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

2.6.1 緒言

Total number of pages: 8

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

略号と用語の定義 3

参 考 文 献 8

略号と用語の定義

ALGLU:	アルグルコシダーゼ　アルファ（alglucosidase alfa）
AUC:	血清中濃度－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）
CAS:	ケミカル・アブストラクツ・サービス（Chemical Abstracts Service）
CDER:	医薬品評価研究センター（Center for Drug Evaluation and Research）
CIM6Pr:	カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（Cation-independent mannose-6-phosphate receptor）
DPH:	ジフェンヒドラミン（Diphenhydramine）
GAA:	酸性 α-グルコシダーゼ（Acid alpha -glucosidase）
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）
ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation）
IV:	静脈内（Intravenous）
NOAEL:	無毒性量（No-observable-adverse-effect-level）
PAD:	薬理学的作用量（Pharmacological active dose）
PK:	薬物動態（Pharmacokinetic）
qow:	2 週に 1 回（Every other week）
rhGAA:	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（Recombinant human acid alpha -glucosidase）
$t_{1/2z}$:	最終相半減期（Terminal half-life）
Vss:	分布容積（Volume of distribution）

2.6.1 緒言
アバルグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

ポンペ病（別名、酸性マルターゼ欠損症又は糖原病［GSD］II 型）は、ライソゾームにおいてグリコーゲン分解酵素である酸性 α-グルコシダーゼ（GAA）が欠乏することにより引き起こされる希少常染色体劣性遺伝性疾患である。体内組織、特に心臓、呼吸器及び四肢骨格筋にグリコーゲンが蓄積するため、影響を受けた細胞の構造及び機能が障害され、多系統に病変が生じ、最終的に死に至る。

アルグルコシダーゼ　アルファ（遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ［rhGAA］、以下 ALGLU）は、ポンペ病患者において有効性、すなわち乳児の侵襲的人工呼吸器非使用下での生存期間の延長、呼吸機能の安定化及び 6 分間歩行試験で測定される歩行距離の改善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®）。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。骨格筋への治療効果には、より大きなばらつきがみられる。これには、少なくとも部分的には、ALGLU 上に存在するビス-マンノース-6-リン酸（bis-M6P）の濃度が比較的低いことに関連していると考えられる。なぜなら、ALGLU などのタンパク質はカチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CIM6Pr）を介してライソゾームに輸送されるため、CIM6Pr は ALGLU の細胞への結合及び取込みに極めて重要な役割を果たしているからである。このことを裏付ける非臨床試験結果として、筋特異的 CIM6Pr/GAA ノックアウトマウスモデルでは ALGLU の取込みが減少し、そのグリコーゲン低下作用が抑制されたことが示されている(1)。さらに、同文献において、CIM6Pr はヒト心臓組織に比べ骨格筋では濃度が低いこと、ビスリン酸化グリカンはモノリン酸化型よりも CIM6Pr への親和性が著しく高いことが報告されている。したがって、ALGLU 上の bis-M6P レベルを大幅に増加させると、骨格筋への取込みを増加させることが可能と考えられる。

アバルグルコシダーゼ アルファ（neoGAA、GZ402666、以下、AVAL）は ALGLU 上の酸化シアル酸残基に、多数のヘキサマンノース（2 つの末端 M6P 部分を含む）構造（グリカン）を結合させたものである。本申請資料中に、ALGLU 上の bis-M6P レベルの増加によるマウスポンペ病モデルでのグリコーゲン低下作用の増強、及び AVAL のポンペ病患者における臨床成績が ALGLU よりも優れていることが示されている。

非臨床試験では、相同組換えにより GAA の両アレルが不活性化しているマウスポンペ病モデルにおいて、AVAL が心臓、横隔膜及び骨格筋からグリコーゲンを効果的に低下させることが示された。実施した試験条件下での薬理学的作用量（PAD）は、心臓組織で 4 mg/kg、横隔膜及び骨格筋で 12 mg/kg と考えられた。本マウスモデルにおける AVAL のグリコーゲン低下作用は、用量で比較すると ALGLU よりも約 3～7 倍強いと考えられた。

マウス及びサルを用いた単回投与用量漸増試験において、飽和動態の特徴である循環血中半減期の延長及び全身曝露量の増加並びにそれに対応したクリアランスの減少が認められた。AVAL の最終相半減期（$t_{1/2z}$）は動物種間で同程度であった。反復投与においては、マウスへの初回投与後と 4 回目投与後で薬物動態（PK）パラメータに差は認められなかった。同様に、サルに 40 mg/kg の用量で投与したとき、初回投与後と 4 回目投与後の間に有意差は認められなかったが、120 mg/kg の用量で投与したときには、初回投与後と 4 回目投与後の間に有意差が認められた（クリアランスの減少及び曝露量の増加）。更に、サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験では、連続投与により PK パラメー

タが用量群内で変化した。これらの PK 変化の特徴は、7 回目及び 13 回目の両方の投与における半減期、最大濃度及び曝露量の延長／増加、並びにクリアランスの減少であった。この原因は不明であるが、不純物 T *を添加した AVAL の 3 か月間反復投与毒性試験ではこれらの所見は認められなかった。

AVAL は ALGLU と比較して、幾つかの重要な PK パラメータが異なっていることが試験から示された。これらの違いの特徴として、AVAL の方が $t_{1/2z}$が短く、分布容積（Vss）が小さかった。GAA ノックアウトマウスにおいて、AVAL の大半は肝臓に分布し、次いで心臓、骨格筋の順に分布量が減少した。マウスにおける組織内分布を ALGLU と比較したとき、両分子で類似したパターンを示すことが明らかになった。

反復投与毒性試験において、AVAL はマウス及びサルの両方で概して良好な忍容性を示した。しかし、AVAL はヒトタンパク質であるため、これに対する過敏症反応が散見された。マウスで最も顕著にみられ、ジフェンヒドラミン（DPH）の前投与を必要とした。マウスを用いた 14 日間探索的（GLP 非適用）試験において、50 mg/kg の AVAL を 2 日に 1 回、13 日間静脈内（IV）投与したとき、精巣、精巣上体及び肝臓に剖検所見が認められた。この試験において病理組織学的評価は実施しなかった。その後の試験では、マウス（28 日間反復投与毒性試験の 120 mg/kg 週 1 回、受胎能試験で 50 mg/kg 2 日に 1 回投与）及びサル（28 日間反復投与毒性試験の 120 mg/kg/週 1 回、26 週間反復投与毒性試験の 200 mg/kg 2 週に 1 回［qow］投与）のいずれにおいても、これらの器官に同様の所見は認められなかった。したがって、14 日間探索的試験における剖検所見が AVAL に関連している可能性は低いと考えられた。マウスでは AVAL に対する過敏症反応が生じるため、慢性毒性の評価はサルのみで実施した。サルに AVAL を 26 週間点滴 IV 投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 200 mg/kg qow であった。AUC に基づく曝露量比（サルにおける NOAEL／成人用量 20 mg/kg）は 23 倍であった。

ICH S6 (R1)及び CDER の非臨床ガイドライン（Investigational Enzyme Replacement Therapy Products: Nonclinical Assessment guidance for industry）案に従い、AVAL の GLP 適用遺伝毒性試験の本試験は実施しなかった。しかし、探索的に *in vivo* 小核試験をマウスで実施したところ、150 mg/kg IV（50 mg/kg 1 日 3 回）までの用量で陰性であった。

ICH S6 (R1)及び CDER の非臨床ガイドライン（Investigational Enzyme Replacement Therapy Products: Nonclinical Assessment guidance for industry）案に従い、AVAL のがん原性試験は実施しなかった。しかし、AVAL の非臨床安全性試験結果、*in silico* 検索、文献検索、マイオザイム®及び Lumizyme®のデータの精査及び文献検索、並びに AVAL 中の不純物 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の評価（Module 2.7.2 、[2.2 項]参照）により、AVAL のがん原性リスク評価を行った。証拠の重み付け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ないと考えられた。

以下の生殖発生毒性試験において、AVAL の最高用量で毒性変化は認められなかった：

- 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（50 mg/kg IV 2 日に 1 回）

＊新薬承認情報提供時に置換

- 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（50 mg/kg IV 2 日に 1 回）
- 非妊娠ウサギ（80 mg/kg/日 IV）及び妊娠ウサギ（40 mg/kg/日点滴 IV）を用いた探索的試験
- 妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する本試験（100 mg/kg/日点滴 IV）

妊娠マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験において、AVAL を最高用量の 50 mg/kg/日で投与した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認められた。マウスを用いた胎盤移行性試験において、AVAL の母動物から胎児血液循環への移行は認められなかったことから、胚・胎児発生への影響は免疫応答に関連する母動物毒性に起因することが示唆された。母動物の NOAEL は 50 mg/kg/日 IV（$AUC_{0\text{-}24h}$ = 2080 μg·h/mL）、発生に関する NOAEL は 20 mg/kg/日 IV（$AUC_{0\text{-}24h}$ = 582 μg·h/mL）であった。

幼若マウスを用いた GLP 適用 9 週間 IV 投与毒性試験において、AVAL は最高投与量の 100 mg/kg IV qow まで概して良好な忍容性を示した。

