン濃度は増加した。EZN-2279 又は ADAGEN®投与により、BALF 中アデノシン濃度は ADA 野生型マウスよりも低下し、EZN-2279 と ADAGEN®の投与による抑制は同程度であった。ADA 野生型マウスにおいても、同様の結果が得られた。また、投与量 0.5～5 U の範囲において、EZN-2279 又は ADAGEN®いずれについても同等の BALF 中アデノシン濃度抑制作用の用量依存性が確認された。

2.4.2.1.4　胸腺及び脾臓中アデノシン及びデオキシアデノシン濃度、細胞数、器官重量の改善作用

生後 1 日目の ADA 欠損マウスに、それぞれ 5 U の EZN-2279 又は ADAGEN®を筋肉内に投与し、その後 4 日ごとに生後 21 日目まで、同様に投与を繰り返した。生後 21 日目に胸腺及び脾臓を採取し、器官重量を測定した。また、胸腺及び脾臓から細胞懸濁液を作製し、血球計算盤を用いて

それぞれの細胞数を測定するとともに、逆相 HPLC を用いてアデノシン及びデオキシアデノシン濃度を測定した。その結果、胸腺及び脾臓におけるアデノシン及びデオキシアデノシン濃度は、ADA 野生型マウスに比べ ADA 欠損マウスで有意に増加し、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により非投与の ADA 野生型マウス程度まで抑制された。更に、胸腺及び脾臓細胞数、両器官重量は ADA 野生型マウスに比べ ADA 欠損マウスで有意に減少し、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により非投与の ADA 野生型マウス程度まで減少が抑制され、ADAGEN®に比べ EZN-2279 がより強く減少が抑制された。

2.4.2.1.5 脾臓における脾臓細胞数、T 及び B 細胞数の減少抑制作用

生後 20 日目の ADA 欠損マウスに、それぞれ 5 U の EZN-2279 又は ADAGEN®を筋肉内に投与し、その後週 1 回、6 週齢まで、同様に投与を繰り返した。最終投与後、胸腺及び脾臓を採取し、細胞懸濁液を作製して血球計算盤を用いて脾臓細胞数を測定した。また、T 細胞の表面マーカーとして CD3 及び TCRβ、B 細胞の表面マーカーとして CD45R 及び IgM を指標として、フローサイトメトリーにより T 及び B 細胞の割合を測定した。その結果、ADA 野生型マウスに比べ ADA 欠損マウスにおいて脾臓細胞数、脾臓 T 及び B 細胞数が有意に減少し、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により細胞数の減少が抑制され、その程度は EZN-2279 と ADAGEN®で同程度であった。

2.4.2.1.6 体重減少抑制作用

生後 1 日目の ADA 欠損マウスに、それぞれ 5 U の EZN-2279 又は ADAGEN®を筋肉内に投与し、その後 4 日ごとに生後 21 日目まで、同様に投与を繰り返した。その結果、ADA 野生型マウスに比べ ADA 欠損マウスでは、体重の減少が観察されたが、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により、ADA 欠損マウスで観察される有意な体重減少が認められず、ADA 野生型マウスの体重といずれも同程度に維持された。

2.4.2.1.7 生存率改善作用

生後 20 日目の ADA 欠損マウスに、それぞれ 5 U の EZN-2279 又は ADAGEN®を筋肉内に投与し、その後週 1 回、6 週齢まで、同様に投与を繰り返して生存率を比較検討した。その結果、通常生後約 3～4 週間で死亡するのに対し、EZN-2279、ADAGEN®投与によりそれぞれ 6 例中 6 例及び 5 例が生後 6 週齢まで生存し、いずれも生存率が向上した。

