レブコビ筋注 2.4mg

製造販売承認申請

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.4　薬物動態試験の概要文

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.4　薬物動態試験の概要文 5
2.6.4.1　まとめ 5
2.6.4.2　分析法 6
2.6.4.2.1　EZN-2279 及び ADAGEN®の分析法 6
2.6.4.2.2　抗 EZN-2279 抗体、中和活性試験、及び抗 PEG 抗体の分析法 7
2.6.4.3　吸収 9
2.6.4.3.1　ラットにおける血中濃度 10
2.6.4.3.2　イヌにおける血中濃度 21
2.6.4.4　分布 24
2.6.4.5　代謝 25
2.6.4.6　排泄 25
2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用 25
2.6.4.8　その他の薬物動態試験 25
2.6.4.9　考察及び結論 25
2.6.4.10　参考文献 27
2.6.4.11　付録 27

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
AUC	Area under the drug concentration-time curve	血中濃度 - 時間曲線下面積
AUC/D	AUC per Dose, Dose normalized AUC	用量あたりの AUC
AUC_{inf}	AUC through infinity	無限大時間までの AUC
$AUC_{0\text{-}72h}$	AUC from zero to 72 h	投与 0 時から 72 時間までの AUC
$AUC_{0\text{-}336h}$	AUC from zero to 336 h	投与 0 時から 336 時間までの AUC
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
C_{max}/D	C_{max} per Dose, Dose normalized C_{max}	用量あたりの最高血中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	エデト酸ナトリウム水和物
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	エライザ（酵素結合免疫吸着法）
EZN-2242	SS-PEG-bADA, PEG-bADA, PEGylated ADA	ADAGEN®の米国の開発番号
F	Bioavailability	（絶対的）バイオアベイラビリティ
HPLC	High-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
k_{el}	Elimination rate constant	消失速度定数
$MRT_{0\text{-}336h}$	Mean residence time from zero to 336 h	投与 0 時から 336 時間までの平均滞留時間
MRT	Mean residence time	無限大時間までの平均滞留時間
NA	Not applicable	該当なし
[redacted]	[redacted]	[redacted]
OD	Optical density	光学密度
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PEG-OA	PEGylated ovalbumin	PEG 化オボアルブミン
PEG-bADA	PEGylated bovine 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。
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
POD	Peroxidase	ペルオキシダーゼ（標識酵素）
rADA	Recombinant adenosine deaminase	遺伝子組換えウシアデノシンデアミナーゼ類縁体
SC	Succinimidyl carbamate	スクシンイミジルカルバメート
SC-PEG	Succinimidyl carbamate linked PEG	スクシンイミジルカルバメート架橋したポリエチレングリコール
SC-PEG-rADA	PEGylated recombinant bovine ADA with succinimidyl carbamate linker (EZN-2279)	ポリエチレングリコールで修飾した大腸菌由来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。

略号一覧表（続き）

略号	英名	日本語
SD	Sprague-Dawley CD®	SD（ラット系統名）
SS	Succinimidyl succinate	スクシンイミジルスクシナート
SS-PEG	Succinimidyl succinate linked PEG	スクシンイミジルスクシナート架橋したポリエチレングリコール
SS-PEG-bADA	PEGylated bovine ADA with succinimidyl succinate linker	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。
SS-PEG-rADA	PEGylated recombinant bovine ADA with succinimidyl succinate linker	ポリエチレングリコール修飾した遺伝子組換えウシアデノシンデアミナーゼ類縁体
$t_{1/2}$	Time of elimination half-life calculated as $\ln(2)/k_{el}$	消失半減期
$t_{1/2\alpha}$	Half-life during the initial, rapid distribution phase	α 相消失半減期
$t_{1/2\beta}$	Half-life during the second, slower elimination phase	終末相（β 相）消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	Time of the maximum concentration (obtained without interpolation)	最高血中濃度到達時間
U	Unit	酵素活性の単位 ：毎分 1 μmol の基質を変化することができる酵素量
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態分布容積
V_z/F	Apparent volume of distribution	見かけの分布容積
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。

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

STM-279（EZN-2279）に使用される遺伝子組換えウシアデノシンデアミナーゼ（rADA）は、米国で承認されている ADAGEN®の製造に使用される天然由来のウシアデノシンデアミナーゼ（ADA）に代わるものとして開発されている。

薬物動態（PK）試験は非標識体を用いて実施した。動物種は主に薬理試験及び毒性試験に用いたものとしてラット及びイヌを選択した。投与経路は臨床投与経路である筋肉内投与を主体とし、一部静脈内投与も実施した。ADAGEN®の安全性及び薬物動態プロファイルは既に確立されているので、EZN-2279 の PK 試験は ADAGEN®との比較を活用しつつ、ラット PK 試験並びにラット及びイヌにおける単回及び反復投与毒性試験のトキシコキネティクス（TK）試験結果を用いて評価した。PK の単回筋肉内投与試験及び TK 試験における血中 EZN-2279 及び ADAGEN®濃度はバリデートされたバイオアッセイ法（ADA 活性）により測定した。

ラットに 126 U/kg の EZN-2279 を単回静脈内投与したときの PK パラメータは、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（$t_{1/2\beta}$）は 38 時間であり、ADAGEN®と同様のプロファイルを示した。ラットに 150 U/kg の EZN-2279 を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ（雄/雌）は、見かけのクリアランス（CL/F）が 1.57/1.48 mL/h/kg、見かけの分布容積（V_z/F）が 0.140/0.129 L/kg、消失半減期（$t_{1/2}$）が 61.8/60.3 時間であり、ADAGEN®に比べて長半減期かつ低クリアランスの PK プロファイルを示した。

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、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 CL/F はラット及びイヌで ADAGEN®に比べてそれぞれ 0.68～0.71 倍及び 0.64～0.67 倍であった。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 倍高い値を示した。$t_{1/2}$ は ADAGEN®と比較してラットで 1.1～1.5 倍、イヌで 1.7～2.1 倍延長した。

ラット及びイヌに 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 300 U/kg 群、並びにイヌの 30、100 及び 300 U/kg 群において投与初日と比較して投与最終日で高い曝露（ADA 活性）が認められた。一方で、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、イヌでは 30 U/kg 群の雄 1 例、100 U/kg 群の雌 1 例において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、ラット及びイヌに反復投与したとき、投与最終日又は回復期間において多くの個体で抗 EZN-2279 抗体が陽性であった。ラットにおいて ADA 活性の中和が 30 U/kg 群の雄 1 例及び 300 U/kg 回復群の雌 1 例で確認された。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。

製剤評価のため、不純物 A を含まない 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 について評価した。EZN-2279 の不純物 A の有無に関わらず、Day 1 及び Day 25 投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$

は同程度であり、EZN-2279 の PK パラメータに影響しないことを確認した。また、不純物 A 含有の有無に関わらず、抗体産生の発生頻度は同程度であった。

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）を用いた胚・胎児発生に関する試験において、EZN-2279 を筋肉内投与したとき、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ は用量に応じて増加した。妊娠後の反復投与で曝露量の変化は認められず、抗薬物抗体も検出されなかった。

2.6.4.2　分析法

2.6.4.2.1　EZN-2279 及び ADAGEN®の分析法

PK 試験に用いた血漿中 EZN-2279 及び ADAGEN®濃度は、バイオアッセイ法（ADA 活性）により測定した。ADA 活性は、アデノシンを基質としてイノシンを生成する酵素反応における吸光度変化を測定することにより求めた。分光学的定量法の詳細を以下に示す。アデノシンは最大吸収波長 260 nm（吸光係数：14.9 $mM^{-1}cm^{-1}$）に対して、イノシンは 248 nm（吸光係数：12.1 $mM^{-1}cm^{-1}$）を有する。これらの 2 つの化合物の間で最大の吸光度差を有する 263 nm を分析波長とし、アデノシンの吸光度変化を 15 分間連続的にモニターして減少速度を算出した。濃度既知の EZN-2279 もしくは ADAGEN®を血漿に添加して検量線を作成し、検体中の ADA 活性を mU/mL で算出した。1U は、1 分間あたり 1 µmol のイノシンを生成する ADA 活性と定義しており、1 mU/mL= 0.06 µmol/h/mL である。なお、[redacted]補正［4.2.3.7.6］）の投与量を併記した。

ラット及びイヌ血漿における ADA 活性の分析法は、[redacted]で構築し、バリデートした。なお、動物試験により異なる抗凝固剤を用いたため、種ごとに抗凝固剤別のバリデーションを実施した。その後[redacted]試験［2.6.4.3.1.5 項］から TK 試料の測定に合わせ、ラット血漿中の ADA 活性分析法を改良し、[redacted]にてパーシャルバリデーションを実施した。さらにその後本測定法を[redacted]にて移管バリデーションを実施し、[redacted]試験［2.6.4.3.1.6 項］以降の TK 測定で適用した。ADA 活性分析法の施設と定量下限及びバリデーション報告書の関係一覧を表 2.6.4-1 に示す。

表 2.6.4-1　ラット及びイヌ血漿における ADA 活性分析法

バリデーション試験番号	分析施設	分析対象物/動物種	定量下限	適応試験番号
[redacted]	[redacted]	ADAGEN®/ Rat plasma	50 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted] a)	EZN-2279/ Rat plasma	25 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted] a)	EZN-2279/ Rat plasma	25 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted]	ADAGEN®/ Rat plasma	50 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted]	EZN-2279, ADAGEN®,SS-PEG-rADA/ Rat plasma	各化合物 25 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted]	EZN-2279/ Rat plasma	25 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted]	EZN-2279/ Rat plasma	15 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted] a)	ADAGEN®/ Dog plasma	25 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted]	EZN-2279/ Dog plasma	25 mU/mL	[redacted]
[redacted]	[redacted]	EZN-2279/ Dog plasma	25 mU/mL	[redacted]

a) 2015 年 9 月 21 日、法人「[redacted]」は[redacted]に名称変更

2.6.4.2.2　抗 EZN-2279 抗体、中和活性試験、及び抗 PEG 抗体の分析法

（1）抗 EZN-2279 抗体の分析法

血漿中抗 EZN-2279 抗体の検出は酵素結合免疫吸着法（ELISA）を用いた。

ラット血漿中抗体の分析法として、[redacted]では、二次抗体の代わりにペルオキシダーゼ（POD）に結合したプロテイン-L を用い、結合した抗 EZN-2279 抗体を検出した。その後、[redacted]で二次抗体を、抗免疫グロブリン G 抗体（抗 IgG 抗体）の POD 標識体に変更し、バリデートした。さらに、薬物特異的な抗体を検出するため、[redacted]で以下の段階的判断（Tiered strategy）を取り入れたバリデーションを実施した。[redacted]では、抗 IgG 抗体の POD 標識体を二次抗体として使用した。1st tier では、検体の OD 値が分析バッチのカットオフ OD 値を超える場合に抗 EZN-2279 抗体はスクリーニング陽性（偽陽性を含む）とみなし、2nd tier では、大過剰の EZN-2279 を競合させて特異的抗体か否かを判断、3rd tier で検体の力価を段階希釈により決定した。

イヌ血漿中抗体の分析法として、[redacted]で抗 IgG 抗体の POD 標識体を二次抗体として使用した。抗 EZN-2279 抗体の検出は、ブランク血漿の OD 値に基づ