サルで点滴 IV 投与部位を検査したところ、AVAL 投与に関連する毒性変化は認められなかった。

得られた安全性及び品質データにおいて、本新規製剤に関連するヒトへの明らかな遺伝毒性リスクは認められなかった。

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。漸増濃度の 不純物 T *を添加した AVAL をサルに 13 週間投与したとき、高用量の 50 mg/kg AVAL／12.55 mg/kg 不純物 T *qow 投与まで毒性変化は認められなかった。不純物 T *は、*in vitro* で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 *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 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、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。乱用性を示すデータがないことから、乱用の結果として起こりうる公衆衛生へのリスクもないと予想された。このため、薬物乱用性評価試験は実施しなかった。

以上、本 Module に示す一連の非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験を適切な ICH 及び国際的ガイドラインに基づいて実施することにより AVAL を評価した。これらの試験結果は、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

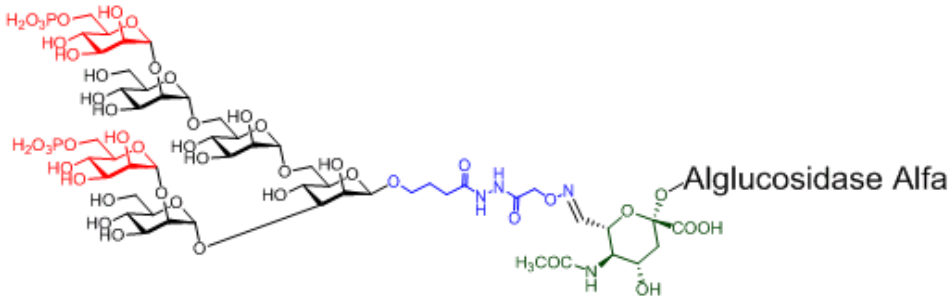
名称、構造式、分子式及び相対分子量

化学名： 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

開発コード番号又は名称： GZ402666

CAS 登録番号： 1802558-87-7

構造式：



分子式： 概略の分子式はアルグルコシダーゼ アルファ（$C_{4490}H_{6829}N_{1197}O_{1298}S_{32}$、タンパク質の式）+ (6-8)グリカン（$C_{42}H_{75}N_3O_{40}P_2$）。

相対分子量： GZ402666 の概略の総分子量は 120000 Da。

参 考 文 献

1. Koeberl DD, Luo X, Sun B, McVie-Wylie A, Dai J, Li S, et al. Enhanced efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle. Mol Genet Metab. 2011 June; 103(2):107-12.

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

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 30

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表 目 次 4

図 目 次 4

略号と用語の定義 5

1　　まとめ 6

1.1　　分析法 8

1.1.1　　グリコーゲン量の生化学的分析 8

1.1.2　　グリコーゲン量の組織化学的分析 8

1.1.3　　血清中の抗体の測定：抗 AVAL 及び抗 ALGLU 特異的 IgG 抗体 8

1.2　　動物モデル 9

2　　効力を裏付ける試験 11

2.1　　GAAKO マウスに AVAL 及び ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下（[redacted]-1948 試験） 11

2.2　　GAAKO マウスに AVAL 及び ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下（[redacted]-00587 試験） 14

2.3　　GAAKO マウスに ALGLU 又は様々なレベルの bis-M6P を含有する AVAL を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下（[redacted]-3981 試験） 17

2.4　　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 GAAKO マウスに週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの薬力学的作用（[redacted]-02367 試験） 20

3 副次的薬理試験 23

4 安全性薬理試験 24

4.1 中枢神経系（CNS） 24

4.2 心血管系 25

4.3 呼吸系 25

4.4 腎／泌尿器系 25

4.5 胃腸管系 26

4.6 自律神経系 26

4.7 他の器官系 26

5 薬力学的薬物相互作用試験 27

6 考察及び結論 28

参 考 文 献 30

表　目　次

表 1 - 薬理試験の概要 6
表 2 - 非臨床薬理試験で使用したロット 7
表 3 - 試験デザイン - ■-1948 試験 11
表 4 - 試験デザイン - ■-00587 試験 15
表 5 - 被験物質 - ■-3981 試験 18
表 6 - 試験デザイン - ■-3981 試験 18
表 7 - 試験デザイン – ■-02367 試験 21
表 8 - 評価した各 CNS 評価項目 24

図　目　次

図 1 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの各組織におけるグリコーゲン量（■-1948 試験） 13
図 2 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの抗薬物抗体価（■-1948 試験） 14
図 3 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの各組織におけるグリコーゲンの低下（■-00587 試験） 16
図 4 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの抗薬物抗体価（■-00587 試験） 17
図 5 - SAM6 を週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの各組織におけるグリコーゲン量（■-3981 試験） 19
図 6 - ALGLU 又は SAM6 を週 1 回、計 4 回投与したときの抗薬物抗体価（■-3981 試験） 20
図 7 - AVAL を週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの各組織におけるグリコーゲン量（■-02367 試験） 22

略号と用語の定義

ALGLU:	アルグルコシダーゼ アルファ（alglucosidase alfa）
AUC:	血清中濃度－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）
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）
GAA:	酸性 α- グルコシダーゼ（Acid alpha-glucosidase）
GAAKO:	酸性 α-グルコシダーゼノックアウト（Acid alpha-glucosidase knock out）
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）
HRP:	ホースラディッシュペルオキシダーゼ（Horseradish peroxidase）
IP:	腹腔内（Intraperitoneal）
IV:	静脈内（Intravenous）
M6P:	マンノース-6-リン酸（Mannose-6-phosphate）
NOAEL:	無毒性量（No-observable adverse effect level）
OD:	光学密度（Optical density）
PAD:	薬理学的作用量（Pharmacologic active dose）
PAS:	過ヨウ素酸シッフ（Periodic acid-schiff）
PSCP:	プレート固有のカットポイント（Plate-specific cut point）
qow:	2 週に 1 回（Every other week）
rhGAA:	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（Recombinant human acid alpha glucosidase）

1　まとめ

アバルグルコシダーゼ アルファ（以下、AVAL）の薬理特性を評価するため、酸性 α-グルコシダーゼ（GAA）ノックアウト（GAAKO）マウスを用いた非臨床薬理試験を 4 試験実施した。GAAKO マウスへの AVAL 反復投与によるグリコーゲン低下作用を 2 試験で評価した（[■-1948 試験]及び[■-00587 試験]）。また、AVAL の効力をアルグルコシダーゼ　アルファ（遺伝子組換えヒト GAA［rhGAA］又はマイオザイム®、以下 ALGLU）よりも増強するために必要なグリカンの数（[■-3981 試験]）、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 の効力（[■-02367 試験]）を検討した。

AVAL についての独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、野生型カニクイザルに AVAL を 200 mg/kg 2 週に 1 回（qow）までの用量で 26 週間静脈内（IV）投与した慢性毒性試験（Module 2.6.6 、[3.2.2 項]及び[0658-11097 試験]参照）において安全性薬理評価項目を評価した。

本 Module で考察する薬理試験を表 1 に要約するとともに、Module 2.6.3、[表 2.6.3.1]及び[表 2.6.3.2.1]にも要約する。AVAL は一部の試験報告書等では、SAM6 又は neoGAA と記載されている。

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 マウス	非適用	IV ボーラス	0、4、12 及び 20	■-1948
効力を裏付ける試験	GAAKO マウス	非適用	IV ボーラス	0、4、12 及び 20	■-00587
効力を裏付ける試験	GAAKO マウス	非適用	IV ボーラス	0 及び 20	■-3981
効力を裏付ける試験	GAAKO マウス	非適用	IV ボーラス	0、4 及び 12	■-02367
安全性薬理試験	カニクイザル	適用	点滴静注	0、50 及び 200	0658-11097

非臨床薬理試験で使用された各 AVAL ロットの組成及び、各ロットの製造に使用したグリカンの供給源を表 2 に示す。

表 2 - 非臨床薬理試験で使用したロット

試験番号	被験物質	ロット番号	組成	グリカンの供給源
[redacted]-1948	AVAL	[redacted]	25 mmol/L リン酸ナトリウム、2%マンニトール、0.005% Tween-80、pH6.25	[redacted]
[redacted]-3981	SAM6-1 SAM6-2 SAM6-3 SAM6-4 SAM6-5	[redacted]	25 mmol/L リン酸ナトリウム、2%マンニトール、0.005%ポリソルベート 80、pH 6.4	[redacted]
[redacted]-00587	AVAL	[redacted]	10 mmol/L L-ヒスチジン、2%グリシン、2%マンニトール、0.01% Tween-80、pH6.5	[redacted] 及び [redacted]
[redacted]-02367	AVAL	[redacted]		[redacted] 及び [redacted]

GAAKO マウスに AVAL を週 1 回、計 4 回投与したときの組織内グリコーゲン低下作用は、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]）。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これらの試験データから示された。すなわち、心臓組織では 4 mg/kg の用量でグリコーゲンが大幅に低下したことから、心臓における AVAL の PAD は 4 mg/kg 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 以上であった。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]）。ALGUL 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。シアル酸を ALGLU の規格内の異なるレベル（5.5 及び 7.2 mol/mol）含有する ALGLU から製造した 2 つのロットの AVAL を比較検討した（[[redacted]-02367 試験]）。その結果、試験で評価した AVAL の 2 つのロットは、組織内グリコーゲンを同程度に低下することが示された。このことから、シアル酸レベルが 5.5～7.2 mol/mol 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。

