アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
アリケイス吸入液 590 mg

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

インスメッド合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.1　緒言 4

図一覧

図 2.6.1-1　アミカシン硫酸塩の構造式 5

略号一覧表

略語・用語	内容
ALIS	Amikacin Liposome Inhalation Suspension : アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine：ジパルミトイルホスファチジルコリン
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia：欧州薬局方
FA	free amikacin:遊離型アミカシン（リポソーム非封入型アミカシン硫酸塩水溶液）
JP	Japanese pharmacopeia：日本薬局方
LAI	liposomal amikacin for inhalation：－（吸入用アミカシンリポソーム製剤）
M abscessus	*Mycobacterium abscessus*
M avium	*Mycobacterium avium*
MAC	*Mycobacterium avium* complex
NTM	nontuberculous mycobacteria：非結核性抗酸菌
pH	potential of hydrogen：水素イオン指数
SLIT	Sustained release Lipid Inhalation Targeting
USP	United States Pharmacopeia：米国薬局方

2.6.1　緒言

アミカシンリポソーム吸入用懸濁液（ALIS）は、以前は Arikace™、Sustained release Lipid Inhalation Targeting™（SLIT™）Amikacin 又は Liposomal Amikacin for Inhalation（LAI）と称されていた。

ALIS 製剤は、アミカシン（70 mg/mL）封入リポソーム製剤である。リポソームはジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）とコレステロールから成り、その他の製剤中添加剤として塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム（pH 調整用）及び注射用水を含有する。投与はラミラネブライザを用いた吸入投与によって行われる。ALIS は、1 回量としてアミカシン 590 mg を含む透明ガラスバイアル（容量 10 mL）で供給される。ALIS の製剤開発については 3.2.P.2 項に記載する。

アミカシンは、カナマイシン由来の半合成アミノグリコシド系抗生物質であり、感受性細菌のリボソーム 30S サブユニットに結合することによりタンパク質合成を阻害することで抗菌作用を発揮する。

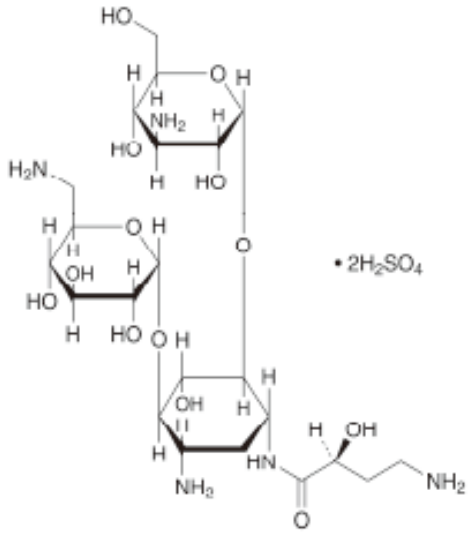
アミカシンの化学名は以下のとおりである。

- 日本薬局方（JP）：
  3-Amino-3-deoxy-α-$_D$-glucopyranosyl-(1→6)-[6-amino-6-deoxy-α-$_D$-glucopyranosyl-(1→4)]-1-*N*-[(2*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-$_D$-streptamine disulfate
- 欧州薬局方（Ph. Eur）：
  6-*O*-(3-Amino-3-deoxy-α-$_D$-glucopyranosyl)-4-*O*-(6-amino-6-deoxy-α-$_D$-glucopyranosyl)-1-*N*-[(*2S*)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-$_D$-streptamine sulfate
- 米国薬局方（USP）：
  6-*O*-(3-Amino-3-deoxy-α-$_D$-glucopyranosyl)-4-*O*-(6-amino-6-deoxy-α-$_D$-glucopyranosyl)-1-*N*-[(*2S*)-4-amino-2-hydroxybutanoyl]-2-deoxy-$_D$-streptamine sulfate
- IUPAC
  (2*S*)-4-amino-*N*-[(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-amino-2-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-4-amino-3,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-4-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(aminomethyl)-3,4,5-trihydroxy-oxan-2-yl]oxy-3-hydroxy-cyclohexyl]-2-hydroxy-butan-amide, sulfate (1:2 salt)

CAS 登録番号：39831-55-5

アミカシン硫酸塩の化学構造式を図 2.6.1-1 に示す。

図 2.6.1-1　アミカシン硫酸塩の構造式



ALIS は、アミカシンの殺菌作用に加え、喀痰／バイオフィルムから成るマトリックス中への浸透力により有効成分であるアミカシンの感染部位への供給能が高く、また、ヒトマクロファージへの取り込みが遊離型アミカシン（FA）に比べ 4 倍良好であることから、*Mycobacterium avium* complex（MAC）を起因菌とする成人肺非結核性抗酸菌（NTM）症患者に対する多剤併用療法薬の一つとして、有効性が高く重要な治療選択肢になり得ることが期待される。

3 種類の *M. avium* 菌株を感染させた接着性ヒト単核マクロファージを用いた *in vitro* 試験において、ALIS はすべての菌株に対して FA よりも高い殺菌性を示した。また、*in vivo* 試験において、雌マウスにおける肺マクロファージの *M. avium* 感染に対する吸入 ALIS の非常に高い効果が認められ、FA 吸入投与に比べて高い *M. avium* の完全除菌効果が認められた。培養ヒトマクロファージを用いた試験では、ALIS のマクロファージへの取り込みは FA に比べ 4 倍高いことが示された。*In vivo* での肺マクロファージへの取り込みを評価した試験では、ラットに ALIS を吸入投与後の気管支肺胞洗浄細胞中アミカシン濃度は、FA 吸入投与時の 5～8 倍高かったが、アミカシンの肺沈着量には群間で差は認められなかった。

また、日本人被験者を含む第Ⅲ相国際共同臨床試験（INS-212 試験、INS-312 試験）において、ALIS は、投与 6 ヵ月目までの喀痰培養陰性化を示し、投与終了後 3 ヵ月までの培養陰性化の持続により、臨床的有効性が示された（2.7.3 項参照）。

申請適応菌種、適応症及び用法・用量に関する情報を以下に示す。

【効能・効果】　<u>適応菌種</u>
アミカシンに感性のマイコバクテリウム・アビウムコンプレックス（MAC）
<u>適応症</u>
マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス（MAC）による肺非結核性抗酸菌症

