サノフィ株式会社

アバルグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 29

目　　次

2.4 非臨床試験の概括評価 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 4

略号と用語の定義 5

1　　非臨床試験計画概略 6

1.1　　ポンペ病における酵素補充療法に関する背景の要約 6

1.2　　GAA ノックアウト（GAAKO）マウスモデル 7

1.3　　試験計画 7

2　　薬理試験 10

2.1　　効力を裏付ける試験 10

2.2　　副次的薬理試験 11

2.3　　安全性薬理試験 11

3　　薬物動態試験 12

3.1　　生物分析法 12

3.2　　単回投与薬物動態試験 13

3.3　　反復投与薬物動態試験 13

3.4　　組織分布試験 14

4 毒性試験 15

4.1 単回投与毒性試験 18

4.2 反復投与毒性試験 18

4.2.1 げっ歯類 18

4.2.2 非げっ歯類 19

4.3 遺伝毒性試験 19

4.4 がん原性試験 20

4.5 生殖発生毒性試験 20

4.6 局所刺激性試験 22

4.7 その他の毒性試験 22

4.7.1 潜在的変異原性不純物の評価 22

4.7.2 不純物／分解物の評価 23

4.7.3 その他の評価 23

5 総括及び結論 25

6 参考文献一覧 28

7 付録 29

7.1 付録 1 - 試験を実施しなかった理由 29

表　目　次

表 1 - 薬理試験の概要 10
表 2 - 薬物動態試験及び生体内分布試験の概要 12
表 3 - AVAL の毒性試験プログラム 15
表 4 - AVAL を用いた反復投与毒性試験 26

図　目　次

図 1 - 構造式 7

略号と用語の定義

ALGLU:	アルグルコシダーゼ アルファ（alglucosidase alfa）
ADA:	抗薬物抗体（Anti-drug antibodies）
AUC:	濃度－時間曲線下面積（Area under the serum concentration-time curve）
AVAL:	アバルグルコシダーゼ アルファ（avalglucosidase alfa）
bis-M6P:	ビス-マンノース-6-リン酸（Bis-mannose-6-phosphate）
CDER:	医薬品評価研究センター（Center for Drug Evaluation and Research）
C_{max}:	最高濃度（Maximum serum concentration）
DALA:	薬物乱用性評価（Drug abuse liability assessment）
DPH:	ジフェンヒドラミン（Diphenhydramine）
ECG:	心電図（Electrocardiogram）
ELISA:	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay）
ERT:	酵素補充療法（Enzyme replacement therapy）
GAA:	酸性 α-グルコシダーゼ（Acid α-glucosidase）
GAAKO:	GAA ノックアウト（ Acid α-glucosidase knockout mouse）
GLP:	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
GSD:	糖原病（Glycogen storage disease）
GTI:	遺伝毒性不純物（Genotoxic impurity）
ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation）
IV:	静脈内（Intravenous）
4-MUG:	4 メチルウンベリフェロン-α-D-グリコピラノシド（4 methylumbelliferone-α-D-glycopyranoside）
M6P:	マンノース-6-リン酸（Mannose-6-phosphate）
MMN:	マウス小核（Mouse micronucleus）
NOAEL:	無毒性量（No-observed-adverse-effect-level）
NZW:	ニュージーランドホワイト（New Zealand White）
PAD:	薬理学的作用量（Pharmacological active dose）
PK:	薬物動態［Pharmacokinetic(s)］
rhGAA:	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（Recombinant human acid α-glucosidase）
TK:	トキシコキネティクス（Toxicokinetic）
TTC:	毒性学的懸念の閾値（Threshold of toxicologic concern）

1　非臨床試験計画概略

本 Module では、アバルグルコシダーゼ アルファ（以下、AVAL）のポンペ病への長期使用をサポートするために実施した非臨床薬理、薬物動態及び安全性プロファイルを評価する試験の全体的な試験計画及びプログラムを要約する。薬理、薬物動態及び毒性試験の詳細な結果は、それぞれ[Module 2.6.2]、[Module 2.6.4]及び[Module 2.6.6]に記載し、考察している。

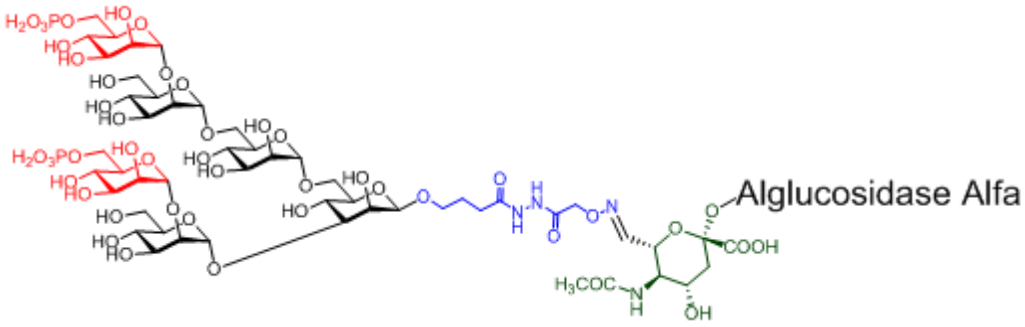
本 Module では、名称として AVAL を使用しているが、本申請資料及びその裏付けとなる試験報告書では GZ402666、neoGAA 又は SAM6 も使用している。

1.1　ポンペ病における酵素補充療法に関する背景の要約

ポンペ病は、ライソゾームにおけるグリコーゲン分解に必要な酸性 α-グルコシダーゼ（GAA）の欠乏を特徴とする常染色体劣性遺伝性の希少代謝性筋疾患である。ポンペ病は、糖原病（GSD）II 型及び酸性マルターゼ欠損症としても知られている。他の大半の GSD では細胞質への過剰なグリコーゲンの蓄積がみられることとは対照的に、ポンペ病では多くの体内組織でライソゾームにグリコーゲンが蓄積する(1)。ポンペ病の確定診断を受けた患者への長期酵素補充療法（ERT）に使用するため、有効成分として遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（rhGAA）を含むアルグルコシダーゼ アルファ（以下、ALGLU）が開発された。ALGLU は、ポンペ病患者における有効性として、乳児の侵襲的人工呼吸器非使用での生存期間の延長(2)(3)並びに小児及び成人の呼吸機能の安定化作用(4)が認められたことから、ポンペ病治療薬として世界的に承認されている（商品名：マイオザイム®及び Lumizyme®）。これらの有効性は、ALGLU を 2 週に 1 回 20 mg/kg の用量で投与することにより得られる。臨床試験での心エコー検査により、ALGLU は心筋に効果を示すことが明らかになっている(2)(3)。一方、横隔膜及びその他の骨格筋での治療効果には大きなばらつきがみられる(4)。

ALGLU に結合させるビス-マンノース-6-リン酸（bis-M6P）レベルを増加させると、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸（M6P）受容体を介した骨格筋及び横隔膜への取込みを促進しうると考えられる。このことから、ポンペ病の第 2 世代治療薬として AVAL（合成ビス-マンノース-6-リン酸-Man6 グリカンに結合した遺伝子組換えヒト α-グルコシダーゼ）（図 1）が開発された。AVAL は ALGLU を改変したものであり、多数のヘキサマンノース（2 つの末端 M6P 部分を含む）構造を ALGLU 上の酸化シアル酸残基に結合させることにより分子上の bis-M6P レベルを増加させている。

図 1 - 構造式



1.2　GAA ノックアウト（GAAKO）マウスモデル

非臨床試験プログラムに使用した GAAKO マウスは、Raben らが遺伝子ターゲティングを用いて作製したマウスポンペ病モデルである(5)(6)。このノックアウトマウスは、マウス GAA 遺伝子のエクソン 6 にネオマイシン耐性（*neo*）遺伝子を挿入してコーディング領域を破壊することによって作製された。この GAA 遺伝子破壊のホモ接合型マウス（*6neo/6neo*）は、酵素活性が欠如しているため、ヒトのポンペ病と同様にグリコーゲンが蓄積する。この GAAKO マウスモデルは、ERT 又は遺伝子置換療法の評価に適した進行速度で乳児型及び遅発型の両方の疾患の重要な特徴を再現する(5)。GAAKO マウスにおける疾患進行の経時変化は、乳児型（グリコーゲンが早期に蓄積する）及び遅発型（筋消耗の発現が遅い）のポンペ病と同様の特徴を示す。しかし、マウスの寿命を考慮すると、GAAKO マウスで観察される臨床表現型は、成人での発症により類似している。さらに、GAAKO マウスでみられるグリコーゲンの蓄積及び筋病変の程度は、乳児期に発症したポンペ病患者ほど重度ではない。早期の臨床症状はみられないものの、GAAKO マウスは非臨床試験において有用であることが示されている。このマウスは GAA 酵素活性が欠如しているため、AVAL を臨床的意義のある用量で投与し、GAA 活性の薬物動態及び生体内分布を評価することが可能である。また、GAAKO マウスは心臓及び骨格筋にグリコーゲンが蓄積されているため、AVAL を投与したときのグリコーゲン低下作用を評価することも可能である。ノックアウトマウスポンペ病モデルの 1 つの欠点は、AVAL を反復投与すると、遺伝子組換えヒトタンパク質に対して予測される過敏症反応が認められることである。この過敏症反応を軽減するため、動物には投与前及び必要に応じて投与後にジフェンヒドラミン（DPH）を投与した。