GAAKO マウスに ALGLU を投与した時、抗薬物抗体が産生した。このため、AVAL 投与後の抗薬物抗体の産生を、[redacted]-1948、[redacted]-00587 及び[redacted]-3981 試験で評価した。全体として、実施した試験条件下で、AVAL と ALGLU の間に産生した抗体の抗体価に差は認められなかった。

AVAL の安全性薬理評価は、野生型カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験（[0658-11097 試験]）の一部として実施した。その結果、AVAL を 200 mg/kg までの用量で単回及び反復投与したとき、神経行動活性、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。

1.1 分析法

1.1.1 グリコーゲン量の生化学的分析

AVAL 又は ALGLU の非臨床試験における試料中のグリコーゲン量の生化学的評価は、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。この生化学的グリコーゲン量アッセイの概要は[DIV1924 試験]に記載されている。検体中のグルコースは比色分析（Trinder 試薬）により測定し、グルコース標準曲線を用いて、グルコースの mg/dL で表した。内因性グルコースのバックグラウンド値により補正した。グルコースの 1 単位重量がグリコーゲンの 1 単位重量に等しいとし、検体中のグリコーゲンから遊離したグルコースの総量は、存在していたグリコーゲン量に等しいとした。結果を mg グリコーゲン/g 組織湿重量とした。

1.1.2 グリコーゲン量の組織化学的分析

グリコーゲン量の組織化学的分析は、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。既報(1)に従い、グリコーゲンを最適な状態で保存するため、組織を 3%グルタルアルデヒドで固定後、1%四酸化オスミウムで後固定し、エポンーアラルダイトに包埋した。組織から薄片を作製し、過ヨウ素酸シッフ（PAS）で染色した後、Richardson の対比染色を行い、高解像度の光学顕微鏡で評価した。コンピューター上で MetaMorph ソフトウエア（バージョン 6.1）を用いて組織形態計測を行い、グリコーゲンを定量した。

1.1.3 血清中の抗体の測定：抗 AVAL 及び抗 ALGLU 特異的 IgG 抗体

血清中抗 AVAL 特異的 IgG 抗体の定量は、Sanofi Genzyme Corporation（米国マサチューセッツ州フレーミングハム）で酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いて実施した（[SED0088 試験]）。血清中に存在する抗 AVAL 抗体に対する抗原として働く AVAL をマイクロタイタープレートにコートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）で標識したヤギ抗マウス IgG を用いて、AVAL-抗体複合体を検出した。HRP 酵素の発色基質であるテトラメチルベンジジンを添加すると、抗 AVAL 抗体価に比例して発色反応が生じた。発色はマイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の波長で測定した。

抗 AVAL 抗体 ELISA は、血清希釈倍率と検体から得られる光学密度（OD）450 が検出できなくなるポイント（カットポイント）との比を測定することにより、抗 AVAL IgG 抗体の相対的測定値が得られる抗体価測定アッセイである。このカットポイントは、各アッセイプレートに少なくともデュプリケートで含めた血清陰性対照の平均 OD450 値に基づいている。各アッセイ／プレートについて、陰性対照の平均 OD450 値にカットポイント係数（アッセイの適格性評価で決定したもの）を乗じてプレート固有のカットポイント（PSCP）を算出した。試験検体の平均 OD450 値が PSCP 以上である場合、その検体は抗 AVAL 抗体反応陽性と判定した。抗体価は Microsoft® Excel®の関数 TREND を用いて算出した。検体の OD450 反応と PSCP 値が交差する点の希釈倍率をその検体の抗体価とした。

必要とされる最小限の希釈で検討したとき、試験検体の OD450 値がカットポイントよりも低い場合には、検出限界未満と判定した。

抗 ALGLU 特異的 IgG 抗体も同様の方法で定量した（[DIV1923 試験]及び[[redacted]GSTR098 試験]）。マイクロタイタープレートにコートした ALGLU 及び HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いた ELISA を実施し、血清中抗 ALGLU 特異的抗体を検出した。抗 AVAL 抗体アッセイと同様に、各検体の OD450 反応とアッセイのカットポイントが交差する点の希釈倍率を算出することにより、検体の抗体価を測定した。抗 ALGLU 抗体 ELISA の最初の適格性評価において、アッセイカットポイントを 0.200 に固定した。カットポイント係数を設定し、浮動カットポイントの測定（抗 AVAL 抗体アッセイにおけるカットポイント測定と同じ）を可能にするため、更なる適格性評価を実施した。[[redacted]-1948 試験]及び[[redacted]-3981 試験]では抗体価の測定に固定カットポイントの 0.200 を使用したが、[[redacted]-00587 試験]及び[[redacted]-02367 試験]では浮動カットポイントを使用した。

1.2　動物モデル

非臨床試験プログラムに使用した GAAKO マウスは、Raben らによって作製されたものである(2)(3)。このポンペ病（糖原病 II 型）モデルは、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。

GAAKO マウスは、酵素補充療法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成人型の両方の疾患の重要な特徴を再現する(3)。ホモ接合型 6neo/6neo マウスは、GAA 酵素活性が欠如しているため、3 週齢までに心臓及び骨格筋のライソゾームにグリコーゲンが蓄積し始める。このホモ接合型マウスは成獣まで正常に成長し、生殖能を維持している。8～9 か月齢までに明らかな筋肉の消耗及び筋力の低下した動揺性の歩行を発現する。18～19 か月齢までに、進行した遅発型ポンペ病に類似した重度の進行性筋肉消耗疾患を発症する。この月齢のマウスでは、複数の器官（横隔膜及びその他の骨格筋、心臓及び脳を含む）における顕著なグリコーゲン蓄積とともに、心筋症、筋緊張低下、重度の運動機能障害、顕著な筋力低下及び筋肉の消耗が認められる(3)。

GAAKO マウスにおける疾患進行の経時変化は、特にグリコーゲン蓄積に関して、乳児型及び遅発型の両方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（筋肉の消耗及び歩行変化の発現）は、高齢期の疾患進行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肉病変の程度は、乳児期に発症した患者でみられるほど重度ではない。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。このマウスは内因性の GAA 酵素活性が欠如しているため、遺伝子組換え酵素である AVAL を臨床的に意味のある用量で投与し、AVAL 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。さらに、GAAKO マウスの心臓及び骨格筋にはグリコーゲンが蓄積するため、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が可能である。これ

らのマウスで実施した非臨床試験から、望ましい臨床結果を得るための適切な用量及び投与レジメンに関する知見も得られると考えられる。本 Module において要約する薬力学的試験は、明らかな筋力低下の徴候がみられない 6 か月齢未満のマウスを用いて実施した。したがって、これらの試験では、AVAL による臨床表現型の回復及び安定化作用は評価しなかった。ノックアウトマウスポンペ病モデルの欠点の 1 つは、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過敏症反応が認められると予測されることである。この反応を軽減するため、動物には投与の前後にジフェンヒドラミン（DPH）を投与した。

2　効力を裏付ける試験

2.1　GAAKO マウスに AVAL 及び ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下（[redacted]-1948 試験）

試験目的

本試験は、GAAKO マウスに AVAL を様々な用量で投与したときの種々の組織におけるグリコーゲンの低下を評価することを目的として実施した（[[redacted]-1948 試験]）。AVAL の有効性について ALGLU との比較評価も実施した。本試験では、ALGLU に合成グリカンをシアル酸の代わりにガラクトースで結合させた別の研究用物質も評価した。この研究用物質の結果は以下には記載しないが、試験報告書では考察している。

試験デザイン

GAAKO マウスに AVAL を 4～20 mg/kg の用量範囲で週 1 回、計 4 回投与した。比較のために、ALGLU も 20～100 mg/kg の用量範囲で投与した。マウスにヒトタンパク質を投与したときに予想される過敏症反応を予防するため、2 回目の投与から投与の 10～20 分前に DPH を 5 mg/kg 腹腔内（IP）投与した。最終投与 7 日後に全例を安楽死させ、種々の組織におけるグリコーゲン量を生化学的グリコーゲンアッセイで評価した。心臓及び四頭筋のグリコーゲン量は、PAS-Richardson 染色を用いた組織化学的アッセイでも評価した。また、AVAL 及び ALGLU を高及び低用量で投与した動物から採取した肺、肝臓、腎臓、心臓及び四頭筋の検体をホルマリンで固定後、パラフィンに包埋し、一般的な病理学的評価を実施した。血清を採取し、抗薬物抗体の評価を行った。試験デザインを表 3 に要約する。

表 3 - 試験デザイン - [redacted]-1948 試験

被験物質（ロット番号）	投与経路	用量（mg/kg）	投与レジメン	1 群あたりの動物数（性）	齢
溶媒	IV	0	週 1 回、計 4 回	6（雄 3／雌 3）	3～6 か月齢
AVAL（[redacted]）		4			
		12			
		20			
ALGLU（[redacted]）		20			
		60			
		100			