きカットポイントを決定した。カットポイントより高い OD 値を示すサンプルを陽性とし、カットポイント以下の OD 値の検体を陰性と判断した。

ラット及びイヌにおける抗 EZN-2279 抗体検出法の一覧を表 2.6.4-2 に示す。

表 2.6.4-2　ラット及びイヌにおける抗 EZN-2279 抗体検出法

バリデーション 試験番号	測定施設	動物種	適応試験番号
[redacted]	[redacted] a)	Rat plasma	[redacted]
[redacted]	[redacted]	Rat plasma	[redacted]
[redacted]	[redacted]	Rat plasma	[redacted]
[redacted]	[redacted] a)	Dog plasma	[redacted]

a)　2015 年 9 月 21 日、法人「[redacted]」は[redacted]に名称変更

（2）中和活性試験

血漿中 ADA 活性の中和分析は、血漿中 ADA 活性分析法と同様の方法を用いた。この ADA 活性中和分析法は、添加した血漿による EZN-2279 の酵素活性の阻害の程度を測定し、中和率（%）として報告する。酵素活性の分析は、抗 ADA 抗体を含有する可能性のある血漿試料を予め規定の活性に調製した EZN-2279 に添加し、既知量の EZN-2279 より調製した標準曲線（検量線）用試料と共にインキュベートした。酵素反応はアデノシン溶液の添加により開始し、OD 263 nm を 15 分間連続的にモニターして EZN-2279 の濃度を算出した。中和率（%）は、EZN-2279 酵素活性の低下率をパーセントとして計算した。中和抗体の有無は、カットポイントに基づき判断した。ラット及びイヌ血漿における中和抗体の検出法は、[redacted]（後に[redacted]に名称変更）で構築及びバリデートした。その後、ラットについては[redacted]にて移管バリデーションを実施し、[redacted]試験［2.6.4.3.1.6 項］の TK 血漿試料の評価に用いた。ラット及びイヌにおける ADA 活性中和抗体検出法の一覧を表 2.6.4-3 に示す。

表 2.6.4-3　ラット及びイヌにおける中和抗体検出法

バリデーション試験番号	測定施設	動物種	適応試験番号
[redacted]	[redacted] a)	Rat plasma	[redacted]
[redacted]	[redacted]	Rat plasma	[redacted]
[redacted]	[redacted]	Rat plasma	[redacted]
[redacted]	[redacted] a)	Dog plasma	[redacted]

a)　2015 年 9 月 21 日、法人「[redacted]」は[redacted]に名称変更

（3）抗 PEG 抗体

ラット血漿中における抗 PEG 抗体の評価には、PEG 特異的な抗体を検出する ELISA 法を用いた。プレートに PEG 化オボアルブミン（PEG-OA）を固相化し、二次抗体の代わりとしてプロテイン L を用いて、プレートに捕捉した抗 PEG 抗体を検出した。抗体の評価は Tiered strategy で実施した。1st tier では、検体の OD 値が分析バッチのカットポイントの OD 値を超える場合、抗 PEG 抗体はスクリーニング陽性（偽陽性を含む）とみなし、2nd tier では、大過剰の PEG-OA を競合させて特異的抗体か否かを判断、3rd tier で検体の力価を段階希釈により決定した。この分析方法は[redacted]にて構築、バリデートした［表 2.6.4-4］。

表 2.6.4-4　ラットにおける抗 PEG 抗体検出法

バリデーション試験番号	測定施設	動物種	適応試験番号
[redacted]	[redacted]	Rat plasma	[redacted]

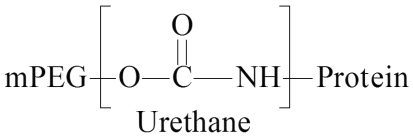
2.6.4.3　吸収

EZN-2279 は PEG で修飾した大腸菌由来遺伝子組換えウシアデノシンデアミナーゼ類縁体（SC-PEG-rADA）であり、米国で承認済みの ADAGEN®とは PEG 化の架橋構造と ADA 酵素の由来の二点が異なる。非臨床試験では被験物質として EZN-2279 及び ADAGEN®（SS-PEG-bADA）に加え、必要に応じて SS-PEG-rADA（架橋構造は ADAGEN®と同じ rADA 製剤）を用いて、比較検討した。各被験物質の違いを図 2.6.4-1 及び表 2.6.4-5 に示す。

表 2.6.4-5　EZN-2279（SC-PEG-rADA）、ADAGEN®（SS-PEG-bADA）又は SS-PEG-rADA の相違点

化合物	ADA の由来	リンカー（架橋構造）
EZN-2279	遺伝子組換え体	SC（succinimidyl carbamate）
ADAGEN®	ウシ腸	SS（succinimidyl succinate）
SS-PEG-rADA	遺伝子組換え体	SS（succinimidyl succinate）

SC-PEG-rADAの構造



SS-PEG-bADAの構造

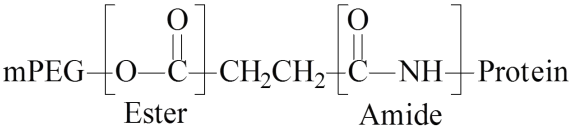


図 2.6.4-1　SC リンカーと SS リンカーの架橋構造の違い
mPEG: monomethoxy PEG

2.6.4.3.1　ラットにおける血中濃度

2.6.4.3.1.1　ラット単回静脈内投与時の血漿中濃度［[redacted]］

SD 系雌性ラットに EZN-2279（SC-PEG-rADA）又は ADAGEN®（SS-PEG-bADA）を 126 U/kg の用量で単回静脈内投与し、所定の時点で採血し、血漿を調製し、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果から 2-コンパートメントモデル解析により PK パラメータを算出した。

雌性ラットに EZN-2279 を単回静脈内投与したとき、全身クリアランス（CL）は 0.93 mL/h/kg、V_{ss} は 0.045 L/kg、$t_{1/2\beta}$ は 38 時間であり、ADAGEN®と比較して消失半減期の平均値の増加傾向が見られ、ADAGEN®と同様の低クリアランス及び低分布容積、並びに長半減期のプロファイルを示した（［図 2.6.4-2］及び［表 2.6.4-6］）。

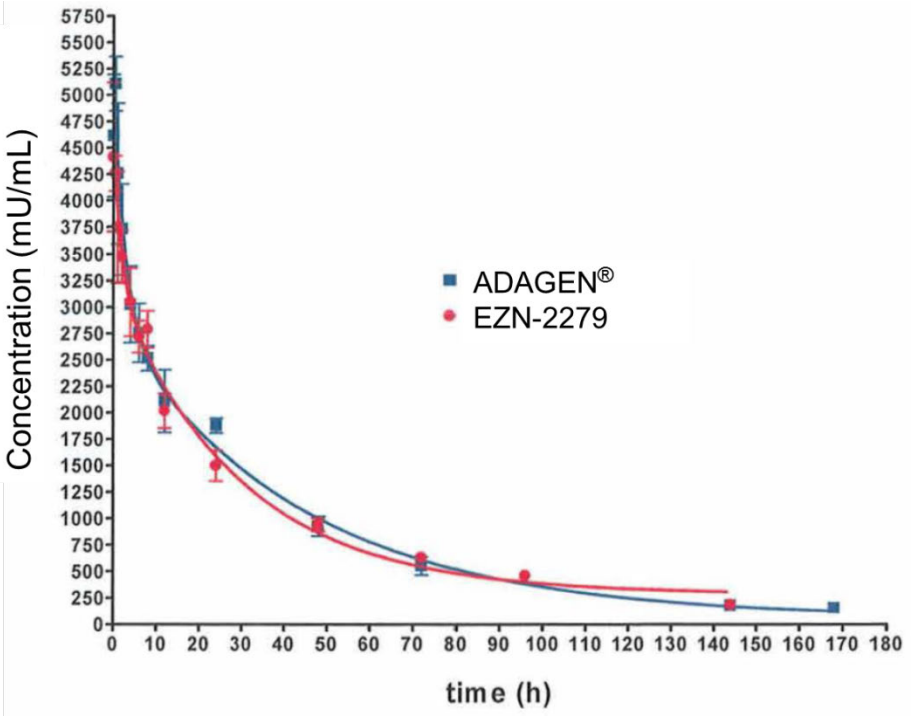


図 2.6.4-2　雌性ラットに EZN-2279 又は ADAGEN®を単回静脈内投与したときの血漿中薬物濃度推移

結果は平均値±標準偏差（n=5）で示した。

表 2.6.4-6　雌性ラットに EZN-2279 又は ADAGEN®を単回静脈内投与したときの PK パラメータ

化合物	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (L/kg)	AUC (mU· h/mL)
EZN-2279	3.7 ± 3.6	37.5 ± 12.1	0.93 ± 0.06	0.045 ± 0.008	136565 ± 9264
ADAGEN®	2.7 ± 2.2	34.4 ± 3.5	0.90 ± 0.07	0.042 ± 0.002	140643 ±10261

結果は平均値±標準偏差（n=5）で示した。

2.6.4.3.1.2　ラット単回筋肉内投与時の血漿中濃度［[redacted]］

SD 系雌雄ラットに EZN-2279（SC-PEG-rADA）、ADAGEN®（SS-PEG-bADA、EZN-2242）、又は SS-PEG-rADA を 150 U/kg の用量で単回筋肉内投与し、所定の時点で採血して血漿を調製し、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果からノンコンパートメント解析により PK パラメータを算出した。

雌雄ラットに EZN-2279 を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ（雄/雌）は、CL/F が平均 1.57/1.48 mL/h/kg、V_z/F は 0.140/0.129 L/kg、$t_{1/2}$ は 61.8/60.3 時間であり、低クリアランス、低分布容積、及び長半減期のプロファイルを示した。また、明確な雌雄差は認められなかった。SS-PEG 結合を持つ ADAGEN®と SS-PEG-rADA の $t_{1/2}$ はそれぞれ約 40 時間を示したのに対し、SC-PEG 結合を持つ EZN-2279 の $t_{1/2}$ は約 60 時間と延長しており、PEG 化の架橋構造による消失速度への影響が示唆された。また、$AUC_{0\text{-}336h}$ の平均値は EZN-2279 と SS-PEG-rADA でそれぞれ ADAGEN®の 1.4 倍及び 1.2～1.4 倍であった（［図 2.6.4-3］、［図 2.6.4- 4］及び［表 2.6.4-7］）。