1.3　試験計画

上記の背景及び情報に基づき、AVAL を一連の非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験で評価した。これらの試験で、非臨床安全性、*in vivo* 動物モデルにおける有効性を評価した。

臨床投与経路は点滴静注であることから、非臨床試験でも AVAL は全て静脈内（IV）投与した。

薬理試験は試験施設内の方法及び手順に従って実施し、結果の信頼性及び解釈に影響を及ぼしうる不測の状況は認められなかった。AVAL の有効性を評価するため、GAAKO マウスを用いた反復投

与による *in vivo* 薬力学的試験を 2 試験実施した。これらの試験は AVAL を投与したときの標的組織におけるグリコーゲン低下を評価するために計画した。別の試験では、AVAL の効力を ALGLU よりも増強させるのに必要なグリカンの数を検討し、また、シアル酸を異なるレベルで含有する ALGLU から製造された AVAL の効力を検討した。組織内グリコーゲン含量は生化学的及び組織学的に測定した。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、心血管系、呼吸系及び中枢神経系の評価を、カニクイザルを用いた AVAL の GLP 適用 26 週間反復投与毒性試験の一部として実施した。これは、医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1) ：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に準拠している。

薬物動態試験は、AVAL の承認申請をサポートするため、毒性試験で使用した動物種を含む非臨床試験動物種に AVAL を静脈内投与したときの曝露量が十分に評価されるように計画した。単回及び反復投与、異なる動物種（マウス及びカニクイザル）及び種々の用量（4～200 mg/kg）で AVAL の薬物動態試験を実施した。反復投与毒性試験（マウス及びサル）及び胚・胎児発生に関する試験（マウス及びウサギ）で AVAL の曝露量を評価した。さらに、AVAL の標的器官への分布を評価するため、GAAKO マウスを用いた組織分布試験を実施した。毒性試験では AVAL に対する抗薬物抗体（ADA）の産生を測定し、曝露量に対する ADA の影響を検討するとともに、ADA 産生に関連する毒性変化の有無を評価した。薬物動態試験の GLP 適用状況を表 2 に示す。

AVAL の非臨床安全性試験プログラムは、以下の ICH S6(R1)、ICH S2(R1)：医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて、ICH S7A：安全性薬理試験ガイドライン、ICH M7(R1)：潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理、ERT 薬の非臨床評価に関する CDER ガイドライン案（Investigational Enzyme Replacement Therapy Products: Nonclinical Assessment、以下 CDER ガイドライン案）を考慮して設計した。

重要な非臨床毒性及び安全性薬理試験は適宜 GLP 適用下で実施した。GLP 適用毒性試験の一部は、GLP を完全には遵守していないが、適切な科学的原則及び試験施設で設定された標準操作手順に従って実施した。これらの試験の信頼性に影響を及ぼしうる不測の状況はなく、試験実施中に記録された GLP からの逸脱はいずれもデータの完全性及び結果の解釈に影響を及ぼさないと考えられた。これらの逸脱は全て個々の試験報告書の適合陳述書に詳述されている。探索的な GLP 非適用の毒性試験は適切な科学的原則に従って実施しており、結果の信頼性及び解釈に影響を及ぼしうる不測の状況は認められなかった。

マウス及びサルを用いた反復投与毒性の探索的及び本試験、マウスを用いた探索的遺伝毒性試験、並びにマウス及びウサギを用いた生殖発生毒性（幼若マウスを用いた毒性試験を含む）の探索的及び本試験において、AVAL の安全性プロファイルを評価した。反復投与毒性試験（マウス及びサル）及び生殖発生毒性試験（マウス及びウサギ）における動物種は、同種類の試験でこれらの野生型動物種が一般的に使用されていること、及び豊富な背景データベースが存在することにより選択した。

AVAL の反復投与毒性試験は、最初にマウス及びサルで実施した。マウスでは DPH を前投与したにもかかわらず、過敏症の徴候が認められた。このため、AVAL の GLP 適用慢性毒性試験はサルのみで実施した。

医薬品について通常実施される遺伝毒性試験は、ICH S6(R1)及び CDER ガイドライン案によると、バイオテクノロジー応用医薬品には適用されない。しかしながら、AVAL については GAAKO マウスを用いた探索的 *in vivo* 小核試験を実施した。

標準的ながん原性試験は、ICH S6(R1)及び CDER ガイドライン案によると、バイオテクノロジー応用医薬品には一般的には必要ないと考えられている。AVAL については、非臨床安全性評価の一環として、非臨床安全性試験結果、*in silico* 検索、文献検索、並びにマイオザイム®及び Lumizyme®のデータの精査及び文献検索に加え、AVAL における 不 純 物 T * の[redacted]部分及びその他のヒドラジン含有化合物が放出される可能性を評価することにより、がん原性リスク評価を実施した（Module 2.7.2、[2.2 項]参照）。証拠の重み付け（weight of evidence）に基づく評価により、AVAL のがん原性を評価する非臨床試験の実施は必要ではないと判断し、がん原性試験は実施しなかった。

製剤中不純物のより高い規格値をサポートするため、更なる試験を実施した。不純物 T *の毒性の有無を、不純物 T *を添加した AVAL のサル反復投与毒性試験及び不純物 T *単独の *in vitro* 遺伝毒性試験で評価した。

潜在的遺伝毒性不純物（GTI）の有無は、予定治療用量及び臨床試験の投与期間を考慮に入れた毒性学的懸念の閾値（TTC）法を用いて検討した。

AVAL は、依存性及び乱用性のシグナルを示さず、化学構造、薬理作用、作用機序、非臨床及び臨床データから、乱用が知られる既知の薬物との類似性はみられない。したがって、乱用及びその結果としての公衆衛生上のリスクはないと予想されるため、薬物乱用性評価（DALA）試験は実施しなかった。

その他、薬力学的薬物相互作用試験、代謝及び排泄試験、遺伝毒性試験などの一部の非臨床試験は AVAL の申請適応症での承認申請において、該当しない又は必要とされていないため、実施しなかった。これらの試験を実施しなかった理由を 7.1 項に示す。

＊新薬承認情報提供時に置換

2　薬理試験

反復投与による *in vivo* 薬力学的試験を実施し、標的組織におけるグリコーゲンの枯渇を指標として AVAL の有効性を評価した。組織内グリコーゲン含量は生化学的及び組織学的に測定した。AVAL の効力を裏付ける全ての試験で GAAKO マウスを使用した。

本申請資料に含まれる薬理試験の概要を表 1 及び Module 2.6.3[表 2.6.3.1]に示す。薬理試験は Module 2.6.2 に要約した。

表 1 - 薬理試験の概要

試験の種類	動物種	GLP	投与経路	AVAL の用量（mg/kg）	試験番号
効力を裏付ける試験	GAAKO	非適用	IV ボーラス	4、12 及び 20	[redacted]-1948
効力を裏付ける試験	GAAKO	非適用	IV ボーラス	4、12 及び 20	[redacted]-00587
効力を裏付ける試験	GAAKO	非適用	IV ボーラス	20	[redacted]-3981
効力を裏付ける試験	GAAKO	非適用	IV ボーラス	4 及び 12	[redacted]-02367
安全性薬理試験	カニクイザル	適用	点滴静注	50 及び 200	0658-11097

略号：GAAKO：GAA ノックアウトマウス；GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；IV：静脈内

2.1　効力を裏付ける試験

2 つの試験の結果から、AVAL を週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの組織内グリコーゲン減少作用は、ALGLU と比較して、少なくとも 3～7 倍強力であることが示された（[redacted]-1948 試験]及び[redacted]-00587 試験]）。両試験において、用量 4、12 及び 20 mg/kg の AVAL を 20、60 及び 100 mg/kg の ALGLU と比較した。心臓、四頭筋、三頭筋、腰筋及び横隔膜組織における効力は AVAL の方が明らかに強かった。また、AVAL の薬理学的作用量（PAD）が評価した組織によって異なることもその結果から示された。GAAKO マウスの心臓組織では、4 mg/kg IV の用量でグリコーゲンが大幅に低下したことから、AVAL の PAD は 4 mg/kg IV であった。一方、横隔膜及びその他の骨格筋（四頭筋、三頭筋及び腰筋）では、グリコーゲン蓄積に対して明らかな作用を発揮するのに必要な AVAL の用量は 12 mg/kg IV 以上であった。