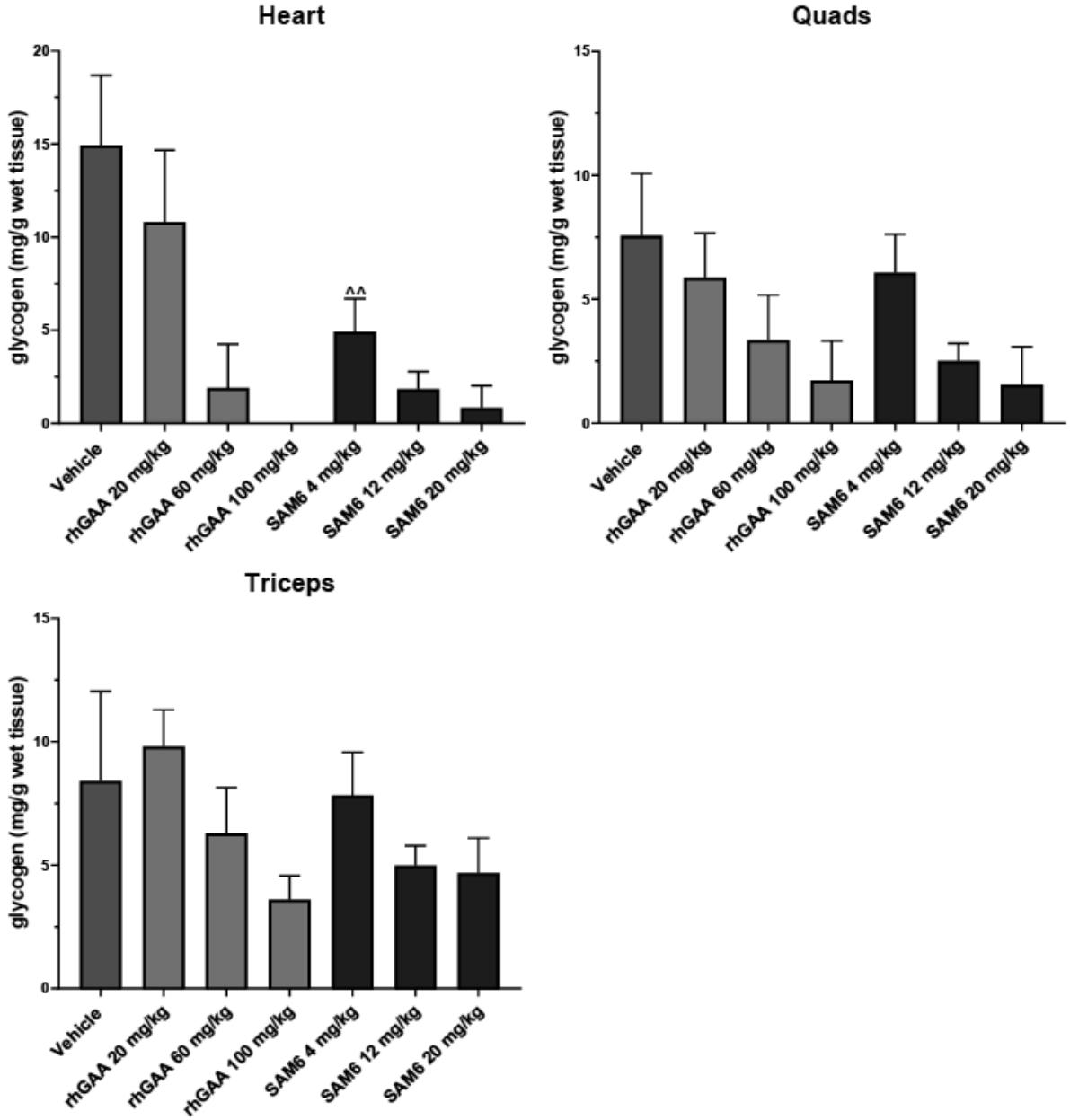
試験結果

生化学的グリコーゲン分析では、AVAL 及び ALGLU を投与した動物の種々の組織において用量依存的なグリコーゲンの低下が認められた（図 1）。週 1 回、計 4 回投与したとき、12 及び 20 mg/kg AVAL 投与群の心臓におけるグリコーゲン低下は、それぞれ 60 及び 100 mg/kg ALGLU 投与群と同様であった。4 mg/kg AVAL 投与群では、20 mg/kg ALGLU 投与群と比較して、心臓組織におけるグリコーゲン低下が統計学的に有意に大きかった（注：全ての組織について投与群間のみで統計解析を行った）。骨格筋においても、4、12 及び 20 mg/kg AVAL 投与群におけるグリコーゲン低下は、それぞれ 20、60 及び 100 mg/kg ALGLU 投与群と同様であった。グリコーゲン量の生化学的分析結果は、心臓及び四頭筋の組織化学的分析により裏付けられた。

ALGLU 及び AVAL を投与した全例で抗薬物抗体がみられた（図 2）。ALGLU 投与群と AVAL 投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。AVAL 投与群の抗体価は用量依存的に増加した（図 2）。しかし、観察された増加は互いの 1 アッセイ希釈倍率の範囲内であったため、生物学的に意味のあるものではないと考えられた。

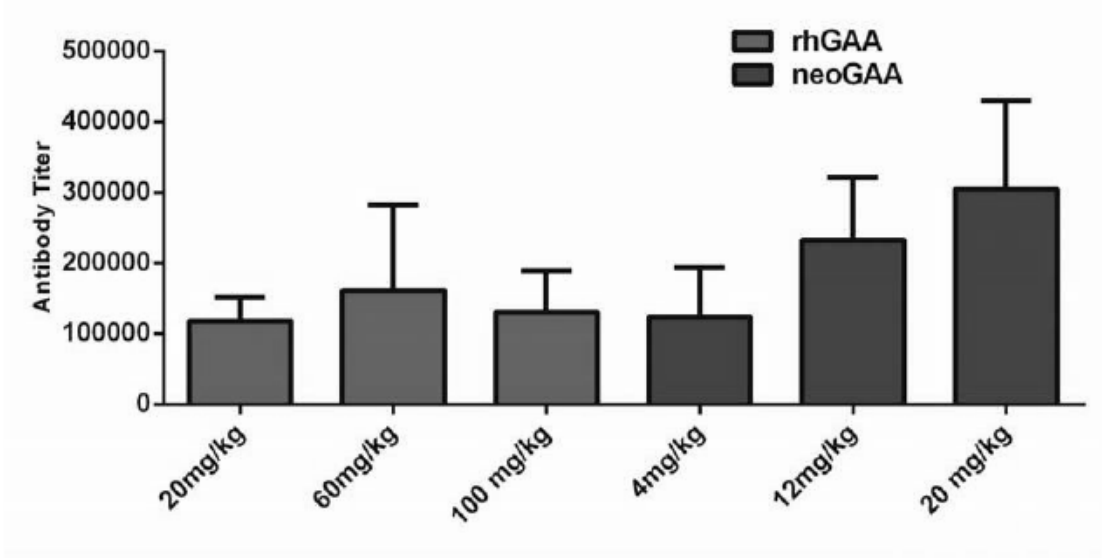
AVAL 及び ALGLU を本試験で検討した低及び高用量で週 1 回、計 4 回 IV 投与したとき、肝臓、腎臓、肺及び四頭筋組織に毒性変化は認められなかった。高用量の AVAL 投与群の 1 例に軽度の多巣性心筋壊死が認められた。しかし、この所見の意義及び AVAL 投与の影響は不明である。この所見がみられたため、中用量の ALGLU 及び AVAL 投与群から採取した心臓も検査したところ、病変は認められなかった。本試験期間中に 1 例が死亡した。被験物質の投与と死亡時期、認められた一般状態の変化に基づくと、この死亡は過敏症反応の結果として生じた可能性が示唆された。

図 1 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの各組織におけるグリコーゲン量（[redacted]-1948 試験）



rhGAA: ALGLU, SAM6: AVAL
^^p≤0.01（20 mg/kg ALGLU との比較）

図 2 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの抗薬物抗体価（[redacted]-1948 試験）



rhGAA: ALGLU, neoGAA: AVAL

結論

本試験結果から、AVAL を 4、12 及び 20 mg/kg の用量で投与したときの組織内グリコーゲン低下は、ALGLU をそれぞれ 20、60 及び 100 mg/kg の用量で投与したときと同様であるか又はそれより大きいことが示された。このことから、本試験条件下において用量ベースで比較すると、AVAL は同用量の ALGLU よりも約 5～7 倍強力であることが示唆された。被験物質を投与した全ての用量群で抗薬物抗体が認められ、用量間又は薬物間に統計学的な有意差は認められなかった。AVAL 投与群の抗体価は用量依存的に増加した。しかし、観察された増加は互いの 1 アッセイ希釈倍率の範囲内であったため、生物学的に意味のあるものではないと考えられた。

病理組織学的検査では、AVAL 及び ALGLU を低及び高用量で週 1 回、計 4 回投与したとき、肝臓、腎臓、肺及び四頭筋に毒性変化は認められなかった。20 mg/kg AVAL 投与群の 1 例に軽度の多巣性心筋壊死が認められた。しかし、この所見の意義は不明であり、また AVAL 投与の影響はあったとしても不明である。

2.2 GAAKO マウスに AVAL 及び ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下（[redacted]-00587 試験）

試験目的

本試験の目的は、GAAKO マウスに AVAL 及び ALGLU を投与したときの所定の組織におけるグリコーゲン低下を評価することであった（[[redacted]-00587 試験]）。本試験で使用した AVAL のロットはカニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験で使用したロットの 1 つであった（Module 2.6.6、[3.2.2 項]参照）。

試験デザイン

GAAKO マウスに溶媒、AVAL（4、12 及び 20 mg/kg）又は ALGLU（20、60 及び 100 mg/kg）を週 1 回、計 4 回投与した。予想される過敏症反応を予防するため、2 回目の投与から投与の 10～20 分前に DPH を 5 mg/kg IP の用量で前投与した。最終投与 7 日後に全例を安楽死させ、種々の組織におけるグリコーゲン低下を生化学的グリコーゲンアッセイで評価した。全ての投与群の血清検体で抗体分析を行った。試験デザインを表 4 に要約する。

