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

2.6.6　毒性試験の概要文

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 4
2.6.6.1　まとめ 4
2.6.6.2　単回投与毒性試験 6
2.6.6.2.1　EZN-2279 のラットにおける単回投与試験 6
2.6.6.2.2　EZN-2279 のイヌにおける単回投与試験 7
2.6.6.3　反復投与毒性試験 7
2.6.6.3.1　EZN-2279 のラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験 7
2.6.6.3.2　EZN-2279 のイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験 8
2.6.6.3.3　反復投与毒性試験の投与期間に関する考察 8
2.6.6.4　遺伝毒性試験 9
2.6.6.5　がん原性試験 9
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 9
2.6.6.6.1　EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験 9
2.6.6.6.2　生殖発生毒性評価の充足性に関する考察 10
2.6.6.7　局所刺激性試験 11
2.6.6.8　その他の毒性試験 11
2.6.6.8.1　不純物に関する試験 11
2.6.6.8.2　ADAGEN®の米国申請時に実施された毒性試験 12
2.6.6.8.2.1　PEG-ADA のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験 12
2.6.6.8.2.2　PEG-ADA のマウスにおける 2 週間反復腹腔内投与毒性試験 12
2.6.6.8.2.3　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 12
2.6.6.9　考察及び結論 13
2.6.6.10　図表 14
2.6.6.11　参考文献 15

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 concentration-time curve	血中濃度‐時間曲線下面積
AUC_{0-t}	AUC from the time of drug administration, zero, to time t	t 時間までの AUC
AUC_{last}	AUC from the time of drug administration, zero, to time of last quantifiable enzyme activity	最終定量時点までの AUC
C_{max}	Maximum concentration	最高血中濃度
Cys	Cysteine	システイン
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
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 linker	スクシンイミジルカルバメート
SD	Sprague-Dawley	ラットの系統名
Ser	Serine	セリン
SS	Succinimidyl succinate	スクシンイミジルスクシナート
U	Unit	酵素活性の単位
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。

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

EZN-2279 は、遺伝子組換えウシ ADA 類縁体にポリエチレングリコール（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、天然型ウシ腸由来 ADA の Cys74 が Ser へ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ネート（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。

以上の EZN-2279 及び ADAGEN®の類似性から、EZN-2279 の非臨床安全性は、EZN-2279 の毒性試験成績に加えて、ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験成績からも評価可能と考えた。

EZN-2279 の毒性試験成績及び ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験成績を以下に詳述する。

EZN-2279 の毒性試験プログラムを表 2.6.6.1-1 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 2.6.6.1-2 に示した。

表 2.6.6.1-1　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）トキシコキネティクス及び抗 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 2.6.6.1-2　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。トキシコキネティクス（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。トキシコキネティクス（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。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

2.6.6.2.1　EZN-2279 のラットにおける単回投与試験

［概要表 2.6.7.6；報告書 4.2.3.1-1（試験番号 07-2018/AD07027）］

EZN-2279 又は ADAGEN®をラット（SD、雌雄、10 週齢）の各群 10 匹に 30 及び 150 U/kg（0.65 mL/kg）の投与量で単回筋肉内投与し、その後 14 日間観察した。検査項目として一般状態観察、体重、摂餌量及び薬物動態評価［全動物について EZN-2279 又は ADAGEN®の血漿中濃度（ADA 活性）を測定］を実施した。

EZN-2279 投与群での死亡例は認められなかった。また、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。なお、ADAGEN®投与群においても死亡例は認められず、ADAGEN®に関連した変化は認められなかった。

EZN-2279 と ADAGEN®の C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。ADAGEN®と比べて EZN-2279 は、AUC_{last} で 56～91%の増加及び C_{max} で 12～23%の増加を示した。

2.6.6.2.2　EZN-2279 のイヌにおける単回投与試験

［概要表 2.6.7.6；報告書 4.2.3.1-2（試験番号 07-3265/AD07026）］

EZN-2279 又は ADAGEN®をイヌ（ビーグル、雌雄、24 ヵ月未満の月齢）の各群 5 匹に 30 及び 150 U/kg（0.65 mL/kg）の投与量で単回筋肉内投与し、その後 14 日間観察した。検査項目として一般状態観察、体重、摂餌量及び薬物動態評価［全動物について EZN-2279 又は ADAGEN®の血漿中濃度（ADA 活性）を測定］を実施した。

EZN-2279 投与群での死亡例は認められなかった。また、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。なお、ADAGEN®投与群においても死亡例は認められず、ADAGEN®に関連した変化は認められなかった。

EZN-2279 と ADAGEN®の C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。C_{max} については EZN-2279 及び ADAGEN®は同程度の値を示した。ADAGEN®と比べて EZN-2279 は、AUC_{last} で 25～41%の増加を示した。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

2.6.6.3.1　EZN-2279 のラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験

［概要表 2.6.7.7.1；報告書 4.2.3.2-1（試験番号 07-2030/AD07028）］

EZN-2279 をラット（SD、雌雄、投与開始時約 8 週齢）の各群 10 匹に、0（PBS）、30、100 及び 300 U/kg（1.2 mL/kg）の投与量で 4 週間筋肉内投与（3 日又は 4 日おきに計 9 回投与）した。検査については、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量、病理組織学的検査、トキシコキネティクス（血漿中 ADA 活性）及び抗 EZN-2279 抗体測定を行った。また、各群雌雄 5 匹の回復群を設けて 4 週間の休薬による回復性を検討した。

投与期間及び休薬期間を通して死亡例は認められなかった。

一般状態、体重、摂餌量、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査では、EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。血液学的検査では、平均血小板容積（MPV）の増加が雄の 30 U/kg 以上の投与群で投与期間終了時にみられた。しかし、この変化は血小板数減少を伴っていないことから、毒性学的に意義のある変化ではないと考えた。血液凝固検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の延長が雌雄の 300 U/kg 群で投与期間終了時にみられた（雄：対照群平均 18.2 秒に対して 300 U/kg 群平均 23.9 秒、雌：対照群平均 18.2 秒に対して 300 U/kg 群平均 24.5 秒）。しかし、APTT 延長がみられた以外に、出血、血液凝固障害を示唆する変化は認められなかったことから、APTT 延長は毒性学的に意義のある変化ではないと考えた。なお、休薬期間終了時の同群で APTT の変化は認められなかった。