また、異なるレベルのシアル酸を含有する ALGLU から製造された AVAL を評価した（[redacted]-02367 試験]）。AVAL は ALGLU のシアル酸残基に bis-M6P 含有グリカンを結合させることによって製造される。規格によると、ALGLU におけるシアル酸レベルは変動する可能性があるため、出発原料として使用する ALGLU のロットによって AVAL 上に存在するグリカンのレベルが異なる可能性がある。したがって、5.5 又は 7.2 mol/mol のシアル酸を含有する ALGLU から製造された AVAL のバッチを評価した。その結果、評価した AVAL の 2 つのロットは、グリコーゲンを同程度に低下させるこ

とが示された。このことから、シアル酸レベルが 5.5～7.2 モル/モルの範囲の ALGLU から製造された AVAL は、GAAKO マウスで同程度の効力を示すと考えられた。

さらに、AVAL の効力を増強させるのに必要なグリカンのレベルを評価した（[[redacted]-3981 試験]）。ALGLU よりもグリカンを 3 個以上多く含有する AVAL をマウスに投与したとき、組織内グリコーゲンが大幅に低下した。

抗薬物抗体の測定は [redacted]-1948、[redacted]-00587 及び [redacted]-3981 試験で行った。実施した試験条件下で、AVAL と ALGLU の間に産生した各抗体の抗体価に差は認められなかった。

2.2 副次的薬理試験

AVAL の副次的薬理試験は実施していない。

2.3 安全性薬理試験

AVAL の独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、安全性薬理評価項目はカニクイザルを用いた AVAL の 26 週間反復投与毒性試験（[0658-11097 試験]）で評価し、Module 2.6.2、[4 項]に記載した。評価項目には、ICH S7A 及び S7B ガイドラインで規定されているコアバッテリーを含めた。試験の結果、最高用量の 200 mg/kg IV を投与したとき、神経行動、心電図（ECG）パラメータ、心拍数、体温、活動性及び呼吸数に、被験物質に関連する変化は認められなかった。

3　薬物動態試験

GAAKO マウス、CD-1 マウス、幼若マウス及びカニクイザルに AVAL を単回投与及び反復投与したときの薬物動態を評価するため、複数の試験を実施した。GAAKO マウスを用いて AVAL の組織分布を ALGLU と比較評価するための試験を実施した。実施したこれらの試験の概要を表 2 及び Module 2.6.5「薬物動態試験の概要表」に示すとともに、Module 2.6.4「薬物動態試験の概要文」で概説する。

表 2 - 薬物動態試験及び生体内分布試験の概要

試験の種類	動物種	GLP	投与経路	投与量（mg/kg）	試験番号
単回投与時の薬物動態	GAAKO マウス	非適用	静脈内ボーラス	20 mg/kg	[redacted]-2344
単回投与時の薬物動態	GAAKO マウス	非適用	静脈内ボーラス	20 mg/kg	[redacted]-00813
単回投与時の薬物動態	GAAKO マウス	非適用	静脈内ボーラス	20 mg/kg	[redacted]-00540
反復投与時の生体内分布	GAAKO マウス	非適用	静脈内ボーラス	50 mg/kg 4 時間ごと	[redacted]-3559
単回投与時の生体内分布	GAAKO マウス	非適用	静脈内ボーラス	20 mg/kg	[redacted]-00818
反復投与時の薬物動態	CD-1 マウス	非適用	静脈内ボーラス	4, 40, 120 mg/kg 週 1 回	[redacted]-00183 [a]
反復投与時の薬物動態	CD-1 マウス	適用	静脈内ボーラス	20, 50, 100 mg/kg 隔週	JUV0033 [a]
反復投与時の薬物動態	カニクイザル	非適用	点滴静注	4, 40, 120 mg/kg 週 1 回	1213-004 [a]
反復投与時の薬物動態	カニクイザル	適用	点滴静注	50, 200 mg/kg 隔週	0658-11097 [a]
反復投与時の薬物動態	カニクイザル	適用	点滴静注	50 mg/kg 隔週	TXC1530 [a]

略語：GAAKO：GAA ノックアウトマウス、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

a　反復投与毒性試験の一部として、反復投与時の薬物動態を評価した。

3.1　生物分析法

非臨床試験における AVAL 活性の測定は、4-メチルウンベリフェロン-α-D-グリコピラノシド（4-MUG）酵素活性分析法を用いて、Sanofi Genzyme Corporation（米国マサチューセッツ州フレーミングハム）で実施した。ALGLU 活性の測定にも同様の分析法を使用した。

抗 AVAL IgG 抗体の測定は、酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を用いて Sanofi Genzyme Corporation（米国マサチューセッツ州フレーミングハム）で実施した。抗 ALGLU 抗体の測定にも同様の ELISA 法を使用した。

分析に使用した全ての定量法の適格性を確認し、適切な技術報告書を Module 2.6.5 [表 2.6.5.2]に示す。

適格性を確認した定量法を用いて、薬力学試験、薬物動態試験及び毒性試験のデータ評価に役立つ再現性の高い結果が得られた。

3.2 単回投与薬物動態試験

GAAKO マウスを用いた単回投与薬物動態試験から、用量 20 mg/kg の AVAL を投与したときの消失半減期は 0.59～0.74 時間の範囲であり、曝露量は約 300～約 600 µg· h/mL の範囲であった（[■-2344]、[■-00813]及び[■-00540 試験]）。CD-1 マウスに用量 4 及び 40 mg/kg の AVAL を単回投与したときの薬物動態パラメータは、上記の GAAKO マウスでの 20 mg/kg 投与時の薬物動態パラメータと類似していた。このことから、疾患モデルマウスにおける AVAL の薬物動態は野生型マウスと同等であることが示唆された。CD-1 マウスに AVAL を投与したとき、4 mg/kg から 120 mg/kg への用量増加に伴って、消失半減期の延長、用量補正した曝露量の増加及びクリアランスの低下が認められ、薬物動態の飽和が示唆された。

カニクイザルに AVAL を単回投与したときの薬物動態については、反復投与試験の初回投与後に評価した（[1213-004]、[0658-11097]及び[TXC1530 試験]）。消失半減期は試験間で類似しており、AVAL の消失半減期は、用量 40 及び 120 mg/kg で約 0.5 及び 0.7 時間、用量 50 及び 200 mg/kg で約 0.5 及び 1.4 時間であった。マウス同様、用量増加に伴って単回投与後の薬物動態パラメータは変化し、薬物動態の飽和（消失半減期の延長、用量補正した曝露量の増加及びクリアランスの低下）が強く示唆された。

AVAL の消失半減期は動物種全体を通して類似していた。CD-1 マウス及びカニクイザルのいずれについても、用量 4～50 mg/kg を投与したときの半減期は約 0.5～0.75 時間の範囲であり、用量 120～200 mg/kg では約 1.0～1.5 時間に延長した。しかし、用量 40 及び 120 mg/kg の AVAL を投与したときの用量で補正した全身曝露量は、CD-1 マウス（それぞれ約 33 及び 43 µg·h·kg/mL/mg）に比べてカニクイザル（それぞれ約 20 及び 26 µg·h·kg/mL/mg）で僅かに低値を示した。曝露量に関するこの差異は、被験物質投与方法の差（マウスではボーラス静注であったのに対して、カニクイザルでは 6 時間持続静注）に起因すると考えられた。

AVAL と ALGLU を単回投与したときの薬物動態を比較した（[■-2344]及び[■-00813 試験]）。得られた結果から、幾つかの薬物動態パラメータに関して、AVAL と ALGLU の間に差異があることが示された。これらの差異としては、AVAL は ALGLU に比べて消失半減期は短く、分布容積は小さかった。なお、[■-2344 試験]では、ALGLU に比べて AVAL の曝露量は僅かではあるものの、統計学的有意に低値を示したが、[■-00813 試験]では、同様な傾向が認められたものの統計学的有意性はなかった。

シアル酸含量が異なる ALGLU から製造された AVAL ロット間で、薬物動態に差異は認められなかった[■-00540 試験]。これらのデータから、5.5～7.2 mol/mol のシアル酸を含有する ALGLU から製造された AVAL の薬物動態はシアル酸含量に影響されないことが示唆された。