【用法・用量】　通常、成人には 1 回 1 バイアル（アミカシンとして 590 mg）を 1 日 1 回本剤専用の吸入用器具を用いて吸入投与する。

アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
アリケイス吸入液 590 mg

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

インスメッド合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 リポソーム製剤化によるマクロファージへのアミカシン取り込み増加 7
2.6.2.2.2 *M avium* 及び *M abscessus* 感染マクロファージに対する ALIS の *in vitro* 殺菌作用 9
2.6.2.2.3 肺 *Mycobacterium avium* 感染マウス（C57Bl/6 系）に対する ALIS 反復吸入投与の効果 9
2.6.2.3 副次的薬理試験 12
2.6.2.3.1 CF 患者由来喀痰サンプルに対するリポソーム浸透能 12
2.6.2.4 安全性薬理試験 12
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 14
2.6.2.6 考察及び結論 14
2.6.2.7 参考文献 15

表一覧

表 2.6.2-1 薬理試験の一覧 5
表 2.6.2-2 *M avium* 感染マクロファージに ALIS、FA 又は空リポソームを 4 日間作用させたときの *in vitro* 殺菌作用 9
表 2.6.2-3 肺 *Mycobacterium avium* 感染マウスに対する ALIS 反復吸入及びアミカシン腹腔内投与の効果（試験デザイン） 10

図一覧

図 2.6.2-1 ALIS 又は FA で処理した時のマクロファージのアミカシン取り込み 7
図 2.6.2-2 ラットに ALIS 又は FA を吸入投与した際の BAL 細胞、BAL 液、肺及び血漿中アミカシン取り込み量の推移 8
図 2.6.2-3 肺 *M.avium* 感染マウスに ALIS 反復吸入又はアミカシン腹腔内投与後の肺内生菌数（Log_{10} CFUs） 10

略号一覧表

略語・用語	内容
ALIS	Amikacin Liposome Inhalation Suspension : アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to time of last measurable concentration : 最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BAL	bronchoalveolar lavage：気管支肺胞洗浄
CF	cystic fibrosis：嚢胞性線維症
CFU	colony forming units：コロニー形成単位
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine：ジパルミトイルホスファチジルコリン
ELC	empty liposomes control：空リポソーム対照
FA	free amikacin : 遊離型アミカシン（リポソーム非封入型アミカシン硫酸塩水溶液）
IP	Intraperitoneal：腹腔内
LAI	liposomal amikacin for inhalation：－（吸入用アミカシンリポソーム製剤）
M abscessus	*Mycobacterium abscessus*
M avium	*Mycobacterium avium*
MAC	*Mycobacterium avium* complex
NTM	nontuberculous mycobacteria：非結核性抗酸菌
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
pH	hydrogen ion concentration：水素イオン指数
Q1D	once daily：1 日 1 回
Q2D	every other day：隔日
SD	standard deviation：標準偏差
SLIT™	Sustained release Lipid Inhalation Targeting™
TAMRA	tetramethylrhodamine：テトラメチルローダミン
THP-1	Tamm-Horsfall Protein 1

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

アミカシンリポソーム吸入用懸濁液（ALIS）は、マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス（MAC）による肺非結核性抗酸菌（NTM）症を適応症とする、噴霧による吸入投与用の無菌水性リポソーム懸濁液である。ALIS は NTM の治療過程を通じて連日投与される。申請する用法用量は、承認された年齢層の患者で体重に関係なく同一で、70 mg/mL 10 mL バイアル 1 本（遊離塩基換算でのアミカシン含有量は 590 mg）がラミラネブライザを用いて 1 日 1 回吸入投与される。

ALIS は、以前、Arikace™、Sustained release Lipid Inhalation Targeting™ （SLIT™）Amikacin 又は Liposomal Amikacin for Inhalation（LAI）と呼ばれていたが、本資料中では、一部の試験タイトルやグラフを除き ALIS と表記する。また、ALIS に含まれるアミカシン硫酸塩をアミカシンと、また、リポソーム非封入型アミカシン硫酸塩水溶液を遊離型アミカシン（FA）と表記する。特に記載がない限り、用量及び濃度は遊離塩基（例えば、アミカシン）として示されている。

ALIS は 70 mg/mL アミカシン封入リポソーム製剤である。本リポソームは内因性物質であるジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）とコレステロール（[redacted]）からなり、また、他の添加剤として塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム（pH 調整用）、及び注射用水を製剤中に含有する。アミカシンは、カナマイシン由来の半合成アミノグリコシド系抗生物質であり、リボソーム 30S サブユニットに不可逆的に結合することにより感受性細菌のタンパク質合成を阻害し、殺菌作用を発揮する。

ALIS の臨床使用を裏付ける試験として、非臨床薬理プロファイルを *in vitro* 又は *in vivo* で検討した（表 2.6.2-1）。一部の試験では、市販予定の製剤と成分濃度や脂質／薬物比が異なるすでに開発を中止した旧製剤を用いたが、両製剤は同一の有効成分と添加剤（アミカシン、DPPC、コレステロール、塩化ナトリウム）を含有するため、試験の結果は市販予定の製剤（70 mg/mL アミカシン）と関連があると考えられる。イヌを用いて安全性薬理を評価した 4 週間の GLP 毒性試験では、市販予定の ALIS 製剤を用いた。

表 2.6.2-1　薬理試験の一覧

Type of Study	Study Title (Report/Study Number/Final Report Date/ Location in Module 4)	Test System	Method of Administration
Primary Pharmacodynamics			
In vitro	Liposomal amikacin for inhalation enhances amikacin uptake into macrophages (VV-NC-000181, May 22, 2017 & Zhang et al, 2018, CTD 4.2.1.1-1)	Human macrophages (THP-1)	NA
In vivo	Amikacin liposome inhalation suspension enhances amikacin uptake into lung macrophages *in vivo* (VV-NC-000474, October 13, 2017 & Zhang et al, 2018, CTD 4.2.1.1-2)	Han-Wistar Rats	Inhalation
In vitro	Determination of the *In Vitro* Bactericidal Effect of Arikace™ Upon Phagocytized *Mycobacterium avium* ([redacted] ([redacted]) Report, April 14, 2010, CTD 4.2.1.1-3)	Human macrophages (THP-1) infected with *M avium*	NA
In vitro	Determination of the *In Vitro* Bactericidal Effect of Arikace™ Upon Phagocytized *Mycobacterium abscessus* (Rose et al, 2014, CTD 4.3)	Human macrophages (THP-1) infected with *M abscessus*	NA
In vivo	The Effect of Multiple Inhaled Doses of Amikacin Liposome Inhalation Suspension (Arikace™) on *Mycobacterium avium* Lung Infection of C57Bl/6 Mice ([redacted] Study Protocol #4257 ([redacted]-4257), February 4, 2013, CTD 4.2.1.1-4)	C57Bl/6 Mice	Inhalation
Secondary Pharmacodynamics			
In vitro	Penetration of Liposomes into a Sputum Sample of a Cystic Fibrosis Patient (AMIK-BRD-2007-01-PC, 09 January 2007, CTD 4.2.1.2-1)	Fluorescently labeled liposomes and sputum from a CF patient	NA
Safety Pharmacology			
In vivo	SLIT™: 30-Day Inhalation Toxicity Study of SLIT™ Amikacin in Dogs with a 30-Day Recovery Period (27657/Charles River Study 667574, 11, July 2007, CTD 4.2.1.3-1)	Beagle Dogs	Inhalation