トキシコキネティクスについて評価した結果、投与初日の C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。投与最終日には 300 U/kg 群において投与初日よりも曝露の増加が、雄の 30 及び 100 U/kg 群、並びに雌の 30 U/kg 群において曝露の低下が認められた。

また、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。30 U/kg 群の雄 1 例（投与期間終了時）及び 300 U/kg 回復群の雌 1 例（回復期間終了時）に中和抗体が認められた。

以上の結果、ラットに EZN-2279 を 4 週間反復筋肉内投与した場合の無毒性量は 300 U/kg であった。

2.6.6.3.2　EZN-2279 のイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験

［概要表 2.6.7.7.2；報告書 4.2.3.2-2（試験番号 07-3280/AD07029）］

EZN-2279 をイヌ（ビーグル、雌雄、投与開始時約 5 又は 6 ヵ月齢）の各群 3 頭に、0（PBS）、30、100 及び 300 U/kg（0.4 mL/kg）の投与量で 4 週間筋肉内投与（3 日又は 4 日おきに計 9 回投与）し、一般状態観察、心電図検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量、病理組織学的検査、トキシコキネティクス（血漿中 ADA 活性）及び抗 EZN-2279 抗体測定を行った。また、各群雌雄 2 匹の回復群を設けて 4 週間の休薬による回復性を検討した。

投与期間及び休薬期間を通して死亡例は認められなかった。

一般状態、心電図検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査では、EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。血液凝固検査では、APTT の延長が雄の EZN-2279 全投与群及び雌の 300 U/kg 投与群で投与期間終了時に認められた（雄：対照群平均 18.2 秒に対して 30 U/kg 群平均 24.6 秒、100 U/kg 群平均 33.3 秒、及び 300 U/kg 群平均 37.7 秒、雌：対照群平均 19.7 秒に対して 300 U/kg 群平均 33.2 秒）。しかし、APTT の延長がみられた以外に、出血、血液凝固障害を示唆する変化が認められなかったことから、APTT の延長は毒性学的に意義のある変化ではないと考えた。なお、休薬期間終了時には APTT 延長の回復傾向又は完全な回復が認められた。

トキシコキネティクスについて評価した結果、投与初日の C_{max} 及び AUC は用量に応じて増加した。投与最終日には全被験物質投与群において投与初日よりも曝露の増加が認められたが、30 U/kg 群の雄 1 例及び 100 U/kg 群の雌 1 例では投与初日と比べて投与最終日の $AUC_{0\text{-}24h}$ は著しく低下（30 U/kg 群の雄は 52.7%低下、及び 100 U/kg 群の雌は 98.3%低下）した。

また、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。投与初日と比べて投与最終日の $AUC_{0\text{-}24h}$ が著しく低下した 100 U/kg 群の雌 1 例において、中和抗体が認められた。

以上の結果、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 300 U/kg であった。

2.6.6.3.3　反復投与毒性試験の投与期間に関する考察

ICH S6（R1）ガイドライン「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（薬食審査発 0323 第 1 号）」で記載されている一般的な原則を踏まえ、長期毒性試験の投与期間について考察した。その結果、以下に示す EZN-2279 の 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験におけ

る抗 EZN-2279 抗体産生及び血中曝露に関する知見から、4 週間を超えて反復投与しても EZN-2279 の安全性評価に関して意義ある新たな情報が得られる可能性はないと考えた。

- 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験では、投与最終日又は回復期間終了時においてラット及びイヌの多くの個体で抗 EZN-2279 抗体が陽性であった。
- ラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験では 30 U/kg の雌雄及び 100 U/kg の雄のほとんどの個体において投与最終日の血中曝露（ADA 酵素活性）は検出下限未満であった。
- イヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験では 30 U/kg 群の雄 1 個体、100 U/kg 群の雌 1 個体において投与最終日の血中曝露は著しく低下した。

以上のことから、毒性を評価するうえで 4 週間を超える長期間の反復投与試験を実施する意義は極めて少ないと考えたため、4 週間を超える長期間の反復投与試験は実施しなかった。

なお、EZN-2279 の最大臨床用量（0.4 mg/kg/週、筋肉内注射）に含まれる PEG の量（約 0.25 mg/kg/週）は、PEG4000 の筋肉内注射の最大 1 日投与量（40 mg）と比較して十分に低い。また、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)]。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドライン「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（薬食審査発 0323 第 1 号）」において、化学合成医薬品について通常実施される標準的な遺伝毒性試験は、バイオ医薬品には適切でなく必要ないとされていることから、EZN-2279 の遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.5　がん原性試験

EZN-2279 の 4 週間反復投与で認められた抗 EZN-2279 抗体産生及び血中曝露の低下を踏まえると、より長期間の反復投与による非臨床安全性評価は技術的に困難であると考えることから、EZN-2279 のがん原性試験は実施しなかった。

以下の通り、EZN-2279 のがん原性の懸念を示唆する報告はない。なお、EZN-2279 は ADA 欠損症に対する酵素補充療法剤であり、ADAGEN®の補充療法と同様に投与量を調節することにより、EZN-2279 が体内に蓄積することのない補充療法が検討される。

- ADAGEN®の補充療法を受けている患者の 2/3 は 5 年以上投与されており（うち 20%は 15～22 年間投与されている）、一般的に忍容性が良好であることが報告されている [10)]。
- PEG に発がん性はないことが報告されている [6)]。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1　EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験

［概要表 2.6.7.8.1；報告書 4.2.3.5.2（試験番号 20098870/STPI20098870）］

EZN-2279 をラット（SD、雌、試験開始時約 9～10 週齢）の雌各群 8 匹に、0（PBS）、100（48）、300（143）及び 500（238） U/kg の投与量で妊娠 7～16 日に反復筋肉内投与（0.9 mL/kg 、3 日おきの全 4 回投与）し、母動物の生殖及び胚・胎児発生への影響を検討した。なお、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）を、投与量として記載した。検査については、一般状態、体重、摂餌量、剖検、妊娠動物開腹検査（妊娠 21 日：黄体数、着床数、着床前胚損失率、生存胎児数、吸収胚数、死亡胎児を有する母動物数、胚・胎児死亡率、胎児体重、胎児の性比）、胎児検査（外表検査、内臓検査、骨格検査）、トキシコキネティクス（血漿中 ADA 活性）及び抗体測定（抗 EZN-2279 抗体及び抗 PEG 抗体）を実施した。