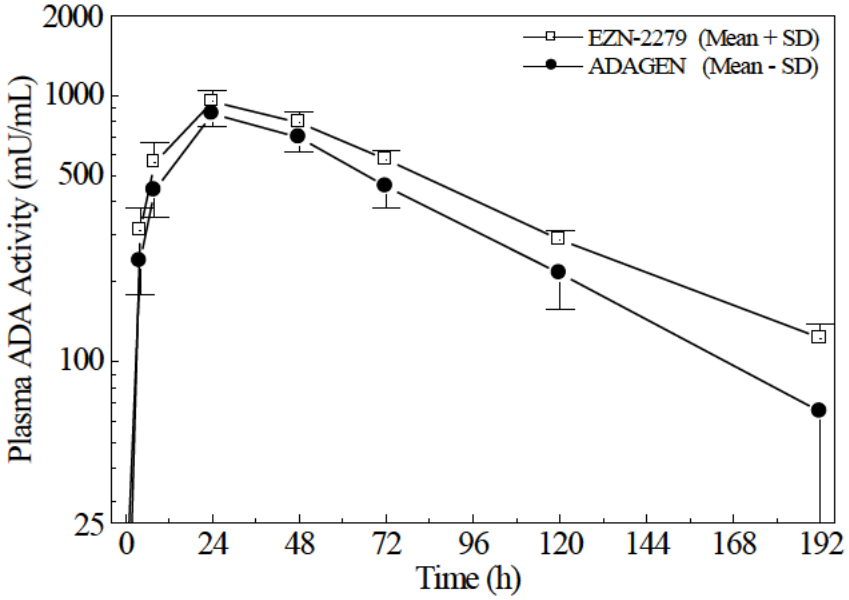


図 2.6.4-3　雌雄ラットに EZN-2279 又は ADAGEN®を単回筋肉内投与したときの血漿中濃度推移

結果は平均値±標準偏差（雌雄合計 n=12）で示した。
定量下限（25 mU/mL）以上を図に示した。

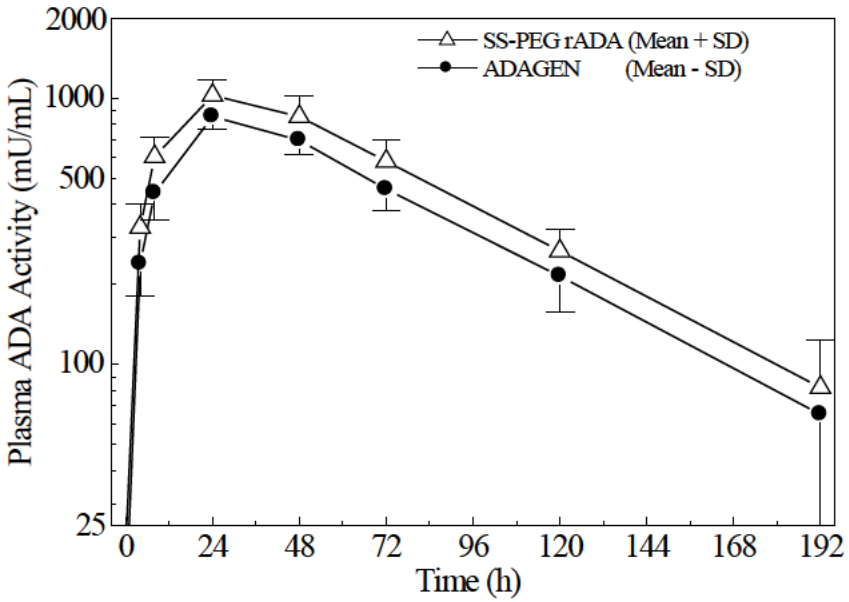


図 2.6.4- 4　雌雄ラットに SS-PEG-rADA 又は ADAGEN®を単回筋肉内投与したときの血漿中濃度推移

結果は平均値±標準偏差（雌雄合計 n=12）で示した。
定量下限（25 mU/mL）以上を図に示した。

表 2.6.4-7　雌雄ラットに EZN-2279、ADAGEN®又は SS-PEG-rADA を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ

化合物	EZN-2279		ADAGEN®		SS-PEG-rADA	
性別	雄	雌	雄	雌	雄	雌
$AUC_{0\text{-}336h}$ (h· mU/mL)	93192 ± 4631	98561 ± 9716	68105 ± 5613	70007 ± 9448	82860 ± 10263	97410 ± 16697
AUC_{inf} (h· mU/mL)	95898 ± 4720	101893 ± 10218	71231 ± 6540	72367 ± 9606	85005 ± 10355	99768 ± 16608
C_{max} (mU/mL)	916±58	983±126	819±51	875±106	944±150	1130±99
t_{max} (h)	24±0	24±0	24±0	24±0	28±9.8	24±0
$t_{1/2}$ (h)	61.8±4.1	60.3±11.1	42.0±3.5	38.6±3.4	41.7±3.7	42.6±2.1
V_z/F (mL/kg)	140±10	129±21	128±7	117±18	108±16	95±20
CL/F (mL/h/kg)	1.57±0.08	1.48±0.15	2.12±0.19	2.10±0.29	1.79±0.23	1.54±0.26
$MRT_{0\text{-}336h}$ (h)	84.1±2.8	79.5±5.7	63.9±1.6	60.5±3.9	65.6±5.2	66.6±3.5
MRT (h)	93.7±4.2	89.5±8.3	72.4±3.2	66.9±3.8	71.4±4.7	72.2±2.0

2.6.4.3.1.3　ラット単回筋肉内投与時の血漿中濃度［[redacted]］

SD 系雌雄ラットに EZN-2279 又は ADAGEN®を 30 及び 150 U/kg の用量で単回筋肉内投与し、所定の時点で採血して血漿を調製後、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果からノンコンパートメントモデル解析により解析した。

雌雄ラットに EZN-2279 を単回筋肉内投与したとき、血漿中濃度は 22～24 時間で C_{max} に達した。$t_{1/2}$ は 49～61 時間であり、CL/F は 1.2～1.4 mL/h/kg であった。C_{max} 及び AUC_{inf} はいずれも用量に応じて増加した。曝露量は雌雄で大きな差は認められなかった（［図 2.6.4-5］及び［表 2.6.4-8］）。

雌雄ラットに ADAGEN®を単回筋肉内投与したとき、血漿中濃度は 19～24 時間で C_{max} に達した。$t_{1/2}$ は 36～50 時間であった。C_{max} 及び AUC_{inf} はいずれも用量に応じて増加した。曝露量は雌雄で大きな差は認められなかった（［図 2.6.4-6］及び［表 2.6.4-9］）。

EZN-2279 の AUC_{inf} 及び $t_{1/2}$ の平均値は ADAGEN®と比較してそれぞれ 1.3～1.5 倍及び 1.1～1.5 倍高い値を示した。

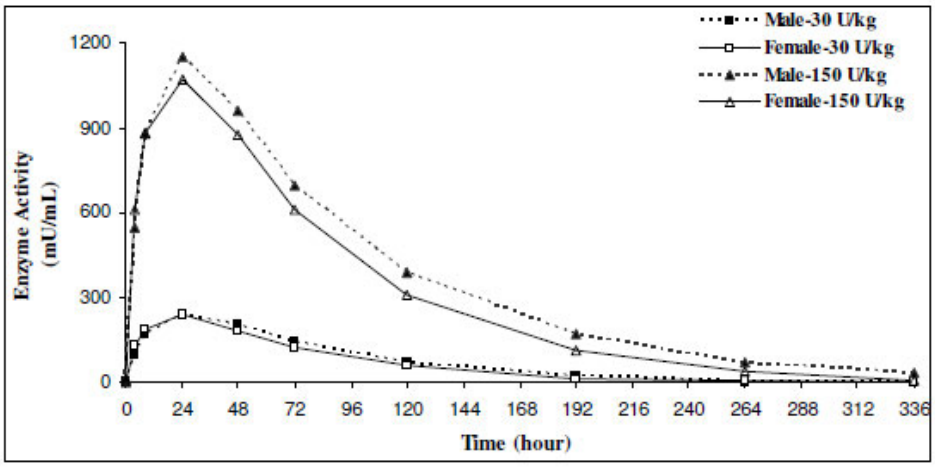


図 2.6.4-5　雌雄ラットに EZN-2279 を単回筋肉内投与したときの血漿中濃度推移
結果は平均値（n=9～10）で示した。

表 2.6.4-8　雌雄ラットに EZN-2279 を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ

性別	雄		雌	
投与経路	筋肉内		筋肉内	
投与量 (U/kg)	30[a)]	150	30	150
C_{max} (mU/mL)	237 ± 33.8	1150 ± 186	238 ± 32.7	1070 ± 119
t_{max} (h)	24.0 ± 0.00	24.0 ± 0.00	24.0 ± 0.00	22.4 ± 5.06
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU･h/mL)	22700 ± 3830	124000 ± 15300	20400 ± 3620	105000 ± 14900
AUC_{inf} (mU･h/mL)	24400 ± 3960	127000 ± 16300	22000 ± 3460	108000 ± 13100
$t_{1/2}$ (h)	53.0 ± 5.98	61.0 ± 12.0	49.4 ± 8.45	51.3 ± 4.18
CL/F (mL/h/kg)	1.25 ± 0.174	1.20 ± 0.170	1.39 ± 0.204	1.41 ± 0.166

結果は平均値±標準偏差（n=10）で示した。
a）n=9 で算出した。

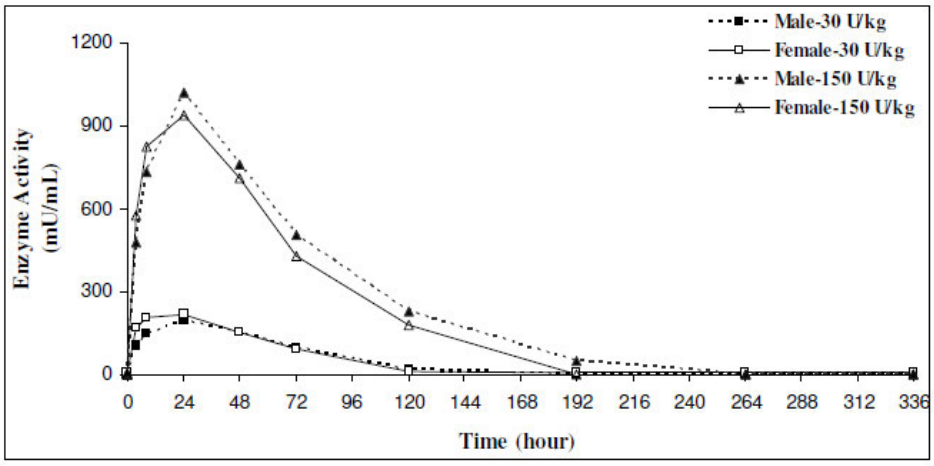


図 2.6.4-6　雌雄ラットに ADAGEN®を単回筋肉内投与したときの血漿中濃度推移
結果は平均値（n=9～10）で示した。

表 2.6.4-9　雌雄ラットに ADAGEN®を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ

性別	雄		雌	
投与経路	筋肉内		筋肉内	
投与量 (U/kg)	30	150	30[a)]	150[a)]
C_{max} (mU/mL)	194 ± 28.9	1020 ± 119	214 ± 46.4	951 ± 182
t_{max} (h)	22.4 ± 5.06	24.0 ± 0.00	18.7 ± 8.00	18.7 ± 8.00
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU･h/mL)	14200 ± 3850	83200 ± 10400	12900 ± 2570	72300 ± 13900
AUC_{inf} (mU･h/mL)	18200 ± 4350	85600 ± 9950	15900 ± 2600	75400 ± 14200
$t_{1/2}$ (h)	50.4 ± 13.1	40.6 ± 3.14	36.1 ± 3.58	36.7 ± 2.47
CL/F (mL/h/kg)	1.75 ± 0.460	1.77 ± 0.209	1.95 ± 0.387	2.04 ± 0.346

結果は平均値±標準偏差（n=10）で示した。
a) n=9 で算出した。

2.6.4.3.1.4　ラット 4 週間反復筋肉内投与時の血漿中濃度（トキシコキネティクス）

[redacted]

SD 系雌雄ラットに EZN-2279 を 0（コントロール群）、30、100 あるいは 300 U/kg の投与量で 4 週間反復筋肉内投与（3 日又は 4 日おきに計 9 回）した。コントロール群を除くサテライト動物について、初回投与日（Day 1）及び最終投与日（Day 29）に所定の時点で採血して血漿を調製後、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果から、ノンコンパートメントモデル解析により PK パラメータを算出した。

雌雄ラットに EZN-2279 を 4 週間反復筋肉内投与したとき、投与初日の血漿中濃度は 24 時間で C_{max} に達し、$t_{1/2}$ は 43～98 時間であった。投与初日の C_{max} 及び AUC_{inf} はいずれも投与量に応じて増加した。雌雄ラットの 300 U/kg 群で投与初日と比較して投与最終日において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（［図 2.6.4-7］及び［表 2.6.4-10］）。

抗体産生については、EZN-2279 を投与された群で投与最終日又は回復期間において雌 1 例を除くすべての個体で抗 EZN-2279 抗体が陽性であった。また、ADA に対する中和が 30 U/kg 群の雄 1 例、及び 300 U/kg 回復群の雌 1 例で確認された（［表 2.6.4-11］）。