以上をまとめると、

- EZN-2279 又は ADAGEN®投与によりいずれも血漿中 ADA 活性トラフ値は上昇し、その値はいずれも臨床において ADAGEN®を投薬した時の血漿中 ADA 活性の範囲であった。
- EZN-2279 又は ADAGEN®投与により、BALF 中アデノシン濃度は ADA 野生型マウスよりも低下し、EZN-2279 と ADAGEN®の投与による抑制は同程度であった。
- 胸腺及び脾臓におけるアデノシン及びデオキシアデノシン濃度は、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により非投与の ADA 野生型マウス程度まで抑制された。更に、胸腺及び脾臓細胞数、両

器官重量は、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により非投与の ADA 野生型マウス程度まで減少が抑制され、ADAGEN®に比べ EZN-2279 がより強く減少が抑制された。
- EZN-2279 又は ADAGEN®投与により ADA 野生型マウスと同程度までいずれも体重減少が抑制され、生存率が向上した。

ADA 欠損マウスにおいて、EZN-2279 は海外で既に承認され臨床で効果が認められている ADAGEN®と同程度かより強い薬効を示したことから、EZN-2279 は ADA 欠損症患者における有効性が期待できると考えた。

2.4.2.2　副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.4.2.3　安全性薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

EZN-2279 もしくは ADAGEN®をラットへ静脈内投与並びにラット及びイヌへ筋肉内投与し、薬物動態を評価した。また、一般毒性試験及び生殖毒性試験の中で、ラット及びイヌに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの TK を評価した。血漿中 EZN-2279 もしくは ADAGEN®濃度は、血漿中 ADA 活性として測定した。

2.4.3.1　吸収及び分布

ラット及びイヌに EZN-2279 又は ADAGEN®を 30 あるいは 150 U/kg の用量で単回筋肉内投与したとき、最高血中濃度（C_{max}）及び血中濃度－時間曲線下面積（AUC）は用量に応じて増加した。EZN-2279 の AUC_{inf}は ADAGEN®と比較してラットで 1.3～1.5 倍、イヌで 1.5～1.6 倍高値を示した。EZN-2279 の消失半減期（$t_{1/2}$）はラット及びイヌでそれぞれ 49～61 時間及び 128～154 時間であり、ADAGEN®に比べてそれぞれ 1.1～1.5 倍及び 1.7～2.1 倍延長した。

ラット及びイヌの 4 週間反復投与毒性試験の TK では、EZN-2279 を 30、100 あるいは 300 U/kg の用量で 4 週間（3 日又は 4 日おきに計 9 回）筋肉内投与したとき、投与初日の C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。ラットの雌雄 300 U/kg 群では、投与初日と比較して投与最終日で高い曝露が認められた。一方、雄性ラットの 30 及び 100 U/kg 群、並びに雌性ラットの 30 U/kg 群において投与初日と比較して投与最終日で曝露の低下が認められた。また、イヌはいずれの用量でも投与初日と比較して投与最終日で高い曝露を認めた。しかしながら 30 U/kg 群の雄 1 例、100 U/kg

群の雌 1 例で投与最終日の曝露は著しく低下した。抗体産生については、投与最終日又は回復期間においてラット及びイヌの多くの個体で抗 EZN-2279 抗体は陽性であった。ラットで 30 U/kg 群の雄 1 例及び 300 U/kg 回復群の雌 1 例で ADA 活性の中和が確認された。また、イヌの 100 U/kg 群の雌 1 例（投与最終日に著しく曝露が低下した個体）で ADA 活性の中和が確認された。

ラットに EZN-2279 もしくは[redacted]%の不純物 A を含む EZN-2279 を 500 U/kg の用量で投与した 4 週間（3 日又は 4 日おきに計 8 回）反復投与毒性試験の TK から、Day 1 及び Day 25 投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ は同程度であった。また、[redacted]%の不純物 A の有無により EZN-2279 の薬物動態パラメータ及び抗体産生の発生頻度に明確な違いは認められなかった。