母動物に死亡例は認められなかった。

母動物の一般状態に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。

500（238） U/kg で母動物の体重増加量の減少（妊娠 7～21 日の体重増加量が対照群の 93%）が認められたが、いずれの投与群でも母動物の体重及び摂餌量に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。

黄体数、着床数、着床前胚損失率、生存胎児数、吸収胚数、死亡胎児を有する母動物数、胚・胎児死亡率、胎児体重及び胎児の性比に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。

胎児の外表、内臓及び骨格に EZN-2279 に関連した変化は認められなかった。したがって、EZN-2279 に胎児に対する催奇形作用はないと考えた。

トキシコキネティクス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。

また、抗体測定の結果、抗 EZN-2279 抗体及び抗 PEG 抗体は認められなかった。

以上の結果、母動物の一般毒性学的無毒性量、生殖に対する無毒性量及び胚・胎児発生に対する無毒性量は、いずれも 500 （238）U/kg であった。

2.6.6.6.2　生殖発生毒性評価の充足性に関する考察

EZN-2279 の 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験及びラットにおける胚･胎児発生に関する試験の成績から、EZN-2279 の生殖発生毒性への懸念は示唆されなかったことから、追加の生殖発生毒性試験は実施しなかった。なお、ADAGEN®の臨床での使用実績から、受胎能、胚・胎児及び出生児への有害作用を示唆する副作用は報告されていない[7),8),9),10)]。

EZN-2279 のラット及びイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験の器官重量及び病理組織学的検査において、雌雄生殖器に変化は認められなかった。ICH M3（R2）ガイドラインにおいて、2 週間の反復投与毒性試験における精巣及び卵巣の標準的な病理組織学的検査を十分に実施することによって、雌雄生殖器への影響を受胎能試験と同等の感度で検出できると考えられていることを踏まえると、EZN-2279 が雌雄の受胎能に影響する懸念は低いと考えた。

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ず、胎児に対する催奇形作用は認められなかった。

なお、ADAGEN®による酵素補充療法を受けているADA欠損症患者2例［24歳女性（375 Uを週3回投与）及び27歳女性（1500 Uを週1回投与）］において妊娠及び出産の成功が報告されている[7),8),9)]。

更に、海外では1986～2008年に185名のADA欠損患者に対してADAGEN®の使用実績があり、ADAGEN®の投与開始時期は約70%が1歳前（このうち50%は6ヵ月齢未満）、約15%が1～3歳である[10)]。また、ADAGEN®の治療対象患者の2/3は5年以上投与されており（このうち20%は15～22年投与されている）、一般的に忍容性が良好であることが報告されている[10)]。したがって、ADAGEN®が出生児の発育に影響する懸念は低いと想定された。

2.6.6.7　局所刺激性試験

EZN-2279の4週間反復投与及び4週間回復性試験（3日又は4日おきに計9回筋肉内投与）において局所刺激性を評価した。当該試験ではEZN-2279投与に起因する局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　不純物に関する試験

［概要表2.6.7.9.1；報告書4.2.3.7.6（試験番号15-2483/STPI130260A）］

安定性試験（5±3℃（長期保存試験）及び25±2℃/60±5%RH（加速試験））において、[redacted]不純物Aが継時的に増加することが確認されたため、不純物Aの安全性を評価する目的で本試験を行った。

不純物Aを含まないEZN-2279又は10%の不純物Aを含むEZN-2279をラット（SD、雌雄、投与開始時9週齢）の各群15匹に、500 U/kgの投与量で4週間反復筋肉内投与（週2回の全8回投与）した。対照群には媒体（PBS）を同様の方法で投与した。検査については、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量、病理組織学的検査、トキシコキネティクス（血漿中ADA活性）及び抗EZN-2279抗体測定を行った。また、各群雌雄5匹の回復群を設けて4週間の休薬による回復性を検討した。なお、投与部位の病理組織学的検査のためのサンプリングが適切に実施されなかったため、投与部位の病理組織学的検査について各群雌雄8匹を用いて再試験を実施した。

投与期間及び休薬期間を通して死亡例は認められなかった。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査では、不純物Aを含まないEZN-2279及び10%の不純物Aを含むEZN-2279に関連した変化は認められなかった。

投与部位の病理組織学的検査では、不純物Aを含まないEZN-2279及び10%の不純物Aを含むEZN-2279に関連した変化は認められなかった。

トキシコキネティクスについて評価した結果、不純物Aを含まないEZN-2279投与時のC_{max}及びAUCは、不純物Aを含むEZN-2279投与時と同程度であった。

また、抗 EZN-2279 抗体測定の結果、抗 EZN-2279 抗体陽性反応は、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。

以上の結果、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。

2.6.6.8.2　ADAGEN®の米国申請時に実施された毒性試験

2.6.6.8.2.1　PEG-ADA のマウスにおける単回腹腔内投与毒性試験

［概要表 2.6.7.10；報告書 4.2.3.7.7-1（試験番号 10）］

PEG-ADA をマウス（Swiss-Webster、雌雄）の各群 1 匹に、10000 及び 50000 U/kg の投与量で単回腹腔内投与（50000 U/kg 群については、午前と午後の 2 回に分けて投与）し、その後 7 日間（50000 U/kg 群）又は 21 日間（10000 U/kg 群）観察した。検査項目として一般状態観察、体重、器官重量（心臓、肝臓、脾臓、腎臓及び精巣）、剖検及び病理組織学的検査（心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、精巣、卵巣及び胸腺）を実施した。

死亡例は認められなかった。

一般状態、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査では、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が認められた。50000 U/kg 群で軽度な減少が認められた。

2.6.6.8.2.2　PEG-ADA のマウスにおける 2 週間反復腹腔内投与毒性試験

［概要表 2.6.7.10；報告書 4.2.3.7.7-2（試験番号 9）］

PEG-ADA をマウス（Swiss-Webster、雌雄）の各群 5 匹に、0（PBS）及び 200 U/kg の投与量で 2 週間腹腔内投与（週 2 回投与）し、一般状態観察、体重、血液学的検査、器官重量（心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、卵巣及び胸腺）、剖検及び病理組織学的検査（心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、精巣、卵巣及び胸腺）を実施した。