NA = not applicable

マクロファージに分化させたヒト THP-1 細胞を用いたアミカシン取り込み能の検討で、ALIS では FA よりもアミカシンの取り込み量が 4 倍高いことが示された。また、ラットに ALIS を吸入投与した 2、6 及び 24 時間後の肺胞マクロファージ内アミカシン濃度は、同程度の肺沈着量を示す用量の FA を吸入投与した時と比較して 5～8 倍高かった。更に、FA 高用量群との比較では、ALIS 群のアミカシン肺沈着量が 1/2 程度であったにも関わらず、肺胞マクロファージ内アミカシン濃度が 4～6 倍高かった。

THP-1 細胞を *M avium* 3 株又は *M abscessus* 2 株に感染（1 時間共培養）させた翌日から 1 日 1 回 4 日間、ALIS（1～10 μg/mL アミカシン）、FA（10 μg/mL）又は空リポソーム対照（ELC）で処置した結果、ALIS は最高濃度（10 μg/mL アミカシン）において、使用した全ての *M avium* 株及び *M abscessus* 株に対して FA より優れた殺菌作用を示したが、THP-1 細胞に対し細胞毒性を示さなかった。ECL 群では抗菌作用は認められなかった。

MAC が肺マクロファージで生存及び複製する機能があるのに対し、ALIS はマクロファージ内に内在化する MAC に対して殺菌性であったことから、*in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果は、MAC 肺感染症の治療に強く関連付くものである。

ALIS の殺菌作用は *in vivo* NTM モデルでも認められた。吸入 ALIS（70 mg/mL アミカシン）は、

非結核性抗酸菌（NTM）モデル（C57Bl/6 雌マウス）の *M avium* 肺感染に対して有効であることが示された。*M avium* の臨床分離株（strain 104）をマウスに吸入（鼻腔内注入）感染させ、肺マクロファージ感染を生じさせた。感染 3 週間後から 1.5%食塩水又は ALIS を最長 28 日間吸入投与、又は FA を 1 日 1 回、28 日間反復腹腔内投与した。投与開始時の平均肺内生菌数は 0.7×10^5 CFU/肺であった。各群の肺内生菌数（$\log_{10}$ コロニー形成探知［CFU］／肺±標準偏差［SD］）を以下に示す。

- 第 1 群：1.5%食塩水（第 1 群）：4.1 ± 0.9
- 第 2 群：ALIS 76 mg/kg Q1D × 28 日間投与（第 2 群、総投与量 2128 mg/kg)：1.6 ± 1.1
- 第 3 群:ALIS 152 mg/kg Q1D × 14 日間投与後､2 週間休薬(第 3 群､総投与量 2128 mg/kg): 2.3 ± 0.8
- 第 4 群：ALIS 152 mg/kg 隔日（Q2D） × 28 日間投与（第 4 群、総投与量 2128 mg/kg)：1.3 ± 1.2
- 第 5 群：FA 100 mg/kg Q1D × 28 日間投与（第 5 群、総投与量 2800 mg/kg)：2.1 ± 1.7

アミカシン投与群はいずれも、1.5%食塩水投与群と比較して統計学的に有意な効果が認められた。第 2 群及び第 4 群は、他のアミカシン投与群よりも優れた効果を示しており、最大で 42%のマウスで *M avium* の完全除菌が認められた（第 4 群)。この結果から､肺マクロファージの *M avium* 感染に対する ALIS の高い有効性が示された。

副次的薬理試験では、*in vitro* において ALIS リポソームが嚢胞性線維症（CF）患者の喀痰サンプルに 24 時間で十分浸透することが示された。

独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、ALIS の心血管系、呼吸系に及ぼす影響について、イヌを用いた 1 ヵ月反復投与毒性試験の中で評価したところ、最大 31 mg/kg/日投与しても、心拍数、心電図データ（PR、QRS、QT、QTc)、呼吸数、1 回換気量及び毎分換気量に対する影響は認められなかった。なお、ALIS 反復投与毒性試験において気道以外の器官に対して投与関連の影響がみられなかったことから、他の安全性薬理試験は実施しなかった。肺局所への送達により ALIS 吸入投与時の全身曝露量はアミカシン静脈内投与時に比べ低いこと、さらにその持続的な放出特性から、ALIS は生命維持に関与する器官系に対して重大な副作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

以上、ALIS は *M avium* 又は *M abscessus* 感染ヒトマクロファージに対し FA より高い殺菌作用を示し、*M avium* の臨床分離株を感染させたマウスの肺 NTM モデルに対し優れた有効性を示した。また、ALIS はイヌの呼吸系及び心血管系パラメータのいずれにも影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

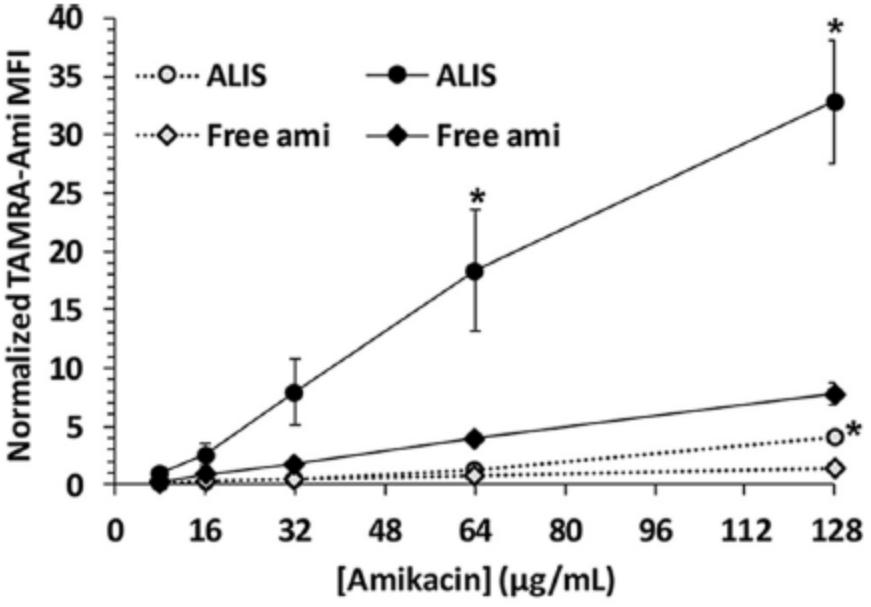
2.6.2.2.1　リポソーム製剤化によるマクロファージへのアミカシン取り込み増加