表 4 - 試験デザイン - [redacted]-00587 試験

被験物質（ロット番号）	投与経路	用量（mg/kg）	投与レジメン	1 群あたりの動物数（性）	齢
溶媒	IV	0	週 1 回、計 4 回	12（雄 6／雌 6）	3～6 か月齢
ALGLU（[redacted]）		20			
		60			
		100			
AVAL（[redacted]）		4			
		12			
		20			

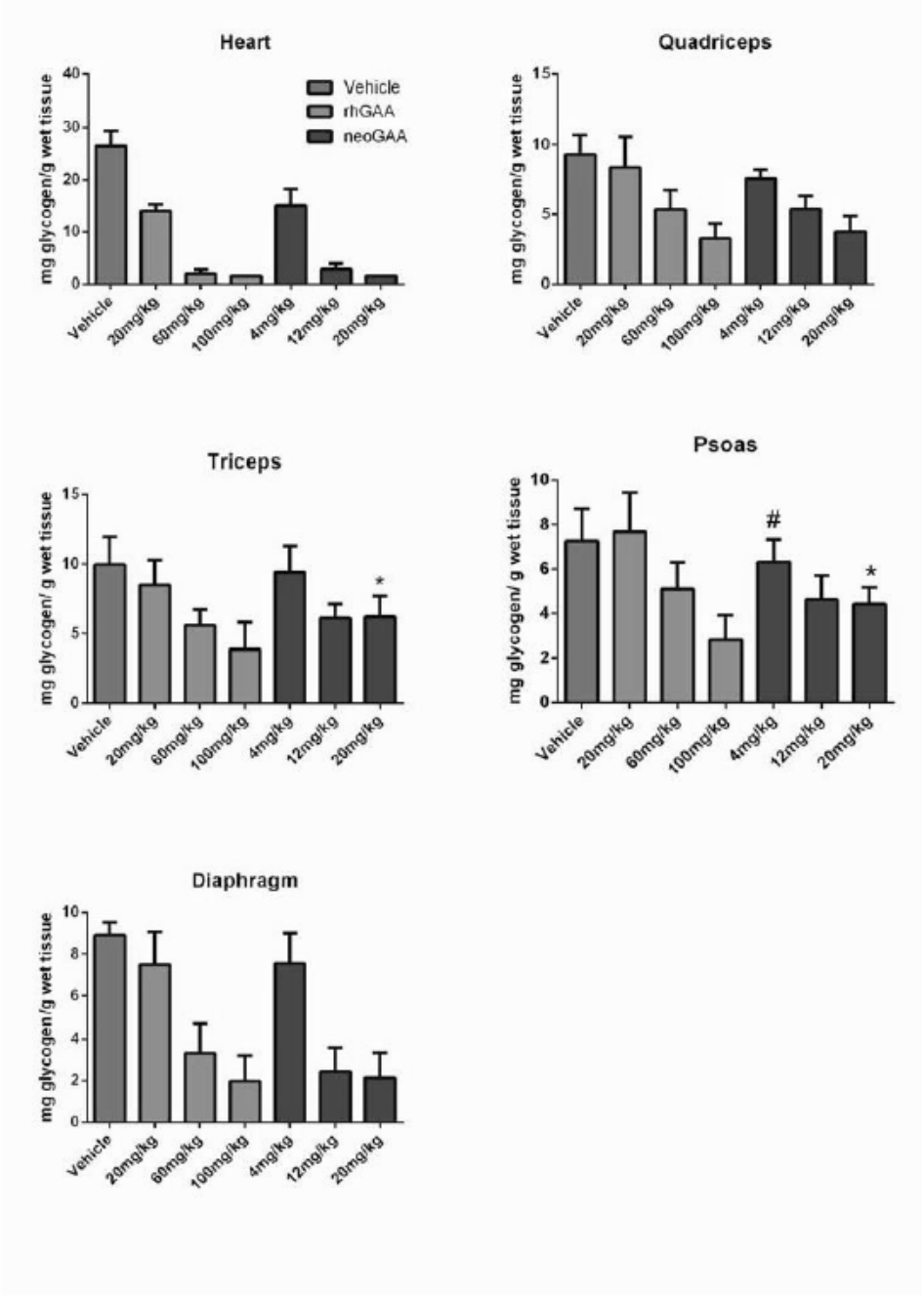
試験結果

AVAL 及び ALGLU は、評価した全ての組織でグリコーゲンを効果的に低下させた（図 3）。AVAL を 4、12 及び 20 mg/kg の用量で投与したとき、ALGLU をそれぞれ 20、60 及び 100 mg/kg の用量で投与したときと比較して、心臓、四頭筋及び横隔膜組織におけるグリコーゲンの低下に統計学的な有意差は認められなかった。このことから、AVAL は、ALGLU の 1/5 の用量で、これらの組織内グリコーゲンを低下させることが示された。

AVAL を 4 及び 12 mg/kg の用量で投与したときの三頭筋のグリコーゲン量は、ALGLU をそれぞれ 20 及び 60 mg/kg の用量で投与したときと同程度であった（図 3）。ただし、ALGLU を 100 mg/kg の用量で投与したときの三頭筋のグリコーゲン量は、AVAL を 20 mg/kg の用量で投与したときよりも統計学的に有意に低かった。AVAL を 12 mg/kg の用量で投与したときの腰筋のグリコーゲン量は、ALGLU を 60 mg/kg の用量で投与したときと同程度であった。ALGLU を 100 mg/kg の用量で投与したときの腰筋組織のグリコーゲン量は、三頭筋での結果と同様に、AVAL を 20 mg/kg の用量で投与したときよりも統計学的に有意に低かった。AVAL を 20 mg/kg の用量で投与したとき、三頭筋及び腰筋の両方において、ALGLU を 60 mg/kg の用量で投与したときと同程度までグリコーゲンが低下したことから、AVAL は、ALGLU の 1/3 の用量で、これらの組織内グリコーゲンを低下させることが示唆された。図中には AVAL と ALGLU の統計比較結果のみを記載している。

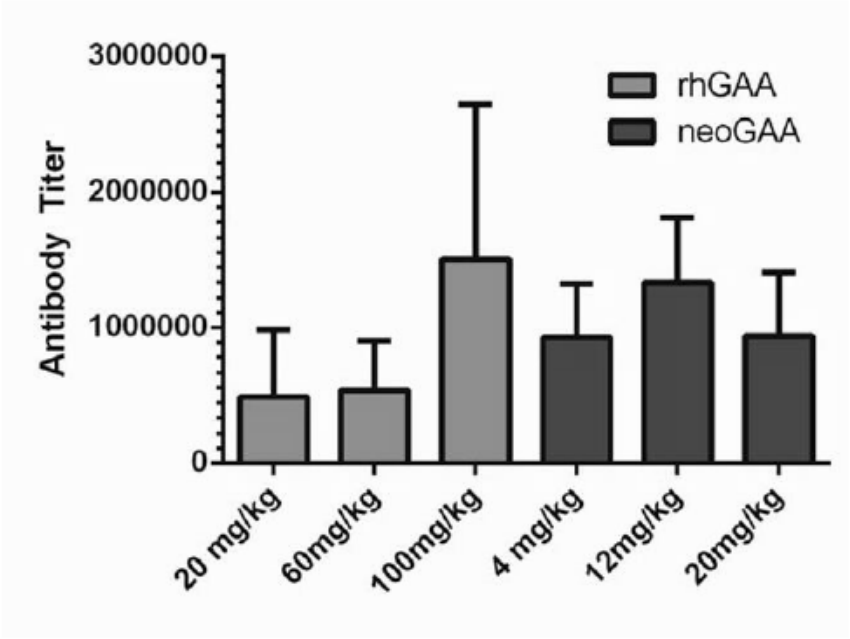
投与した被験物質及び用量に関係なく、いずれの群間でも抗体価は同程度であった（図 4）。本試験期間中に数例が死亡した。被験物質の投与と死亡の時期、認められた一般状態の変化に基づくと、大半の死亡は過敏症反応の結果として生じた可能性が示唆された。

図 3 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの各組織におけるグリコーゲンの低下（[redacted]-00587 試験）



*p≤0.05（100 mg/kg ALGLU との比較）
#p≤0.05（20 mg/kg ALGLU との比較）

図 4 - AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したときの抗薬物抗体価（[redacted]-00587 試験）



結論

全体として、本試験結果から、GAAKO マウスに AVAL を投与したとき、評価した全ての組織においてグリコーゲンが効果的に低下することが示された。AVAL は、評価したいずれの組織においても、ALGLU の 1/3～1/5 の用量でグリコーゲンを同程度まで低下させた。

2.3 GAAKO マウスに ALGLU 又は様々なレベルの bis-M6P を含有する AVAL を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下（[redacted]-3981 試験）

試験目的

AVAL は、ALGLU 上のシアル酸残基にビス-マンノース-6-リン酸（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。より多くの bis-M6P が ALGLU に結合すると、ライソゾーム標的化が向上するため、結果として、より多くのグリコーゲンが低下すると考えられる(4)。前述した試験では、ALGLU 1 mol あたり 5～9 個のグリカンで飽和させた AVAL（SAM6）を使用している。本試験の目的は、ALGLU の効力を著しく増強させるのに必要なグリカンの数を決定することであった（[[redacted]-3981 試験]）。