死亡例は認められなかった。

一般状態、血液学的検査、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査では、PEG-ADA に関連した変化は認められなかった。

体重では、200 U/kg 群の雄 4 及び雌 2 例で初回投与後に軽度な減少（初回投与前と比較して 4~7%）がみられたが、投与期間中に回復した。

以上の結果、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。

2.6.6.8.2.3　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

［概要表 2.6.7.10；報告書 4.2.3.7.7-3（試験番号 25）］

PEG-ADA をラット（SD、雌雄）の各群 8 匹に、0（PBS）、150 及び 500 U/kg の投与量で 4 週間又は 8 週間筋肉内投与（週 1 回投与）し、一般状態観察、体重、血液学的検査、血液生化学的

検査、尿検査、器官重量（脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣及び卵巣）、剖検及び病理組織学的検査（肝臓、脾臓、腎臓、副腎、眼、膵臓、精巣、卵巣、肺、脳、心臓及び投与部位）を実施した。

投与期間を通して死亡例は認められなかった。

一般状態、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査では、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。

以上の結果、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。

2.6.6.9　考察及び結論

EZN-2279 及び ADAGEN®の類似性から、EZN-2279 の非臨床安全性は、EZN-2279 の毒性試験成績に加えて、ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験成績からも評価可能と考えた。EZN-2279 の毒性試験成績及び ADAGEN®の米国申請時に提出された毒性試験成績を以下に示す。なお、EZN-2279 及び ADAGEN®についてそれぞれ実施されたラットの反復筋肉内投与毒性試験では、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。トキシコキネティクス（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。トキシコキネティクス（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。

2.6.6.10　図表

本文中に示した。

2.6.6.11　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® Package Insert　4.3-2

3）　PegIntron® (peginterferon alfa-2b) injection, for subcutaneous use. Prescribing Information (Package Insert).　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; 35: 9-16.　4.3-5

7）　List of Pregnancy Cases on ADAGEN®　4.3-16

8）　Chapdelaine H, Saurez F, Fischer A, Hermine O. First experience with pegademase bovine during pregnancy. J Clin Immunol. 2012; 32: 144.　4.3-17

9）　Shams M. Management of ADA-deficient SCID patient during pregnancy. J Clini Immunol. 2016; 36: 242.　4.3-18

10）　Gaspar HB, Aiuti A, Porta F, Candotti F, Hershfield MS, Notarangelo LD. How I treat ADA deficiency. Blood. 2009; 114: 3524-3532.　5.4-9

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

2.6.7　毒性試験概要表

帝人ファーマ株式会社

目次

2.6.7　毒性試験概要表 3
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 3
2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き） 4
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表（C_{max}） 6
2.6.7.4　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表（AUC） 8
2.6.7.5　毒性試験：被験物質 10
2.6.7.6　単回投与毒性試験 11
2.6.7.7　反復投与毒性試験 12
2.6.7.7.1　EZN-2279 のラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験 12
2.6.7.7.2　EZN-2279 のイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験 16
2.6.7.8　生殖発生毒性試験 19
2.6.7.8.1　EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験 19
2.6.7.9　その他の毒性試験 22
2.6.7.9.1　不純物に関する試験 22
2.6.7.10　ADAGEN®の米国申請時に実施された毒性試験 26

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：EZN-2279

試験の種類	動物種及び系統	投与方法	投与期間	投与量（U/kg）[a]	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験	ラット/SD 系	筋肉内	単回	30、150	非	[redacted]	07-2018/AD07027	4.2.3.1-1
	イヌ/ビーグル	筋肉内	単回	30、150	非	[redacted]	07-3265/AD07026	4.2.3.1-2
反復投与毒性試験	ラット/SD 系	筋肉内	4 週間（3 日又は 4 日おきの全 9 回投与）	0、30、100、300	適 [c]	[redacted]	07-2030/AD07028	4.2.3.2-1
	イヌ/ビーグル	筋肉内	4 週間（3 日又は 4 日おきの全 9 回投与）	0、30、100、300	適 [c]	[redacted]	07-3280/AD07029	4.2.3.2-2
生殖発生毒性試験	ラット/SD 系	筋肉内	妊娠 7～16 日（3 日おきの全 4 回投与）	0、100（48）[b]、300（143）[b]、500（238）[b]	適	[redacted]	20098870/STPI20098870	4.2.3.5.2
その他の毒性試験								
不純物に関する試験	ラット/SD 系	筋肉内	4 週間（週 2 回投与）	0、500	適 [d]	[redacted]	STPI130260A/15-2483	4.2.3.7.6

a）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
b）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）
c）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
d）[redacted]で実施した抗 EZN-2279 抗体測定は GLP 非適用

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：PEG-ADA

試験の種類	動物種及び系統	投与方法	投与期間	投与量（U/kg）	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所
単回投与毒性試験	マウス/Swiss-Webster	腹腔内	単回	10000、50000	適	[redacted]	10	4.2.3.7.7-1
反復投与毒性試験	マウス/Swiss-Webster	腹腔内	2 週間	0、200	適	[redacted]	9	4.2.3.7.7-2
	ラット/SD 系	筋肉内	2 ヵ月間（4 週間又は 8 週間）	0、150、500	適	[redacted]	25	4.2.3.7.7-3

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

試験の種類	対照薬	試験系	投与方法	投与量（U/kg）[a)]	GLP 適用	試験番号	記載箇所
単回投与 毒性試験	ADAGEN®	ラット/SD 系	筋肉内	30、150	非	07-2018/ AD07027	4.2.3.1-1
	ADAGEN®	イヌ/ビーグル	筋肉内	0、30、150	非	07-3265/ AD07026	4.2.3.1-2
反復投与 毒性試験	なし	ラット/SD 系	筋肉内	0、30、100、300	適 [c)]	07-2030/ AD07028	4.2.3.2-1
	なし	イヌ/ビーグル	筋肉内	0、30、100、300	適 [c)]	07-3280/ AD07029	4.2.3.2-2
生殖発生 毒性試験	なし	ラット/SD 系	筋肉内	0、100（48）[b)]、 300（143）[b)]、500 （238）[b)]	適	20098870/ STPI20098870	4.2.3.5.2
その他の毒性試験： 不純物に関する試験	なし	ラット/SD 系	筋肉内	0、500	適 [d)]	STPI130260A/ 15-2483	4.2.3.7.6

a）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
b）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）
c）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
d）[redacted]で実施した抗 EZN-2279 抗体測定は GLP 非適用