- *In vitro* での検討

VV-NC-000181 試験、Zhang, 2018、CTD 4.2.1.1-1

ヒトマクロファージによるアミカシン取り込み能を ALIS 及び FA を用いて *in vitro* で検討した。テトラメチルローダミン（TAMRA）標識アミカシンを含有する ALIS を、ALIS の製造工程と同様の封入法を用いて作製し、非標識アミカシン含有の ALIS と同様の粒子径、組成を有するアミカシン封入体を得た。ヒト単球系 THP-1 細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）刺激によりマクロファージへと分化させ、8～128 µg/mL の ALIS 及び FA と 4 又は 24 時間インキュベートした後、フローサイトメトリー法により細胞内へのアミカシン取り込み量を測定した。質量分析法を用いた予備的検討において、TAMRA 標識はマクロファージのアミカシン取り込み能に影響を及ぼさないことが確認されている。ALIS 処置では FA 処置と比較してアミカシン取り込み量が高値を示し、24 時間インキュベート後の標識アミカシン取り込み量は FA の約 4 倍であった。また、蛍光顕微鏡を用いた評価においても、FA と比較して ALIS とインキュベートしたマクロファージでより多くの TAMRA 由来蛍光が確認された。以上のことから、検討した濃度範囲において、ヒトマクロファージによるアミカシンの取り込みは、FA とインキュベートした場合より、リポソーム化した製剤である ALIS とインキュベートした方が高くなることが示された。

図 2.6.2-1　ALIS 又は FA で処理した時のマクロファージのアミカシン取り込み



MFI = mean fluorescence intensity.
THP-1 cells differentiated into macrophages were exposed to increasing concentrations of either ALIS or free amikacin (0.44% labeled with TAMRA) for 4 h (gray symbols) or 24 h (black symbols) and, cell monolayers were resuspended, then cellular TAMRA fluorescence was quantified by flow cytometry.
*$P < 0.05$ vs. free amikacin at the same concentration and timepoint (Tukey post-test).
Source: Zhang, 2018

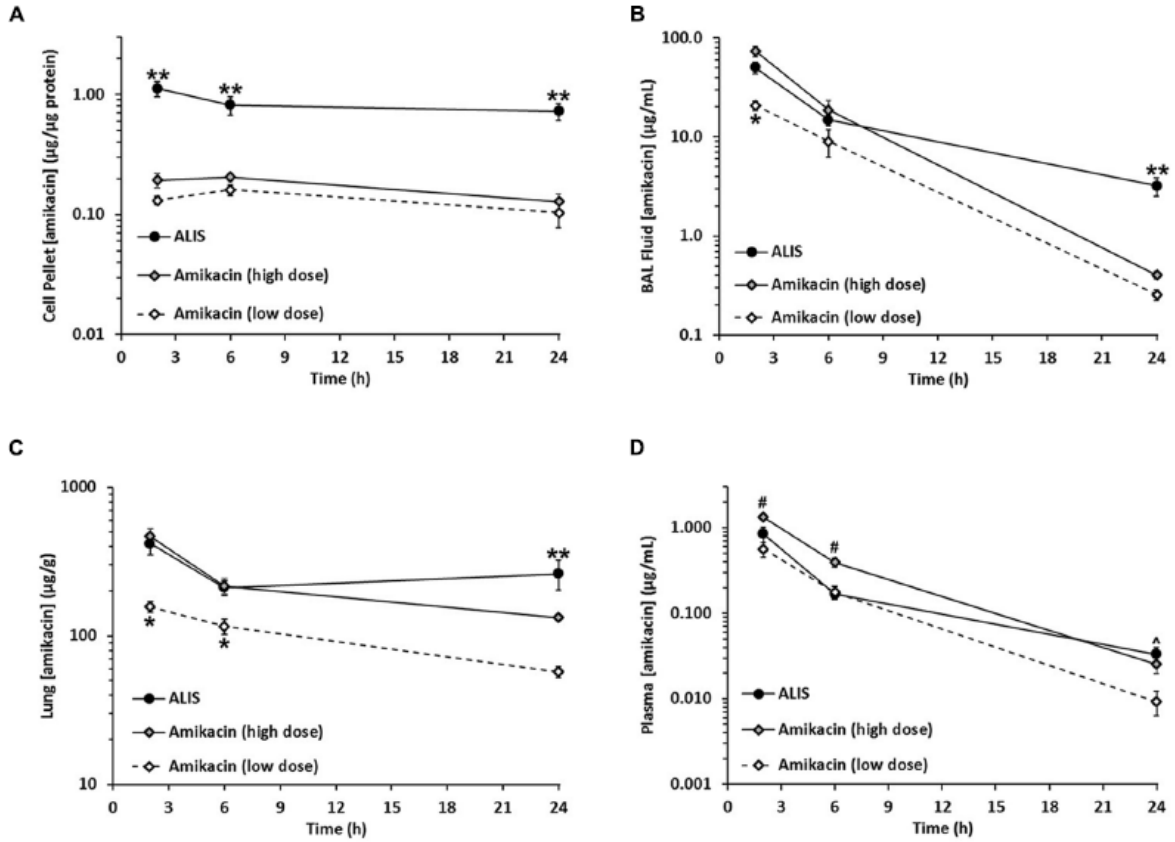
- *In vivo* での検討

VV-NC-000474 試験、Zhang, 2018、CTD 4.2.1.1-2

ラットに ALIS 及び FA をネブライザーを用いて吸入投与したときの、肺胞マクロファージによるアミカシン取り込み量を比較検討した。BAL 細胞中のマクロファージの確認をフローサイトメトリー法で行った結果、その割合は 80%以上であった。ALIS 投与 2、6 及び 24 時間後の BAL 細胞内アミカシン濃度は、FA 低用量群と比較して 5～8 倍高かったが、肺沈着量には両群間で有意差はみられなかった。また、FA 高用量群との比較では、アミカシン肺沈着量が 1/2 程度であったにも関わらず、BAL 細胞内アミカシン濃度は 4～6 倍高く、ALIS 投与 24 時間後の肺組織及び BAL 液中アミカシン濃度も FA 低及び高用量投与群と比較して高かった（図 2.6.2-2）。

以上のことから、*in vivo* において、ALIS の吸入投与では FA の吸入投与と比較して肺胞マクロファージへのアミカシン取り込みが高くなることが示され、また、FA 投与では ALIS 投与に匹敵するマクロファージ内アミカシン濃度を得るには不十分であることが示唆された。

図 2.6.2-2　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与した際の BAL 細胞、BAL 液、肺及び血漿中アミカシン取り込み量の推移