試験デザイン

GAAKO マウスに ALGLU を 100 mg/kg の用量で、又は SAM6-1、SAM6-2、SAM6-3、SAM6-4 若しくは SAM6-5 を 20 mg/kg の用量で週 1 回、計 4 回 IV 投与した。予想される過敏症反応を予防するため、2 回目の投与から投与の 10～20 分前に DPH を 5 mg/kg IP の用量で前投与した。SAM6-1～

SAM6-4 は、2.0 mmol/L の過ヨウ素酸塩中で ALGLU を酸化し、各反応液でグリカン／タンパク質比を漸増させることにより、グリカンの含量が異なる結合体として製造した（表 5）。SAM6-5 は、酸化及び結合が最大の結合体として、22.5 mmol/L の過ヨウ素酸塩で酸化し、16.6 のグリカン／ALGLU 比で結合させることにより製造した。最終投与 7 日後に全例を安楽死させ、種々の組織におけるグリコーゲン低下を生化学的グリコーゲンアッセイで評価した。血清を採取し、抗薬物抗体の評価も行った。試験デザインを表 6 に要約する。

表 5 - 被験物質 - [redacted]-3981 試験

被験物質（過ヨウ素酸塩）	ロット番号	グリカン／タンパク質比	M6P のモル分率（mol/mol）	分子量 [a]（kDa）	ALGLU 1 mol あたりのグリカンの数
ALGLU	[redacted]	0	0.49	110.90	0
SAM6-1（2 mmol/L）	[redacted]	4.2	4.87	113.17	2
SAM6-2（2 mmol/L）	[redacted]	8.3	7.41	114.99	3
SAM6-3（2 mmol/L）	[redacted]	12.5	10.47	116.12	4
SAM6-4（2 mmol/L）	[redacted]	33	11.2	117.49	5
SAM6-5（22.5 mmol/L）	[redacted]	16.6	16.56	119.70	7

[a]: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization 法による

表 6 - 試験デザイン - [redacted]-3981 試験

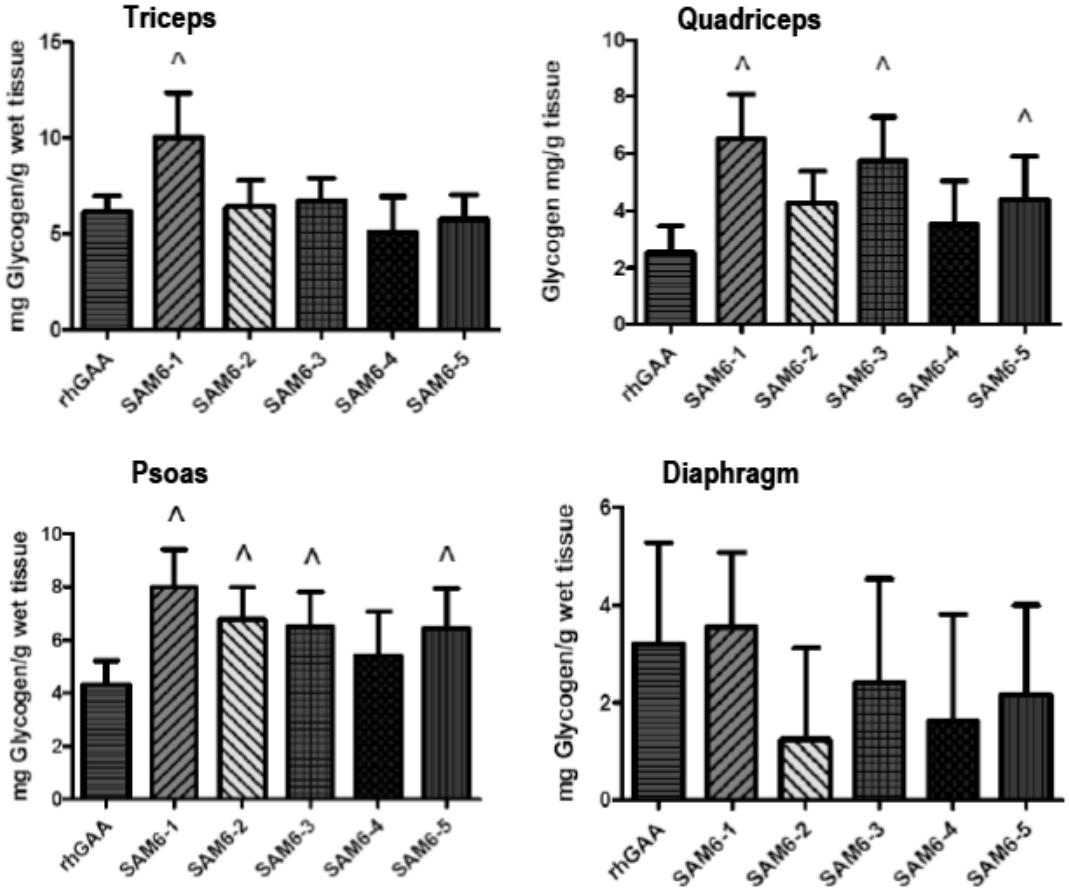
被験物質（ロット番号）	投与経路	用量（mg/kg）	投与レジメン	1 群あたりの動物数（性）	齢
ALGLU	IV	100	週 1 回、計 4 回	12（雄 6／雌 6）	3～6 か月齢
SAM6-1		20			
SAM6-2		20			
SAM6-3		20			
SAM6-4		20			
SAM6-5		20			

試験結果

ALGLU 又は SAM6 結合体を週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲンの低下を評価した。SAM6-4 を 20 mg/kg の用量で週 1 回、計 4 回投与したときのグリコーゲン量は、ALGLU を 100 mg/kg の用量で投与したときと同程度であった。SAM6-2（腰筋）、SAM6-3（腰筋及び四頭筋）及び SAM6-5（腰筋及び四頭筋）と ALGLU の間で、組織内グリコーゲン量に統計学的な有意差が認められた（図 5）。しかし、これらの差は検討した全ての組織で一貫性のあるものではなかった。一方、20 mg/kg SAM6-1 は 100 mg/kg ALGLU よりも四頭筋、三頭筋及び腰筋におけるグリコーゲン低下作用が一貫して弱かった。横隔膜では組織内グリコーゲン量にばらつきがみられたため、投与群間の差を検討することが難しかった。

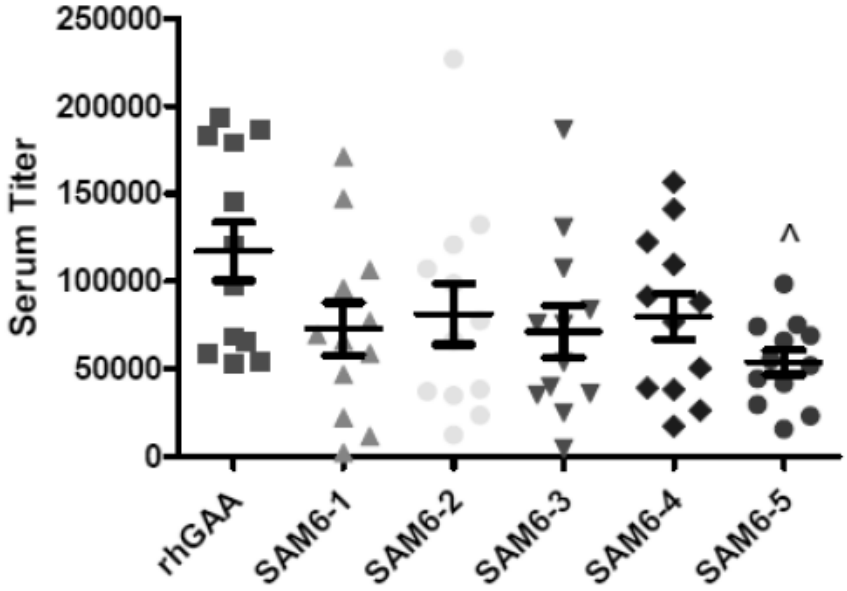
全ての群で抗 ALGLU 抗体が検出された（図 6）。SAM6-5 投与群では、ALGLU 投与群と比較して、抗体価が有意に低かったが、2 倍希釈系列で 2 倍以内の抗体価の減少は一般的に意味のある変化ではないため、この差は生物学的に意味のあるものではないと考えられた。その他のいずれの投与群でも、被験物質を週 1 回、計 4 回投与したときの抗体価は同程度であった。

図 5 - SAM6 を週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの各組織におけるグリコーゲン量（[redacted]-3981 試験）



^p<0.05（ALGLU との比較）

図 6 - ALGLU 又は SAM6 を週 1 回、計 4 回投与したときの抗薬物抗体価（[redacted]-3981 試験）



^p<0.05（ALGLU との比較）

結論

本試験条件下では、横隔膜を除く検討した全ての組織において、2 個のグリカンを有する SAM6-1 の効力が SAM6-2～SAM6-5 よりも著しく弱かった。また、観察されたばらつきを考慮すると、SAM6-2～SAM6-5 の効力の間に一貫した差は認められなかった。これらの結果から、SAM6 の効力を ALGLU よりも大幅に増強させるには 3 個以上のグリカン、すなわち、7.4 mol/mol 以上の M6P レベル（表 5）が必要であることが示唆された。AVAL の M6P レベルは通常約 [redacted] mol/mol（[Module 3.2.S.3.1]）であり、これを十分に上回っている。