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表（C_{max}）

被験物質：EZN-2279

投与量	C_{max}（mU/mL）						
	ラット		イヌ		雌ラット		ヒト
	投与 1 日目	投与 29 日目	投与 1 日目	投与 29 日目	妊娠 7 日	妊娠 16 日	定常状態
0.167 mg/kg							698.5 [f)]、[g)]
0.188 mg/kg							743.3 [f)]、[h)]
0.200 mg/kg							971.7 [f)]、[i)]
30 U/kg（≒0.20 mg/kg）	M：212 [a)] F：219 [a)]	M：64.6 [a)] F：121 [a)]	M：295 [d)] F：309 [d)]	M：808 [d)] F：913 [d)]			
0.209 mg/kg							593.3 [f)]、[j)]
0.224 mg/kg							888.3 [f)]、[k)]
0.233 mg/kg							581.8 [f)]、[l)]
48 U/kg（≒0.32 mg/kg）					656 [e)]	867 [e)]	
100 U/kg（≒0.67 mg/kg）	M：545 [a)] F：694 [a)]	M：167 [a)] F：619 [a)]	M：1330 [d)] F：1390 [d)]	M：4140 [d)] F：4160 [d)]			
143 U/kg（≒0.95 mg/kg）					1830 [e)]	2100 [e)]	
238 U/kg（≒1.6 mg/kg）					3310 [e)]	4540 [e)]	
300 U/kg（≒2.0 mg/kg）	M：2260 [a)] F：2670 [a)]	M：2580 [a)] F：4560 [a)]	M：3180 [d)] F：3150 [d)]	M：9210 [d)] F：9720 [d)]			
500 U/kg（≒3.3 mg/kg）	M：2540 [b)] F：4130 [b)]	M：6150 [c)] F：7960 [c)]					

M：雄、F：雌

a）ラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（試験番号：07-2030/AD07028）

b）不純物に関する試験（試験番号：15-2483/STPI130260A）

c)不純物に関する試験（試験番号：15-2483/STPI130260A）の投与 25 日目
d)イヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（試験番号：07-3280/AD07029）
e)ラットにおける胚・胎児発生に関する試験（20098870/STPI20098870）
f)1 U は、1 分間あたり 1 μmol のイノシンを生成する酵素活性と定義し（CTD 2.7.1 参照）、1U = 60 μmol/h で換算
g)本邦第 III 相試験（STM-279-301 試験）の被験者番号 1*（[redacted]性）
h)米国第 III 相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 2*（[redacted]性）
i)米国第 III 相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 4*（[redacted]性）
j)米国第 III 相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 5*（[redacted]性）
k)米国第 III 相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 3*（[redacted]性）
l)本邦第 III 相試験（STM-279-301 試験）の被験者番号 2*（[redacted]性）

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧表（AUC）

被験物質：EZN-2279

投与量	AUC（mU･h/mL）						
	ラット		イヌ		雌ラット		ヒト
	投与 1 日目	投与 29 日目	投与 1 日目	投与 29 日目	妊娠 7 日	妊娠 16 日	定常状態
0.167 mg/kg							104653 [f)]、[g)]
0.188 mg/kg							102667 [f)]、[h)]
0.200 mg/kg							141333 [f)]、[i)]
30 U/kg（≒0.20 mg/kg）	M：12200 [a)] F：12600 [a)]	M：737 [a)] F：3210 [a)]	M：18100 [d)] F：19100 [d)]	M：58300 [d)] F：65500 [d)]			
0.209 mg/kg							87667 [f)]、[j)]
0.224 mg/kg							127167 [f)]、[k)]
0.233 mg/kg							73848 [f)]、[l)]
48 U/kg（≒0.32 mg/kg）					35900 [e)]	31400 [e)]	
100 U/kg（≒0.67 mg/kg）	M：30600 [a)] F：36000 [a)]	M：5790 [a)] F：32700 [a)]	M：85500 [d)] F：86900 [d)]	M：283000 [d)] F：262000 [d)]			
143 U/kg（≒0.95 mg/kg）					96300 [e)]	110000 [e)]	
238 U/kg（≒1.6 mg/kg）					183000 [e)]	229000 [e)]	
300 U/kg（≒2.0 mg/kg）	M：107000 [a)] F：131000 [a)]	M：154000 [a)] F：231000 [a)]	M：195000 [d)] F：200000 [d)]	M：589000 [d)] F：597000 [d)]			
500 U/kg（≒3.3 mg/kg）	M：139000 [b)] F：186000 [b)]	M：383000 [c)] F：451000 [c)]					

M：雄、F：雌

a）ラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（試験番号：07-2030/AD07028）の $AUC_{0\text{-}72h}$

b）不純物に関する試験（試験番号：15-2483/STPI130260A）の $AUC_{0\text{-}72h}$

c)不純物に関する試験（試験番号：15-2483/STPI130260A）の投与 25 日目の $AUC_{0\text{-}72h}$
d)イヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（試験番号：07-3280/AD07029）の $AUC_{0\text{-}72h}$
e)ラットにおける胚・胎児発生に関する試験（20098870/STPI20098870）の $AUC_{0\text{-}t}$
f)1 U は、1 分間あたり 1 μmol のイノシンを生成する酵素活性と定義し（CTD 2.7.1 参照）、1U = 60 μmol/h で換算
g)本邦第 III相試験（STM-279-301 試験）の被験者番号 1*（[redacted]性）の AUC_{τ}（$AUC_{0\text{-}168h}$）
h)米国第 III相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 2*（[redacted]性）の AUC_{τ}（$AUC_{0\text{-}168h}$）
i)米国第 III相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 4*（[redacted]性）の AUC_{τ}（$AUC_{0\text{-}168h}$）
j)米国第 III相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 5*（[redacted]性）の AUC_{τ}（$AUC_{0\text{-}168h}$）
k)米国第 III相試験（STP-2279-002 試験）の被験者番号 3*（[redacted]性）の AUC_{τ}（$AUC_{0\text{-}168h}$）
l)本邦第 III相試験（STM-279-301 試験）の被験者番号 2*（[redacted]性）の AUC_{τ}（$AUC_{0\text{-}168h}$）