3.3 反復投与薬物動態試験

CD-1 マウス及びカニクイザルに反復投与したときの薬物動態を評価した（[■-00183]、[JUV0033]、1213-004]、[0658-11097]及び[TXC1530 試験]）。CD-1 マウスに AVAL を週 1 回反復投与したとき、

初回及び4回目投与後の間で薬物動態パラメータに差異は認められなかった（[■-00183 試験]）。同様に、カニクイザルに用量 40 mg/kg の AVAL を投与したときの薬物動態パラメータは、初回及び4回目投与後の間で有意差は認められなかったが、120 mg/kg 投与時には、初回及び4回目投与後の間で有意差が認められた（クリアランスの低下及び曝露量の増加[1213-004 試験]）。[0658-11097 試験]においても、反復投与により薬物動態パラメータが変化した。これらの変化は、7回及び13回目投与後の双方で初回投与時と比較して半減期の約 25%延長、最高血清中濃度及び曝露量の 11～52%増加、クリアランスの 15～30%低下であった。上記結果から、サルに反復投与したとき、検討した用量で AVAL の薬物動態プロファイルが経時的に変化することが示唆されたが、その理由は不明である。なお、カニクイザルに種々の用量の不純物 T *を添加した AVAL を隔週投与したとき、投与群間で AVAL の曝露量に差が認められなかったことから（[TXC1530 試験]）、不純物 T *含量は AVAL の曝露量に明確な影響を及ぼさないことが示唆された。

幼若マウスを用いた毒性試験において（[JUV0033 試験]）、用量 20、50 又は 100 mg/kg の AVAL を隔週投与したとき、AVAL 濃度は投与後 4～6 時間まで定量可能であった。血清中濃度推移から、最高血清中濃度は主に投与後 0.083 時間（静脈内ボーラス投与後の最初の試料採取時点）に認められた。

AVAL を反復投与したとき、20～100 mg/kg の範囲で最高血清中濃度は用量にほぼ比例して増加するものの、$AUC_{0\text{-}24h}$ は用量比を上回る増加を示した。20～100 mg/kg の 5 倍の用量増加に伴って、最高血清中濃度は雌で 5.88 倍、雄で 5.11 倍となり、$AUC_{0\text{-}24h}$ は雌で 11.5 倍、雄で 14.8 倍となった。AVAL の $AUC_{0\text{-}24h}$ の雌／雄比は 0.548～0.853 の範囲であり、曝露量は雄に比べて雌で低いと考えられた。

3.4 組織分布試験

GAAKO マウスを用いて AVAL 及び ALGLU の組織への分布を調べた（[■-00818 試験]）。AVAL の大部分は肝臓に分布し、少量が心臓、更に少量が骨格筋に分布し、AVAL の分布パターンは ALGLU と類似していることが確認された。マウス小核（MMN）試験の妥当性を確認するため、AVAL の骨髄分布についても調べた（[■-3539 試験]）。AVAL は GAAKO マウスの骨髄に用量依存的（投与回数に比例して）に分布することが示され、AVAL の遺伝毒性評価に MMN 試験を使用したことの妥当性が裏付けられた。

＊新薬承認情報提供時に置換

4　毒性試験

AVAL の安全性プロファイルを、マウス、ウサギ及びサルを用いた一連の毒性試験プログラムにより検討した（2.6.6 毒性試験の概要文）。14 日間（マウス及びサル）、1 か月間（マウス及びサル）及び 6 か月間（サル）の反復投与毒性試験を実施した。ICH ガイドラインでは遺伝毒性試験は必要とされていないが、マウスを用いた探索的 *in vivo* 小核試験を実施した。生殖発生毒性試験として、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（マウス）、胚・胎児発生に関する試験（マウス及びウサギ）並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（マウス）を実施した。幼若動物を用いた毒性試験を、21 日齢のマウスで実施した。局所刺激性は反復投与毒性試験において評価した。

予定治療用量及び臨床試験の投与期間を考慮に入れた TTC 法を用いて、GTI の有無を検討した。不　純　物　U　*の変異原性の有無を検討するために、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

製剤中不純物のより高い規格値をサポートするため、更なる試験を実施した。不　純　物　T　*の毒性を評価するため、不純物 T *を添加した AVAL のサルを用いた反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及び *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

AVAL の非臨床安全性評価をサポートする毒性試験の一覧を表 3 に示す。

表 3 - AVAL の毒性試験プログラム

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	用量又は濃度 被験物質	投与経路	投与頻度	試験番号
安全性薬理試験（長期反復投与毒性試験に含まれる評価項目）					
カニクイザル	26 週間反復点滴静注毒性試験（GLP 適用）	AVAL 0、50、200 mg/kg	6 時間の点滴静注	2 週に 1 回、26 週間	[0658-11097]
反復投与毒性試験					
CD-1 マウス	探索的 14 日間反復静脈内投与毒性試験（GLP 非適用）	0 mg/kg ALGLU 50 mg/kg AVAL 50 mg/kg ガラクトース修飾 ALGLU（GAM） 50 mg/kg	ボーラス静脈内	2 日に 1 回、2 週間	[FFA00125]

＊新薬承認情報提供時に置換

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	用量又は濃度 被験物質	投与経路	投与頻度	試験番号
CD-1 マウス	探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験（GLP 非適用）	AVAL 0、4、40、120 mg/kg DPH 10 又は 20 mg/kg	AVAL：ボーラス静脈内 DPH：腹腔内	週 1 回、4 週間	[[redacted]-00183]
カニクイザル	探索的 28 日間反復点滴静注毒性試験（GLP 非適用）	AVAL 0、4、40、120 mg/kg	6 時間の点滴静注	週 1 回、4 週間	[1213-004]
カニクイザル	26 週間反復点滴静注毒性試験（GLP 適用）	AVAL 0、50、200 mg/kg	6 時間の点滴静注	2 週に 1 回、26 週間	[0658-11097]
遺伝毒性試験					
GAAKO マウス	探索的生体内分布試験及び *in vivo* 小核試験（GLP 非適用）	AVAL 0（第 1 群）、50（第 2 及び 3 群）、100（第 4 群）又は 150（第 5 群）mg/kg/日（0 又は 50 mg/kg/回）	ボーラス静脈内	第 1～3 群：1 日目に単回 第 4 群：1 日目に 2 回（0 + 4 時間） 第 5 群：1 日目に 3 回（0、4 +、8 時間）	[[redacted]-3559]
GAAKO マウス	探索的 *in vivo* 小核試験（GLP 非適用）	メチルメタンスルホネート 75 mg/kg/日	ボーラス腹腔内	1～3 日目に 1 日 1 回	[[redacted]-00333]
GAAKO マウス	探索的 *in vivo* 小核試験及び陽性対照（GLP 非適用）	AVAL 0 又は 150 mg/kg/日（0、50 mg/kg/回）	ボーラス静脈内	1 日目に 3 回：0 時間、4 時間、8 時間 （150 mg/kg/日）	[[redacted]-00184]
生殖発生毒性試験					
CD-1 マウス	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（GLP 適用）	AVAL 0、10、20 又は 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL：ボーラス静脈内 DPH：腹腔内	交配前（雄：10 週間、雌：2 週間）、交尾確認を通して妊娠 7 日まで 2 日に 1 回	[FER0511]
CD-1 マウス	胚・胎児発生に関する試験（GLP 適用）	AVAL 0、10、20 又は 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL：ボーラス静脈内 DPH：腹腔内	妊娠 6～15 日に 1 日 1 回	[TER0685]

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	用量又は濃度被験物質	投与経路	投与頻度	試験番号
CD-1 マウス	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（GLP 適用）	AVAL 0、10、20 又は 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL：ボーラス静脈内 DPH：腹腔内	妊娠 6 日から分娩後 20 日まで 2 日に 1 回	[DPN0378]
NZW ウサギ	非妊娠ウサギを用いた探索的 7 日間静脈内投与毒性試験（GLP 非適用）	AVAL 0、20、40、80 mg/kg	約 10 分間の点滴静注	1 日 1 回、7 日間	[DDO1378]
NZW ウサギ	妊娠ウサギを用いた探索的静脈内投与毒性試験（GLP 非適用）	AVAL 0（第 1 群）、40（第 2～5 群）mg/kg	約 10 分間の点滴静注	妊娠 6～19 日（第 1 及び 2 群）、妊娠 6～12 日（第 3 群）、妊娠 13～19 日（第 4 群）並びに妊娠 6、10、13、16 及び 19 日（第 5 群）に 1 日 1 回	[TEP0366]
NZW ウサギ	胚・胎児発生に関する試験（GLP 適用）	AVAL 0、30、60、100 mg/kg	約 10 分間の点滴静注	妊娠 6～19 日に 1 日 1 回	[TER0686]
CD-1 マウス	幼若マウスを用いた 9 週間反復静脈内投与毒性試験（GLP 適用）	AVAL 0、20、50 又は 100 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL：ボーラス静脈内 DPH：腹腔内	生後 21 日から生後 77 日（又は生後 91 日）まで 2 週に 1 回	[JUV0033]
その他の毒性試験					
カニクイザル	不純物 T *添加 AVAL の 13 週間反復点滴静注毒性試験（GLP 適用）	AVAL/不純物 T * 0/0、50/3、50/6、50/12.55 mg/kg	6 時間の点滴静注	2 週に 1 回、13 週間	[TXC1530]
ネズミチフス菌菌株 TA1535、TA1537、TA98、TA100、TA102	細菌を用いる復帰突然変異試験（GLP 適用）	不純物 T * 5000 µg/プレートまで、±S9	インキュベーション	48 時間	[HIS2129]