Rats were administered either ALIS or free amikacin by nebulization and BAL cells (representing >80% macrophages) (A), BAL fluid (B), lungs (C), and plasma (D) were collected at 2, 6, or 24 h after the end of nebulization. Amikacin concentrations were quantified by LC-MS/MS.
n = 8 rats per group.
**P* < 0.05 vs. both high-dose amikacin and ALIS groups. ***P* < 0.05 vs. both low and high-dose amikacin groups. #*P* < 0.05 vs. both ALIS and low-dose amikacin groups. ^*P* < 0.05 vs. the low-dose amikacin group (Tukey post-test).
Source: Zhang, 2018

2.6.2.2.2 *M avium* 及び *M abscessus* 感染マクロファージに対する ALIS の *in vitro* 殺菌作用

[redacted]（[redacted]）試験、Rose, 2014、CTD 4.2.1.1-3

マクロファージに感染している NTM に対する ALIS の殺菌作用について、THP-1 細胞を用いて検討した。PMA 刺激により接着性マクロファージに分化させた THP-1 細胞に 3 種の *M avium* 株（MAC 104、A5、及び MAC 3388）又は 2 種の *M abscessus* 株（Ma 26 及び Ma 36）を感染（1 時間共培養）させた翌日から、細胞を 1 日 1 回 4 日間、ALIS（1～10 µg/mL アミカシン）、FA（10 µg/mL）又は空リポソーム（ELC ; 脂質濃度 6.4 µg/mL）で処置した。5 日目に細胞を溶解し、溶解液を段階希釈して寒天平板プレートに塗布し、7～10 日後に CFU を測定し生菌数を求めた。

その結果、ELC は抗菌活性を示さなかった。ALIS は使用した全ての *M avium* 株及び *M abscessus* 株に対して濃度依存的な殺菌作用又は顕著な増殖抑制作用を示した。ALIS（10 µg/mL）は、いずれの *M avium* 株に対しても同濃度の FA と比較してより強力な殺菌作用を示した（5 日目で MAC 104 に対して FA 群の約 1.5 倍、A5 に対して FA 群の約 5.7 倍及び MAC 3388 に対して FA 群の約 2.1 倍の強さ ; 表 2.6.2-2）。同様に、*M abscessus* 株（2 種）に対しても ALIS（10 µg/mL）は、FA と比較してより強力な作用を示した（Rose, 2014）。なお、ALIS は THP-1 細胞に対し細胞毒性を示さなかった。以上、ALIS は *M avium* 又は *M abscessus* 感染マクロファージにおいて FA よりも優れた *in vitro* 殺菌作用を示した。

表 2.6.2-2　*M avium* 感染マクロファージに ALIS、FA 又は空リポソームを 4 日間作用させたときの *in vitro* 殺菌作用

***M avium* Strain**	**Test Substance**	**Amikacin Concentration (µg/mL)[a]**	**No. of Active Bacteria Recovered (× 10^4)[c]**
MAC 104	Control (Media)	0	260 ± 20
	Empty Liposomes	0	250 ± 60
	FA	10	6.7 ± 0.5
	ALIS	10	4.6 ± 0.6
A5	Control (Media)	0	310 ± 30
	Empty Liposomes	0	320 ± 10
	FA	10	12 ± 2
	ALIS	10	2.1 ± 0.4[b]
MAC 3388	Control (Media)	0	210 ± 20
	Empty Liposomes	0	190 ± 30
	FA	10	9.2 ± 0.4
	ALIS	10	4.4 ± 0.3[b]

FA = Free Amikacin; ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension.
[a] Limited to data at 10 µg/mL amikacin concentrations (ALIS or FA).
[b] Statistically significant difference ($P < 0.05$) compared to FA (Mann-Whitney non-parametric test).
[c] Mean ± SD.

2.6.2.2.3 肺 *Mycobacterium avium* 感染マウス（C57Bl/6 系）に対する ALIS 反復吸入投与の効果

[redacted]-4257 試験、CTD 4.2.1.1-4

本試験では *M avium* の臨床分離株（strain 104）を鼻腔内に注入し、肺感染症を惹起した雌性マウスにおける ALIS（70 mg/mL アミカシン）の殺菌効果を、FA を腹腔内（IP）投与したときの殺菌効果と比較した。抗酸菌注入から 21 日後、投与開始前の肺内 *M avium* 数は 0.7×10^5 CFU/肺であった。感染 3 週間後から 5 群（12 匹／群）のマウスに、1.5%食塩水もしくは ALIS を吸入により、又は FA を腹腔内（IP）に投与した（表 2.6.2-3）。

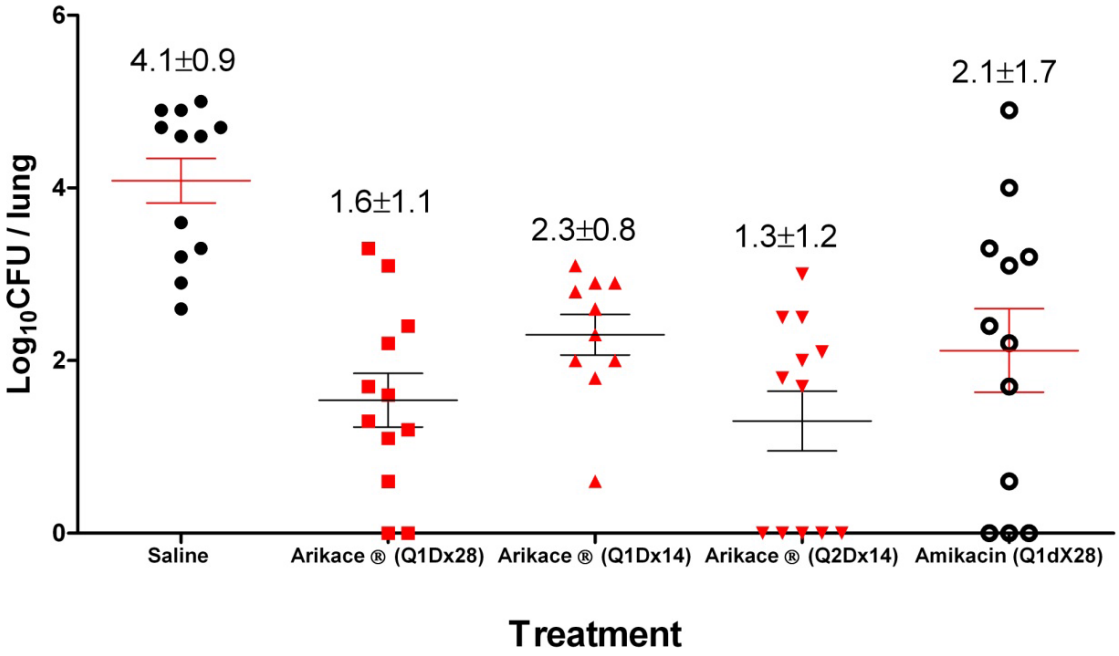
表 2.6.2-3　肺 *Mycobacterium avium* 感染マウスに対する ALIS 反復吸入及びアミカシン腹腔内投与の効果（試験デザイン）