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 毒性試験：被験物質

被験物質：EZN-2279

ロット番号	純度（%）[a)]、[b)]	被験物質中の不純物量[a)]、[b)]	試験番号	試験の種類
P-E-1490-30-050707	99.9	--[c)]	07-2018/AD07027	ラット単回投与毒性試験
			07-3265/AD07026	イヌ単回投与毒性試験
P-E-1490-35-060407	99.3	--[c)]	07-2030/AD07028	ラット 4 週間反復投与毒性試験
			07-3280/AD07029	イヌ 4 週間反復投与毒性試験
6046	99.0	0.4% 不純物 A（[redacted]） 0.7% その他の不純物の総量	20098870/STPI20098870	ラット胚・胎児発生に関する試験
1097	90.0	9.5% 不純物 A（[redacted]） 0.5% その他の不純物の総量	15-2483/STPI130260A	ラット不純物に関する試験
5046	99.8	0.0% 不純物 A（[redacted]）[d)] 0.3% その他の不純物の総量	15-2483/STPI130260A	ラット不純物に関する試験

a）試験開始時の測定値
b）Module 2.3　純度試験（1）（目的物質由来不純物）参照
c）--：同定せず
d）検出下限：0.4%

2.6.7.6 単回投与毒性試験

被験物質：EZN-2279

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与量（U/kg）	性別及び動物数/群	最大非致死量（U/kg）	概略の致死量（U/kg）	特記すべき所見	試験番号
ラット/SD 系	筋肉内（pH 7.2~7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液・塩化ナトリウム溶液）	30、150	10M 10F	150	>150	なし	07-2018/AD07027
イヌ/ビーグル	筋肉内（pH 7.2~7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液・塩化ナトリウム溶液）	30、150	5M 5F	150	>150	なし	07-3265/AD07026

M：雄、F：雌

2.6.7.7 反復投与毒性試験

2.6.7.7.1 EZN-2279 のラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験

被験物質：EZN-2279

動物種：ラット/SD 系	投与期間：4 週間（3 日又は 4 日おきの全 9 回投与）	試験番号：07-2030/AD07028
試験開始週齢：8 週齢（投与開始時）	休薬期間：4 週間	CTD における記載箇所：4.2.3.2-1
初回投与年月日：[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法：筋肉内	GLP 適用：適（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）
特記事項：抗 EZN-2279 抗体測定を実施	溶媒/投与形態：pH 7.2~7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液・塩化ナトリウム溶液	
無毒性量：300 U/kg		

投与量（U/kg）	0（対照）		30		100		300	
動物数 [a]	M：15	F：15	M：15	F：15	M：15	F：15	M：15	F：15
トキシコキネティクス								
C_{max}（mU/mL）								
投与 1 日目	NE	NE	212	219	545	694	2260	2670
投与 29 日目	NE	NE	64.6	121	167	619	2580	4560
$AUC_{0\text{-}72h}$（mU･h/mL）								
投与 1 日目	NE	NE	12200	12600	30600	36000	107000	131000
投与 29 日目	NE	NE	737	3210	5790	32700	154000	231000
$AUC_{0\text{-}\infty}$（mU･h/mL）[b]								
投与 1 日目	NE	NE	33600	33600	81700	65000	171000	212000
投与 29 日目	NE	NE	--[d]	5530	6780	62900	284000	425000
抗 EZN-2279 抗体測定 [c]								
投与 29 日目	NE	NE	12/12	12/12	11/11	11/11	11/12	12/12
休薬期間終了時	1/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5

NE：実施せず、M：雄、F：雌

a）トキシコキネティクス評価のため、被験物質投与群に 12 匹/性/群を設定した。
b）最終採血ポイント：最終投与後 4 週間
c）30 U/kg 群の雄 1 例（投与期間終了時）及び 300 U/kg 回復群の雌 1 例（回復期間終了時）に中和抗体が認められた。
d）定量下限（25 mU/mL）未満となる時点（投与後 24、48、72、120、144、336 及び 672 時間）が多く見られたため算出せず。

2.6.7.7.1 EZN-2279 のラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（続き）

投与量（U/kg）	0（対照）		30		100		300	
動物数	M：15	F：15	M：15	F：15	M：15	F：15	M：15	F：15
特記すべき所見								
死亡数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液凝固検査								
aPTT（sec）	18.2	18.2	18.4	16.5	19.8	18.7	23.9**	24.5**
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
回復性の評価								
評価動物数	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5
血液凝固検査　aPTT（sec）	16.6	18.3	16.9	16.7	17.8	17.0	18.0	16.6

-：特記すべき所見なし、NE：実施せず、M：雄、F：雌
**：p≦0.01（Shirley’s test）

2.6.7.7.1 EZN-2279 のラットにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（続き）

投与量（U/kg）	0（対照）		30		100		300	
投与部位の病理組織学的検査（投与期間終了時）								
評価動物数	M：10	F：10	NE	NE	NE	NE	M：10 [a)]	F：10 [a)]
評価部位	L/R	L/R	NE	NE	NE	NE	L/R	L/R
出血　軽微 軽度 中等度	0/0 1/0 0/0	2/0 1/0 0/0	NE	NE	NE	NE	0/0 0/1 0/1	0/0 1/0 0/0
皮膚：表層の炎症細胞/細胞残渣 軽微 軽度	 1/3 0/0	 0/0 1/1	NE	NE	NE	NE	 0/0 0/0	 0/1 0/0
皮膚：びらん　軽度	0/0	1/0	NE	NE	NE	NE	0/0	0/0
亜急性（慢性活動性）/慢性炎症 軽微 軽度	 7/2 0/2	 4/1 0/1	NE	NE	NE	NE	 4/4 1/1	 3/2 0/4
骨格筋：変性/萎縮　軽微	0/0	0/1	NE	NE	NE	NE	0/0	2/2

NE：実施せず、M：雄、F：雌、L/R：左大腿部/右大腿部

a）左大腿部の評価動物数は 9 匹

2.6.7.7.2 EZN-2279 のイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験

被験物質：EZN-2279

動物種：イヌ/ビーグル	投与期間：4 週間（3 日又は 4 日おきの全 9 回投与）	試験番号：07-3280/AD07029
試験開始週齢：5 又は 6 ヵ月齢（投与開始時）	休薬期間：4 週間	CTD における記載箇所：4.2.3.2-2
初回投与年月日：[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日	投与方法：筋肉内	GLP 適用：適（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）
特記事項：抗 EZN-2279 抗体測定を実施	溶媒/投与形態：pH 7.2~7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液・塩化ナトリウム溶液	
無毒性量：300 U/kg		