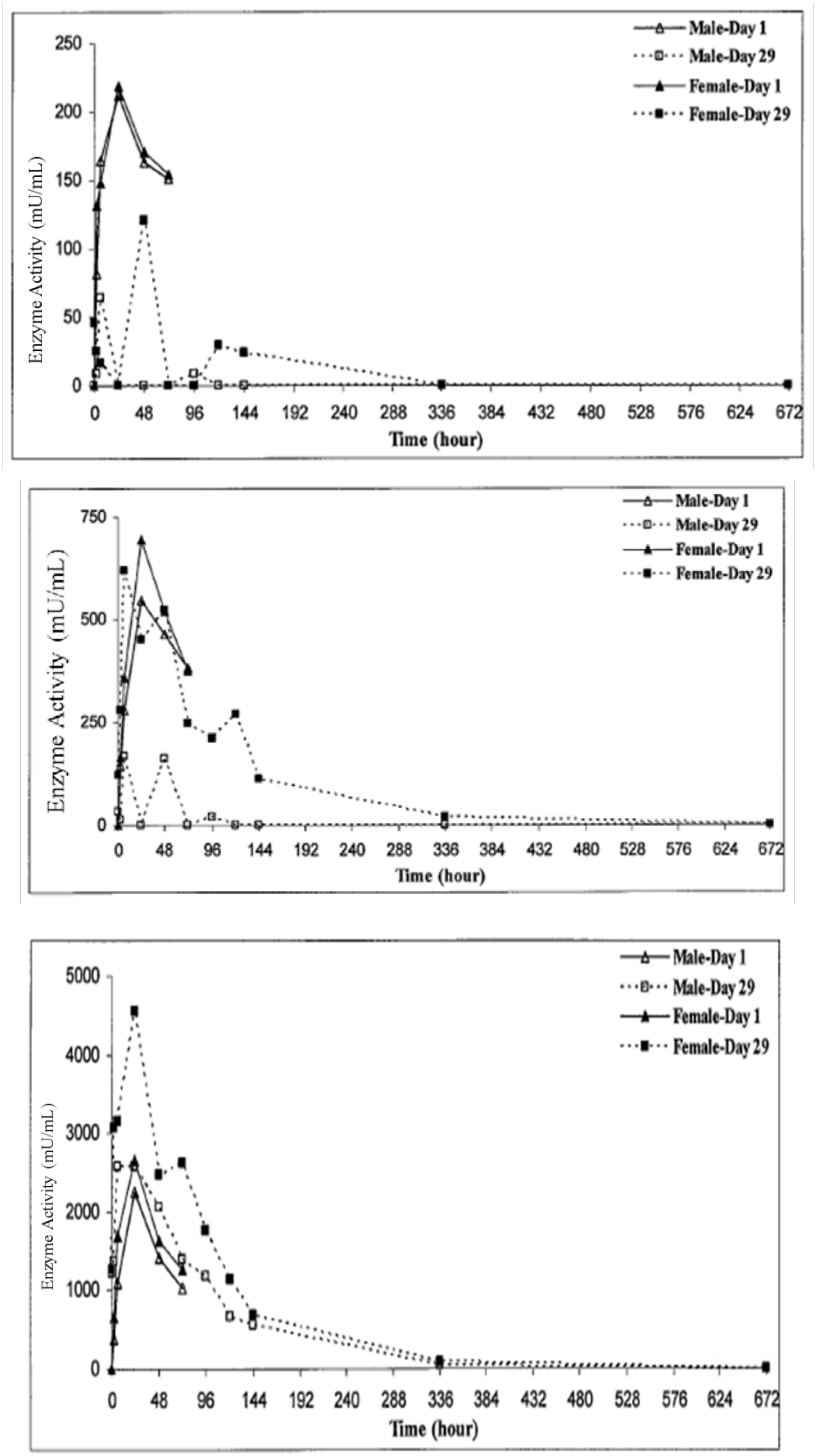


図 2.6.4-7　雌雄ラットに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの血漿中濃度推移

上図：30 U/kg、中図：100 U/kg、下図：300 U/kg
結果は平均値（各採血時点 n=3）で示した。

表 2.6.4-10　雌雄ラットに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの PK パラメータ

性別	Day	投与量 (U/kg)	C_{max} (mU/mL)	t_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU･h/mL)	AUC_{inf} (mU･h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	CL/F (mL/h/kg)
雄	1	30	212	24	12200	33600	98.1	0.893
		100	545	24	30600	81700	92.9	1.22
		300	2260	24	107000	171000	42.9	1.75
	29	30[a)]	64.6	6	737	NC[b)]	NC[b)]	NC[b)]
		100[a)]	167	6	5790	6780	28.0	14.8
		300	2580	6	154000	284000	53.6	1.05
雌	1	30	219	24	12600	33600	94.5	0.894
		100	694	24	36000	65000	53.8	1.54
		300	2670	24	131000	212000	44.3	1.42
	29	30[a)]	121	48	3210	5530	39.2	5.43
		100	619	6	32700	62900	65.7	1.59
		300	4560	24	231000	425000	63.2	0.706

結果は平均値（各採血時点 n=3）で示した。
a)　定量下限未満となる時点が多く見られた。
b)　NC: Not Calculated

表 2.6.4-11　雌雄ラットに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの抗体測定結果

時期	投与量 (U/kg)	抗 EZN-2279 抗体生成例数		雌雄合計例数 抗体生成/全測定例数
		雄	雌	
投与最終日（Day29）	30	12[a),b)]	12[a)]	24/24
	100	11[a),c)]	11[e)]	22/22
	300	12[d)]	12[d)]	24/24
回復期	30	5	5	10/10
	100	5	5	10/10
	300	5	4[b)]	9/10

a）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。
b）1 例で ADA 活性の中和が確認された。
c）投与された 12 例中 1 例は NS（No sample available for analysis）であった。
d）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。
e）投与された 12 例中 1 例は NA（Not applicable）であった。

2.6.4.3.1.5　ラット 4 週間反復筋肉内投与時の血漿中濃度（トキシコキネティクス）

[■■■

雌雄ラットにおける Day 1 及び Day 25 投与後の EZN-2279 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ は両群とも同程度であった。また、両群の Day 25 の $t_{1/2}$ は 53.7～61.1 時間の範囲であった。したがって、不純物 A 含有の有無による PK パラメータへの影響は認められなかった（[図 2.6.4-8]及び[表 2.6.4-12]）。

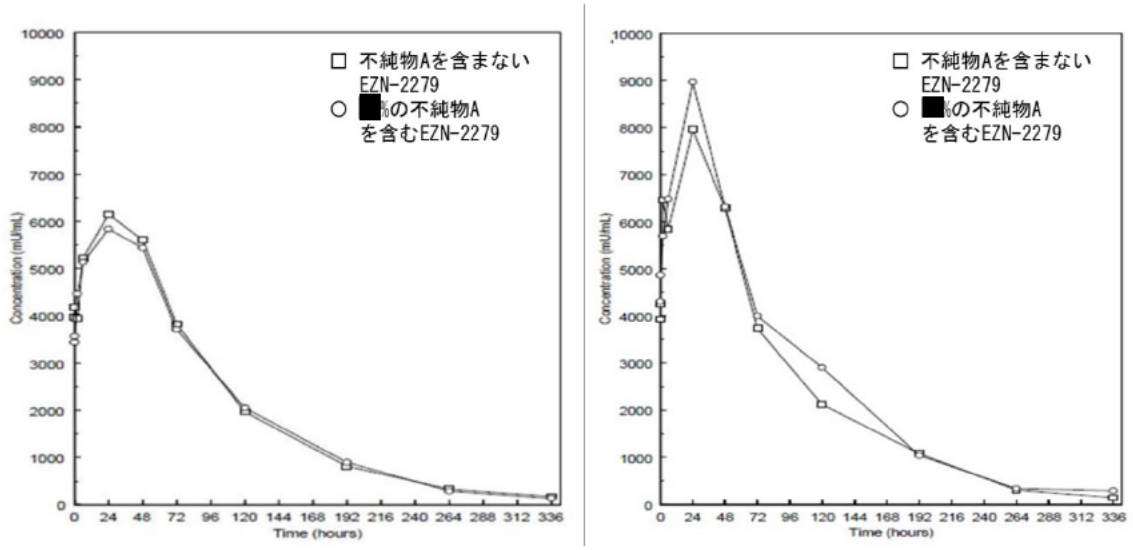


図 2.6.4-8　雌雄ラットに EZN-2279 を週 2 回 4 週間反復投与したときの Day 25 の平均血漿中 EZN-2279 濃度推移

左図：雄、右図：雌
結果は 9 匹（各採血時点 n=3）の平均値で示した。

表 2.6.4-12　雌雄ラットに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの PK パラメータ

投与量 500 U/kg	C_{max} (mU/mL)				$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU·h/mL)				$t_{1/2}$ (h)[a)]	
	Day 1		Day 25		Day 1		Day 25		Day 25	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
EZN-2279（Lot 5046）	2540	4130	6150	7960	139000	186000	383000	451000	57.5	53.7
■%不純物 A を含む EZN-2279（Lot 1097）	3660	4600	5840	8970	184000	224000	371000	481000	54.3	61.1

a)　Day1 の $t_{1/2}$ は算出せず。
PK パラメータは各採血時点 n=3 の平均血漿中濃度から算出した。

抗体産生については、最初に■■■■■■■■におけるスクリーニング試験を実施した結果、Day 28 に第 2 群で 6/18 例及び第 3 群で 6/18 例が陽性を示し、回復期の終了時では第 2 群で 2/10 例が陽性を示し、第 3 群で 5/10 例が陽性であった。

その後、■■■■にて不純物 A を含まない EZN-2279 と■%の不純物 A を含む EZN-2279 に対する反応性を確認するために測定を行った。確認試験の結果、不純物 A を含まない EZN-2279 特異的な確認試験では、Day 28 に第 2 群で 2/18 例及び第 3 群で 1/18 例が陽性を示し、回復期の終了時では第 2 群で 2/9 例が陽性を示し、第 3 群は陰性（0/10）であった。■%の不純物 A を含む EZN-2279 特異的な確認試験では Day 28 に陽性試料は観察されず、回復期の第 2 群で 1/9 例及び第 3 群で 1/10 例が陽性であった。

これらの結果から、抗体産生の発生頻度は不純物 A を含まない EZN-2279 投与群と不純物 A を含む EZN-2279 投与群とで同程度であった。

2.6.4.3.1.6　ラット胚・胎児発生に関する試験における血漿中濃度（トキシコキネティクス）［[redacted]］

妊娠した SD 系雌ラットに EZN-2279 を 0、100（48）、300（143）、500（238）U/kg/日の投与量で妊娠 7 日（Day of Gestation : DG7）から 3 日に 1 回の間隔で計 4 回反復筋肉内投与した。なお、本試験での投与量は HPLC 法により測定した酵素活性を基に算出したため、従来法の分光学的定量法による酵素活性は括弧内に併記した。初回投与日（DG7）及び最終投与日（DG16）に所定の時点で採血して血漿を調製後、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果から、ノンコンパートメントモデル解析により PK パラメータを算出した。

両評価日において、EZN-2279 を筋肉内投与した全ての妊娠ラットで EZN-2279 の曝露が確認され、$AUC_{0\text{-}72h}$ 及び C_{max} は、DG7 で 100（48）から 500（238）U/kg/日にわたって用量依存的に増加し、DG16 では、$AUC_{0\text{-}72h}$ は用量比よりわずかに大きく（5 倍の用量比に対して 7 倍）増加した。評価日間の曝露に顕著な差はなく、明らかな累積は認められなかった。累積比は、それぞれ 100（48）、300（143）及び 500（238）U/kg/日の投与量でそれぞれ 0.874、1.14 及び 1.25 であった（［図 2.6.4-9］及び［表 2.6.4-13］）。