Group No.	Test/Control Article	Dosing Schedule	Daily Amikacin Dose (mg/kg)	Total Amikacin Dose (mg/kg)	Post-Dose Period
1	1.5% saline	Daily inhalation × 1 h × 28 days	NA	NA	NA
2	ALIS	Daily inhalation × 1 h × 28 days	76	2128	NA
3	ALIS	Daily inhalation × 2 h × 14 days, followed by 14 days off drug	152	2128	14 days
4	ALIS	Every other day inhalation × 2 h × 14 days (Q2D x 14)	152	2128	NA
5	FA	Once daily IP injection × 28 days	100	2800	NA

FA = Free amikacin; h = hour; ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension; IP = intraperitoneal.; NA = not applicable, Q2D = every other day

ALIS の総投与量は、アミカシンとして 2128 mg/kg に統一し、対照群のアミカシン総投与量は 2800 mg/kg であった（ALIS 投与群より 32%高い用量）。試験開始後 28 日目に、すべてのマウスを安楽死させ、各マウスの肺あたりの細菌数を測定した。投与後、すべての群で 1.5%食塩水投与群との間に有意差（$P \leq 0.0002$、Dunn の多重比較検定）が認められた。各群の $\log_{10}$ CFU を図 2.6.2-3 に示す。

図 2.6.2-3　肺 *M.avium* 感染マウスに ALIS 反復吸入又はアミカシン腹腔内投与後の肺内生菌数（Log_{10} CFUs）



CFU = colony forming units; Q1D = once daily; Q2D = every other day. See Table 2.6.2-3 for complete dosing information. The symbols represent the Log_{10} CFUs/lung of each mouse after the 28-day study period. The horizontal and vertical lines represent the means and standard deviations. The numerical means and standard deviations are shown at the top of each column.

投与後、第 1、2、3、4 及び 5 群の肺内 *M avium* 数はそれぞれ 48.4%、99.5%、99.3%、99.8%及び 88.8%減少した。完全除菌が認められた動物の割合は、第 1、2、3、4 及び 5 群でそれぞれ 0%、17%、0%、42%及び 25%であった。全体として、ALIS 高用量隔日（第 4 群）は、低用量 1 日 1 回であるが 28 日間の試験期間における総投与量が同じ群（第 2 群）と同等の効果を発揮した。以上、ALIS は、*M avium* 肺感染モデルマウスにおいて優れた殺菌作用を示した。

2.6.2.3　副次的薬理試験

ALIS の反復投与毒性試験において、呼吸器系以外に変化がみられなかったため、追加の動物種を用いた呼吸器系以外の組織に関する副次的薬理試験は実施しなかったが、嚢胞性線維症（CF）患者から採取した喀痰サンプルへの ALIS 類似リポソームの浸透能を検討する試験を実施した。また、有効成分アミカシンの全身的投与による臨床使用経験は豊富であることからも薬理作用は十分に理解されている。ALIS が呼吸器系以外の組織に対して明らかな影響を及ぼさないのは、肺局所へ投与されること、FA よりも全身曝露量が低いこと、さらに徐放性であることによるものと考えられる。

2.6.2.3.1　CF 患者由来喀痰サンプルに対するリポソーム浸透能

AMIK-BRD-2007-01-PC 試験、CTD 4.2.1.2-1

この試験では、CF 患者から採取した喀痰サンプルへの ALIS 類似リポソームの浸透能について検討した。トランスウェルプレート（ポアサイズ 8 μm）の上層に約 1 mm 厚の喀痰層を作成し、ALIS リポソーム（約 0.2 μm）と同じ脂質組成でほぼ同サイズの蛍光標識リポソーム及び 0.2 μm 又は 1 μm の蛍光ポリスチレンビーズを含有する培養液を添加した。24 時間インキュベートした後、下層の蛍光量を測定して喀痰層を通過した蛍光体量を測定した。また、インキュベーション終了 30 分後に喀痰層を鏡検し、リポソーム及びビーズの浸透度を観察した。

その結果、喀痰層を通過した 1 μm ビーズは非常に少なかったが、ほとんどのリポソーム及び 0.2 μm ビーズは喀痰層を通過した。鏡検によってもわずか 30 分のインキュベーションで 1 μm ビーズよりも喀痰層のずっと深い位置までの浸透が確認された。

以上の結果より、ALIS リポソームは生理学的に意義があると考えられる時間でヒト喀痰内に十分浸透することが示唆された。

2.6.2.4　安全性薬理試験

[redacted]667574, Report No. 27657、CTD 4.2.1.3-1

ALIS の心血管系、呼吸器系に及ぼす影響について、イヌを用いた 1 ヵ月反復投与毒性試験の中で呼吸器系パラメータを評価し、心電図（ECG）を記録した。

イヌ（3 群、雌雄各 6 匹/群）にフェイスマスクを用いて ALIS（目標アミカシン投与量 5、15、50 mg/kg/日）を 1 日 1 回最長 60 分間吸入投与した。対照として 1.5%食塩水または ELC を、また、対照薬として FA（50 mg/kg/日）を高用量群と同じ時間投与した。実際に投与されたアミカシン投与量は、目標投与量よりも低く、ALIS 投与群で 4、10 及び 31 mg/kg/日、FA 投与群は 38 mg/kg/日と算出された。

呼吸数、1 回換気量及び毎分換気量を用いて呼吸器への影響を評価した。これらの呼吸器系パラメータへの影響は、最高用量である ALIS 31 mg/kg/日までの用量で認められなかった。このことから、ALIS が呼吸器系パラメータに重要な影響を与えないことが示された。

本試験（試験期間 1 ヵ月）では、最終投与の週に各動物の ECG を記録し、PR、QRS 及び QT 間隔並びに心拍数を評価した。QT 間隔は、Van Der Waters の補正式に従って心拍数で補正した QTc についても評価した。さらに、空のリポソーム対照群を食塩水対照群と比較した。空のリポソーム対照群及び ALIS 用量群では、投与関連の心電図異常は認められなかった。最高用量である 31 mg/kg/日での全身曝露（C_{max}）は、ヒトに 590 mg を投与した際の C_{max}（最大 2.42 μg/ mL）よりも高かった（雄、雌の 30 日目の C_{max} は共に 11.8 μg/mL）。