＊新薬承認情報提供時に置換

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	用量又は濃度 被験物質	投与経路	投与頻度	試験番号
ヒト末梢血リンパ球	染色体異常試験（GLP 適用）	100、300、500 µg/mL ±S9 不純物 T *	インキュベーション	3 時間（±S9）及び 20 時間（-S9）	[MAF0153]
ネズミチフス菌菌株 TA1535、TA1537、TA98、TA100、TA102	細菌を用いる復帰突然変異試験（GLP 適用）	不純物 U * 5000 µg/プレートまで、±S9	インキュベーション	48 時間	[HIS2317]

略語：GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、SAM：ALGLU のシアル酸修飾、GAM：ALGLU のガラクトース修飾、DPH：ジフェンヒドラミン、NZW：ニュージーランドホワイト

4.1 単回投与毒性試験

AVAL の単回投与試験は実施しなかった。

4.2 反復投与毒性試験

4.2.1 げっ歯類

探索的（GLP 非適用）14 日間反復投与毒性試験を、CD-1 マウスを用いて 0 若しくは 50 mg/kg ALGLU 又は 50 mg/kg AVAL の用量で 2 日に 1 回、14 日間の静脈内投与により実施した。ALGLU 又は AVAL に関連する死亡及び一般状態の変化は認められなかった。体重及び摂餌量の変化はみられなかった。AVAL 群の雄で、網状赤血球数の増加並びに血清カルシウム、リン及びカリウムの増加が認められた。脾臓重量の増加が ALGLU 群の雄及び AVAL 群の雌でみられたが、関連する病理組織学的変化は認められなかった。ALGLU 群及び AVAL 群で、精巣の肉眼所見（小型化、黒色巣、赤色巣及び変色）、精嚢変色、陰嚢皮膚変色及び精巣上体小型化が観察された。これらの組織の病理組織学的検査は実施しなかったため、被験物質との関連性は不明であった。肝臓の多巣性壊死（軽微）及び炎症性浸潤（軽微から軽度）が、AVAL 群の雄のみで観察された。これらの所見は AVAL との関連性が不明であったことから、その後の試験で詳細な評価を実施した。

探索的試験（GLP 非適用）において、CD-1 マウスにおける AVAL の毒性評価を、0、4、40 又は 120 mg/kg/週の用量で週 1 回、28 日間静脈内投与により実施した。一般状態の変化として、過敏症に一致する嗜眠が、3 回目投与後に観察された。その後、マウスには DPH を 10 又は 20 mg/kg の用量で AVAL の投与前に腹腔内投与した。過敏症に一致して、4 mg/kg/日群で 4 回目投与後 1 時間以内に雄 9 匹中 2 匹、雌 9 匹中 1 匹が死亡又は安楽死に至った。体重、臨床検査、器官重量、剖検所見及び病理組織学的所見には、いずれの群においても被験物質関連の変化は認められなかった。このマウス 28 日間試験では、上記の 14 日間試験の投与量より高い用量において、精巣及び肝臓の所見は認めら

＊新薬承認情報提供時に置換

れなかった。したがって、前の 14 日間試験でみられた所見が AVAL と因果関係を有する可能性は低いと考えられる。測定可能な抗 AVAL 抗体価が、全ての AVAL 投与マウスで 29 日目に認められた。評価した用量で飽和が観察された。1 回目と 4 回目の投与間で TK パラメータの差はみられず、明らかな TK の性差は認められなかった。以上、AVAL を CD-1 マウスに 28 日間静脈内投与したときの無毒性量（NOAEL）は、検討した最高用量の 120 mg/kg/週であった。NOAEL での 22 日目における雌雄併合の $AUC_{0\text{-}inf}$ 曝露量は 4513 μg·h/mL であった。

4.2.2 非げっ歯類

AVAL のカニクイザルを用いた探索的（GLP 非適用）毒性試験を、0、4、40 又は 120 mg/kg/週の用量で週 1 回、28 日間の 6 時間点滴静注により実施した。生死、一般状態観察、身体検査、体重、摂餌量、臨床検査、剖検及び病理組織学的検査において、被験物質関連の変化は認められなかった。40 mg/kg/週では 1 回目と 4 回目の投与間で TK パラメータに差はみられなかったが、120 mg/kg/週では有意差（血清クリアランス減少及び AUC 増加）が認められた。TK の明らかな性差はみられなかった。測定可能な抗体価が、21 日目に全ての用量で認められた。以上、AVAL をカニクイザルに週 1 回、4 週間静脈内投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 120 mg/kg/週であった。NOAEL での雌雄併合した 22 日目の $AUC_{0\text{-}inf}$（投与後 0 時間から無限大時間まで外挿した血清中濃度 - 時間曲線下面積）曝露量は 5900 μg·h/mL であった。

マウスでは長期反復投与毒性評価において過敏症反応が発現する可能性があったこと、また 28 日間試験で動物種間に毒性所見の違いがみられなかったことから、GLP 適用の 26 週間反復投与毒性試験はサルのみを用いて実施した。

カニクイザルを用いて、AVAL の 0、50 又は 200 mg/kg の用量での 6 時間点滴静注による投与を、2 週に 1 回、26 週間実施した。生死、一般状態観察、身体検査、眼科学的検査、ECG パラメータ、中枢神経系検査、呼吸数、体温、体重、摂餌量、臨床検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において、被験物質関連の変化は認められなかった。いずれの用量においても、全ての投与を通して飽和がみられ、AVAL の消失は二相性であり、TK パラメータの雌雄差は認められなかった。用量内 TK パラメータには、連続した投与による変化として、半減期延長、曝露量（C_{max} 及び AUC）増加及びクリアランス減少がみられた。用量及び時間に応じた抗 AVAL 抗体反応が認められた。以上、カニクイザルに AVAL を 2 週に 1 回、26 週間静脈内投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 200 mg/kg であった。NOAEL における 13 回目投与後の雌雄併合した平均 $AUC_{0\text{-}inf}$ 曝露量は 28162 μg·h/mL であった。

4.3 遺伝毒性試験

ICH S6 (R1)及び CDER ガイドライン案に基づくと、医薬品について通常実施される遺伝毒性試験は、バイオテクノロジー応用医薬品には該当しない。しかしながら、AVAL については、GAAKO マウスを用いた探索的 *in vivo* 小核試験を実施した。

マウスを用いる探索的（GLP 非適用）試験において、AVAL の多染性赤血球における小核誘発能を評価した。GAAKO マウスに、AVAL を、0、50、100（50 mg/kg を 1 日目に 2 回）又は 150 mg/kg（50 mg/kg を 1 日目に 3 回）の用量で静脈内投与した。酵素活性測定のため、投与の 6 又は 24 時間後に骨髄を採取した。小核を有する網状赤血球又は赤血球の評価のため、投与の 6 又は 24 時間後若しくは 7 又は 14 日後に全血を採取した。骨髄への AVAL の分布が AVAL 活性の増加によって示された。小核数の増加は認められなかった。以上、AVAL は、GAAKO マウスを用いる探索的 *in vivo* 小核試験において、150 mg/kg までの用量で陰性であった。

4.4 がん原性試験

ICH S6 (R1) 及び CDER ガイドライン案に基づくと、バイオテクノロジー応用医薬品については、標準的ながん原性試験は一般的に不適切である。非臨床安全性評価の一環として、がん原性リスク評価を、非臨床安全性試験の結果、*in silico* 調査、文献検索、マイオザイム®及び Lumizyme®のデータ精査並びに文献検索、不純物 T *の[redacted]部分及び AVAL におけるその他のヒドラジン含有化合物の放出の有無を評価することにより実施した（Module 2.7.2、[2.2 項]参照）。証拠の重み付け（weight of evidence）に基づく評価から、AVAL のがん原性を評価するための非臨床試験は必要ないと考えられたため、がん原性試験は実施しなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

マウスを用いた雌雄併合の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において、AVAL の 0、10、20 又は 50 mg/kg の用量での 2 日に 1 回静脈内投与による交尾能、受胎能及び初期胚発生に対する影響を、交配前（雄は 10 週間、雌は 2 週間）、交配期間中及び妊娠 7 日までの投与により評価した。10、20 及び 50 mg/kg/回群で、それぞれ雄 4、7 及び 3 匹並びに雌 2、3 及び 1 匹の死亡が認められた。死因は免疫応答（アナフィラキシー様反応を含む）に関連すると考えられた。雄マウスの交尾率、受胎率、器官重量、剖検所見及び病理組織学的所見への影響はみられず、精子パラメータ（精子の運動能及び密度）には変化が認められなかった。雌マウスの交尾率、受胎率、器官重量、卵巣及び子宮のパラメータ並びに病理組織学的検査には変化が認められなかった。雌雄の受胎能に関する NOAEL は 50 mg/kg/回であった。

胚・胎児発生に関する試験において、妊娠マウスに、AVAL を 0、10、20 又は 50 mg/kg/日の用量で、妊娠 6～15 日に 1 日 1 回静脈内投与した。妊娠 18 日に帝王切開を実施した。50 mg/kg/日群で妊娠 14 日に 2 例が死亡したが、免疫応答（アナフィラキシー様反応を含む）に関連したものと考えられた。10 mg/kg/日群における 2 例の死亡は血液検体採取に関連したものであった。母動物体重、剖検、妊娠率、平均黄体数、着床数、雌雄の生存胎児数、死亡胎児数、総胎児数、胎児体重、胎児骨化部位数並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査において、被験物質関連の変化は認められなかった。着床後胚損失率増加及び平均後期吸収胚数増加が 50 mg/kg/日でみられた。胎盤移行試験により、AVAL はマウスにおいて母動物から胎児の血液循環に移行しないことが判明したことから、胚・胎児

＊新薬承認情報提供時に置換

の変化は免疫応答に関連する母動物毒性に起因したものと考えられた。静脈内投与での母動物に関する NOAEL は 50 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$ = 2080 μg·h/mL）、発生に関する NOAEL は 20 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$ = 582 μg·h/mL）であった。

非妊娠ニュージーランドホワイト（NZW）ウサギに、AVAL を 0、20、40 又は 80 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、7 日間静脈内投与した。いずれの用量においても毒性変化は認められなかった。

探索的胚・胎児発生に関する試験において、妊娠 NZW ウサギに、AVAL を 40 mg/kg/日の用量で、1 日 1 回、妊娠 6～19 日、妊娠 6～12 日、妊娠 13～19 日並びに妊娠 6、10、13、16 及び 19 日に静脈内投与した。対照群のウサギには溶媒のみを 1 日 1 回、妊娠 6～19 日に投与した。帝王切開を妊娠 29 日に実施した。母動物及び胎児のいずれにおいても、毒性変化は認められなかった。

器官形成期に母動物を AVAL に曝露したときの発生毒性誘発能を評価するため、妊娠ウサギに、0、30、60 及び 100 mg/kg/日の用量で、1 日 1 回、妊娠 6～19 日に点滴静注した。統計学的に有意な平均体重減少が 100 mg/kg/日群で妊娠 19～20 日にみられ、平均体重増加抑制及び摂餌量減少が 60 及び 100 mg/kg/日群で妊娠 13～20 日に認められた。これらの群では、投与期間全体（妊娠 6～20 日）の平均摂餌量も減少した。子宮内成長及び生存には、母動物への被験物質投与の影響はみられず、被験物質関連の奇形及び発生変異は認められなかった。静脈内投与時の母動物毒性に関する NOAEL は 30 mg/kg/日（妊娠 19 日の $AUC_{0\text{-}24h}$ = 1260 μg·h/mL）、胚・胎児の NOEL は 100 mg/kg/日（母動物における妊娠 19 日の $AUC_{0\text{-}24h}$ = 7910 μg·h/mL）であった。

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、妊娠マウスに、AVAL を、0、10、20 又は 50 mg/kg の用量で、妊娠 6 日から分娩後 20 日まで、2 日に 1 回静脈内投与した。5 回目投与以降、AVAL の投与前に DPH を投与した。F0 及び F1 マウスにおいて被験物質関連の死亡は認められなかった。F0 雌の死亡又は早期安楽死が、10 mg/kg/日群の 2 匹（妊娠 18 日及び授乳 12 日）、20 mg/kg/日群の 1 匹（授乳 20 日）及び 50 mg/kg/日群の 1 匹（妊娠 16 日）にみられた。F1 マウスの死亡又は早期安楽死が、0/5 mg/kg/回 DPH 群の雄 1 匹（分娩後 29 日）、0/0 mg/kg 群の雌 1 匹（分娩後 23 日）及び 20 mg/kg/日群の雌 1 匹（分娩後 71 日）にみられた。F1 の性成熟、神経行動パラメータ（自発運動量、聴覚性驚愕馴化又は受動回避パラダイムの成績）、交尾能及び受胎能パラメータ、剖検、精巣及び精巣上体の重量、帝王切開及び同腹児パラメータ並びに胚外表検査には、AVAL の影響は認められなかった。静脈内投与での母動物に関する NOAEL、母動物の生殖並びに出生児の生存及び成長に関する NOAEL は 50 mg/kg/回であった。

幼若マウスに AVAL を 0、20、50 又は 100 mg/kg（雌）及び 0、25、50 又は 100 mg/kg（雄）の用量で、生後 21 日から生後 77 日又は生後 91 日（受胎能コホートの雄のみ）まで、2 週に 1 回、約 9 週間静脈内投与したときの毒性を評価した。途中死亡が 25 例にみられ、その内訳は雄が 15 匹（0、25、50 及び 100 mg/kg 群でそれぞれ 1、10、3 及び 1 匹）、雌が 10 匹（0、20、50 及び 100 mg/kg 群でそれぞれ 1、7 及び 2 匹）であった。このうち 4 匹（0 mg/kg 群の雌雄各 1 匹、25 mg/kg 群の雄 1 匹及び 50 mg/kg 群の雌 1 匹）は、AVAL 投与との関連がみられなかった。残りのマウスの死因は不明であったが、免疫応答（アナフィラキシー様反応を含む）に関連している可能性があった。雄で総白血球数、リンパ球数、単球数、分節核好中球数、好塩基球数（25、50 及び 100 mg/kg）並びに好酸球数（50 及

び 100 mg/kg）の増加がみられ、免疫応答（アナフィラキシー様）に関連した死亡に一致していた。一般状態観察、体重、大腿骨長、摂餌量、血液生化学的検査、骨密度、器官重量、剖検所見及び病理組織学的所見においても、AVAL 関連の変化は認められなかった。実施した機能発達検査（オープンフィールド、受動回避、聴覚性驚愕馴化及び自発運動量）、性成熟、性周期、交尾率、受胎率並びに母動物の体重及び摂餌量には変化が認められなかった。また、卵巣及び子宮のパラメータ、雄性生殖器官重量並びに精子検査（精子運動能、精子及び精子細胞の密度並びに精子形態）において変化は認められなかった。幼若マウスに 2 週に 1 回投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 100 mg/kg であった。NOAEL での生後 77 日における曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は、雄マウスで 8140 µg·h/mL、雌マウスで 5400 µg·h/mL であった。

4.6 局所刺激性試験

局所刺激性の評価は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験に組み込んで、点滴静注部位の肉眼的及び病理組織学的検査により実施した。AVAL 投与に関連する所見は認められなかった。

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 潜在的変異原性不純物の評価

AVAL の実際及び潜在的な変異原性不純物についての変異原性リスク評価を、ICH M7 ガイドライン（2017 年 3 月 31 日）に従って実施した。

「Cohort of concern」に同定された不純物は特定されなかった。3 種類の不純物がクラス 1（既知の変異原性発がん物質）と特定された。1 種類の不純物がクラス 2（既知の変異原性物質）と特定された。8 種類の不純物が、原薬の構造との関連のない変異原性に関する警告構造を示した。1 種類の不純物は、未分類の特徴を含有するため、2 つの予測システムのうち少なくとも 1 つでドメイン外と判断されたことから、ICH M7(R1)に従って分類できなかった。8 種類の不純物は、いずれも警告構造又は未分類の特徴に基づいて潜在的に変異原性を有すると判断され、クラス 3 に分類された。12 種類の不純物が変異原性に関する警告構造を示したが、警告を受けた下部構造は、試験で変異原性がみられなかった原薬中にも存在する。これらはクラス 4 に分類され、変異原性なしと判断された。26 種類の不純物は、変異原性に関する構造警告を示さないか、若しくは変異原性がないことを示す十分なデータが認められた。これらはクラス 5 に分類され、変異原性なしと判断された。

品質管理に関連する詳細な情報及び臨床試験用原薬バッチにおける変異原性不純物検査に関連する分析結果を、Module 3、S.2.3、S.2.4 及び S.3.2 項に示す。利用可能な安全性及び品質のデータをまとめると、AVAL に関連したヒトへの明らかな変異原性リスクはないと考えられる。

また、不　純　物　U　*は、細菌を用いる復帰突然変異試験において陰性であった。

＊新薬承認情報提供時に置換

4.7.2 不純物／分解物の評価

製剤中不純物の規格値をサポートするため、更なる試験を実施した。AVAL 製剤中の 不 純 物 T * の毒性を評価するため、不 純 物 T *を添加した AVAL のサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験並びに *in vitro* の細菌を用いる復帰突然変異試験及び染色体異常試験を実施した。

不 純 物 T *を添加した AVAL の GLP 適用 13 週間反復投与毒性試験を、カニクイザルを用いて実施した。サルに、不 純 物 T *(3、6 又は 12.55 mg/kg）を添加した AVAL を、0 又は 50 mg/kg の用量で、約 6 時間の点滴静注により、2 週に 1 回、13 週間投与した。 死亡は認められなかった。過敏症に一致する一般状態の変化として、散発的嘔吐（全ての AVAL 投与群）並びに顔面の紅斑及び腫脹（AVAL 50 mg/kg / 不 純 物 T *6 mg/kg 群の雄 1 例で 29 日目のみ）が観察された。体重、摂餌量、臨床検査、眼科学的検査、バイタルサイン（心拍数、体温、呼吸数、血圧）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において変化は認められなかった。いずれの投与日においても曝露量は同程度であったことから、投与期間を通して曝露量が維持されたと考えられた。種々の濃度の 不 純 物 T *を AVAL に添加しても、AVAL の曝露量に対する明らかな影響はみられなかった。以上、種々の量の 不 純 物 T *を添加した AVAL の投与群間で差はみられなかった。2 週に 1 回投与による AVAL の NOAEL は、不 純 物 T *12.55 mg/kg を添加した高用量の 50 mg/kg であった。NOAEL での 85 日目における AVAL の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄で 3920 μg·h/mL、雌で 2450 μg·h/mL であった。

不 純 物 T *の遺伝毒性を、ネズミチフス菌の 5 種類の菌株（TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び TA102）を用いる GLP 適用の Ames 試験において、代謝活性化（Aroclor 1254 誘導ラット肝 S9）の存在下及び非存在下で検討した。処理の 48 時間後に、特定の最小寒天培地上で増殖した復帰変異コロニー数を測定した。いずれの菌株においても、5000 μg/プレートまでの濃度で、代謝活性化の存在下及び非存在下での復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

不 純 物 T *の遺伝毒性を評価するため、ヒトリンパ球を用いる GLP 適用の *in vitro* 染色体異常試験も、代謝活性化の存在下及び非存在下で実施した。ヒト末梢血リンパ球を 不 純 物 T *の 500 μg/mL までの濃度に 3 又は 20 時間（S9 mix 非存在下）及び 3 時間（S9 mix 存在下）曝露し、回収時点（処理開始 20 時間後）まで増殖させた。500 μg/mL までの濃度において、代謝活性化の存在下及び非存在下で染色体の構造異常及び数的異常の増加は認められなかった。

4.7.3 その他の評価

AVAL について DALA 評価を実施した。AVAL と乱用性が知られている薬物との薬理学的及び構造的な類似性はみられない。また、ERT については速やかな血液脳関門の通過が示されていない。血液脳関門の存在により、中枢神経系に拡散するのは小型（5 kDa 未満）かつ脂溶性の分子のみである。AVAL 及び ALGLU は分子量が大きいため、関門を通過して拡散しないと予想される。AVAL 又は ALGLU が、オピエート、セロトニン作動性若しくはドパミン作動性の受容体といった乱用に関与する受容体又はトランスポーターに結合することを示唆するエビデンスはない。

反復投与薬理試験及び薬物動態試験において、マウスに、AVAL を 20 mg/kg まで、ALGLU を 100 mg/kg までの用量で、それぞれ週 1 回、計 4 回投与したところ、行動変化は認められなかった。

カニクイザルを用いた AVAL の 26 週間反復投与毒性試験に組み込んだ詳細なホームケージ神経行動検査及び深部体温測定では、神経行動変化は示されなかった。マウス及びサルを用いた AVAL の反復投与毒性試験において、AVAL 関連の中枢神経系の変化は報告されなかった。

3 つの臨床試験（EFC14028、LTS13769 及び ACT14132）において、依存性及び薬物乱用性に関連する可能性がある AVAL についての有害事象を評価した。調査した有害事象において、中枢神経系活性、薬物乱用及び依存を裏付けるものはなかった。さらに、18 年間にわたる ALGLU の臨床使用では乱用のエビデンスは認められず、AVAL における M6P 結合による乱用性の変化はないと予想される。

以上、AVAL は依存及び乱用性のシグナルを示さず、化学構造、薬理作用、作用機序並びに非臨床及び臨床データからは、乱用が知られる既知の薬物との類似性はみられなかった。したがって、乱用及びその結果としての公衆衛生へのリスクはないと予想される。このため、薬物乱用性を評価する試験は実施しなかった。

5　総括及び結論

非臨床試験により、AVAL は、GAA の両対立遺伝子が相同的組換えにより不活性化されたポンペ病のマウスモデルにおいて、心臓、横隔膜及びその他の骨格筋から、グリコーゲンを効果的に低下させる作用があることが示された。実施した試験における静脈内投与での薬理学的作用量は、心臓組織では 4 mg/kg、横隔膜及びその他の骨格筋では 12 mg/kg であった。このモデルにおけるグリコーゲン減少を指標とした AVAL の効果は、用量ベースで比較すると、ALGLU と比較して約 3～7 倍強力であると考えられる。

CD-1 マウス及びカニクイザルを用いた単回投与用量漸増試験において、薬物動態の飽和の特徴である消失半減期の延長、用量補正した曝露量の増加及びクリアランスの低下が認められた。AVAL の消失半減期は、いずれの動物種においても同程度であった。CD-1 マウスに反復投与したとき、初回及び 4 回目の投与間で PK パラメータの差はみられなかった。同様に、カニクイザルでは、40 mg/kg の用量での 1 回目と 4 回目の投与間で有意差はみられなかったが、120 mg/kg では初回及び 4 回目の投与間で有意差（クリアランスの低下及び曝露量増加）が認められた。さらに、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験では、反復投与による用量内 PK パラメータの変化がみられた。これらの変化として、消失半減期の延長、最高濃度及び曝露量の増加並びにクリアランスの低下が、7 回目及び 13 回目投与のいずれにおいても認められた。その理由は不明であるが、これらの所見は、不純物Ｔ･含量を高めた AVAL の 3 か月間反復投与毒性試験では認められなかった。AVAL と ALGLU と比較した結果、幾つかの薬物動態パラメータに違いがあることが示された。これらの違いは、AVAL での消失半減期の短縮及び分布容積減少であった。GAA ノックアウトマウスでは、AVAL の大部分が肝臓に分布し、次いでより少ない量が心臓に、更に少ない量が骨格筋に分布した。ALGLU との比較では、両酵素はマウスにおいて類似した組織分布パターンを示していた。

反復投与毒性試験では、CD-1 マウス及びカニクイザルのいずれにおいても、AVAL の忍容性はおおむね良好であった。マウスでは、このヒトタンパク質に対する顕著な過敏症反応が散見されたことから、DPH の前投与が必要になった。マウスの探索的（GLP 非適用）14 日間反復投与毒性試験では、精巣、精巣上体及び肝臓で所見が観察されたが、その後のより長期の試験では、マウス及びサルのいずれにおいても同様の所見は認められなかった。したがって、探索的 14 日間試験におけるこれらの変化が AVAL と関連する可能性は低いと考えられる。マウスでは AVAL に対する過敏症反応がみられたため、慢性毒性試験はサルのみで実施した。サルに AVAL を 2 週に 1 回、26 週間静脈内投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 200 mg/kg であった。