抗体産生について、投与期間中に抗薬物抗体及び抗 PEG 抗体陽性の妊娠ラットは存在せず、TK 曝露に対する抗薬物抗体の影響はないと考えられた。

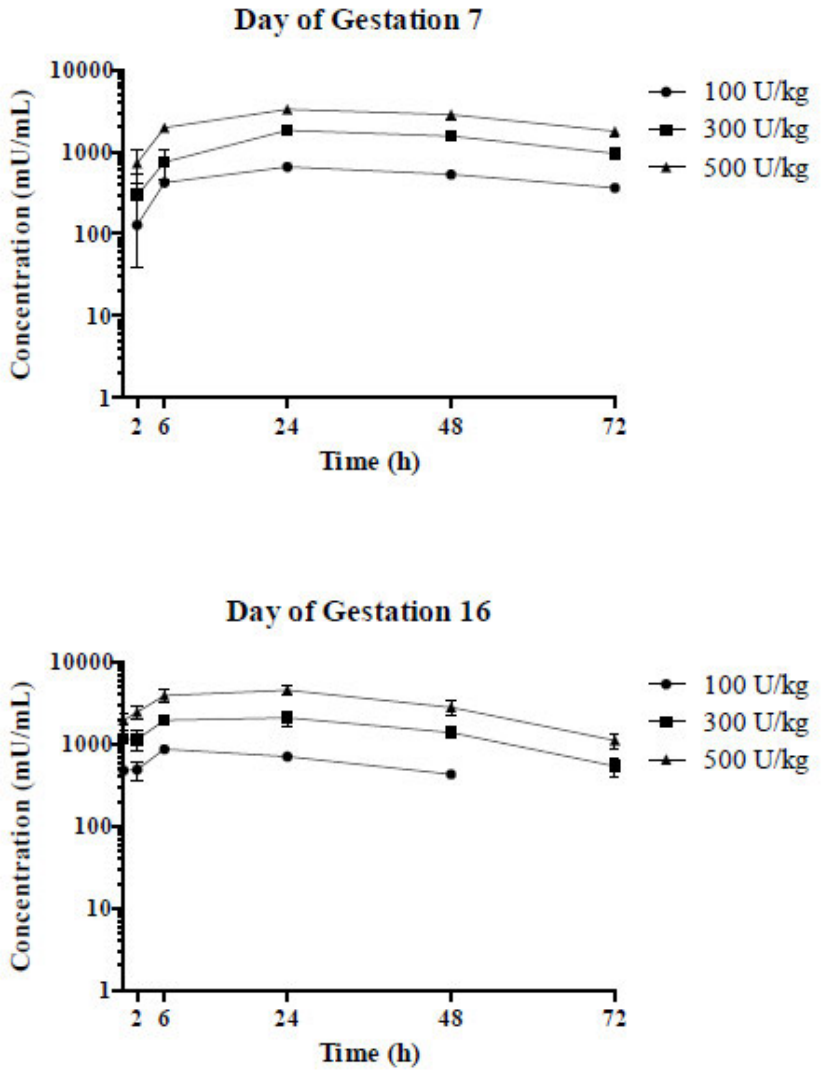


図 2.6.4-9　妊娠ラットに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの平均血漿中濃度推移

上図：DG7、下図：DG16（HPLC 法により算出した投与量を示す）
結果は平均値±標準偏差（各採血時点 n=3）で示した。

表 2.6.4-13　妊娠ラットに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの血漿中平均 PK パラメータ

Dose (U/kg)	Day of Gestation	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU· h/mL)	$AUC_{0\text{-}72h}$/D	C_{max} (mU/mL)	C_{max}/D	t_{max} (h)	蓄積率
100 (48)	DG7	35900	359	656	6.56	24	NA
	DG16	31400[a)]	314[a)]	867	8.67	6	0.874
300 (143)	DG7	96300	321	1830	6.09	24	NA
	DG16	110000	367	2100	7.01	24	1.14
500 (238)	DG7	183000	366	3310	6.61	24	NA
	DG16	229000	457	4540	9.08	24	1.25

NA= not applicable, D=Dose

a)　DG16 の 100 U/kg 投与群では 72 時間が定量下限未満であったため、AUC は 48 時間までで算出した。

2.6.4.3.2　イヌにおける血中濃度

2.6.4.3.2.1　イヌ単回筋肉内投与時の血漿中濃度［[redacted]］

雌雄イヌ（ビーグル）に EZN-2279 又は ADAGEN®を 30 あるいは 150 U/kg の投与量で単回筋肉内投与後、所定の時点で採血して血漿を調製後、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果から、ノンコンパートメントモデル解析により PK パラメータを算出した。

雌雄イヌに EZN-2279 を単回筋肉内投与したとき、血漿中濃度は 18 時間で C_{max} に達した。$t_{1/2}$ は 128～154 時間であり、CL/F は 0.47～0.51 mL/h/kg であった。C_{max} 及び AUC_{inf} はいずれも投与量に応じて増加した。曝露の雌雄差は認められなかった（［図 2.6.4-10］及び［表 2.6.4-14］）。

雌雄イヌに ADAGEN®を単回筋肉内投与したとき、血漿中濃度は 11～21 時間で C_{max} に達した。$t_{1/2}$ は 68～79 時間であった。C_{max} 及び AUC_{inf} はいずれも投与量に応じて増加した。曝露の雌雄差は認められなかった（［図 2.6.4-11］及び［表 2.6.4-15］）。

EZN-2279 の AUC_{inf} 及び $t_{1/2}$ は ADAGEN®と比較して 1.5～1.6 倍及び 1.7～2.1 倍高い値を示した。

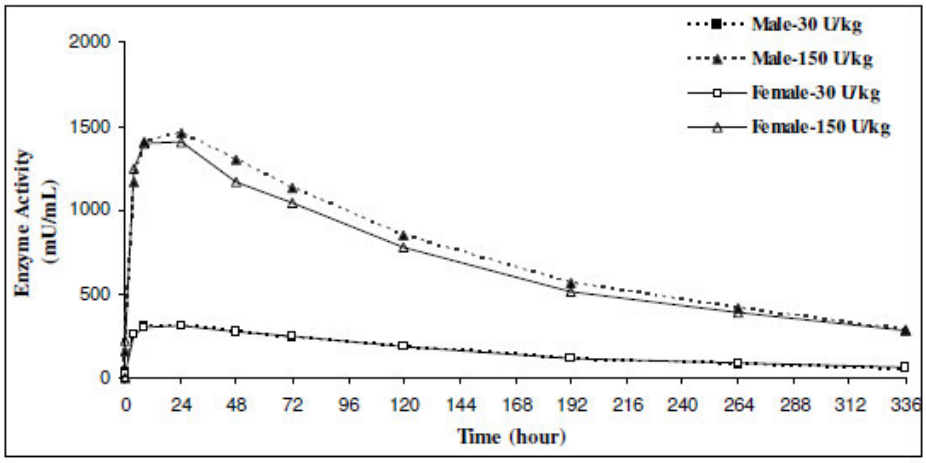


図 2.6.4-10　雌雄イヌに EZN-2279 を単回筋肉内投与したときの血漿中濃度
結果は平均値（n=5）で示した。

表 2.6.4-14　雌雄イヌに EZN-2279 を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ

性別	雄		雌	
投与経路	筋肉内		筋肉内	
投与量 (U/kg)	30	150	30	150
C_{max} (mU/mL)	316 ± 16.6	1480 ± 118	312 ± 23.0	1430 ± 184
t_{max} (h)	17.6 ± 8.76	17.6 ± 8.76	17.6 ± 8.76	17.6 ± 8.76
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU･h/mL)	52500 ± 1690	252000 ± 18900	53900 ± 4480	235000 ± 27900
AUC_{inf} (mU･h/mL)	62200 ± 3080	309000 ± 23800	65400 ± 8180	298000 ± 38300
$t_{1/2}$ (h)	128 ± 20.0	138 ± 13.3	134 ± 20.4	154 ± 15.2
CL/F (mL/h/kg)	0.483 ± 0.0224	0.487 ± 0.0366	0.465 ± 0.0599	0.510 ± 0.0617

結果は平均値±標準偏差（n=5）で示した。

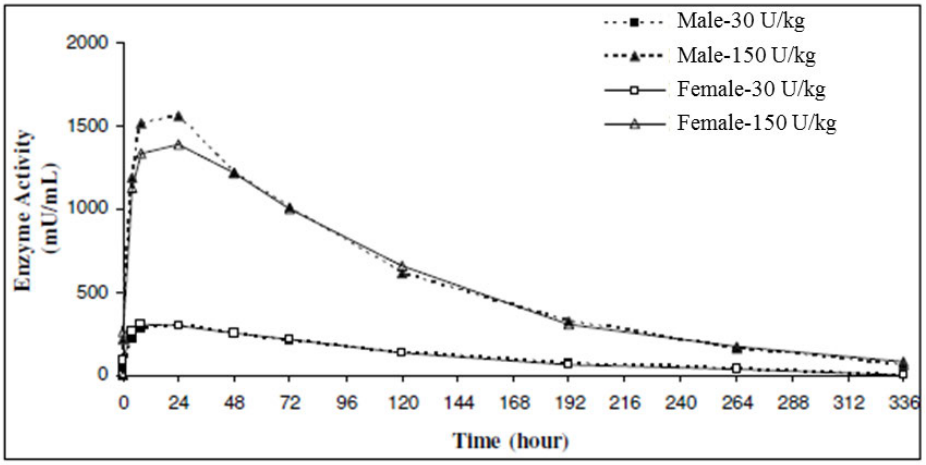


図 2.6.4-11　雌雄イヌに ADAGEN®を単回筋肉内投与したときの血漿中濃度

結果は平均値（n=5）で示した。

表 2.6.4-15　雌雄イヌに ADAGEN®を単回筋肉内投与したときの PK パラメータ

性別	雄		雌	
投与経路	筋肉内		筋肉内	
投与量 (U/kg)	30	150	30	150
C_{max} (mU/mL)	300 ± 27.4	1620 ± 108	309 ± 24.6	1460 ± 191
t_{max} (h)	20.8 ± 7.16	17.6 ± 8.76	11.2 ± 7.16	17.6 ± 8.76
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU･h/mL)	38600 ± 3230	191000 ± 6940	39500 ± 2820	188000 ± 9530
AUC_{inf} (mU･h/mL)	41300 ± 3570	197000 ± 8530	42600 ± 2770	196000 ± 9860
$t_{1/2}$ (h)	77.3 ± 1.92	68.3 ± 4.48	79.0 ± 4.95	73.9 ± 2.84
CL/F (mL/h/kg)	0.730 ± 0.0645	0.760 ± 0.0345	0.707 ± 0.0435	0.766 ± 0.0383

結果は平均値±標準偏差（n=5）で示した。

2.6.4.3.2.2　イヌ反復筋肉内投与時の血漿中濃度（トキシコキネティクス）[■■■■■■■■■■]

雌雄イヌ（ビーグル）に EZN-2279 を 0（コントロール群）、30、100 あるいは 300 U/kg の投与量で 4 週間反復筋肉内投与（3 日又は 4 日おきに計 9 回）した。初回投与日（Day 1）及び最終投与日（Day 29）に、所定の時点で採血して血漿を調製後、バイオアッセイ法（ADA 活性）により血漿中濃度を測定した。得られた結果から、ノンコンパートメントモデル解析により PK パラメータを算出した。