投与量（U/kg）	0（対照）		30		100		300	
動物数	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5
トキシコキネティクス								
C_{max}（mU/mL）								
投与 1 日目	NE	NE	295	309	1330	1390	3180	3150
投与 29 日目	NE	NE	808	913	4140	4160	9210	9720
$AUC_{0\text{-}72h}$（mU･h/mL）								
投与 1 日目	NE	NE	18100	19100	85500	86900	195000	200000
投与 29 日目	NE	NE	58300	65500	28300	26200	589000	597000
$AUC_{0\text{-}\infty}$（mU･h/mL）[a)]								
投与 1 日目	NE	NE	57900	60800	336000	303000	815000	717000
投与 29 日目	NE	NE	278000	286000	1040000	742000	2620000	2280000
抗 EZN-2279 抗体測定 [b)]								
投与 29 日目	NE	NE	1/3	2/3	3/3	0/3	3/3	3/3
休薬期間終了時	NE	NE	0/2	0/2	1/2	1/2	0/2	2/2

-：特記すべき所見なし、NE：実施せず、M：雄、F：雌

a）最終採血ポイント：最終投与後 4 週間

b）100 U/kg 群の雌 1 例において中和抗体が認められた。

2.6.7.7.2 EZN-2279 のイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（続き）

投与量（U/kg）	0（対照）		30		100		300	
動物数	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5
特記すべき所見								
死亡数	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-	-	-
心電図検査	-	-	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
血液凝固検査								
aPTT（sec）	18.2	19.7	24.6**	21.6	33.3**	27.6	37.7**	33.2**
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
回復性の評価								
評価動物数	M：2	F：2	M：2	F：2	M：2	F：2	M：2	F：2
血液凝固検査　aPTT（sec）	18.6	19.4	20.3	19.5	20.4	18.3	28.6	21.6

-：特記すべき所見なし、NE：実施せず、M：雄、F：雌
**：p≦0.01（Williams 又は Shirley’s test）

2.6.7.7.2 EZN-2279 のイヌにおける 4 週間反復投与及び 4 週間回復性試験（続き）

投与量（U/kg）	0（対照）		30		100		300	
投与部位の病理組織学的検査（投与期間終了時）								
評価動物数	M：2	F：2	NE	NE	NE	NE	M：2	F：3
評価部位	L/R	L/R	NE	NE	NE	NE	L/R	L/R
真皮/皮下組織：出血　軽微	0/0	1/0	NE	NE	NE	NE	0/1	0/0
真皮/皮下組織:好酸球による亜急性炎症 軽微 軽度	 0/0 0/0	 2/0 0/0	NE	NE	NE	NE	 0/0 0/0	 0/1 0/1
骨格筋：急性/亜急性炎症　軽微 軽度	0/1 0/0	1/0 0/0	NE	NE	NE	NE	0/0 0/0	0/0 0/1

NE：実施せず、M：雄、F：雌、L/R：左背部/右背部

2.6.7.8 生殖発生毒性試験

2.6.7.8.1 EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験

被験物質：EZN-2279

試験計画：ICH4.1.3 準拠　適	投与期間：妊娠 7～17 日	試験番号：20098870/STPI20098870
動物種/系統：ラット/SD 系	交尾成立日：妊娠 0 日	CTD における記載箇所：4.2.3.5.2
試験開始日齢：60～73 日	帝王切開日：妊娠 21 日	GLP 適用：適
初回投与日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日	投与方法：筋肉内	
特記事項：抗 EZN-2279 及び抗 PEG 抗体測定を実施	溶媒/投与形態：pH 6.9 のリン酸塩緩衝液	
無毒性量：		
F_0 母動物の一般毒性学的影響及び生殖機能に対する影響：500 U/kg		
F_1 胚・胎児に対する影響：500 U/kg		

投与量（U/kg）		0（対照）	100（48）[a)]	300（143）[a)]	500（238）[a)]
母体	トキシコキネティクス評価動物数	3	6	6	6
	C_{max}（mU/mL）				
	妊娠 7 日	NE	656	1830	3310
	妊娠 16 日	NE	867	2100	4540
	AUC_{0-t}（mU･h/mL）				
	妊娠 7 日	NE	35900	96300	183000
	妊娠 16 日	NE	311400	110000	229000
	抗 EZN-2279 及び抗 PEG 抗体測定				
	妊娠 7 日	Neg	Neg	Neg	Neg
	妊娠 16 日	Neg	Neg	Neg	Neg

NE：実施せず、Neg：陰性

a）高速液体クロマトグラフィー法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）

2.6.7.8.1 EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）

投与量（U/kg）		0（対照）	100（48）[a)]	300（143）[a)]	500（238）[a)]
母体	妊娠動物数	8	8	8	8
	死亡及び瀕死動物数	0	0	0	0
	流産又は全胚吸収母動物数	0	0	0	0
	一般状態	-	-	-	-
	体重（g） 妊娠 21 日	381.9	379.9	382.4	365.8
	体重増加量（g） 妊娠 7～21 日	147.8	145.0	147.6	137.8
	摂餌量（g） 妊娠 7～21 日の 1 日平均	25.6	25.2	25.0	24.9
	剖検	-	-	-	-
	平均黄体数	13.5	12.8	12.0	11.9
	平均着床数	12.8	12.4	11.9	11.3
	平均着床前胚損失率（%）	5.39	3.01	1.39	4.89