マウス及びサルの反復静脈内投与毒性試験における NOAEL での曝露量と、ヒトに 20 mg の用量で 2 週に 1 回静脈内投与したときの曝露量との比較による動物／ヒト AVAL 曝露量比の要約を表 4 に示す。サルを用いた慢性毒性試験における曝露量比（サルの NOAEL における血清中曝露量／成人ポンペ病患者に 20 mg/kg の用量で 2 週に 1 回静脈内投与したときの血清中曝露量）は 23 倍である。

＊新薬承認情報提供時に置換

表 4 - AVAL を用いた反復投与毒性試験

動物種	試験の種類（期間／経路）	用量	NOAEL	NOAEL での $AUC_{0\text{-}inf}$ [a,b] (μg· h/mL)	曝露量比 [c]
マウス	14 日間、静脈内（GLP 非適用）	0、50 mg/kg、2 日に 1 回	ND	ND	ND
	28 日間、静脈内（GLP 非適用）	0、4、40、120 mg/kg/週	120 mg/kg/週	4513	3.7X
サル	28 日間、静脈内（GLP 非適用）	0、4、40、120 mg/kg/週	120 mg/kg/週	5900	4.8X
	26 週間、静脈内（GLP 適用）	0、50 又は 200 mg/kg、2 週に 1 回	200 mg/kg、2 週に 1 回	28162	23X

略語：ND：算出せず、NOAEL：無毒性量、AUC：血清中濃度－時間曲線下面積

a 雌雄併合

b 最終投与後の曝露量

c ポンペ病患者に AVAL を 20 mg/kg の用量で 2 週に 1 回投与したときの 49 週目における臨床曝露量（$AUC_{0\text{-}2W}$）である 1230 μg·h/mL に基づく（EFC14028）。

ICH S6 (R1)及び CDER ガイドライン案に基づき、AVAL の GLP 適用の遺伝毒性試験は実施しなかった。しかし、GAAKO マウスを用いた探索的 *in vivo* 小核試験を、150 mg/kg（投与日に 50 mg/kg の用量で計 3 回投与）までの用量での静脈内投与により実施したところ、遺伝毒性は認められなかった。

ICH S6 (R1)及び CDER ガイドライン案に基づき、AVAL のがん原性試験は実施しなかった。その代わり、AVAL のがん原性リスク評価を、非臨床安全性試験の結果、*in silico* 調査、文献検索、マイオザイム®及び Lumizyme®のデータ精査並びに文献検索、及び不純物 T *の[redacted]部分及び AVAL におけるその他のヒドラジン含有化合物の放出の有無を評価することにより実施した（Module 2.7.2、[2.2 項]参照）。証拠の重み付け（weight of evidence）に基づく評価により、AVAL のがん原性を評価するための非臨床試験は必要ないと判断し、がん原性試験は実施しなかった。

生殖発生毒性試験における毒性変化は、AVAL の最高用量（マウスを用いた雌雄併合の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では 50 mg/kg の 2 日に 1 回静脈内投与、マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では 50 mg/kg の 2 日に 1 回静脈内投与、非妊娠ウサギを用いた探索的試験では 80 mg/kg/日静脈内投与、妊娠ウサギを用いた探索的試験では 40 mg/kg/日の 1 日 1 回静脈内投与、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する本試験では 100 mg/kg/日）で認められなかった。妊娠マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験では、AVAL を最高用量の 50 mg/kg/日で投与したところ、一部の母動物でアナフィラキシー様反応を含む免疫応答が認められた。この群では着床後胚損失率及び平均後期吸収胚数の増加がみられた。胎盤移行試験により、AVAL はマウスにおいて母動物から胎児の血液循環に移行しないことが判明したことから、胚・胎児の変化は免疫応答に関連する母動物毒性に起因したものと考えられた。静脈内投与での母動物に関する NOAEL は

＊新薬承認情報提供時に置換

50 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$ = 2080 μg·h/mL）、発生に関する NOAEL は 20 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$ = 582 μg·h/mL）であった。

幼若マウスを用いた GLP 適用の 9 週間反復静脈内投与毒性試験において、AVAL を 2 週に 1 回静脈内投与したときの忍容性は、最高投与量の 100 mg/kg までおおむね良好であり、発生評価項目への影響は認められなかった。

サルの点滴静注部位を検査したところ、AVAL 投与に関連する毒性変化は示されなかった。

利用可能な安全性及び品質データによると、AVAL の不純物からの明らかなヒトへの変異原性リスクはないと考えられる。

製剤中不純物の規格値をサポートするため、更なる試験を実施した。不純物 T *を添加した AVAL をカニクイザルに 2 週に 1 回、13 週間投与したところ、高用量である 50 mg/kg（AVAL）/12.55 mg/kg（不純物 T *）までの用量で、毒性への影響はみられなかった。不純物 T *は、*in vitro* の細菌を用いる復帰突然変異試験（5000 μg/プレートまで）及びヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験（500 μg/mL まで）において遺伝毒性を示さなかった。

AVAL の薬物乱用性を評価した。AVAL は依存性及び乱用性のシグナルを示さず、化学構造、薬理作用、作用機序並びに非臨床及び臨床データからは、乱用が知られる既知の薬物との類似性はみられなかった。したがって、乱用及びその結果としての公衆衛生へのリスクはないと予想された。このため、薬物乱用性を評価する試験は実施しなかった。

以上、適切な ICH ガイドライン及び国際的ガイダンスに基づいて実施した AVAL の非臨床試験結果は、AVAL の臨床試験プログラムの実施、及びポンペ病を適応とした AVAL の承認申請をサポートするものである。

＊新薬承認情報提供時に置換

6　参考文献一覧

1. Hirschhorn R and Reuser AJJ. Glycogen Storage Disease Type II: Acid α-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency. Chapter 135 in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 2001. p3389-420.
2. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. Recombinant human acid α-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. Neurology. 2007;68(2):99-109.
3. Nicolino M, Byrne B, Wraith JE, Leslie N, Mandel H, Freyer DR, et al. Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease. Genet Med. 2009;11(3):210-9.
4. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. A Randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. N Engl J Med. 2010;362(15):1396-406.
5. Raben N, Nagaraju K, Lee E, Kessler P, Byrne B, Lee L, et al. Targeted disruption of the acid α-glucosidase gene in mice causes and illness with critical features of both infantile and adult human glycogen storage disease Type II. J Biol Chem. July 1998; 273(30): 19086-92.
6. Raben N, Nagaraju K, Lee E, and Plotz P. Modulation of disease severity in mice with targeted disruption of the acid α-glucosidase gene. Neuromusc Disord. 2000; 10: 283-91.

7　付録

7.1　付録 1 - 試験を実施しなかった理由

CTD の項	理由
4.2.1 薬理試験	
4.2.1.2 副次的薬理試験	非臨床の副次的薬理試験は実施しなかった。
4.2.1.3 安全性薬理試験	安全性薬理評価項目はサルを用いた 6 か月間反復投与毒性試験で評価した。
4.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験	非臨床の薬力学的薬物相互作用試験は、有用なデータが得られないと考えられたため、実施しなかった。
4.2.2 薬物動態	
4.2.2.4 代謝	AVAL はペプチド加水分解を介して代謝分解されると予想されることから、非臨床代謝試験は実施しなかった。
4.2.2.5 排泄	酵素が排泄によって消失することはないと予想されることから、排泄試験は実施しなかった。[a]
4.2.2.6 薬物動態学的薬物相互作用	本薬及び酵素の ADME プロファイルに基づき必要はないと考えられることから、薬物動態学的薬物相互作用試験は実施しなかった。
4.2.2.7 その他の薬物動態試験	その他の非臨床薬物動態試験は実施しなかった。
4.2.3 毒性試験	
4.2.3.1 単回投与毒性試験	急性毒性については、反復投与毒性試験の初回投与後に評価した。
4.2.3.3.1 遺伝毒性試験 - *In vitro*	高分子については、*in vitro* 遺伝毒性試験は必要とされていない。
4.2.3.4 がん原性試験	がん原性試験は、がん原性リスク評価で得られた証拠の重み付け（weight of evidence）に基づいた評価の結果、実施しなかった。
4.2.3.6 局所刺激性試験	局所刺激性については、マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験で評価した。
4.2.3.7 その他の毒性試験 4.2.3.7.1 抗原性試験 4.2.3.7.2 免疫毒性試験 4.2.3.7.3 作用機序解明試験 4.2.3.7.4 依存性試験 4.2.3.7.5 代謝物の試験	これらの試験を実施しなかった理由は、一般毒性試験で関連の所見がみられなかったこと及び AVAL が生物製剤であることである。

a 医薬品規制調和国際会議ガイドライン S6 (R1)「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」に基づく根拠