雌雄イヌに EZN-2279 を 4 週間反復筋肉内投与したとき、投与初日の血漿中濃度は 5～38 時間で C_{max} に達し、$t_{1/2}$ は 113～227 時間であった。曝露の雌雄差は認められなかった。投与初日の C_{max} 及び AUC_{inf} はいずれも投与量に応じて増加した。投与最終日の血中曝露について、30 U/kg 群の雄 1 例及び 100 U/kg 群の雌 1 例では投与初日に比較して著しく低下したが、これらの 2 例を除いたすべての個体では投与初日に比較して高い曝露が認められた（[図 2.6.4-12]及び[表 2.6.4-16]）。

雌雄イヌの抗体産生については、投与最終日において 30 及び 100 U/kg 群でそれぞれ 6 例中 3 例、300 U/kg 群の 6 例中 6 例で抗 EZN-2279 抗体陽性であった。また、回復期間において 100 及び 300 U/kg 群で 4 例中 2 例が抗 EZN-2279 抗体陽性であった。ADA 活性の中和が 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）で確認された（[表 2.6.4-17]）。

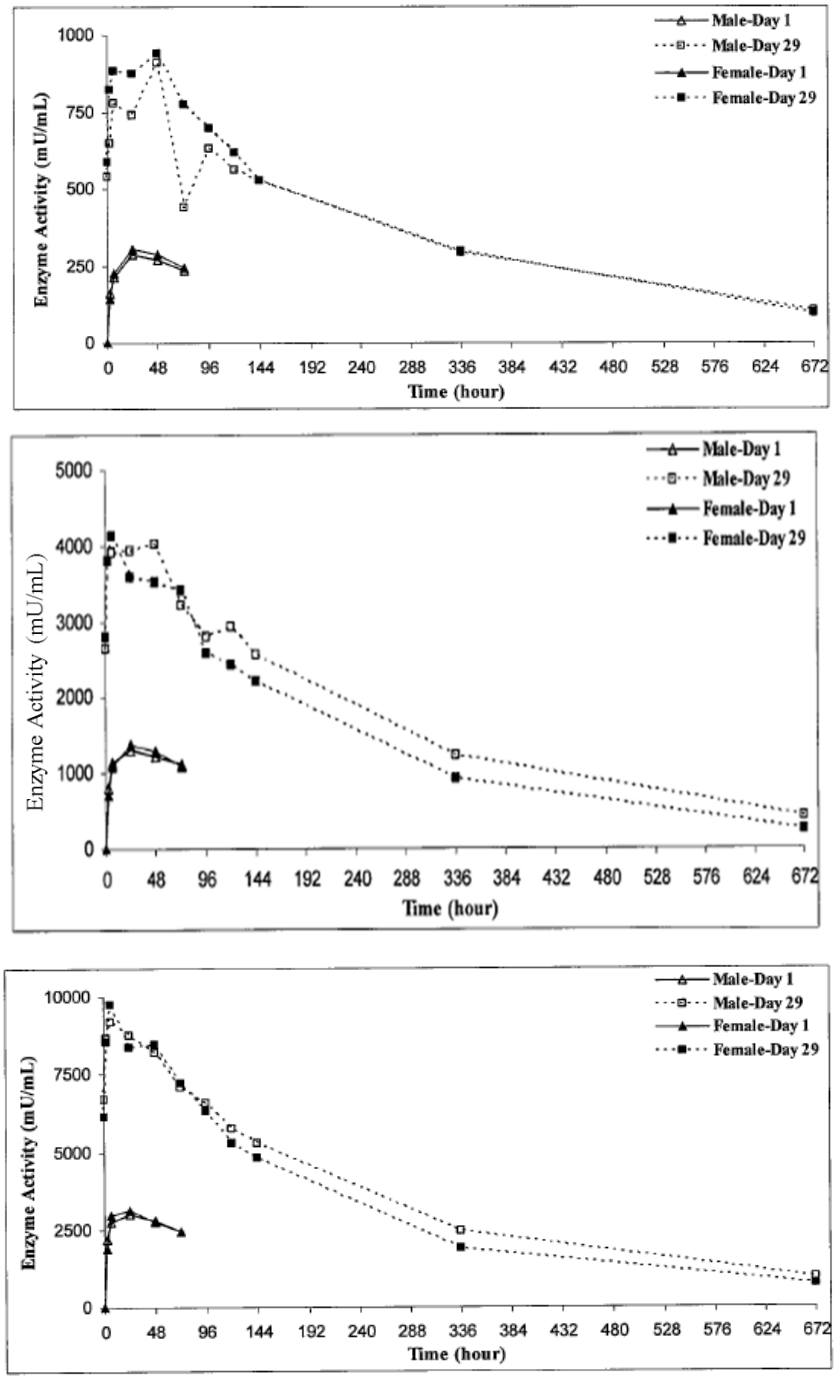


図 2.6.4-12　雌雄イヌに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの血漿中濃度

上図：30 U/kg、中図：100 U/kg、下図：300 U/kg
結果は平均値（n=4～5）で示した。

表 2.6.4-16　雌雄イヌに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの PK パラメータ

性別	Day	投与量 (U/kg)	C_{max} (mU/mL)	t_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}72h}$[a)] (mU･h/mL)	AUC_{inf} (mU･h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	CL/F (mL/h/kg)
雄	1	30	295	38.4	18100	57900	113	0.520
		100	1330	30.0	85500	336000	167	0.318
		300	3180	19.6	195000	815000	173	0.400
	29	30	808	14.4	58300	278000	227	0.109
		100	4140	20.8	283000	1040000	170	0.107
		300	9210	9.60	589000	2620000	207	0.116
雌	1	30	309	28.8	19100	60800	120	0.501
		100	1390	28.8	86900	303000	138	0.344
		300	3150	20.4	200000	717000	144	0.444
	29	30	913	12.4	65500	286000	209	0.105
		100[b)]	4160	5.00	262000	742000	122	0.155
		300	9720	6.00	597000	2280000	174	0.133

結果は平均値（n=5）で示した。
a)　Day29 については n=2 で算出した。
b)　1 例は投与後 2h のみしか定量値が得られなかったため、平均値の算出から除外した。

表 2.6.4-17　雌雄イヌに EZN-2279 を反復筋肉内投与したときの抗体測定結果

時期	投与量 (U/kg)	抗 EZN-2279 抗体生成例数		雌雄合計例数 抗体生成/全測定例数
		雄	雌	
投与最終日（Day29）	30	1[a)]	2	3/6
	100	3	0	3/6
	300	3	3	6/6
回復期	30	0	0	0/4
	100	1	1[a),b)]	2/4
	300	0	2	2/4

a)　当該動物において投与初日と比較して投与最終日で曝露は著しく低下した。
b)　当該動物において ADA 活性の中和が確認された。

2.6.4.4　分布

雌性ラットに EZN-2279 を単回静脈内投与したとき、V_{ss} は 0.045 L/kg と小さく、EZN-2279 はラットにおいてほぼ血中に分布することを示唆した。また、ADAGEN® 100～500 U/kg を ADA 欠損マウスに筋肉内投与したとき、投与 2 日後に血中では検出されたが、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、肺などの組織では検出されなかったとの報告がある [1)]。以上のことから、PEG 化された ADA はほぼ血中に分布し、他組織への移行性は低いと考えた。

慢性 C 型肝炎の小児集団における SC-PEG の使用例はペグイントロン [2),3)] で既に確認されており、EZN-2279 は毒性試験において、臓器特異的な毒性所見が認められなかったことから、薬物動態の分布特性を関連付けた考察は必要ないと考えた。以上のことから、分布試験は必要ないと考え、実施しなかった。

2.6.4.5　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 [4]、本剤の代謝に関する検討は実施していない。

2.6.4.6　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。

2.6.4.7　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。蛋白はチトクローム P450（CYP）に依存しない生化学的な経路により小さなペプチドやアミノ酸に分解されることから、蛋白である本剤が CYP などの薬物代謝酵素で代謝される薬物との顕著な相互作用は起こさないと考えられる。また、類薬である ADAGEN®注射剤の添付文書 [5]には既知の薬物相互作用は報告されていない。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 [6),7)] やネララビン [8)] を代謝する可能性や、ADA に対する酵素阻害剤であるペントスタチン [9)]により本剤の酵素活性が減弱する可能性が考えられる。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

実施しなかった。

2.6.4.9　考察及び結論

ADAGEN®の安全性及び薬物動態プロファイルは既に確立されているので、EZN-2279 の PK 試験は、吸収についてのみ、適宜 ADAGEN®との比較を交えながら検討した。評価にはラット及びイヌを用い、PK 試験並びに単回及び反復投与毒性試験（TK）を実施した。EZN-2279 及び ADAGEN®の薬物動態は血漿中 ADA 活性を測定することにより評価した。

ラット単回投与において血漿中 ADA 活性に対するリンカー及び ADA の由来による違いを評価した。EZN-2279 を 126 U/kg 単回静脈内投与したときの CL は 0.93 mL/h/kg、V_{ss} は 0.045 L/kg、$t_{1/2\beta}$ は 38 時間と ADAGEN®と同様のプロファイルを示した。次に EZN-2279 を 150 U/kg 単回筋肉内投与したときの PK パラメータ（雄/雌）は、CL/F が 1.57/1.48 mL/h/kg、V_z/F が 0.140/0.129 L/kg、$t_{1/2}$ が 61.8/60.3 時間であり、ADAGEN®の $t_{1/2}$（約 40 時間）に比較して長半減期かつ低クリアランスの PK プロファイルを示した。

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 は用量依存的に増加し、ラット及びイヌにおける EZN-2279 の $t_{1/2}$ は 49～61 時間及び 128～154 時間であり、ADAGEN®に対してラット及びイヌでそれぞれ 1.1～1.5 倍及び 1.7～2.1 倍延長した。

EZN-2279 が SS-PEG 製剤の ADAGEN®や SS-PEG-rADA より長い半減期を示したことより、EZN-2279 の半減期の延長は SC リンカーであることの方が遺伝子組換え体であることよりも寄与が大きいと考えられた。筋肉内投与における EZN-2279 の V_z/F は静脈内投与から推察された分布容積より大きく、一般的な全血漿容量より大きかった。EZN-2279 の分子量は約 113,000 であることから、筋肉内投与時の吸収過程ではリンパ管を経由して循環血に移行することも一因と推察された [10)]。

ラット及びイヌの 4 週間反復投与毒性試験の TK について評価した。ラット及びイヌに 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 300 U/kg 群、並びにイヌの 30、100 及び 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（ADA 活性）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、イヌでは 30 U/kg 群の雄 1 例、100 U/kg 群の雌 1 例において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、ラット及びイヌに反復投与したとき、投与最終日又は回復期間において多くの個体で抗 EZN-2279 抗体が陽性であった。ラットにおいて ADA 活性の中和が 30 U/kg 群の雄 1 例及び 300 U/kg 回復群の雌 1 例で確認された。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 の中和が確認され、中和抗体産生による曝露低下が示唆された。

製剤評価のため、不純物 A を含まない 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 を評価した。Day 1 及び Day 25 投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ は EZN-2279 中不純物 A の有無に関わらず、同程度であったことから、不純物 A 含量の違いが EZN-2279 の PK パラメータに影響しないことを確認した。また、不純物 A 含有の有無に関わらず抗体産生の発生頻度は同程度であった。

妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験において、EZN-2279 を 100（48）から 500（238）U/kg/日（括弧内は分光学的定量法による酵素活性に換算）の範囲で筋肉内に投与したとき、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ は用量に応じて増加した。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、投与期間中には抗 EZN-2279 抗体及び抗 PEG 抗体陽性は認められなかった。