妊娠ラットに EZN-2279 を 0、48、143 あるいは 238 U/kg 相当（分光学的定量法による酵素活性に換算）を妊娠 7 日から 3 日に 1 回の間隔で計 4 回反復筋肉内投与した胚・胎児発生に関する試験の TK から、$AUC_{0\text{-}72h}$ 及び C_{max} は用量に応じて増加し、妊娠後の反復投与で曝露量の変化は認められなかった。抗体産生について、抗薬物抗体は検出されなかった。

ラットに 126 U/kg の EZN-2279 を単回静脈内投与したときのクリアランス（CL）は 0.93 mL/h/kg、定常状態分布容積（V_{ss}）は 0.045 L/kg、終末相消失半減期は 38 時間であり、ADAGEN®と同様のプロファイルを示した。静脈内投与したときの V_{ss} から EZN-2279 はラットでほぼ血中に分布していることが示唆された。また、マウスに ADAGEN®100～500 U/kg を筋肉内投与したとき、血中を除く、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、肺などの組織で検出されなかったとの報告がある [7)]。以上のことから、EZN-2279 はほぼ血中に分布し、他組織への移行性は低いと考えられた。

2.4.3.2　代謝

バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（医薬審第 326 号、平成 12 年 2 月 22 日）において、「バイオ医薬品の期待される代謝は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解である。したがって、その代謝経路は一般によく分かっている。一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ない」と記載されていること、また高分子量の PEG は生体内で代謝されにくく、尿や胆汁中に排泄されることが報告されているため [6)]、本剤の代謝に関する検討は実施していない。

2.4.3.3　排泄

バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（医薬審第 326 号、平成 12 年 2 月 22 日）において、「物質収支を評価するための画一的な試験からはあまり有益な情報は得られない」と記載されていることから、本剤の排泄に関する検討は実施していない。

2.4.3.4　薬物動態学的薬物相互作用

薬物相互作用の検討は実施していない。一方、本剤は ADA 活性を有することから、ADA の基質であるビダラビンやネララビンを代謝する可能性や、ADA の阻害剤であるペントスタチンにより本剤の酵素活性が減弱する可能性が考えられる。

2.4.4　毒性試験

EZN-2279 の毒性試験プログラムを表 2.4.4-1 に示した。ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験プログラムを表 2.4.4-2 に示した。

表 2.4.4-1　EZN-2279 の毒性試験プログラム

試験項目及び期間	投与経路	動物種	投与量（U/kg）[c]	GLP 適用
単回投与毒性試験 [a]	筋肉内	ラット（SD、雌雄）	EZN-2279: 30, 150 ADAGEN®: 30, 150	非
単回投与毒性試験 [a]	筋肉内	イヌ（ビーグル、雌雄）	EZN-2279: 30, 150 ADAGEN®: 30, 150	非
反復投与毒性試験				
4 週間 [b]	筋肉内（3 日又は 4 日おきの全 9 回投与）	ラット（SD、雌雄）	0, 30, 100, 300	適 [e]
4 週間 [b]	筋肉内（3 日又は 4 日おきの全 9 回投与）	イヌ（ビーグル、雌雄）	0, 30, 100, 300	適 [e]
生殖発生毒性試験				
胚・胎児発生に関する試験 [b]	筋肉内（3 日おきの全 4 回投与）	ラット（SD、雌）、妊娠 7～16 日	0, 100（48）[d], 300（143）[d], 500（238）[d]	適
その他の毒性試験				
不純物に関する試験 [b]	筋肉内（週 2 回の全 8 回投与）	ラット（SD、雌雄）	0, 500	適 [f]

a）薬物動態評価（EZN-2279 と ADAGEN®の比較）を主目的として実施した試験
b）TK 及び抗 EZN-2279 抗体測定を実施した試験
c）特に明記しない限り、分光学的定量法による酵素活性を基に算出した投与量を示す
d）高速液体クロマトグラフィーにより測定した酵素活性を基に算出した投与量（分光学的定量法による酵素活性に換算した場合の投与量）
e）被験物質の安定性試験及び投与液の濃度分析は GLP 非適用
f）[redacted]で実施した抗 EZN-2279 抗体測定は GLP 非適用

表 2.4.4-2　ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験プログラム

試験項目及び期間	投与経路	動物種	投与量（U/kg）	GLP 適用
単回投与毒性試験	腹腔内	マウス（Swiss-Webster、雌雄）	10000, 50000	適
反復投与毒性試験 2 週間	腹腔内	マウス（Swiss-Webster、雌雄）	0, 200	適
2 ヵ月間（4 週間又は 8 週間）	筋肉内	ラット（SD、雌雄）	0, 150, 500	適

EZN-2279 の毒性試験結果：

EZN-2279 のラット及びイヌにおける単回投与試験において、死亡例は認められず、一般状態、体重、及び摂餌量に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。

EZN-2279 のラット及びイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験において、EZN-2279 に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。TK（血漿中 ADA 活性）について評価した結果、C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。抗 EZN-2279 抗体測定の結果、投与期間終了時又は回復期間終了時において多くの個体が抗 EZN-2279 抗体陽性を示した。ラット及びイヌに EZN-2279 を 4 週間反復筋肉内投与した場合の無毒性量は、いずれの動物種においても 300 U/kg（≒2.0 mg/kg）であった。

EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験において、母動物の生殖及び胚・胎児発生に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。TK（血漿中 ADA 活性）について評価した結果、C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。ラットにおける母動物の一般毒性及び生殖並びに胚・胎児発生に対する無毒性量は、いずれも 238 U/kg（≒1.6 mg/kg）であった。

不純物に関する試験において、不純物 A 含有の有無による毒性学的に意義のある差異は認められなかった。

EZN-2279 の毒性試験の無毒性量は、本申請での最大投与量（0.4 mg/kg/週、筋肉内注射）を超えている。

ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験結果：

PEG-ADA のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験において、一般状態、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査で PEG-ADA に関連した変化は認められなかった。体重では、10000 U/kg 群で一過性の増加抑制、50000 U/kg 群で軽度な減少が認められた。

PEG-ADA のマウスにおける 2 週間反復腹腔内投与毒性試験において、PEG-ADA に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。マウスに PEG-ADA を 2 週間反復腹腔内投与した場合の無毒性量は 200 U/kg であった。

PEG-ADA のラットにおける 2 ヵ月間反復筋肉内投与毒性試験において、PEG-ADA に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。ラットに PEG-ADA を 4 週間又は 8 週間反復筋肉内投与した場合の無毒性量は 500 U/kg であった。

2.4.5 総括及び結論

非臨床試験成績により、EZN-2279 の薬理、薬物動態及び毒性評価を行った。

効力を裏付ける試験として、ADA 欠損マウスを用いて、EZN-2279 又は ADAGEN®を同じ投与量（それぞれ 5 U）で腹腔内単回投与又は筋肉内反復投与して病態改善効果を検討した。その結果、以下の効果を示した。

- EZN-2279 又は ADAGEN®投与によりいずれも血漿中 ADA 活性トラフ値は上昇し、その値はいずれも臨床において ADAGEN®を投薬した時の血漿中 ADA 活性の範囲であった。
- EZN-2279 又は ADAGEN®投与により、BALF 中アデノシン濃度は ADA 野生型マウスよりも低下し、EZN-2279 と ADAGEN®の投与による抑制は同程度であった。
- 胸腺及び脾臓におけるアデノシン及びデオキシアデノシン濃度は、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により非投与の ADA 野生型マウス程度まで抑制された。更に、胸腺及び脾臓細胞数、両器官重量は、EZN-2279 又は ADAGEN®投与により非投与の ADA 野生型マウス程度まで減少が抑制され、ADAGEN®に比べ EZN-2279 がより強く減少が抑制された。
- EZN-2279 又は ADAGEN®投与により ADA 野生型マウスと同程度までいずれも体重減少が抑制され、生存率が向上した。

以上、ADA 欠損マウスにおいて、EZN-2279 は海外で既に承認され臨床で効果が認められている ADAGEN®と同程度かより強い薬効を示したことから、EZN-2279 は ADA 欠損症患者における有効性が期待できると考えた。

ラット及びイヌに EZN-2279 又は ADAGEN®を 30 あるいは 150 U/kg の用量で単回筋肉内投与したとき、C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。また、EZN-2279 の $t_{1/2}$ は ADAGEN®と比較してラット及びイヌでそれぞれ延長した。ラットに EZN-2279 を単回静脈内投与したときの V_{ss} は 0.045 L/kg と小さく、ほぼ血中に分布していることが示唆され、EZN-2279 はほぼ血中に分布し、他組織への移行性は低いと考えられた。

EZN-2279 のラット及びイヌにおける単回投与試験において、死亡例は認められず、一般状態、体重、及び摂餌量に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。

EZN-2279 のラット及びイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験において、EZN-2279 に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。TK（血漿中 ADA 活性）について評価した結果、C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。抗 EZN-2279 抗体測定の結果、投与期間終了時又は回復期間終了時において多くの個体が抗 EZN-2279 抗体陽性を示した。ラット及びイヌ

に EZN-2279 を 4 週間反復筋肉内投与した場合の無毒性量は、いずれの動物種においても 300 U/kg（≒2.0 mg/kg）であった。

EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験において、母動物の生殖及び胚・胎児発生に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。TK（血漿中 ADA 活性）について評価した結果、C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。ラットにおける母動物の一般毒性及び生殖並びに胚・胎児発生に対する無毒性量は、いずれも 238 U/kg（≒1.6 mg/kg）であった。

不純物に関する試験において、不純物 A 含有の有無による毒性学的に意義のある差異は認められなかった。

EZN-2279 の毒性試験の無毒性量は、本申請での最大投与量（0.4 mg/kg/週、筋肉内注射）を超えている。

ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験結果：

PEG-ADA のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験において、一般状態、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査で PEG-ADA に関連した変化は認められなかった。体重では、10000 U/kg 群で一過性の増加抑制、50000 U/kg 群で軽度な減少が認められた。

PEG-ADA のマウスにおける 2 週間反復腹腔内投与毒性試験において、PEG-ADA に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。マウスに PEG-ADA を 2 週間反復腹腔内投与した場合の無毒性量は 200 U/kg であった。

PEG-ADA のラットにおける 2 ヵ月間反復筋肉内投与毒性試験において、PEG-ADA に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。ラットに PEG-ADA を 4 週間又は 8 週間反復筋肉内投与した場合の無毒性量は 500 U/kg であった。

2.4.6　参考文献

1）Booth C, Gaspar HB. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). Biologics. 2009; 3: 349-358. 4.3-1

2）ADAGEN® の添付文書 4.3-2

3）PEGINTRON® (peginterferon alfa-2b) injection, for subcutaneous use. Prescribing Information (Package Insert). 2017. 4.3-3

4）Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, Brändli-Baiocco A, Cavagnaro J, Dempster M, et al. PEGylated biopharmaceuticals: current experience and considerations for nonclinical development. Toxicol Pathol. 2015; 43: 959-983. 4.3-14

5）Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, Ivens IA. PEGylation of biopharmaceuticals: A review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs. J Pharm Sci. 2016; 105: 460-475. 4.3-15

6）Webster R, Didier E, Harris P, Siegel N, Stadler J, Tilbury L, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. Drug Metab Dispos. 2007 Jan; 35(1):9-16. 4.3-5

7）Blackburn MR, Aldrich M, Volmer JB, Chen W, Zhong H, Kelly S, et al. The Use of Enzyme Therapy to Regulate the Metabolic and Phenotypic Consequences of Adenosine Deaminase Deficiency in Mice. Defferential Impact on Pulmonary and Immunologic abnormalities. J Biol Chem. 2000; 275(41):32114-21. 4.3-6