-：特記すべき所見なし

a）高速液体クロマトグラフィー法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）

2.6.7.8.1 EZN-2279 のラットにおける胚・胎児発生に関する試験（続き）

投与量（U/kg）		0（対照）	100（48）[a)]	300（143）[a)]	500（238）[a)]
胎児	評価母動物数	8	8	8	8
	生存胎児数	12.4	12.1	11.6	10.8
	平均吸収胚数	0.4	0.3	0.3	0.5
	死亡胎児を有する母動物数	0	0	0	0
	平均胚・胎児死亡率（%）	2.96	2.08	2.60	5.06
	平均胎児体重（g）	5.976	5.735	5.886	6.051
	胎児の性比：雄（%）	51.04	52.98	42.11	51.10
	胎児の異常				
	外表異常	0	0	0	0
	内臓異常				
	眼小型化				
	胎児数（%）	0	0	0	1（2.4）
	母動物数（%）	0	0	0	1（12.5）
	骨格異常				
	頬骨弓不完全骨化				
	胎児数（%）	0	0	1（2.0）	6（13.3）
	母動物数（%）	0	0	1（12.5）	3（37.5）

a）高速液体クロマトグラフィー法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）

2.6.7.9 その他の毒性試験

2.6.7.9.1 不純物に関する試験

被験物質：EZN-2279

動物種：ラット/SD 系	投与期間：4 週間（週 2 回投与）	試験番号：15-2483/STPI130260A
試験開始週齢：9 週齢（投与開始時）	休薬期間：4 週間	CTD における記載箇所：4.2.3.7.6
初回投与年月日：[redacted]年[redacted]月[redacted]日	投与方法：筋肉内	GLP 適用：適
特記事項：抗 EZN-2279 抗体測定を実施	溶媒/投与形態：pH 6.9 のリン酸塩緩衝液	
無毒性量：500 U/kg		

投与量（U/kg）	0（対照）		500（不純物 A を含まない）		500（10% 不純物 A 含有）	
動物数	M：15	F：15	M：15	F：15	M：15	F：15
トキシコキネティクス [a)]、[b)]						
C_{max}（mU/mL）投与 1 日目	BLQ	BLQ	2540	4130	3660	4600
C_{max}（mU/mL）投与 25 日目	BLQ	BLQ	6150	7960	5840	8970
$AUC_{0\text{-}72h}$（mU･h/mL）投与 1 日目	BLQ	BLQ	139000	186000	184000	224000
$AUC_{0\text{-}72h}$（mU･h/mL）投与 25 日目	BLQ	BLQ	383000	451000	371000	481000
$AUC_{0\text{-}336h}$（mU･h/mL）投与 25 日目	BLQ	BLQ	683000	773000	674000	862000
抗 EZN-2279 抗体測定 [b)]、[c)]、[d)]						
投与 28 日目　single-tier assay [e)]	0/3	0/3	4/9	2/9	5/9	1/9
two-tier assay [f)]	NE	NE	1/9	1/9	1/9	0/9
中和抗体 [d)]	0/3	0/3	1/9	0/9	1/9	0/9
休薬期間終了時　single-tier assay [e)]	0/3	0/3	2/5	0/5	4/5	1/5
two-tier assay [f)]	NE	NE	1/5	1/4 [g)]	0/5	0/5
中和抗体 [d)]	0/3	0/3	0/5	0/5	0/5	0/5

NE：実施せず、BLQ：定量下限未満、M：雄、F：雌

a）トキシコキネティクスのための最終採血ポイント：最終投与後 2 週間

b）[redacted]トキシコキネティクス及び抗 EZN-2279 抗体測定について再試験を実施した。当該再試験用に対照群に 3 匹/性、被験物質投与各群に 9 匹/性を追加した。

c）抗 EZN-2279 抗体測定のための最終採血ポイント：休薬期間終了時
d）Module 2.6.5 参照
e）Single-tier assay による抗 EZN-2279 抗体測定は [redacted] で実施した。
f）Two-tier assay による抗 EZN-2279 抗体測定は [redacted] で実施した（GLP 非適用）。
g）測定実施可能な検体数で実施した。

2.6.7.9.1 不純物に関する試験（続き）

投与量（U/kg）	0（対照）		500（不純物 A を含まない）		500（10% 不純物 A 含有）	
動物数	M：15	F：15	M：15	F：15	M：15	F：15
特記すべき所見						
死亡数	0	0	0	0	0	0
一般状態	-	-	-	-	-	-
体重	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-	-	-	-	-	-
眼科学的検査	-	-	-	-	-	-
血液学的検査	-	-	-	-	-	-
凝固検査	-	-	-	-	-	-
血液生化学的検査	-	-	-	-	-	-
尿検査	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-
剖検	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査 a)	-	-	-	-	-	-
回復性の評価						
評価動物数	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5
特記すべき所見なし	5	5	5	5	5	5

M：雄、F：雌

a）投与部位の病理組織学的検査のためのサンプリングが適切に実施されなかったため、投与部位の病理組織学的検査について再試験を実施した。

2.6.7.9.1 不純物に関する試験（続き）

投与量（U/kg）	0（対照）		500（不純物 A を含まない）		500（10% 不純物 A 含有）	
投与部位の病理組織学的検査						
評価動物数	M：5	F：5	M：5	F：5	M：5	F：5
慢性活動性炎症　軽微 軽度	3/5 0/5	4/5 1/5	4/5 1/5	3/5 0/5	3/5 1/5	3/5 0/5
筋線維変性/壊死　軽微	2/5	3/5	1/5	5/5	2/5	1/5
筋線維再生　軽微 軽度	0/5 0/5	2/5 1/5	1/5 0/5	1/5 0/5	0/5 0/5	2/5 0/5
毛幹肉芽腫　軽微	0/5	2/5	0/5	1/5	0/5	1/5
表皮過形成　軽微	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
皮膚線維化　軽微	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
回復性の評価						
評価動物数	M：3	F：3	M：3	F：3	M：3	F：3
慢性活動性炎症　軽微	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
筋線維再生　軽微	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3
毛幹肉芽腫　軽微	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
皮膚線維化　軽微	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3

M：雄、F：雌

2.6.7.10 ADAGEN®の米国申請時に実施された毒性試験

被験物質：PEG-ADA

動物種/系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量（U/kg）	性別及び動物数/群	無毒性量（U/kg）	特記すべき所見	試験番号
マウス /Swiss-Webster	腹腔内（pH 7.3 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液）	単回	10000、50000	1M 1F	-	10000 U/kg 群で一過性の体重増加抑制が認められた。 50000 U/kg 群で軽度な体重減少が認められた。	10
マウス /Swiss-Webster	腹腔内（pH 7.3 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液）	2 週間（週 2 回投与）	0、200	5M 5F	200	なし	9
ラット/SD 系	筋肉内（pH 7.3 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液）	2 ヵ月（4 週間又は 8 週間、週 1 回投与）	0、150、500	8M 8F	500	なし	25

M：雄、F：雌