2.6.4.10　参考文献

1）　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

2）　PegIntron® (Peginterferon alfa-2b) Injection Package Insert. 2017　4.3-3

3）　Susan Cannon-Carlson·David Wylie, Doug Kline, Doug Inloes. CMC and Regulatory Considerations for Polyethylene Glycol-Modified Protein Therapeutics. Drug Delivery System. 2005; 20(6): 620-634.　4.3-4

4）　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; 35(1): 9-16.　4.3-5

5）　ADAGEN® (pegademase bovine) Injection Package Insert.　4.3-2

6）　アラセナ−A 軟膏 3%／アラセナ−A クリーム 3%:　添付文書　2016 年 11 月改訂（第 9 版）　4.3-9

7）　アラセナ−A 点滴静注用 300 mg:　添付文書　2017 年 1 月改訂（第 8 版）　4.3-10

8）　アラノンジー静注用 250 mg:　添付文書　2016 年 4 月改訂（第 5 版）　4.3-11

9）　コホリン静注用 7.5 mg:　添付文書　2017 年 4 月改訂（第 13 版）　4.3-12

10）　村西昌三. 薬物のリンパ指向性と癌化学療法における応用. YAKUGAKU ZASSHI, 1980; 100(7): 687-698.　4.3-13

2.6.4.11　付録

該当事項なし。

レブコビ筋注 2.4mg

製造販売承認申請

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.5　薬物動態試験概要表

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.5　薬物動態試験概要表 3
2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表 3
2.6.5.2　分析法及びバリデーション試験（血漿中 ADA 活性） 4
2.6.5.3　分析法及びバリデーション試験（抗薬物抗体） 5
2.6.5.4　薬物動態試験：吸収 6
2.6.5.4.1　単回投与時の血中濃度：ラット 6
2.6.5.4.2　単回投与時の血中濃度：ラット （つづき） 7
2.6.5.4.3　反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：ラット 8
2.6.5.4.4　反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：ラット（つづき） 9
2.6.5.4.5　ラット胚・胎児発生に関する試験における反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：ラット 10
2.6.5.4.6　単回投与時の血中濃度：イヌ 11
2.6.5.4.7　反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：イヌ 12
2.6.5.5　薬物動態試験：分布 13
2.6.5.6　薬物動態試験：代謝 13
2.6.5.7　薬物動態試験：排泄 13
2.6.5.8　薬物動態試験：その他 13

2.6.5　薬物動態試験概要表

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
吸収					
血中濃度（単回投与）	ラット	静脈内	[redacted]	[redacted]	4.2.2.2-1
血中濃度（単回投与）	ラット	筋肉内	[redacted]	[redacted]	4.2.2.2-2
血中濃度（単回投与）	ラット	筋肉内	[redacted]	[redacted]	4.2.3.1-1
血中濃度（トキシコキネティクス）a)	ラット	筋肉内	[redacted]b)	[redacted]	4.2.3.2-1
血中濃度（トキシコキネティクス）a)	ラット	筋肉内	[redacted]	[redacted]	4.2.3.7.6
血中濃度（トキシコキネティクス）a)	妊娠ラット	筋肉内	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.2
血中濃度（単回投与）	イヌ	筋肉内	[redacted]b)	[redacted]	4.2.3.1-2
血中濃度（トキシコキネティクス）a)	イヌ	筋肉内	[redacted]b)	[redacted]	4.2.3.2-2

a）GLP 適合試験、その他の試験は GLP 非適合試験

b）[redacted]は、2015 年 9 月 21 日付で[redacted]に名称変更した

2.6.5.2 分析法及びバリデーション試験（血漿中 ADA 活性）

試験タイトル	動物種／マトリックス	測定対象	定量法	実施施設	試験番号	記載箇所
ADA 酵素活性測定法（血漿中薬物濃度）						
Validation of an enzyme activity assay for peg-adenosine deaminase (EZN-2242, ADAGEN) in potassium EDTA rat plasma	ラット／血漿	ADAGEN®	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-1
Partial validation of an enzyme activity assay for adenosine deaminase (EZN-2279, PEG-SC-rbADA) in rat EDTA plasma	ラット／血漿	EZN-2279	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-2
Validation of an enzyme activity assay for adenosine deaminase (EZN-2279, PEG-SC-rbADA) in rat lithium heparinized plasma	ラット／血漿	EZN-2279	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-3
Qualification of an enzyme activity assay for PEG-adenosine deaminase (EZN-2242, ADAGEN) in lithium heparinized rat plasma	ラット／血漿	ADAGEN®	吸光光度法	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-4
Qualification of an Enzyme Activity Assay for the Determination of PEG-ADA in Potassium EDTA Rat Plasma	ラット／血漿	EZN-2279, ADAGEN®, SS-PEG-rADA	吸光光度法	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-5
Validation of an Assay for Determination of PEG-Adenosine Deaminase (EZN-2279) Enzyme Activity in Heparinized Rat Plasma	ラット／血漿	EZN-2279	吸光光度法	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-6
Partial validation of an enzyme activity assay for the determination of EZN-2279 (PEG-SC-rADA) in heparinized rat plasma	ラット／血漿	EZN-2279	吸光光度法	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-7
Validation of an enzyme activity assay for adenosine deaminase (EZN-2242, ADAGEN) in potassium EDTA dog plasma	イヌ／血漿	ADAGEN®	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-8
Partial validation of an enzyme activity assay for adenosine deaminase (EZN-2279, PEG-SC-rbADA) in dog EDTA plasma	イヌ／血漿	EZN-2279	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-9
Validation of an enzyme activity assay for adenosine deaminase (EZN-2279, PEG-SC-rbADA) in dog sodium heparinized plasma	イヌ／血漿	EZN-2279	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-10

a) [redacted] は、2015 年 9 月 21 日付で [redacted] に名称変更した

2.6.5.3 分析法及びバリデーション試験（抗薬物抗体関連）

試験タイトル	動物種／マトリックス	測定法	実施施設	試験番号	記載箇所
抗 EZN-2279 抗体測定法					
Validation of an immunoassay method for the qualitative measurement of anti-PEG-SC-rADA antibodies (anti-EZN-2279) in rat lithium heparinized plasma by ELISA	ラット／血漿	ELISA	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-11
Validation of an immunoassay procedure for the detection of anti-EZN-2279 antibodies in heparinized rat plasma	ラット／血漿	ELISA	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-12
Validation of an immunoassay method for the measurement of antibodies to pegylated adenosine deaminase ("EZN-2279") in rat heparinized plasma samples	ラット／血漿	ELISA	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-13
Validation of an immunoassay method for the qualitative measurement of anti-PEG-SC-rADA antibodies (anti-EZN-2279) in dog sodium heparinized plasma by ELISA	イヌ／血漿	ELISA	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-14
中和抗体測定法					
Validation of an enzyme activity method for the detection of neutralizing rat anti-EZN-2279 (PEG-SC-rADA) antibodies in rat lithium heparinized plasma	ラット／血漿	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-15
Validation of an enzymatic activity assay for the detection of neutralizing anti-EZN-2279 antibodies in rat plasma	ラット／血漿	吸光光度法	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-16
Validation of an assay for detection of neutralizing antibodies to PEG-adenosine deaminase (EZN-2279) in rat heparinized plasma	ラット／血漿	吸光光度法	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-17
Validation of an enzyme assay procedure for the detection of neutralizing dog anti-adenosine deaminase antibodies in dog sodium heparinized plasma	イヌ／血漿	吸光光度法	[redacted] a)	[redacted]	4.2.2.1-18
抗 PEG 抗体測定法					
Validation of a method for determination of anti-PEG antibodies in heparinized rat plasma by ELISA Immunoassay	ラット／血漿	ELISA	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-19

a) [redacted] は、2015 年 9 月 21 日付で [redacted] に名称変更した

2.6.5.4 薬物動態試験：吸収

2.6.5.4.1 単回投与時の血中濃度：ラット

被験物質：EZN-2279、ADAGEN®、SS-PEG-rADA
CTDにおける記載箇所：[4.2.2.2-1][4.2.2.2-2]

試験番号	[redacted] a)		[redacted]					
動物種／系統	ラット／SD		ラット／SD					
投与化合物	EZN-2279	ADAGEN®	EZN-2279		ADAGEN®		SS-PEG-rADA b)	
性別（雌／雄）／動物数	雌／5匹	雌／5匹	雄／6匹	雌／6匹	雄／6匹	雌／6匹	雄／6匹	雌／6匹
食餌	摂食		摂食					
投与方法	静脈内投与		筋肉内投与					
投与量（U/kg）	126		150 c)					
試料	EDTA血漿		EDTA血漿					
測定対象	EZN-2279 血漿中濃度	ADAGEN® 血漿中濃度	EZN-2279 血漿中濃度		ADAGEN®血漿中濃度		SS-PEG-rADA 血漿中濃度	
定量法	吸光光度法		吸光光度法					
薬物動態パラメータ（平均値）			薬物動態パラメータ（平均値） d)					
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU•h/mL)	—	—	93192	98561	68105	70007	82860	97410
AUC (mU•h/mL)	136565	140643	95898	101893	71231	72367	85005	99768
C_{max} (mU/mL)	4521	5094	916	983	819	875	944	1130
t_{max} (h)	—	—	24	24	24	24	28	24
$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2\,\alpha}$:3.7, $t_{1/2\,\beta}$:38	$t_{1/2\,\alpha}$:2.7, $t_{1/2\,\beta}$:34	61.8	60.3	42.0	38.6	41.7	42.6
分布容積(L/kg)	0.045	0.042	0.140	0.129	0.128	0.117	0.108	0.095
クリアランス(mL/h/kg)	0.93	0.90	1.57	1.48	2.12	2.10	1.79	1.54
n	5	5	6	6	5 e)	6	6	5 f)

a）試験報告書における SC-rbADA-cys 75-Mut が EZN-2279 である。
[redacted]
b）SS-PEG-rADA：スクシンイミジルスクシナートを架橋剤として PEG を結合させた遺伝子組換えウシアデノシンデアミナーゼ類縁体
c）投与媒体：リン酸緩衝生理食塩水
d）筋肉内投与のため見かけの分布容積及び見かけのクリアランスの値を示す。AUC は AUC_{inf} の値を示す。
e）投与前に ADA 活性が観測された雄ラット 1 匹を除く
f）投与前に ADA 活性が観測された雌ラット 1 匹を除く

2.6.5.4.2 単回投与時の血中濃度：ラット （つづき）

被験物質：EZN-2279、ADAGEN®
CTD における記載箇所：[4.2.3.1-1]

試験番号	[redacted]							
動物種／系統	ラット／SD							
投与化合物	EZN-2279				ADAGEN®			
性別（雌／雄）／動物数	雄／10 匹	雌／10 匹	雄／10 匹	雌／10 匹	雄／10 匹	雌／10 匹	雄／10 匹	雌／10 匹
食餌	摂食							
投与溶媒 a)	リン酸緩衝生理食塩水							
投与方法	筋肉内投与							
投与量（U/kg）	30		150		30		150	
試料	EDTA 血漿							
測定対象	EZN-2279 血漿中濃度				ADAGEN®血漿中濃度			
定量法	吸光光度法							
薬物動態パラメータ（平均値）								
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU•h/mL)	22700	20400	124000	105000	14200	12900	83200	72300
$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	24400	22000	127000	108000	18200	15900[d)]	85600	75400
C_{max} (mU/mL)	237	238	1150	1070	194	214	1020	951
t_{max} (h)	24.0	24.0	24.0	22.4	22.4	18.7	24.0	18.7
$t_{1/2}$ (h)	53.0	49.4	61.0	51.3	50.4	36.1[d)]	40.6	36.7
CL/F (mL/h/kg)	1.25	1.39	1.20	1.41	1.75	1.95	1.77	2.04
n	9[b)]	10	10	10	10	9[c)]	10	9[e)]

a）リン酸緩衝生理食塩水：0.85 % 食塩を含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.2～7.4）
b）投与前に ADA 活性が観測された雄ラット 1 匹を除く
c）投与前に ADA 活性が観測された雌ラット 1 匹を除く
d）消失相が算出できなかった雌ラット 1 匹を除く（n=8）
e）血漿中濃度が 1 時点しか検出されなかった雌ラット 1 匹を除く