2.4 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 GAAKO マウスに週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの薬力学的作用（[redacted]-02367 試験）

試験目的

AVAL は、ALGLU のシアル酸部分に合成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。本試験の目的は、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（それぞれ AVAL-5SA 又は AVAL-7SA）を GAAKO マウスに投与したときの組織からのグリコーゲンの低下を評価することであった（[[redacted]-02367 試験]）。これら 2 つのロットの AVAL は、AVAL 1 分子あたりそれぞれ約 5 又は 7 個のグリカンを含有している。

試験デザイン

GAAKO マウスに溶媒、AVAL-5SA 又は AVAL-7SA を 4 又は 12 mg/kg の用量で週 1 回、計 4 回 IV 投与した。予想される過敏症反応を予防するため、2 回目の投与から投与の 10～20 分前に DPH を 10 mg/kg IP の用量で前投与した。最終投与 7 日後に全例を安楽死させ、種々の組織におけるグリコーゲン低下を生化学的グリコーゲンアッセイで評価した。試験デザインを表 7 に要約する。

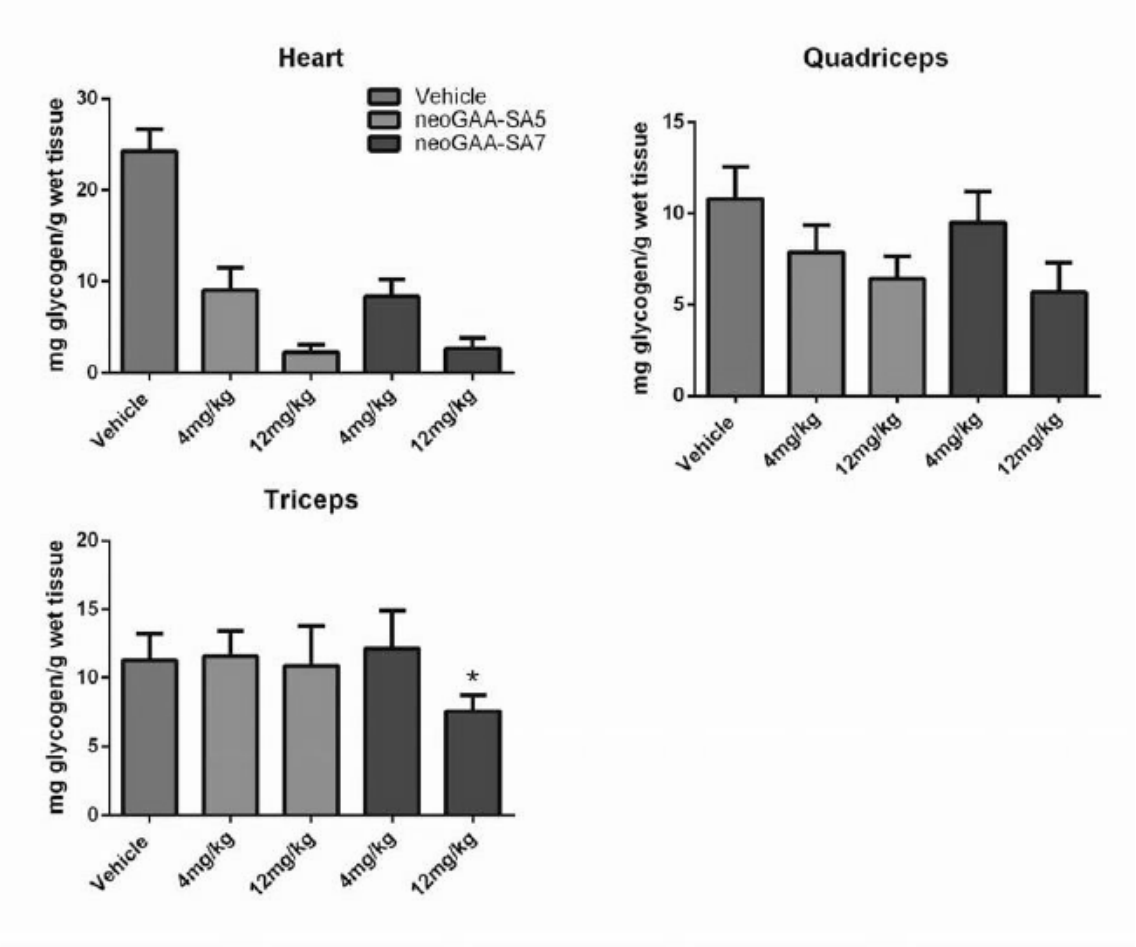
表 7 - 試験デザイン - ■-02367 試験

被験物質（ロット番号）	投与経路	用量（mg/kg）	投与レジメン	1 群あたりの動物数（性）	齢
溶媒	IV ボーラス	0	週 1 回、4 回	6（雄 3／雌 3）	3～6 か月齢
AVAL-5SA		4			
		12			
AVAL-7SA		4			
		12			

試験結果

全体として、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 GAAKO マウスに週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの薬力学的作用は、12 mg/kg の用量での三頭筋を除き、全ての群を通して同程度であった（図 7）。検討した全ての組織（心臓、四頭筋及び三頭筋）において、AVAL-5SA と AVAL-7SA の間に 4 mg/kg の用量で統計学的な有意差は認められなかった。しかし、この用量では骨格筋（四頭筋及び三頭筋）でグリコーゲンの低下がほとんど又は全く認められなかった。心臓及び四頭筋において、AVAL-5SA と AVAL-7SA の間に 12 mg/kg の用量で統計学的な有意差は認められなかった。三頭筋におけるグリコーゲン量は、12 mg/kg AVAL-7SA を投与したときのほうが、12 mg/kg AVAL-5SA を投与したときよりも有意に低かった。このことは、シアル酸を介して ALGLU に結合するグリカンの数に関連していると考えられるが、得られているデータが少ないため、この仮説を裏付けることはできない。本試験期間中に数例が死亡した。被験物質の投与と死亡の時期、認められた一般状態の変化に基づくと、大半の死亡は過敏症反応の結果として生じた可能性が示唆された。

図 7 - AVAL を週 1 回、計 4 回 IV 投与したときの各組織におけるグリコーゲン量（[redacted]-02367 試験）



*p<0.05（12 mg/kg AVAL-5SA との比較）

結論

本試験条件下において、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 を投与したとき、組織内グリコーゲンの低下に一貫した差はないと考えられた。

3　副次的薬理試験

AVAL の副次的薬理試験は実施していない。

4　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において評価した（Module 2.6.6、[3.2.2 項]参照）。1 群雌雄各 6 匹のカニクイザルに AVAL（バッチ：[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]）を 0、50 又は 200 mg/kg qow の用量で 6 時間の点滴静注により 2 週に 1 回 26 週間投与した（[0658-11097 試験]）。安全性薬理評価項目には、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。

4.1　中枢神経系（CNS）

ホームケージでの詳細な神経行動検査（表 8）及び深部体温の測定を、1 回目の投与前、1、3、7、10 及び 13 回目（1、29、85、127 及び 169 日目）の投与終了 20～24 時間後、並びに回復期間の最終週に実施した[0658-11097 試験]。

表 8 - 評価した各 CNS 評価項目

活動性レベル	
0	覚醒度が極めて低い状態（意識消失、観察者又は身体刺激に反応しない）
1	覚醒度が低い状態（活動しない、観察者の存在に反応しない、身体刺激に反応する）
2	正常な安静時の状態（観察者の存在に注意を向け、ケージ周囲をゆっくりと動くが、一般的な攻撃行動は示さない）
3	正常な活動時の状態（観察者の存在に注意を向け、ケージ周囲を活発に動き、攻撃行動［歯を見せるなど］を示す）
4	覚醒度が高い状態（常同行動、興奮及び観察者の存在に対する反応の亢進がみられ、非常に攻撃的な場合もある）
5	興奮による狂乱状態（多動性行動、数秒を超えて座らない又は立たない、ケージ周囲をほとんど休みなく動き続ける）
線維束性収縮 （皮膚を通して肉眼で観察することが可能な微細な筋肉収縮）	
0	なし
1	あり
顔面筋の動き （動物の顔面が左右に等しく分けられるように目視により想像で下ろした線；左右の顔面の比較）	
0	対称的－表情は顔面の両側に等しく現れる。
1	非対称的－表情又は筋肉は片側のみに位置する。

視野 （動物の前に適切な好物を置き、上下左右に動かす。動きについてくる能力を測定する。）	
0	対称的な全ての動き（上下及び左右の両方）についてくる。
1	動きについてくる際に非対称性がみられるー一方向にしか動かせない。
2	眼を左右に動かせない。
3	眼を上下に動かせない。
4	2 番と 3 番の両方に該当するー上下左右に動かせない。

被験物質に関連する神経行動の変化及び深部体温の変化は認められなかった。カニクイザルに 26 週間 IV 投与したときの最大無作用量（NOAEL）は、試験最高用量の 200 mg/kg qow であった。NOAEL で 13 週間投与したときの平均 $AUC_{0\text{-}inf}$（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 28162 µg·h/mL であった。

4.2 心血管系

ECG の測定を、1 回目の投与前、2 及び 12 回目の投与後（注入終了時及び注入終了 24 時間後）、並びに回復期間の最終週に実施した（[0658-11097 試験]）。ECG において、形態変化及び不整脈の有無を定性的に精査した。QT 間隔及び RR 間隔を定量的に測定し、補正 QT 間隔（QTc）を Bazett 式により算出した。