ALIS 反復投与毒性試験において気道以外の器官に対して影響がみられなかったことから、さらなる動物種を用いた安全性薬理試験は不要と考え、追加の安全性薬理試験は実施しなかった。安全性薬理を評価したイヌを用いた4週間のGLP毒性試験において、最高用量での全身曝露（AUC）は、ヒトの 590 mg 吸入投与時の AUC と類似していた（2.6.6.3.4 項）。さらに、本試験におけるこの最高用量での定常状態の肺への曝露は、臨床用量である 590 mg 吸入投与時のヒトの曝露よりも 12 倍高いと推定された。また、アミカシンは全身的投与による臨床使用経験が豊富で、その特徴も十分明らかになっている。以上のことから ALIS は、肺へ局所的に送達されること（ALIS 吸入投与時の喀痰中濃度は血清中濃度よりはるかに高い［2.7.2 項］）、アミカシンの非経口投与と比較して吸入時のアミカシンの全身曝露が低いこと（アミカシン静脈内投与時の $AUC_{0\text{-}24h}$ は ALIS 吸入投与時と比較して 10 倍以上高い［2.7.2 項］）、及び、ALIS の持続的な放出特性から、ALIS 投与により生理機能に対して重大な異常が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

ALIS の抗菌学的な相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6　考察及び結論

成人の MAC を起因菌とする NTM 患者に対する多剤併用療法の一環としての ALIS の臨床使用を支持することを目的に、*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

In vitro でマクロファージに分化させた THP-1 細胞に感染させた *M avium* 3 株又は *M abscessus* 2 株に対して、ALIS は殺菌作用又は増殖抑制作用を示した。10 µg/mL 濃度での比較で、ALIS は FA と比較して最大 5.7 倍（*M avium* A5 株）強い殺菌作用を示した。これは、ALIS 処置時のマクロファージによるアミカシンの取り込み量が FA 処置時よりも 4 倍高かったことと一致している。ALIS の *in vivo* での試験結果は *in vitro* の試験結果を反映していた。すなわち、NTM の臨床分離株である *M avium* 104 株の鼻腔内注入による肺感染マウスに、ALIS（70 mg/mL アミカシン）をアミカシンとして 76 mg/kg を 1 日 1 回 1 時間吸入 × 28 日間、152 mg/kg を 1 日 1 回 2 時間吸入 × 14 日間（投与後 14 日間休薬）、又は、152 mg/kg を隔日 1 回 2 時間吸入 × 28 日間の用法用量で投与した。また、FA を 100 mg/kg、1 日 1 回 × 28 日間 IP 投与した。その結果、各 ALIS 投与群の平均肺内 *M avium* 数は投与前に比較してそれぞれ 99.5%、99.3%、99.8%減少した。以上のように、高用量の隔日 1 回投与と低用量の 1 日 1 回で同等の効果が得られた。これらの結果から ALIS は、MAC 菌が粘膜下及び肺胞マクロファージに貪食されてその中で増殖することによって難治性となる（すなわち、MAC 菌がマクロファージ内に局在化する［Griffith, 2007］ことによって、抗菌剤の多くが菌への接触を制限される）感染症に対して有効であることが示された。

さらに副次的薬理試験において、リポソームは生理学的に意義があると考えられる時間でヒト喀痰内に十分浸透することが示された。この性質は、肺 NTM 感染症治療における ALIS の有効性に寄与するものと考えられる。

安全性薬理に関し、イヌを用いた ALIS の 1 ヵ月反復投与毒性試験において、呼吸器系及び心血管系パラメータに影響は認められなかった。

以上、実施した薬理試験の結果は、ALIS を肺 NTM 患者に使用するという我々の提案を支持するものであった。

2.6.2.7 参考文献

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175:367-416.

Rose SJ, Neville ME, Gupta R, Bermudez LE. Delivery of aerosolized liposomal amikacin as a novel approach for the treatment of nontuberculous mycobacteria in an experimental model of pulmonary infection. PLOS One 2014; 9:e108703.

Zhang J, Leifer F, Rose S, Chun DY, Thaisz J, Herr T, et al. Amikacin Liposome Inhalation Suspension (ALIS) penetrates non-tuberculous mycobacterial biofilms and enhances amikacin uptake into macrophages. Frontiers in Microbiology 2018; 9:1-12.

アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
アリケイス吸入液 590 mg

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3 薬理試験概要表

インスメッド合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 7
2.6.3.4 安全性薬理試験 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 9

略号一覧表

略語・用語	内容
ALIS	Amikacin Liposome Inhalation Suspension : アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
F	Female：雌性
FA	free amikacin:遊離型アミカシン（リポソーム非封入型アミカシン硫酸塩水溶液）
IP	intraperitoneal：腹腔内
M	Male：雄性
MAC	*Mycobacterium avium* Complex
M abscessus	*Mycobacterium abscessus*
M avium	*Mycobacterium avium*
Q1D	once daily：1 日 1 回
Q2D	every other day：隔日

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: ALIS

Type of Study	Test System	Method of Adminis tration	Testing Facility	Study/Report Number [a]	CTD Location
Primary Pharmacodynamics					
ALIS uptake into cultured human macrophages	Human macrophages[b]	*In vitro*	Insmed	VV-NC-000181; Zhang et al, (2018)	4.2.1.1.1
Amikacin uptake into pulmonary macrophages in rats given either ALIS or free amikacin by nebulization	Male Han-Wistar Rats	Inhalation	Insmed	VV-NC-000474; Zhang et al, (2018)	4.2.1.1.2
Bactericidal Effect of ALIS on phagocytized *Mycobacterium avium*	Human macrophages[b] infected with three *M avium* strains	*In vitro*	[redacted]	[redacted]	4.2.1.1.3
Bactericidal Effect of ALIS on phagocytized *Mycobacterium abscessus*	Human macrophages[b] infected with two *M abscessus* strains	*In vitro*	[redacted]	Rose et al, (2014)	4.3
The Effect of Multiple Inhaled Doses of ALIS on *Mycobacterium avium* Lung Infection of Mice	Female C57Bl/6 Mice	Inhalation	[redacted]	[redacted]-4257	4.2.1.1.4
Secondary Pharmacodynamics					
Penetration of Liposomes into a Sputum Sample of a CF patient	Fluorescently labeled liposomes and sputum from a CF patient	*In vitro*	Insmed	AMIK-BRD-2007-01-PC	4.2.1.2.1
Safety Pharmacology					
1-Month repeat-dose toxicity study including respiratory and ECG assessments	Dog/Beagle	Inhalation	[redacted]	667574	4.2.1.3.1
Pharmacodynamic Drug Interactions	No studies were conducted; see discussion in Module 2.6.2, Section 5 of the Pharmacology Written Summary				

ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension; CF = Cystic Fibrosis; *M abscessus* = *Mycobacterium abscessus*; *M avium* = *Mycobacterium avium*.

[a] Report numbers are used to identify each study. When report numbers were not available, the study protocol number is included.

[b] THP-1 cells differentiated into macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: ALIS

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study/Report Number [a]
In vitro	Human macrophages[b]	*In vitro*	8 - 128 µg Amikacin/mL	NA	Compared to free amikacin, ALIS significantly enhanced amikacin uptake into macrophages by ~4-fold following 24-hour incubation. Additionally, fluorescence microscopy clearly showed greater fluorescence in macrophages incubated with ALIS compared to free amikacin.	No	VV-NC-000181; Zhang et al, 2018
Lung	Rats/Han Wistar	Inhalation	ALIS – 96 mg Amikacin/kg; Free Amikacin (Low) – 67 mg Amikacin/kg; Free Amikacin (High) – 161 mg Amikacin/kg	M / 30	Lung deposition of amikacin was not different for ALIS and low-dose free amikacin, but it was 2-fold higher than ALIS for high-dose free amikacin. ALIS achieved 5- to 8-fold higher amikacin concentrations in pulmonary macrophages compared to low-dose free amikacin at 2, 6, and 24 hours post-dose, and 4- to 6-fold higher amikacin levels versus high-dose free amikacin. Rats in the ALIS group also retained higher amikacin concentrations in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid at 24 hours post-dose than rats in the low- and high-dose free amikacin groups.	No	VV-NC-000474; Zhang et al, 2018
In vitro	Human macrophages[b] infected with three *M avium* strains	*In vitro*	1-10 µg Amikacin/mL	NA	ALIS (70 mg/mL) at amikacin concentrations from 2-10 µg/mL showed statistically significant bactericidal activity (compared to culture media and empty liposome controls) against the A5 and MAC 3388 strains of *M avium*. At amikacin concentrations from 8-10 µg/mL, ALIS showed statistically significant bactericidal activity against the MAC 104 strain of *M avium*. Furthermore, ALIS was found to be approximately 1.5, 5.7, and 2.1 times more bactericidal than free amikacin at equivalent amikacin concentrations (10 µg/mL) against MAC 104, A5 and MAC 3388, respectively. Empty liposomes showed negligible antibacterial activity at a lipid concentration of 6.4 µg/mL.	No	[redacted]

ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension; F = Female; FA = Free Amikacin; IP = Intraperitoneal; M = Male; MAC = *Mycobacterium avium* Complex; *M abscessus* = *Mycobacterium abscessus*; *M avium* = *Mycobacterium avium*; NA = not applicable; NaCl = Sodium Chloride; Q1D = Once Daily; Q2D = Every Other Day.

[a] Report numbers are used to identify each study. When report numbers were not available, the study protocol number is included.

[b] THP-1 cells differentiated into macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: ALIS

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study/Report Number [a]
In vitro	Human macrophages[b] infected with two *M abscessus* strains	*In vitro*	1-10 µg Amikacin/mL (ALIS) 10 µg Amikacin/mL (FA) Empty liposomes	NA	Macrophages infected with the *M abscessus* strains Ma 36 and Ma 26 were treated with both free amikacin and ALIS leading to the killing of the intracellular bacteria. ALIS at 10 µg/mL was significantly more effective than free amikacin for both strains.	No	Rose et al, (2014)
Lung	Mice / C57Bl/6	Inhalation (ALIS) or IP (FA)	1.5% NaCl; ALIS 76 mg/kg (daily × 28 days); ALIS 152 mg/kg (daily × 14 days followed by 2 weeks off drug); ALIS 152 mg/kg (every other day × 28 days); FA 100 mg/kg (daily × 28 days)	F / 12	Daily doses of ALIS (70 mg/mL) effectively reduced *M avium* in the lungs of mice. Complete eradication of *M avium* in lungs was highest in the group receiving 152 mg/kg Q2D for 28 days (42%) compared to the group receiving amikacin IP 100 mg/kg Q1D for 28 days (25%); mice received approximately 25% less amikacin daily by inhalation compared to IP administration. Overall, the schedule of administering a higher dose of ALIS (152 mg/kg) every other day was similar in efficacy to a lower dose (76 mg/kg) given daily, while achieving the same total dose administered over a 28-day period (ie, 2128 mg/kg).	No	[redacted]-4257

ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension; F = Female; FA = Free Amikacin; IP = Intraperitoneal; M = Male; MAC = *Mycobacterium avium* Complex; *M abscessus* = *Mycobacterium abscessus*; *M avium* = *Mycobacterium avium*; NA = not applicable; NaCl = Sodium Chloride; Q1D = Once Daily; Q2D = Every Other Day.

[a] Report numbers are used to identify each study. When report numbers were not available, the study protocol number is included.

[b] THP-1 cells differentiated into macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate.

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: ALIS

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study/Report Number [a]
In vitro	Fluorescently labeled liposomes and sputum from a CF patient	*In vitro*		NA	The majority of fluorescently labeled liposomes with the same lipid composition and nearly the same average size as ALIS liposomes (0.2 µm) traversed a layer of human sputum (approximately 1 mm thick) compared to only a small percentage of 1 µm polystyrene beads over 24 hours. Polystyrene beads close to the average size of ALIS liposomes (0.2 µm) also penetrated the sputum layer. Microscopic evaluation also showed extensive penetration of liposomes after a 30-minute incubation period. These data suggest that substantial penetration of liposomes similar to ALIS can occur on a physiologically relevant time scale.	No	AMIK-BRD-2007-01-PC

ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension; CF = Cystic Fibrosis. NA = not applicable.
[a] Report numbers are used to identify each study. When report numbers were not available, the study protocol number is included.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: ALIS

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)/ Concentrations	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study/Report Number [a]
Pulmonary and Cardiovascular Systems	Dog/Beagle	Inhalation	0 (1.5% NaCl); 0 (Empty Liposome Control); 50 (FA); 5, 15, 50 (ALIS) Achieved Doses 38 (FA) and 4, 10, and 31 for ALIS Animals dosed for 30 days	6M/6F	Respiratory function parameters (respiration rate, tidal volume, and respiratory minute volume) and electrocardiographic evaluations (heart rate and PR, QRS, QT, and QTc intervals): no findings at daily doses up to 31 mg/kg of ALIS, the highest dose employed. Mean C_{max} at 31 mg/kg/day was 11.8 µg/mL on Day 30 in both males and females, respectively.	Yes	667574

ALIS = Amikacin Liposome Inhalation Suspension; F = Female; FA = Free Amikacin; M = Male; NaCl = Sodium Chloride; PR = pulse rate; QRS = the name for the combination of three of the graphical deflections seen on a typical electrocardiogram (EKG or ECG).

[a] Report numbers are used to identify each study. When report numbers were not available, the study protocol number is included.

2.6.3.5　　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。