2.6.5.4.3 反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：ラット

被験物質：EZN-2279
CTD における記載箇所：[4.2.3.2-1]

試験番号		[redacted]					
動物種／系統		ラット／SD					
投与化合物		EZN-2279					
性別（雌／雄）／動物数		雄／12 匹	雌／12 匹	雄／12 匹	雌／12 匹	雄／12 匹	雌／12 匹
用法		3 日又は 4 日おきに計 9 回，4 週間反復筋肉内投与（投与 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 及び 29 日）					
投与媒体		リン酸緩衝生理食塩水					
投与量（U/kg）		30		100		300	
試料／測定対象／定量法		ヘパリン血漿／EZN-2279 血漿中濃度／吸光光度法					
薬物動態パラメータ（各採血時点 n=3 の血漿中濃度の平均値より算出）							
初回投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	12200	12600	30600	36000	107000	131000
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	33600	33600	81700	65000	171000	212000
	C_{max} (mU/mL)	212	219	545	694	2260	2670
	t_{max} (h)	24	24	24	24	24	24
	$t_{1/2}$ (h)	98.1	94.5	92.9	53.8	42.9	44.3
最終投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	737[a)]	3210[a)]	5790[a)]	32700	154000	231000
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	—[b)]	5530	6780	62900	284000	425000
	C_{max} (mU/mL)	64.6	121	167	619	2580	4560
	t_{max} (h)	6	48	6	6	6	24
	$t_{1/2}$ (h)	—[b)]	39.2	28.0	65.7	53.6	63.2
各採血時点の n 数		3	3	3	3	3	3
抗体陽性（中和抗体）	最終投与時	12/12（1/12）	12/12（0/12）	11/11（0/11）	11/11（0/11）	12/12（0/11[c)]）	12/12（0/12）
	最終投与 4 週間後	5/5（0/5）	5/5（0/5）	5/5（0/5）	5/5（0/5）	5/5（0/5）	4/5（1/4[c)]）

a）Day 29 において、群内の全てのラットで 1 時点以上定量下限を下回ったが、その時点は 0 として扱った
b）適切な消失相が算出できなかった
c）測定可能な検体数で実施した

2.6.5.4.4 反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：ラット（つづき）

CTD における記載箇所：[4.2.3.7.6]

試験番号		[redacted]			
動物種／系統		ラット／SD			
投与化合物		EZN-2279（不純物 A なし）a)		EZN-2279（[redacted]%不純物 A ピーク含有）b)	
性別（雌／雄）／動物数		雄／9 匹	雌／9 匹	雄／9 匹	雌／9 匹
用法		3 日又は 4 日おきに計 8 回，4 週間反復筋肉内投与（投与 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 及び 25 日）			
投与量（U/kg）／投与媒体		500 U/kg／リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.9）			
試料／測定対象／定量法		ヘパリン血漿／EZN-2279 血漿中濃度／吸光光度法			
薬物動態パラメータ（各採血時点 n=3 の血漿中濃度の平均値より算出）					
初回投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	139000	186000	184000	224000
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	—c)	—c)	—c)	—c)
	C_{max} (mU/mL)	2540	4130	3660	4600
	t_{max} (h)	48	24	24	24
	$t_{1/2}$ (h)	—c)	—c)	—c)	—c)
最終投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	383000	451000	371000	481000
	$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU•h/mL)	683000	773000	674000	862000
	C_{max} (mU/mL)	6150	7960	5840	8970
	t_{max} (h)	24	24	24	24
	$t_{1/2}$ (h)	57.5	53.7	54.3	61.1
各採血時点の n 数		3	3	3	3
抗薬物抗体（中和活性）					
最終投与時	抗体測定試験 d)	4/9 (1/9)	2/9 (0/9)	5/9 (1/9)	1/9 (0/9)
	追加確認試験①e)	1/9 (0/1)	1/9 (0/1)	1/9 (0/1)	0/9 (-/-) h)
	追加確認試験②f)	0/9 (0/1)	0/9 (0/1)	0/9 (0/1)	0/9 (-/-) h)
回復期 最終投与 4 週間後	抗体測定試験 d)	2/5 (0/5)	0/5 (0/5)	4/5 (0/5)	1/5 (0/5)
	追加確認試験①e)	1/5 (0/1)	1/4g) (0/1)	0/5 (-/-) h)	0/5 (0/1)
	追加確認試験②f)	1/5 (0/1)	0/4 g) (0/1)	0/5 (-/-) h)	1/5 (0/1)

a) Lot 5046、[redacted]不純物[redacted]未検出（[redacted]%未満）
b) Lot 1097、[redacted]不純物[redacted] [redacted]%含有
c) 適切な消失相が算出できなかった
d) [redacted]にて実施
e) [redacted]で実施し、キャプチャー抗原（coating ligands）と中和試験の添加標品は不純物 A を含まない EZN-2279（Lot 5071）を使用
f) [redacted]で実施し、キャプチャー抗原（coating ligands）と中和試験の添加標品は不純物 A を含む EZN-2279（Lot 1097）を使用
g) 測定実施可能な検体数で実施した。
h) 抗体陰性のため中和活性は測定せず

2.6.5.4.5 ラット胚・胎児発生に関する試験における反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：ラット

被験物質：EZN-2279
CTD における記載箇所：[4.2.3.5.2]

試験番号		[redacted]		
動物種／系統		妊娠ラット／SD		
投与化合物		EZN-2279		
性別（雌／雄）／動物数		雌／6 匹	雌／6 匹	雌／6 匹
投与溶媒		リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.9）		
用法		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（妊娠 7、10、13、16 日）		
投与量（U/kg）		100（48）[a]	300（143）[a]	500（238）[a]
試料／測定対象／定量法		ヘパリン血漿／EZN-2279 血漿中濃度／吸光光度法		
薬物動態パラメータ [b]				
初回投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	35900	96300	183000
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	—[c]	—[c]	—[c]
	C_{max} (mU/mL)	656	1830	3310
	t_{max} (h)	24	24	24
	$t_{1/2}$ (h)	44[d]	35[d]	35[d]
最終投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	31400	110000	229000
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	—[c]	—[c]	—[c]
	C_{max} (mU/mL)	867	2100	4540
	t_{max} (h)	6	24	24
	$t_{1/2}$ (h)	34[d]	18[d]	18[d]
抗体陽性（中和抗体）[e]	妊娠 7 日	0/6	0/6	0/6
	妊娠 16 日	0/6	0/6	0/6

a）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を示す。他の全ての試験では分光学的定量法による酵素活性値に基づき投与しているので括弧内に分光学的定量法による酵素活性値に換算した場合の投与量を示す。
b）血漿中濃度の平均値より算出した (各採血時点 n=3)
c）適切な消失相が算出できなかった
d）半減期は最終 2 時点の観測値より算出した
e）抗体陰性のため中和活性は測定せず

2.6.5.4.6 単回投与時の血中濃度：イヌ

被験物質：EZN-2279、ADAGEN®
CTD における記載箇所：[4.2.3.1-2]

試験番号	[redacted]							
動物種／系統	イヌ／ビーグル							
投与化合物	EZN-2279				ADAGEN®			
性別（雌／雄）／動物数	雄／5 匹	雌／5 匹	雄／5 匹	雌／5 匹	雄／5 匹	雌／5 匹	雄／5 匹	雌／5 匹
食餌	摂食							
投与溶媒	リン酸緩衝生理食塩水							
投与方法	筋肉内投与							
投与量（U/kg）	30		150		30		150	
試料	EDTA 血漿							
測定対象	EZN-2279 血漿中濃度				ADAGEN®血漿中濃度			
定量法	吸光光度法							
薬物動態パラメータ（平均値）								
$AUC_{0\text{-}336h}$ (mU•h/mL)	52500	53900	252000	235000	38600	39500	191000	188000
$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	62200	65400	309000	298000	41300	42600	197000	196000
C_{max} (mU/mL)	316	312	1480	1430	300	309	1620	1460
t_{max} (h)	17.6	17.6	17.6	17.6	20.8	11.2	17.6	17.6
$t_{1/2}$ (h)	128	134	138	154	77.3	79.0	68.3	73.9
n	5	5	5	5	5	5	5	5

2.6.5.4.7 反復投与時の血中濃度（トキシコキネティックス）：イヌ

被験物質：EZN-2279
CTD における記載箇所：[4.2.3.2-2]

試験番号		[redacted]					
動物種／系統		イヌ／ビーグル					
投与化合物		EZN-2279					
性別（雌／雄）／動物数		雄／5 匹	雌／5 匹	雄／5 匹	雌／5 匹	雄／5 匹	雌／5 匹
用法		3 日又は 4 日おきに計 9 回，4 週間反復筋肉内投与（投与 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 及び 29 日）					
投与溶媒		リン酸緩衝生理食塩水					
投与量（U/kg）		30		100		300	
試料／測定対象／定量法		ヘパリン血漿／EZN-2279 血漿中濃度／吸光光度法					
薬物動態パラメータ（平均値）							
初回投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	18100	19100	85500	86900	195000	200000
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	57900 (n=3)[a)]	60800 (n=4)[a)]	336000 (n=4)[a)]	303000 (n=4)[a)]	815000	717000
	C_{max} (mU/mL)	295	309	1330	1390	3180	3150
	t_{max} (h)	38.4	28.8	30.0	28.8	19.6	20.4
	$t_{1/2}$ (h)	113 (n=3)[a)]	120 (n=4)[a)]	167 (n=4)[a)]	138 (n=4)[a)]	173	144
最終投与後	$AUC_{0\text{-}72h}$ (mU•h/mL)	58300	65500	283000 (n=2)[a)]	262000	589000 (n=2)[a)]	597000 (n=2)[a)]
	$AUC_{0\text{-}inf}$ (mU•h/mL)	278000 (n=2)[a)]	286000 (n=2)[a)]	1040000 (n=3)[a)]	742000 (n=2)[a)]	2620000 (n=2)[a)]	2280000 (n=2)[a)]
	C_{max} (mU/mL)	808	913	4140	4160	9210	9720
	t_{max} (h)	14.4	12.4	20.8	5.00	9.60	6.00
	$t_{1/2}$ (h)	227 (n=2)[a)]	209 (n=2)[a)]	170 (n=3)[a)]	122 (n=2)[a)]	207 (n=2)[a)]	174 (n=2)[a)]
	n	5	5	5	5	5	5
抗体陽性[b)]（中和抗体）	最終投与時	1/3（0/1）	2/3（0/2）	3/3（0/3）	0/3（0/0）	3/3（0/3）	3/3（0/3）
	最終投与 4 週間後	0/2（0/0）	0/2（0/0）	1/2（0/1）	1/2（1/1）	0/2（0/0）	2/2（0/2）

a) 消失相が算出できた個体より求めた
b) バックグラウンドが高かったため、カットポイントの 2 倍以上の場合に陽性とした

2.6.5.5 薬物動態試験：分布

該当試験なし。

2.6.5.6 薬物動態試験：代謝

該当試験なし。

2.6.5.7 薬物動態試験：排泄

該当試験なし。

2.6.5.8 薬物動態試験：その他

該当試験なし。