各生存動物における心拍数の測定を、1 回目の投与前、1、3、7、10 及び 13 回目（1、29、85、127 及び 169 日目）の投与終了 24 時間後、並びに回復期間の最終週に実施した。

被験物質に関連する ECG パラメータ及び心拍数の変化は認められなかった。カニクイザルに 26 週間 IV 投与したときの NOAEL は、試験最高用量の 200 mg/kg qow であった。NOAEL で 13 週間投与したときの平均 $AUC_{0\text{-}inf}$ 曝露量は 28162 µg·h/mL であった。

4.3 呼吸系

呼吸数の測定を、1 回目の投与前、1、3、7、10 及び 13 回目（1、29、85、127 及び 169 日目）の投与終了 24 時間後、並びに回復期間の最終週に実施した（[0658-11097 試験]）。

被験物質に関連する呼吸数の変化は認められなかった。カニクイザルに 26 週間 IV 投与したときの NOAEL は、試験最高用量の 200 mg/kg qow であった。NOAEL で 13 週間投与したときの平均 $AUC_{0\text{-}inf}$ 曝露量は 28162 µg·h/mL であった。

4.4 腎／泌尿器系

該当なし。

4.5　胃腸管系

該当なし。

4.6　自律神経系

該当なし。

4.7　他の器官系

該当なし。

5　薬力学的薬物相互作用試験

AVAL の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6　考察及び結論

GAAKO マウスを用いて AVAL の薬理特性を評価する非臨床薬理試験を 2 試験実施した。これらの試験において AVAL の作用を ALGLU と比較したところ、AVAL を週 1 回、計 4 回投与したときの組織内グリコーゲン低下作用は、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（[■-1948 試験]及び[■-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が、AVAL の PAD が評価した組織によって異なることも示された。GAAKO マウスの心臓組織では、4 mg/kg 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 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、グリコーゲンを著しく低下させるのに必要な AVAL の用量は 12 mg/kg 以上であった。

AVAL は、ALGLU 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。AVAL のグリカンレベルは細胞内取込み及びライソゾーム標的化に重要と考えられており、グリカンレベルがより高くなると、ライソゾーム標的化が向上するため、結果として、より多くのグリコーゲンが低下すると考えられる。様々なレベルのグリカンを結合させた AVAL を GAAKO マウスに投与したときのグリコーゲン低下作用を評価した（[■-3981 試験]）。2～7 個のグリカンを有する AVAL の 20 mg/kg の用量と、0 個のグリカンを有する ALGLU の 100 mg/kg の用量とを、週 1 回の計 4 回投与で比較した。横隔膜を除く検討した全ての組織で、2 個のグリカンを有する AVAL（SAM6-1）の効力のみが著しく弱かった。3 個以上のグリカンを有する AVAL の効力に一貫した差は認められなかったことから、ALGLU よりも効力を大幅に増強させるには 3 個のグリカンが必要であることが示唆された。

さらに、異なるレベルのシアル酸を含有する ALGLU から製造した AVAL を評価した。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 におけるシアル酸の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、[■-02367 試験]では、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 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することが示された。このことから、シアル酸レベルが 5.5～7.2 mol/mol 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。

抗薬物抗体の評価も ■-1948 試験、■-3981 試験及び ■-00587 試験で行った。■-1948 試験では、GAAKO マウスにおいて AVAL と ALGLU に対して産生された抗体価の間に有意差は認められなかったが、このデータから、抗 AVAL 抗体が用量の増加に伴って増加する可能性が示唆された。しかし、この傾向は ■-00587 試験では確認されず、この試験において AVAL 又は ALGLU を週 1 回、計 4 回投与したマウスの群間で抗薬物抗体価は同程度であった。また、[■-3981 試験]でも全ての AVAL（SAM6）及び ALGLU 投与群で抗体が認められた。SAM6-5 を投与したマウスのみで抗体価に有意

差（低値）が認められたが、2 倍希釈系列で 2 倍以内に留まっていたことから、生物学的に意味のあるものではないと考えられた。全体として、実施した試験の条件下で、AVAL と ALGLU の間に抗体価の差はなかった。

最後に AVAL の安全性薬理評価を、カニクイザルを用いた 26 週間反復 IV 投与毒性試験（[0658-11097 試験]）の一部として行った。その結果、AVAL を 200 mg/kg までの用量で IV 投与したとき、CNS、心血管系及び呼吸系パラメータに、被験物質に関連する変化は認められなかった。

全体として、これらの試験で AVAL の薬理特性が十分に明らかになり、予定されているポンペ病患者への使用が支持された。

参 考 文 献

1. Lynch CM, Johnson J, Vaccaro C, Thurberg BL. High resolution light microscopy (HRLM) and digital analysis of Pompe disease pathology. J Histochem Cytochem. 2005; 53(1):63-73.
2. Raben N, Nagaraju K, Lee E, Plotz P. Modulation of disease severity in mice with targeted disruption of the acid α-glucosidase gene. Neuromusc Disord. 2000; 10: 283-91.
3. 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.
4. Zhu Y, Jiang J-L, Gumlaw NK, Zhang J, Bercury SD, Ziegler RJ, et al. Glycoengineered acid α-glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of Pompe disease. Mol Ther. Jun 2009; 17(6): 954-63.

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

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 7

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 5

3　　副次的薬理試験 7

4　　安全性薬理試験 7

5　　薬力学的薬物相互作用試験 7

表　目　次

表2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4

表2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics overview - noteworthy findings 5

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: avalglucosidase alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics					
Determination of 3- to 7-fold greater potency of avalglucosidase alfa relative to alglucosidase alfa	Biochemical and histological analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	Genzyme, Framingham, MA, USA	[[redacted]-1948]	4.2.1.1-1
Determination of 3- to 5-fold greater potency of avalglucosidase alfa relative to alglucosidase alfa	Biochemical analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	Genzyme, Framingham, MA, USA	[[redacted]-00587]	4.2.1.1-2
Determination that at least 3 glycans are needed to significantly increase potency of avalglucosidase alfa relative to alglucosidase alfa	Biochemical analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	Genzyme, Framingham, MA, USA	[[redacted]-3981]	4.2.1.1-3
Determination that avalglucosidase alfa produced from alglucosidase alfa with sialic acid levels from 5.5 to 7.2 mole/mole display similar potency	Biochemical analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	Genzyme, Framingham, MA, USA	[[redacted]-02367]	4.2.1.1-4
Secondary Pharmacodynamics - Not applicable					
Safety Pharmacology					
Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology study conducted in cynomolgus monkeys (see 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary [Section 3.2.2]).					

Abbreviations: IV: intravenous; GAAKO: *GAA* $^{6neo/6neo}$

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics overview - noteworthy findings

Test Article: avalglucosidase alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Determination of 3- to 7-fold greater potency of avalglucosidase alfa relative to alglucosidase alfa	Biochemical and histological analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	4, 12, and 20 mg/kg	6 (3M/3F)	Avalglucosidase alfa is 5- to 7-fold more potent than alglucosidase alfa. Anti-drug antibodies were identified in all dose groups. No adverse effects were observed by histological examination in the liver, kidney, lung or quadriceps. One mouse showed mild multifocal myocardia necrosis in the 20 mg/kg avalglucosidase alpha group.	[[redacted]-1948]	4.2.1.1-1
Determination of 3- to 5-fold greater potency of avalglucosidase alfa relative to alglucosidase alfa	Biochemical analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	4, 12, and 20 mg/kg	12 (6M/6F)	Avalglucosidase alfa reduced glycogen levels in heart, quadriceps, triceps, psoas, and diaphragm at doses 3- to 5-fold lower than observed with alglucosidase alfa.	[[redacted]-00587]	4.2.1.1-2

Abbreviations: M: male; F: female; IV: intravenous; GAAKO: *GAA* $^{6neo/6neo}$

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics overview - noteworthy findings (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Determination that at least 3 glycans are needed to significantly increase potency of avalglucosidase alfa relative to alglucosidase alfa	Biochemical analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	20 mg/kg	12 (6M/6F)	This study evaluated the effects of SAM6 with variable amounts of bis-M6P, from 0 to 7 glycans per mole alglucosidase alfa. A minimum of 3 glycans is required to obtain a substantial increase in potency of SAM6 relative to alglucosidase alfa.	[[redacted]-3981]	4.2.1.1-3
Determination that avalglucosidase alfa produced from alglucosidase alfa with sialic acid levels from 5.5 to 7.2 mole/mole display similar potency	Biochemical analysis of glycogen content in GAAKO mouse tissues	4 weekly doses via IV Bolus	4 and 12 mg/kg	6 (3M/3F)	There is no difference in tissue glycogen reduction when avalglucosidase alfa is produced with 5.5 or 7.2 mol/mol sialic acid.	[[redacted]-02367]	4.2.1.1-4

Abbreviations: M: male; F: female; IV: intravenous; GAAKO: *GAA* $^{6neo/6neo}$; SAM6: avalglucosidase alpha; M6P: mannose-6-phosphate

3　副次的薬理試験

該当なし

4　安全性薬理試験

安全性薬理のエンドポイントは、カニクイザルにおける GLP 遵守毒性試験の中で評価された（Module 2.6.6 の[3.2.2]参照）。

5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし