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

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 46

目　　次

2.6.6 毒性試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 5

略号と用語の定義 6

1　　まとめ 7

2　　単回投与毒性試験 11

3　　反復投与毒性試験（補助的なトキシコキネティクス評価を含む） 12

3.1　　げっ歯類 12

3.1.1　　CD-1 マウスを用いた探索的 14 日間反復静脈内投与毒性試験 12

3.1.2　　CD-1 マウスを用いた探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験 13

3.2　　非げっ歯類 15

3.2.1　　カニクイザルを用いた探索的 28 日間反復点滴静注毒性試験 15

3.2.2　　カニクイザルを用いた 26 週間反復点滴静注毒性試験及び 4 週間回復性試験 17

4　　遺伝毒性試験 20

4.1　　マウスを用いる探索的 *in vivo* 小核試験 20

5　　がん原性試験 21

6　　生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む） 22

6.1　　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 22

6.2 胚・胎児発生に関する試験 24
6.2.1 マウス 24
6.2.2 ウサギ 25
6.2.2.1 非妊娠ウサギを用いた探索的 7 日間毒性試験 25
6.2.2.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験 26
6.2.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 26
6.3 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 28
6.4 幼若動物を用いた試験 28
7 局所刺激性試験 32
8 その他の毒性試験 33
8.1 潜在的変異原性不純物の評価 33
8.1.1 *In silico* 評価 33
8.1.2 細菌を用いる復帰突然変異試験 41
8.2 不純物／分解物の評価 41
8.2.1 不純物T* 添加 AVAL のカニクイザルを用いた 13 週間反復点滴静注毒性試験及び 4 週間回復性試験 42
8.2.2 細菌を用いる復帰突然変異試験 43
8.2.3 ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験 43
8.3 その他の評価 44
8.3.1 薬物乱用性の評価 44
9 考察及び結論 45

＊新薬承認情報提供時に置換

表　目　次

表 1 - 毒性試験プログラム 8
表 2 - AVAL を用いた反復投与毒性試験 12
表 3 - マウスを用いた探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験：1 回目及び 4 回目投与後における AVAL の TK パラメータ 14
表 4 - 29 日目の抗 AVAL 抗体価 14
表 5 - サルを用いた探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験：1 回目及び 4 回目投与後の AVAL の TK パラメータ 16
表 6 - 21 日目の抗 AVAL 抗体価 16
表 7 - サルを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験：1 及び 13 回目投与後の AVAL の TK パラメータ 18
表 8 - 7 及び 13 回目投与前の抗 AVAL 抗体価 18
表 9 - 遺伝毒性試験の結果 20
表 10 - 雄の死亡 22
表 11 - 雌の死亡 23
表 12 - TK データ 24
表 13 - AVAL の平均 TK パラメータ 27
表 14 - 幼若マウスを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験における AVAL 血清中 TK の要約 29
表 15 - 生後 48、76 及び 110/111 日のマウスにおける抗 AVAL 抗体の要約 30
表 16 - クラス 1、2 及び 3 の変異原性不純物の評価に関する要約 34
表 17 - クラス 1、2 及び 3 の変異原性不純物の管理方針 39
表 18 - 群構成及び用量 42
表 19 - サルにおける AVAL の平均血清中 TK パラメータ 42

図　目　次

図 1 - 不純物T* の構造式 41

＊新薬承認情報提供時に置換

略号と用語の定義

ADA:	抗薬物抗体（Anti-drug antibody）
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）
CDER:	医薬品評価研究センター（Center for Drug Evaluation and Research）
CL:	クリアランス（Clearance）
C_{max}:	最高血清中濃度（Maximum serum concentration）
DPH:	ジフェンヒドラミン（Diphenhydramine）
ECG:	心電図（Electrocardiogram）
ERT:	酵素補充療法（Enzyme replacement therapies）
GAA:	酸性 α-グルコシダーゼ（Acid alfa-glucosidase）
GAAKO:	酸性 α-グルコシダーゼノックアウト（Acid alfa-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）
GTI:	遺伝毒性不純物（Genotoxic impurities）
ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization）
NOAEL:	無毒性量（No observed adverse effect level）
NOEL:	無作用量（No observed effect level）
NZW:	ニュージーランドホワイト（New Zealand White）
PND:	生後日数（Postnatal Day）
rhGAA:	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（recombinant human acid alfa-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　まとめ

アバルグルコシダーゼ アルファ（以下、AVAL）の非臨床試験は、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」、ICH S2(R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイドラインについて」、ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」、ICH S5(R2)「医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドライン」及び酵素補充療法（ERT）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 guidance for industry、2015、以下 CDER ガイドライン案）を考慮して計画した。

ICH ガイドラインで規定された重要な毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を適用して実施した（Module 2.6.7、 [表 2.6.7.1]参照）。幾つかの試験は GLP 非適用試験として実施したが、社内手順に従って行い、試験の信頼性に影響を及ぼす可能性のある不測の事態は発生しなかった。本被験物質の国際一般名は、avalglucosidase alfa である。なお、試験報告書等では neoGAA 又は GZ402666 が用いられているが、これらは AVAL と同一のものを示している。

AVAL について実施した全ての毒性試験の一覧を表 1 に示す。マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験、マウスを用いた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試験、幼若マウスを用いた毒性試験を実施した。

潜在的遺伝毒性不純物（GTI）の有無を、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）法により検討した。不　純　物　U　*の変異原性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。利用可能な安全性及び品質データから、本新製剤に関連した明白なヒトへの遺伝毒性リスクはないと考えられた。

製剤中不純物の安全性を評価するため、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 13 週間反復投与毒性試験及び不純物 T *の *in vitro* 遺伝毒性試験（2 試験）を実施した。

＊新薬承認情報提供時に置換

表 1 - 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	被験物質の用量又は濃度	投与経路	投与頻度	試験番号
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 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL：ボーラス静脈内 DPH：腹腔内	2 日に 1 回、2 週間	FFA00125
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 時間及び 8 時間（150 mg/kg/日）	[redacted]-00184

動物種又は試験系	試験の種類及び期間	被験物質の用量又は濃度	投与経路	投与頻度	試験番号
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（溶媒）、0（溶媒／DPH）、10、20 又は 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL 静脈内ボーラス DPH 腹腔内ボーラス	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（溶媒）、0（溶媒／DPH）、10、20 又は 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL 静脈内ボーラス DPH 腹腔内ボーラス	妊娠 6 日から妊娠 15 日まで 1 日 1 回	TER0685
NZW ウサギ	探索的 7 日間用量設定試験（GLP 非適用）	AVAL 0、20、40 又は 80 mg/kg/日	約 10 分間の点滴静注	1 日 1 回、7 日間	DDO1378
NZW ウサギ	探索的胚・胎児発生に関する試験（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、妊娠 6～12 日、妊娠 13～19 日並びに妊娠 6、10、13、16 及び 19 日に 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/日	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	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（溶媒）、0（溶媒／DPH）、10、20 又は 50 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL 静脈内ボーラス DPH 腹腔内ボーラス	妊娠 6 日から分娩後 20 日まで 2 日に 1 回	DPN0378
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、0、20 又は 25、50 及び 100 mg/kg DPH 5 mg/kg	AVAL 静脈内ボーラス DPH 腹腔内ボーラス	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

＊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	被験物質の用量又は濃度	投与経路	投与頻度	試験番号
ネズミチフス菌株 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 * 5、16、50、160、500、1600 及び 5000 µg/プレート±S9	インキュベーション	48 時間	HIS2129
ヒト末梢血リンパ球	染色体異常試験（GLP 適用）	不純物 T * 100、300、500 µg/mL ±S9	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：DPH：ジフェンヒドラミン、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、
AVAL：アバルグルコシダーゼ アルファ、ALGLU：アルグルコシダーゼ アルファ

In vivo 毒性試験に使用する動物種として CD-1 マウス及びカニクイザルを選択した理由は、これらの野生型動物種がそれぞれの試験で標準的に使用されていること、確固とした背景データベースが存在することである。マウスでは、ヒトタンパク質の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、28 日間反復投与毒性試験では動物種間に毒性学的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カニクイザルのみを用いて実施した。探索的 *in vivo* 遺伝毒性試験は GAA ノックアウト（GAAKO）マウスを用いて実施した。野生型ウサギを胚・胎児発生に関する試験における非げっ歯類動物種として選択した理由は、この動物種がこれらの試験で広く使用されていることである。

全ての毒性試験は、予定臨床投与経路である静脈内経路により実施した。

カニクイザルを用いた重要な 26 週間反復投与毒性試験における用量設定は、利用可能なデータに基づいた。すなわち、高用量（200 mg/kg、2 週に 1 回）は、注入時間及び薬物濃度（10 mg/mL）を考慮した最大投与可能量とした。低用量（50 mg/kg、2 週に 1 回）は高用量の 4 分の 1 とした。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の高用量（100 mg/kg/日）は、薬物濃度（10 mg/mL）及びウサギにおける許容可能な最大静脈内投与容量（10 mL/kg）を考慮した最大投与可能量とした。

毒性試験に使用した製剤のバッチ及び品質は、臨床試験で使用したバッチを代表するものであった。

＊新薬承認情報提供時に置換

2　単回投与毒性試験

AVAL の単回投与毒性試験は実施しなかった。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。

3　反復投与毒性試験（補助的なトキシコキネティクス評価を含む）

AVAL の反復投与毒性試験として、マウスの探索的 14 日間反復投与毒性試験、マウス及びサルの探索的 28 日間反復投与毒性試験を実施し、本試験としてサル 26 週間反復投与毒性試験を実施した。マウスには過敏症の徴候がみられたため、ジフェンヒドラミン（DPH）を前投与した。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。

表 2 - 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）	投与量	NOAEL	NOAEL での血清中曝露量 *a,b*	
				AUC (µg.h/mL)	C_{max} (µg/mL)
マウス	14 日間、静脈内	0、50 mg/kg、2 日に 1 回	ND	ND	ND
	28 日間、静脈内	0、4、40、120 mg/kg/週	120 mg/kg/週	4513	2866
サル	28 日間、静脈内	0、4、40、120 mg/kg/週	120 mg/kg/週	5900	1273
	26 週間、静脈内	0、50 又は 200 mg/kg、2 週に 1 回	200 mg/kg、2 週に 1 回	28162	5284

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、C_{max}：最高血清中濃度
注：作用量での血清中濃度のみをここに示す。
a 雌雄併合
b 最終投与後の曝露量

3.1　げっ歯類

3.1.1　CD-1 マウスを用いた探索的 14 日間反復静脈内投与毒性試験

CD-1 マウス（1 群雌雄各 10 匹）を用いた探索的（GLP 非適用）14 日間反復投与毒性試験を、0 mg/kg（溶媒）、50 mg/kg 遺伝子組換えヒト rhGAA（アルグルコシダーゼ アルファ［以下、ALGLU］）、50 mg/kg AVAL（バッチ [redacted]、SAM）又は 50 mg/kg ガラクトース修飾した ALGLU の 2 日に 1 回、14 日間静脈内ボーラス投与により実施した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.6]及び[FFA00125 試験]参照）。すなわち、合計 7 回投与した。1 群の動物数は雌雄各 10 匹、投与容量は 10 mL/kg とした。9 日目以降、被験物質投与前に DPH を 5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。

評価パラメータは、生死、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査及び血液生化学的検査とした。投与期間終了時にマウスを安楽死させ剖検した。肉眼的観察を行って特定の器官重量を記録し、特定の組織について病理組織学的検査を実施した。

試験中、被験物質関連の死亡はみられず、ALGLU 又は AVAL に関連する一般状態の毒性変化は認められなかった。

体重及び摂餌量の変化は認められなかった。

AVAL 群の雄で網状赤血球数（対照群の 1.3 倍）、血清カルシウム（対照群の 1.1 倍）、リン（1.5 倍）及びカリウム（2.1 倍）の増加が認められた。

脾臓重量の増加が ALGLU 群の雄（28%）並びに AVAL 群の雄及び雌（それぞれ 41%及び 32%）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。

3.1.2 CD-1 マウスを用いた探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験

探索的試験（GLP 非適用）において、CD-1 マウスにおける AVAL（バッチ[redacted]）の毒性評価を、0（溶媒）、4、40 又は 120 mg/kg/週の用量で週 1 回、28 日間静脈内ボーラス投与により実施した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.6]及び[[redacted]-00183 試験]参照）。投与容量は 10 mL/kg とし、合計 4 回投与した。過敏症の徴候がみられたため、DPH を 10 又は 20 mg/kg（2 mL/kg）の用量で腹腔内投与した。0、4、40 又は 120 mg/kg/週群の動物数は、それぞれ雌雄各 3、9、9 又は 9 匹とした。4、40 又は 120 mg/kg/週群では、このうち雌雄各 6 匹についてトキシコキネティクス（TK）評価を実施した。

評価パラメータは、生死、一般状態観察、体重、血液学的検査及び血液生化学的検査とした。TK 評価用の血清検体を採取し、抗薬物抗体の有無を評価した。4 回目投与の 1 週間後にマウスを安楽死させ剖検した。肉眼的観察を行って特定の器官重量を記録し、特定の組織について病理組織学的検査を実施した。

TK パラメータを表 3 に要約した。抗 AVAL 抗体価を表 4 に要約した。1 回目投与と 4 回目投与の間で TK パラメータの差はみられなかった。曝露量の性差は認められなかった。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。これらの動物では、ADA の存在にもかかわらず、遊離型 AVAL への曝露が引き続き認められた。

表 3 - マウスを用いた探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験：1 回目及び 4 回目投与後における AVAL の TK パラメータ

パラメータ	1 回目投与（mg/kg/週）			4 回目投与（mg/kg/週）		
	4 (n=5)	40 (n=6)	120 (n=5)	4 (n=1)	40 (n=6)	120 (n=5)
C_{max} (µg/mL)	87.6 ± 7.77	942 ± 95.3	2517 ± 203	68.8	949 ± 161	2866 ± 656
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg.h/mL)	66.1 ± 11.5	1306 ± 45.3	5127 ± 611	50.0	1498 ± 368	4513 ± 589

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$：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、C_{max}：最高血清中濃度、SD：標準偏差

雌雄併合

値は平均値 ± SD で示す。

表 4 - 29 日目の抗 AVAL 抗体価

群	動物	投与量（mg/kg/週）	試験日	抗体価	群平均値	%CV
1	1	0	29	BDL	BDL	NA
	2			BDL		
	3			BDL		
	4			BDL		
	5			BDL		
	6			BDL		
2	7	4	29	836065	462196	494596
	8			228219		
	9			94188		
	11			1134164		
	12			18344		
3	13	40	29	100152	1761493	2223027
	14			1189479		
	15			176742		
	16			6018985		
	17			2208054		
	18			875545		

群	動物	投与量（mg/kg/週）	試験日	抗体価	群平均値	%CV
4	19	120	29	16606	1862543	2731156
	20			486		
	21			2061		
	22			6638830		
	23			3643055		
	24			874222		

略語：NA：該当せず、BDL：検出限界未満、CV：変動係数

一般状態の変化として、過敏症に一致する嗜眠が、全ての AVAL 投与群で 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 投与前に腹腔内投与した。

4 mg/kg/日群において 4 回目投与後 1 時間以内に 9 匹中 3 匹で死亡がみられたが（雄 2 匹は死亡、雌 1 匹は瀕死のため安楽死させた）、これも過敏症に一致するものであった。他の群では死亡は認められなかった。軽度の白血球増加症（リンパ球絶対数増加による）及び好酸球増加症が 120 mg/kg/週群の雄にみられたが、これは観察された過敏症反応に一致する可能性があると考えられた。

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。

この試験では、上記の 14 日間試験の投与量より高用量において、投与に関連した精巣及び肝臓の所見は認められなかった。したがって、上記の 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。

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。

3.2 非げっ歯類

3.2.1 カニクイザルを用いた探索的 28 日間反復点滴静注毒性試験

AVAL（バッチ [redacted]）のカニクイザルを用いた探索的（GLP 非適用）毒性試験を、0（溶媒）、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（Module 2.6.7、[表 2.6.7.6]及び[1213-004 試験]参照）。1 群の動物数は雌雄各 2 匹とし、投与容量は 10 mL/kg として合計 4 回投与した。サルには DPH を投与しなかった。

評価パラメータは、生死、一般状態観察、身体検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査及び尿検査とした。TK 測定用の血清検体を採取し、抗薬物抗体の有無を評価した。投与期間終了時にサルを安楽死させ剖検した。剖検所見を記録して特定の器官重量を測定し、特定の組織の病理組織学的検査を実施した。

TK パラメータを表 5 に要約した。AVAL の TK パラメータに性差は認められなかった。1 回目投与後の C_{max} には、40 mg/kg/週と 120 mg/kg/週の用量間で 4.5 倍の差がみられた。初回投与後の $AUC_{0\text{-}inf}$ を用量で補正した曝露量（$AUC_{0\text{-}inf/dose}$）は、40 及び 120 mg/kg/週でそれぞれ 20.6 ± 6.49 及び 26.3 ± 7.59 μg·h/mL/用量であった。40 mg/kg/週では 1 回目と 4 回目の投与間で TK パラメータに有意差はみられなかったが、120 mg/kg/週では 1 回目と 4 回目の投与間で TK パラメータに有意差（CL 減少及び $AUC_{0\text{-}inf}$ 増加）が認められた。120 mg/kg/週において 1 回目と 4 回目の投与間で TK パラメータに変化がみられたことから、サルへのこの用量での反復投与により、AVAL の TK プロファイルが影響を受けることが示唆された。

表 5 - サルを用いた探索的 28 日間反復静脈内投与毒性試験：1 回目及び 4 回目投与後の AVAL の TK パラメータ

パラメータ	1 回目投与（mg/kg/週）			4 回目投与（mg/kg/週）		
	4 (n=4)	40 (n=4)	120 (n=4)	4 (n=4)	40 (n=4)	120 (n=4)
C_{max} (μg/mL)	N/A	192 ± 63.3	862 ± 302	N/A	258 ± 39.7	1273 ± 214
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg.h/mL)	N/A	824 ± 260	3155 ± 911	N/A	954 ± 202	5900 ± 660

略語：N/A：該当せず（分析用の血清が不十分）、AUC：血清中濃度ー時間曲線下面積、C_{max}：最高血清中濃度
注：雌雄併合、値は平均値 ± SD を示す。

抗 AVAL 抗体価を表 6 に要約した。測定可能な抗体価が 21 日目に全ての用量で認められた。

表 6 - 21 日目の抗 AVAL 抗体価

群	動物	被験物質用量 (mg/kg/週)	試験日	抗体価	群平均値	%CV
1	1001	0	21	BDL	BDL	NA
	1002			BDL		
	1501			BDL		
	1502			BDL		
2	2001	4	21	34046	13789	108.4
	2002			1362		
	2501			16015		
	2502			3734		

群	動物	被験物質用量 (mg/kg/週)	試験日	抗体価	群平均値	%CV
3	3001	40	21	466809	263026	84.7
	3002			438144		
	3501			122695		
	3502			24454		
4	4001	120	21	66388	139257	36.2
	4002			168721		
	4501			145393		
	4502			176527		

略語：NA：該当せず、BDL：検出限界未満、CV：変動係数

生死、一般状態観察、身体検査、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。

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 $AUC_{0\text{-}inf}$曝露量は 5900 μg·h/mL であった。

3.2.2 カニクイザルを用いた 26 週間反復点滴静注毒性試験及び 4 週間回復性試験

カニクイザル（1 群雌雄各 6 匹）を用いて、AVAL（バッチ[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]）の 0（溶媒）、50 又は 200 mg/kg の用量で 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（Module 2.6.7、[表 2.6.7.7.1]及び[0658-11097 試験]参照）。1 群の動物数は雌雄各 6 匹とし、投与容量は 20 mL/kg として合計 13 回投与した。1 群雌雄各 4 匹を 26 週間の投与期間終了時の主剖検用とし、残りの 1 群雌雄各 2 匹を 4 週間の無投与回復期間に割り付けた。サルには DPH を投与しなかった。

評価パラメータは、生死、一般状態観察、身体検査、体重、摂餌量、心電図検査、中枢神経系検査、眼科学的検査、呼吸数、心拍数、深部体温、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査とした。TK 測定用の血清検体を採取し、抗薬物抗体の有無を評価した。投与期間又は回復期間終了時にサルを安楽死させ剖検した。肉眼所見を収集し、特定の器官重量を測定し、組織の病理組織学的検査を実施した。

TK パラメータを表 7 に要約した。TK パラメータには雌雄差は認められなかった。1 回目投与後の C_{max}には、50 mg/kg 群と 200 mg/kg 群の間で 7 倍近い差がみられた。用量について補正した AUC（$AUC_{0\text{-}inf/dose}$）は、50 mg/kg 群で 48.5 ± 13.6 μg·h/mL/用量、200 mg/kg 群で 93.6 ± 14.3 μg·h/mL/用量であった。用量内 TK パラメータには、連続した投与（すなわち 1、7 及び 13 回目投与）による変化が認められた。これらの変化の特徴は、$t_{1/2}$延長、C_{max}及び AUC の増加並びに CL 減少であった。こ

のことから、検討した用量でサルに反復投与すると、AVAL の TK プロファイルが影響を受けることが示唆された。

表 7 - サルを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験：1 及び 13 回目投与後の AVAL の TK パラメータ

動物種	用量（mg/kg、2 週に 1 回）	C_{max} (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	
		1 回目投与	13 回目投与	1 回目投与	13 回目投与
サル	50	566 ± 157	861 ± 189	2423 ± 682	3712 ± 977
	200	3892 ± 506	5284 ± 1440	18728 ± 2866	28162 ± 10694

略語：AUC：血清中濃度ー時間曲線下面積、C_{max}：最高血清中濃度、SD：標準偏差
注：雌雄併合、値は平均値 ± SD を示す。

抗 AVAL 抗体価を表 8 に要約した。用量及び時間に応じた ADA 産生が認められた。

表 8 - 7 及び 13 回目投与前の抗 AVAL 抗体価

群	動物	用量（mg/kg、2 週に 1 回）	7 回目投与前		13 回目投与前	
			抗体価	群平均値 (%CV)	抗体価	群平均値 (%CV)
1	DEW1M01	0	194	144 (48)	197	258 (171)
	DEW1M02		BDL		BDL	
	DEW1M03		112		451	
	DEW1M04		BDL		BDL	
	DEW1M05		BDL		BDL	
	DEW1M06		BDL		BDL	
	DEW1F19		BDL		BDL	
	DEW1F20		BDL		BDL	
	DEW1F21		103		BDL	
	DEW1F22		111		BDL	
	DEW1F23		200		126	

群	動物	用量（mg/kg、2 週に 1 回）	7 回目投与前		13 回目投与前	
			抗体価	群平均値 (%CV)	抗体価	群平均値 (%CV)
2	DEW2M07	50	41486	26905 (16941)	39022	43704 (33863)
	DEW2M08		22313		25365	
	DEW2M09		13962		32353	
	DEW2M10		15614		18156	
	DEW2M11		24967		29926	
	DEW2M12		34027		51467	
	DEW2F25		10968		24305	
	DEW2F26		7392		15013	
	DEW2F27		37557		55277	
	DEW2F28		18877		82080	
	DEW2F29		26828		19330	
	DEW2F30		68872		132153	
3	DEW3M13	200	10000	43822 (46623)	23543	62121 (54629)
	DEW3M14		180311		160000	
	DEW3M15		31748		37961	
	DEW3M16		48429		121257	
	DEW3M17		8000		16919	
	DEW3M18		31748		55597	
	DEW1F24		19319		9488	
	DEW3F31		70861		152775	
	DEW3F33		49509		33522	
	DEW3F34		19056		25080	
	DEW3F35		35205		88585	
	DEW2F36		21683		20723	

略語：BDL：検出限界未満、CV：変動係数

生死、一般状態観察、身体検査、眼科学的検査、心電図（ECG）検査、神経学的検査、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。

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 $AUC_{0\text{-}inf}$ は 28162 μg·h/mL であった。

4　遺伝毒性試験

ICH S6(R1)では、医薬品について通常実施される範囲及び種類の遺伝毒性試験は、バイオテクノロジー応用医薬品には該当せず、実施の必要はないとされている。しかし、AVALについてはマウスを用いる探索的 *in vivo* 小核試験を実施した（表 9）。

表 9 - 遺伝毒性試験の結果

試験系	用量 （mg/kg、静脈内）	結果	GLP 適用の有無
マウスを用いる *in vivo* 骨髄小核試験	50 100（50 mg/kg を 2 回） 150（50 mg/kg を 3 回）	陰性	GLP 非適用

4.1　マウスを用いる探索的 *in vivo* 小核試験

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（Module 2.6.7、[表 2.6.7.9.1]、[表 2.6.7.9.2] 及び [表 2.6.7.9.3]、それぞれ[[redacted]-3559 試験]、[[redacted]-00333 試験]及び[[redacted]-00184 試験]参照）。GAAKOマウスに、AVAL（バッチ [redacted] 及び [redacted]）を、0（溶媒）、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。1 群の動物数は雌雄各 5 匹とし、投与容量は 10 mL/kg とした。メチルメタンスルホネート（75 mg/kg/日の用量で 3 日間腹腔内投与）を陽性対照として使用した。酵素活性測定のため、投与の 6 及び 24 時間後に骨髄を採取した。8 又は 15 日目に、小核分析用の全血を採取した。

骨髄への分布が AVAL 活性の増加によって示された。AVALによる小核数の増加は認められなかった。陽性対照のメチルメタンスルホネートにより、予想どおりの小核増加がみられた。

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。

5　がん原性試験

AVAL のがん原性試験を評価するための試験は実施しなかった。非臨床安全性評価の一環として、AVAL に関するがん原性リスク評価を以下のように実施した。

- マウス及びサルを用いた反復投与毒性試験及び、マウスを用いる探索的 *in vivo* 遺伝毒性試験における AVAL の毒性評価、AVAL のようなヒト化製剤のマウスへの投与によるアナフィラキシー様反応を含めた過敏症反応を考慮した長期がん原性試験の実施可能性を評価した。
- *In silico* 遺伝毒性調査、公表文献、過剰量の不純物 T *を添加した AVAL のサルを用いた反復投与毒性試験及び不純物 T *の *in vitro* 遺伝毒性試験を評価した。
- 市販のポンペ病薬であるマイオザイム®及び Lumizyme®の臨床試験結果、疫学データ、医薬品監視データベース、外部データベース及び公表文献に基づく、腫瘍発現又はがんとの関連性を調査した。
- AVAL のがん原性に関して、AVAL の投与量中における不純物 T *の[redacted]部分及びその他のヒドラジン含有化合物の放出の有無を評価した（Module 2.7.2、[2.2 項]参照）。
  - 算出された AVAL の 20 mg/kg 用量中における[redacted]の理論上の最大量（用量当たり 21.6 µg/kg）は、不純物 T *[redacted]の補正された生涯摂取量許容限界（用量当たり 25.8 µg/kg）以内であった。
  - *In vitro* 代謝試験において、AVAL と不純物 T *をヒト肝細胞中でインキュベートしても、不純物 T *[redacted]及びその他のヒドラジン含有化合物は生成されないことが示された。
  - 以上より、AVAL 投与による[redacted]及びヒドラジ含有化合物への曝露のリスクは軽微であると考えられた。

以上、証拠の重み付け（weight of evidence）による評価の結果、AVAL のがん原性を評価するための更なる非臨床試験は必要ないと判断した。

＊新薬承認情報提供時に置換

6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及び TK 評価を含む）

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

交尾、受胎能及び初期胚発生に対する AVAL の影響を、CD-1 マウスを用いて評価した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.12.1]及び[FER0511 試験]参照）。雌雄の CD-1 マウスに、AVAL（バッチ [redacted]、[redacted]）を 0（溶媒）、0（溶媒／DPH）、10、20 又は 50 mg/kg の用量で、2 日に 1 回静脈内投与した。1 群の動物数は雌雄各 22 匹とし、投与容量は 10 mL/kg とした。雄マウスに、対照物質又は被験物質を、交配前 10 週間、交配期間中及び安楽死まで、2 日に 1 回、継続的に投与した。雌マウスには、対照物質又は被験物質を、交配前 2 週間、交配期間中（最長 13 日間）及び妊娠 7 日まで、2 日に 1 回、継続的に投与した。DPH の 5 mg/kg の用量での腹腔内投与（1 mL/kg）を、雄は 6 回目投与後、雌は 2 回目投与後に行った。

評価パラメータ及び評価項目は、生死、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、性周期評価、交配、卵巣及び子宮の検査、雄性生殖評価（精子の運動能及び濃度）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査とした。

雄マウスには被験物質関連の死亡は認められなかった。10、20 及び 50 mg/kg/回群において、それぞれ 4、7 及び 3 匹の雄マウスが投与後に死亡した（表 10）。投与後の死亡時間及び一般状態の毒性変化に基づくと、これらの死亡は AVAL 投与に対する免疫応答（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。一般状態の変化はおおむね死亡例のみで観察され、その内訳は自発運動低下、平伏歩行、振戦、運動失調及び努力性呼吸であった。更に、触覚過敏（50 mg/kg/回）及び円背位（全ての AVAL 群）が観察された。

表 10 - 雄の死亡

動物番号	用量（mg/kg/回）	試験日	投与後の死亡時間	死亡前の一般状態の変化
5152	10	11	36 分	-
5159	10	105	8 分	自発運動低下（11 日目）、努力性呼吸（105 日目）
5160	10	13	1 時間 12 分	自発運動低下、平伏歩行（11 日目、13 日目）、振戦（11 日目）、運動失調、努力性呼吸（13 日目）
5166	10	9	1 時間 33 分	-
5168	20	9	1 時間 39 分	-
5170	20	9	1 時間 39 分	-

動物番号	用量（mg/kg/回）	試験日	投与後の死亡時間	死亡前の一般状態の変化
5180	20	9	1 時間 36 分	-
5182	20	13	1 時間 7 分	自発運動低下（9 日目）
5183	20	9	1 時間 39 分	-
5184	20	27	3 分	円背位（13 日目）
5185	20	9	1 時間 40 分	-
5190	50	9	1 時間 38 分	-
5198	50	9	1 時間 36 分	自発運動低下（9 日目）
5210	50	9	1 時間 33 分	-

略語：-：該当せず

雄の体重及び摂餌量には変化がみられなかった。雄マウスの交尾率、受胎率、器官重量、剖検所見、病理組織学的所見及び精子パラメータ（精子の運動能及び密度）には変化が認められなかった。

雌マウスでは被験物質関連の死亡は認められなかった。10、20 及び 50 mg/kg/回群において、それぞれ 2、3 及び 1 匹の雌マウスが投与後に死亡した（表 11）。投与後の死亡時間及び一般状態の毒性変化に基づくと、これらの死亡は AVAL 投与に対する免疫応答（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。更に、20 mg/kg/回群の雌 1 匹で 9 日目の投与後に一般状態の毒性変化（自発運動低下、運動失調、努力性呼吸、正向反射消失）がみられたため安楽死させた。一般状態の変化はおおむね死亡例のみで観察され、その内訳は自発運動低下、運動失調及び正向反射消失であった。投与群の雌で観察されたその他の一般状態の変化は、10 及び 50 mg/kg/回群における触覚過敏であった。

表 11 - 雌の死亡

動物番号	用量（mg/kg/回）	試験日（妊娠日数）	投与後の死亡時間	死亡前の一般状態の変化
5361	10	9	55 分	自発運動低下（9 日目）
5362	10	9	17 分	-
5370	20	9	44 分	自発運動低下（9 日目）
5375	20	9	17 分	-
5382[a]	20	9	3 時間 34 分	自発運動低下、運動失調、努力性呼吸、正向反射消失（9 日目）
5384	20	11	投与後 15 分以内	自発運動低下、正向反射消失（11 日目）

動物番号	用量（mg/kg/回）	試験日（妊娠日数）	投与後の死亡時間	死亡前の一般状態の変化
5410	50	7（妊娠）	1時間2分	自発運動低下、運動失調（11日目）

略語：-：該当せず
a 一般状態の毒性変化がみられたため、9日目に安楽死させた。

雌の体重及び摂餌量には変化がみられなかった。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所見には変化が認められなかった。

以上、雄親動物及び母動物の NOAEL は、検討した最高用量の 50 mg/kg/回であった。雌雄の受胎能に関する NOAEL は 50 mg/kg/回であった。

6.2 胚・胎児発生に関する試験

6.2.1 マウス

この試験の目的は、AVAL（バッチ [redacted]）を妊娠 CD-1 マウスに着床から硬口蓋閉鎖まで投与したときの胚・胎児発生への影響の有無を検討することであった（Module 2.6.7、[表 2.6.7.13.1]及び[TER0685 試験]参照）。妊娠マウスに、AVAL を、0（溶媒）、0（溶媒）、10、20 又は 50 mg/kg/日の用量で、妊娠 6 日から 15 日まで 1 日 1 回静脈内投与した。1 群の動物数は雌 22 匹とし、投与容量は 10 mL/kg とした。AVAL 投与マウスでアナフィラキシーの徴候はみられなかったため、この試験では DPH 投与の必要はなかった。

妊娠 18 日に帝王切開を実施した。評価パラメータ及び評価項目は、生死、一般状態観察、母動物体重、剖検、TK、卵巣及び子宮の内容、母動物及び胎児の組織内濃度、胎児の生存、胎児の性、胎児体重並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査とした。

妊娠 6 日のマウスにおける AVAL の 10、20 及び 50 mg/kg/日の用量での平均血清中 TK パラメータを表 12 に示す。曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は用量比を上回って増加した。10 mg/kg/回から 50 mg/kg/回にかけての 5 倍の用量範囲において、C_{max} は 9.90 倍に、$AUC_{0\text{-}24h}$ は 12.8 倍に、それぞれ増加した。

表 12 - TK データ

性	妊娠日数	AVAL 用量（mg/kg/日）	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)
雌	6	10	145	163
	6	20	454	582
	6	50	1440	2080

性	妊娠日数	AVAL 用量 （mg/kg/日）	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)

略語：C_{max}：**最高血清中濃度、AUC：血清中濃度－時間曲線下面積**
注：値（平均値）は有効数字 3 桁に丸めた。

妊娠 18 日に、母動物の肝臓及び胎盤における AVAL 濃度の用量依存的な増加がみられたが、胎児肝臓ではこれに伴う増加は認められなかった。このことから、AVAL の母動物から胎児血液循環への移行はないと思われる。

被験物質関連の死亡は認められなかった。50 mg/kg/日群の 2 匹が、妊娠 14 日の投与の約 2 時間 20 分後に死亡した。投与時間と死亡時間並びに一般状態の変化、体重への影響及び剖検所見がみられなかったことに基づくと、これらの死亡は免疫応答（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/日群の雌 1 匹が妊娠 6 日の採血の 1 時間後に死亡し、他の雌 1 匹が妊娠 6 日の 15 分採血後に、瀕死状態になったため安楽死させた。これらの死亡は血液検体採取に起因すると考えられた。

一般状態の変化として、妊娠 13 日から 18 日に、活動性低下が、10、20 及び 50 mg/kg/日群の少数例（それぞれ 22 匹中 1 匹、3 匹及び 2 匹に、1 回、3 回及び 5 回）で観察された。これは少数のマウスのみに発生したこと、及び用量依存性ではなかったことから、毒性変化ではないと考えられた。これらの少数の孤発性所見の発生原因は明白ではないが、過敏症が観察された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活動低下も認められていることから、ヒト化タンパク質である AVAL に対する免疫応答が関与している可能性が考えられた。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、総胎児数並びに胎児の外表、内臓及び骨格検査において、50 mg/kg/日までの用量で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（2 匹で 62.5%及び 78.6%）及び平均後期吸収胚数増加（背景対照の 0.2 と比較して 1.4）が、50 mg/kg/日でみられた。AVAL はマウスにおいて胎盤を通過しないことから、この胚・胎児への影響はヒト化タンパク質の投与に起因する免疫応答による母体毒性の二次的なものであることが示唆された。

以上、AVAL を妊娠 6 日から 15 日まで 1 日 1 回静脈内投与したときの母動物に関する NOAEL は 50 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$は 2080 µg·h/mL）であった。50 mg/kg/日で着床後胚損失率及び後期吸収胚数の増加がみられたことから、発生に関する NOAEL は 20 mg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24h}$は 582 µg·h/mL）であった。

6.2.2 ウサギ

6.2.2.1 非妊娠ウサギを用いた探索的 7 日間毒性試験

この試験の目的は、AVAL（バッチ [redacted]、[redacted]）の非妊娠ニュージーランドホワイトウサギにおける忍容性を評価し、その後の妊娠ウサギを用いた試験における用量設定の情報を得ることであった（Module 2.6.7、[表 2.6.7.11]及び[DDO1378 試験]参照）。非妊娠ウサギに、AVAL を、0（溶媒、9 日間）又は 20、40 又は 80 mg/kg/日（7 日間）の用量で、1 日 1 回、約 10 分間の点滴静注によ

り投与した。ウサギにはDPHを投与しなかった。1群の動物数は雌3匹とし、投与容量は8 mL/kgとした。

評価パラメータ及び評価項目は、生死、一般状態観察、体重、摂餌量及び剖検とした。

死亡はみられず、一般状態観察、体重、摂餌量及び剖検において変化は認められなかった。

以上、AVALをウサギに1日1回、7日間静脈内投与したときの忍容性は、最高用量の80 mg/kg/日において良好であった。

6.2.2.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

本試験の目的は、妊娠ニュージーランドホワイトウサギにおけるAVAL（バッチ[redacted]）の忍容性を評価し、最終的なウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の用量設定に関する情報を得ることであった（Module 2.6.7、[表 2.6.7.11]及び[TEP0366試験]参照）。AVAL（40 mg/kg/日）の約10分かけた妊娠ウサギへの点滴静注を、1日1回、妊娠6～19日（第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）に実施した。対照群（第1群）には溶媒を1日1回、妊娠6～19日に投与した。ウサギにはDPHを投与しなかった。1群の動物数は雌6匹とし、投与容量は8 mL/kgとした。

母動物のパラメータ及び評価項目は、生死、一般状態観察、体重及び摂餌量とした。帝王切開を妊娠29日に実施した。子宮、胎盤及び卵巣を検査し、胎児数、早期及び後期吸収胚数、総着床数並びに黄体数を記録した。妊娠子宮重量を記録した。胎児の体重を測定し、外表奇形及び発生変異を検査した。

母動物の生死、一般状態観察、体重、摂餌量及び剖検において、AVALの影響は認められなかった。胎児の子宮内成長、生存及び外表形態には、AVALの影響はみられなかった。

以上、妊娠ウサギに、AVALを、40 mg/kg/日の用量で、妊娠6～19日、妊娠6～12日、妊娠13～19日又は妊娠6、10、13、16及び19日に静脈内投与したときの忍容性は良好であった。

6.2.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

本試験の目的は、AVAL（バッチ[redacted]及び[redacted]）の母動物への投与を、器官形成期に行ったときの発生毒性を検討することであった（Module 2.6.7、[表 2.6.7.13.2]及び[TER0686試験]参照）。適時交配した雌のニュージーランドホワイトウサギに、AVALを0（溶媒）、30、60及び100 mg/kg/日の用量で、妊娠6～19日に約10分かけて点滴静注した。ウサギにはDPHを投与しなかった。1群の動物数は雌24匹とし、投与容量は10 mL/kgとして合計14回の投与を実施した。

母動物の評価パラメータ及び評価項目は、生死、一般状態観察、体重及び摂餌量とした。妊娠29日に、生存例の雌について開腹子宮摘出を実施した。子宮、胎盤及び卵巣を検査し、胎児数、早期及び後期吸収胚数、総着床数並びに黄体数を記録した。妊娠子宮重量を記録した。胎児の体重を測定し、性別を判定するとともに、外表、内臓及び骨格の奇形及び発生変異を検査した。

AVALの平均TKパラメータを表13に示す。t_{max}の群中央値は、妊娠6日及び妊娠19日のいずれにおいても、投与0.083時間後であった。$AUC_{0\text{-}24h}$及びC_{max}を指標とするAVALへの曝露量は、30～

100 mg/kg/日の用量範囲で、ほぼ用量比例的ないし用量比を上回って増加した。特に、用量を約 3 倍に増加させると、妊娠 6 日及び妊娠 19 日の $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ約 4 倍及び 6 倍に増加し、C_{max} はいずれの測定日においても 3 倍に増加した。妊娠 6 日から妊娠 19 日にかけて蓄積は認められなかった。30、60 及び 100 mg/kg/日群における幾何平均値を用いて算出した蓄積比は、$AUC_{0\text{-}24h}$ を指標とするとそれぞれ 0.61、0.82 及び 1.1、C_{max} を指標とするとそれぞれ 0.78、0.83 及び 0.78 であった。

表 13 - AVAL の平均 TK パラメータ

用量（mg/kg/日）	AUC_{last} (μg·h/mL)	$AUC_{0–24h}$ (μg·h/mL)	C_{max} (μg/mL)	t_{max}[a]（投与後時間）
妊娠 6 日				
30	2040	2160	991	0.083
60	3920	4330	1830	0.083
100	7240	8110	3220	0.083
妊娠 19 日				
30	1230	1260	772	0.083
60	3180	3310	1530	0.083
100	7920	7910	2530	0.083

略語：AUC：血清中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血清中濃度、t_{max}：最高血清中濃度到達時間
a t_{max} 値については中央値を示す。

30 mg/kg 群の雌 1 匹が妊娠 16 日に死亡した。死因は不明であったが、より高用量では死亡がみられなかったことから、この死亡は被験物質関連ではないと考えられた。他の雌は全例とも計画剖検時まで生存した。被験物質関連の一般状態の変化は認められなかった。

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。これらの変化は被験物質関連の毒性変化と考えられた。

いずれの用量においても、被験物質関連の剖検所見は認められなかった。

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なかった。被験物質関連の奇形及び発生変異は認められなかった。

以上、60 及び 100 mg/kg/日で平均母動物体重増加抑制及び摂餌量減少がみられたことから、母動物毒性に関する NOAEL は 30 mg/kg/日であった。母動物の NOAEL での妊娠 19 日における曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は 1260 μg·h/mL であった。生存及び発生への影響がみられなかったことから、胚・胎児の無作用量（NOEL）は 100 mg/kg/日であった。胚・胎児の NOEL における妊娠 19 日の曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は 7910 μg·h/mL であった。

6.3　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

この試験の目的は、AVAL（バッチ[redacted]、[redacted]）を雌の CD-1 マウスに着床から授乳期を通して離乳まで投与したときの母動物及び出生児の発達への影響を検討することであった（Module 2.6.7、[表 2.6.7.14]及び[DPN0378 試験]参照）。妊娠マウスに、AVAL を、0（溶媒）、0（溶媒／DPH）、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。DPH は、AVAL の 5 回目投与以降、5 mg/kg の用量（1 mL/kg）で腹腔内投与した。1 群の動物数は雌 25 匹とし、投与容量は 10 mL/kg とした。F1 世代の出生児への AVAL 直接投与は行わなかったが、母動物の妊娠中（子宮内曝露）又は授乳期間中の母乳摂取を介して曝露された可能性がある。

F0 世代の評価パラメータは、生死、一般状態観察、体重、分娩観察、卵巣及び子宮の検査並びに剖検とした。F1 世代の評価パラメータは、生死、一般状態観察、体重、性成熟、行動検査（受動回避検査、自発運動量及び聴覚性驚愕馴化）、生殖能、剖検、雄性生殖器官重量並びに卵巣及び子宮の検査とした。

F0 世代の雌マウスには、被験物質関連の死亡は認められなかった。10 mg/kg/日群では、F0 世代の雌マウス 1 匹を、授乳 12 日に一般状態の毒性変化により安楽死させ、F0 世代の雌マウス 1 匹は妊娠 18 日の投与中に死亡した。20 mg/kg/日群では、F0 世代の雌マウス 1 匹を授乳 20 日に一般状態の毒性変化により安楽死させ、50 mg/kg/日群では F0 世代の雌マウス 1 匹を妊娠 16 日に流産したため安楽死させた。これらの早期死亡は AVAL 投与に起因するものではないと考えられた。その理由として、単発的であったこと、及び用量依存的な発現がみられなかったことが挙げられる。更に、F0 世代の雌マウスの一般状態観察、体重及び剖検において、被験物質関連の変化は認められなかった。

F1 世代の雌雄マウスにおいて、被験物質関連の死亡は認められなかった。0/5 mg/kg/回 DPH 群では、F1 世代の雄 1 匹を一般状態の毒性変化により生後 29 日に安楽死させた。0/0 mg/kg/回群では、F1 世代の雌 1 匹が生後 23 日に死亡した。20 mg/kg/回群では、F1 世代の雌 1 匹を一般状態の毒性変化により生後 71 日に安楽死させた。これらの早期死亡は AVAL 投与に起因するものではないと考えられた。その理由として、対照群にみられたこと、用量依存的な発現がみられなかったこと、及び変化がみられた群の少数例に発現したことが挙げられる。

F1 世代の雌雄マウスにおける離乳後、交配前及び妊娠期間中の一般状態観察、体重及び摂餌量、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。

以上、母動物に関する AVAL の NOAEL は 50 mg/kg/回であった。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。

6.4　幼若動物を用いた試験

幼若マウスにおける AVAL の毒性を、生後 21 日から生後 77 日まで（受胎能コホートの雄のみについては生後 91 日まで）、2 週に 1 回、約 9 週間（合計 5 又は 6 回）の静脈内投与により評価した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.15]及び[JUV0033 試験]参照）。AVAL（バッチ[redacted]）を、雌雄のマウ

スに、0（溶媒／溶媒）、0（溶媒／DPH）、20/25（主コホートの雄のみ 25 mg/kg）、50 又は 100 mg/kg の用量で、2 週に 1 回、静脈内投与（緩やかなボーラス投与）した。投与容量は 8 又は 10 mL/kg とし、合計 5 回又は 6 回の投与を行った。先に実施したマウスの試験に基づくと、過敏症の可能性があることから、0（溶媒／溶媒）群以外のマウスには、2 回目以降の投与前に、DPH を 5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。主コホート、回復コホート、受胎能コホート及び TK コホートに、それぞれ 1 群雌雄各 10 匹、5 匹、20 匹及び 3 匹（対照群）又は 9 匹（AVAL 投与群）の動物を配した。9 週間の投与期間終了時に主コホートの 1 群雌雄各 10 匹の動物を剖検した後、1 群雌雄各 5 匹について 4 週間の回復期間をおいた。

試験に割り付けられた全てのマウス（全てのコホート）における評価パラメータ及び評価項目は、一般状態観察、体重、体重変化及び摂餌量とした。受胎能コホートに割り付けられた動物の評価項目は、性成熟、自発運動量、オープンフィールド観察、聴覚性驚愕馴化、生殖能（性周期判定及び交配）、卵巣及び子宮の検査、雄性生殖評価（精子の運動能、濃度、形態及び精子細胞数）とした。主コホート又は回復コホートに割り付けられた動物の評価パラメータ及び評価項目は、受動回避検査（主コホート）、臨床検査（血液学的検査及び血液生化学的検査［主コホート及び回復コホート］）、抗薬物抗体分析（回復コホートのみ）、肉眼剖検所見、器官重量、大腿骨長及び骨密度測定（主コホート）並びに病理組織学的検査（主コホート及び回復コホート）とした。TK コホートに割り付けられたマウスについて生後 77 日に血液検体を採取し、AVAL の濃度を測定した。

TK パラメータを表 14 に要約した。全ての用量において、AVAL の血清中濃度が、2 週に 1 回の反復投与の 4～6 時間後まで定量可能であった。多くの場合、最高濃度は 0.083 時間の時点（静脈内ボーラス投与後の初回採血時点）で認められた。AVAL 反復投与後の C_{max} は、ほぼ用量に比例して増加したのに対し、$AUC_{0\text{-}24h}$ は用量比を上回って増加した。20/25 mg/kg から 5 倍の用量の 100 mg/kg で 2 週に 1 回投与したとき、C_{max} は 5.88 倍（雌）及び 5.11 倍（雄）に増加し、$AUC_{0\text{-}24h}$ は 11.5 倍（雌）及び 14.8 倍（雄）に増加した。曝露量はおおむね雌の方が低く、$AUC_{0\text{-}24h}$ の雌／雄比は 0.548～0.853 の範囲であった。

表 14 - 幼若マウスを用いた 26 週間反復静脈内投与毒性試験における AVAL 血清中 TK の要約

性	用量（mg/kg、2 週に 1 回）	PND	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)
雄	20	77	611	550
	50	77	1750	2730
	100	77	3120	8140
雌	20	77	422	469
	50	77	1170	1490
	100	77	2480	5400

略語：PND：生後日数、AUC：血清中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血清中濃度
注：ほとんどの値は有効数字 3 桁に丸めた。

抗 AVAL 抗体の結果を表 15 に要約した。測定可能な抗 AVAL 抗体価が、全ての AVAL 投与群で生後 48、76 及び 110/111 日に認められた。同じ群のマウス間で抗体価に大きなばらつきがみられたのに対し、個体別の抗体価は時点間で一貫しており、おおむね反復投与に伴った抗体価の増加が認められた。回復性試験例からは ADA 検体を採取したが TK 用動物からは採取しなかったため、薬物曝露量に対する ADA の影響に関しては結論が得られなかった。

表 15 - 生後 48、76 及び 110/111 日のマウスにおける抗 AVAL 抗体の要約

群	被験物質	AVAL の用量（mg/kg、2 週に 1 回）	性	生後日		
				48	76	110/111 [a]
1	対照物質/生理食塩液	0	雄	1/5	0/5	0/5
			雌	0/5	0/5	0/5
2	生理食塩液/DPH	0	雄	0/5	0/5	0/5
			雌	2/5	2/5	2/5
3	AVAL/ DPH	25/20 [b]	雄	5/5	5/5	5/5
			雌	5/5	5/5	5/5
4	AVAL/ DPH	50	雄	5/5	5/5	5/5
			雌	5/5	5/5	5/5
5	AVAL/ DPH	100	雄	5/5	5/5	5/5
			雌	4/5	5/5	4/5

a 剖検前日

b AVAL を、雄には 25 mg/kg、雌には 20 mg/kg の用量で投与した。

途中死亡が 25 匹にみられ、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、2 及び 0 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 投与との関連がなく、2 匹は対照群、25 mg/kg 群の雄 1 匹は傷害による安楽死、50 mg/kg 群の雌 1 匹は泌尿生殖部位腫脹による安楽死であった。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。その根拠として、死亡時間が投与の約 3 時間後までであったこと、死亡の発現頻度が全ての投与群を通して低く、低用量群における発現頻度がより高かったことが挙げられる。

生存例の雄では、生後 80～82 日及び生後 111～112 日に、AVAL に関連すると考えられる血液学的パラメータの用量関連性の変化が一部に認められた。変化の内訳は、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）の軽度から重度の増加であった。これらの血液学的パラメータの変化は AVAL 投与群における死亡の

増加に一致しており、免疫応答に関連するものと推定された。雌マウスには血液学的パラメータの変化は認められなかった。

一般状態観察、体重、摂餌量、血液生化学的検査、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。測定した発達評価項目（大腿骨長、骨密度）、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。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）の変化は認められなかった。

以上、幼若マウスに AVAL を 2 週に 1 回投与したときの NOAEL は 100 mg/kg と判断された。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。

7　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。

8　その他の毒性試験

8.1　潜在的変異原性不純物の評価

8.1.1　*In silico* 評価

AVAL の実際の変異原性不純物及び潜在的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（[MAR0080 試験]参照）。潜在的及び実際の不純物の変異原性に関する警告構造について、2 種類の *in silico* 予測システム、すなわち DEREK Nexus（第 6.0.1 版及び知識ベース第 2018 1.1 版）及び Leadscope（第 3.6.1/3.6.4 版［同一予測］及び知識ベース第 2018 1.0 版モデル）を用いて検討した。全てのデータを専門的知識に基づいて解析した。

「Cohort of concern」に同定された不純物はなかった。

- クラス 1（既知の変異原性発がん物質）として 3 種類の不純物が同定された。
  - [redacted]
  - 不純物 L *
  - [redacted]
- クラス 2（既知の変異原性物質）として 1 種類の不純物が同定された。
  - [redacted]
- 8 種類の不純物が変異原性に関する警告構造を示した。更に、警告構造には原薬の構造との関連は認められなかった。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 つにより「ドメイン外」と判断されることから、ICH M7(R1)に従って分類できなかった。8 種類の不純物は、いずれも潜在的に変異原性ありと判断され（警告構造又は未分類の特徴に基づく）、クラス 3 に分類された。
  - [redacted]又は[redacted]
  - 不純物P*
  - [redacted]
  - [redacted]
  - [redacted]
  - 不純物M*
  - 不純物O*
  - [redacted]
- 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、警告構造は原薬の[redacted]中にも存在しており、それについての検査では変異原性が認められなかった。それらはクラス 4 に分類され、変異原性なしと判断された。このため、それらについては更なる考察を行わない。

＊新薬承認情報提供時に置換

- 26 種類の不純物は変異原性に関する警告構造を示さない、又は変異原性がないことを証明する十分なデータがあった。それらはクラス 5 に分類され、変異原性なしと判断された。このため、それらについては更なる考察を行わない。

クラス 1、2 及び 3 の潜在的変異原性不純物の評価を表 16 に要約し、管理方針を表 17 に示した。管理方針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 MI 検査に関連する分析結果を、Module 3 の S.2.3、S.2.4 及び S.3.2 項に示す。この評価は、予定している 20 mg の用量での 2 週に 1 回静脈内投与での生涯投与をカバーしている。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。

表 16 - クラス 1、2 及び 3 の変異原性不純物の評価に関する要約

Impurity (origin)	Toxicological data	DEREK Prediction (mutagenicity)	Leadscope Prediction (mutagenicity)	ICH M7 Class	Comments
[redacted]	**EU Classification:** [redacted] **IARC Category** [redacted] **Carcinogenicity studies: positive in several studies** → [redacted] mg/kg/day [redacted] → [redacted] /day [redacted] **Ames positive** (Internal report ID: 2003-2062) **Ames positive**	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: Positive 1.1. Expert system: Alert [redacted] 1.2. Public Ames models: Not in domain 2. Internal Ames model: Not in domain	**Class 1:** Known mutagenic carcinogen	None

Impurity (origin)	Toxicological data	DEREK Prediction (mutagenicity)	Leadscope Prediction (mutagenicity)	ICH M7 Class	Comments
不純物 L *	**IARC Category** [redacted] **EU Classification:** [redacted] **Carcinogenicity positive** [redacted] mg/kg/day [redacted] mg/kg/day). [redacted] mg/kg/day → [redacted] mg /day [redacted] **Ames positive** (Internal report ID: 1985.0017) **Ames positive**	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: Positive* 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: Not in domain 2. Internal Ames model: Not in domain *Overall Leadscope conclusion is based on positive Ames result from Leadscope training dataset	**Class 1:** Known mutagenic carcinogen	None
[redacted]	**Carcinogenicity positive** [redacted] mg/kg/day [redacted] [redacted] /day	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: Positive 1.1. Expert system: Alert [redacted] 1.1. Public Ames models: Positive 2. Internal Ames model: Positive	**Class 1:** Known mutagenic carcinogen	None

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6 毒性試験の概要文
アバルグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

Impurity (origin)	Toxicological data	DEREK Prediction (mutagenicity)	Leadscope Prediction (mutagenicity)	ICH M7 Class	Comments
[redacted]	**EU Classification:** [redacted] **Ames positive** **HPRT positive**	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: Positive 1.1. Expert system: Alert [redacted] 1.2. Public Ames models: Positive 2. Internal Ames model: Positive	**Class 2:** Known mutagen with unknown carcinogenic potential (bacterial mutagenicity positive, no rodent carcinogenicity data)	None
[redacted]	None found	Negative	1. Overall conclusion public models: Inconclusive 1.1. Expert system: **Alert** [redacted] 1.2. Public Ames models: Negative 2. Internal Ames model: Negative	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance; no mutagenicity data	None
不純物 P * [redacted]	None found	**Alert** [redacted]	1. Overall conclusion public models: **Positive** 1.1. Expert system: **Alert** [redacted] **Alert** [redacted] and **Alert** [redacted] 1.2. Public Ames models: **Positive** 2. Internal Ames model: Negative	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	None

＊新薬承認情報提供時に置換

Impurity (origin)	Toxicological data	DEREK Prediction (mutagenicity)	Leadscope Prediction (mutagenicity)	ICH M7 Class	Comments
	None found	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: **Positive** 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: **Positive** 2. Internal Ames model: Negative	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	None
	None found	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: Inconclusive 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: Not in domain 2. Internal Ames model: Negative	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	None
	None found	Alert [redacted]	1. Overall conclusion public models: **Positive** 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: **Positive** 2. Internal Ames model: Negative	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	None

Impurity (origin)	Toxicological data	DEREK Prediction (mutagenicity)	Leadscope Prediction (mutagenicity)	ICH M7 Class	Comments
不純物 M * [redacted]	No valid mutagenicity results found	**Alert** [redacted]	1. Overall conclusion public models: **Positive** 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: **Positive** 2. Internal Ames model: **Positive**	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, insufficient mutagenicity data	None
不純物 Q * [redacted]	None found	**Alert** [redacted]	1. Overall conclusion public models: **Positive** 1.1. Expert system: **Alert** [redacted] **Alert** [redacted] 1.2. Public Ames models: **Positive** 2. Internal Ames model: **Positive**	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	None
[redacted]	None found	**Alert** [redacted]	1. Overall conclusion public models: Negative 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: Negative 2. Internal Ames model: Negative	**Class 3:** Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	None
[redacted]	None found	Negative (contains **unclassified features** highlighted in yellow)	1. Overall conclusion public models: Negative 1.1. Expert system: No alert 1.2. Public Ames models: Negative 2. Internal Ames model: Negative	**Non-classifiable in DEREK** to be considered as **Class 3**	None

＊新薬承認情報提供時に置換

表 17 - クラス 1、2 及び 3 の変異原性不純物の管理方針

Compound	ICH M7 class	Origin	Control option (ICH M7)	Acceptance limit	Justification
[redacted]	1	[redacted]	Option 2	[redacted] ppm [redacted]	Based on acceptable intake of [redacted] µg/d (ICH M7)
不純物 L *	1	[redacted]			
[redacted]	1	[redacted]	Option 2	[redacted] ppm [redacted]	Based on a PDE of [redacted] µg/d
[redacted]	2	[redacted]	Option 4	-	[redacted] mg/mL [redacted]
[redacted]	3	[redacted]	Option 4	-	[redacted]
不純物P*	3	[redacted]	Option 3	[redacted] ppm in the drug substance	[redacted] ppm [redacted]

＊新薬承認情報提供時に置換

Compound	ICH M7 class	Origin	Control option (ICH M7)	Acceptance limit	Justification
[redacted]	3	[redacted]	Option 4	-	[redacted]
[redacted]	3	[redacted]	Option 4	-	[redacted]
[redacted]	3	[redacted]	Option 4	-	[redacted]
不純物 M *	3	[redacted]			
不純物 Q *	3	[redacted]	Option 3	[redacted] ppm in the drug product	[redacted] ppm, [redacted] ppm

Abbreviations:

NMT: Not more than, PDE: Permissible daily exposure, ICH: International Conference on Harmonization, DS: Drug substance, PPM: Parts per million

＊新薬承認情報提供時に置換

8.1.2 細菌を用いる復帰突然変異試験

AVAL における潜在的不純物の *in silico* 評価により、不　純　物　U　*は、予備的にクラス 3（原薬の構造と無関係の警告構造）と特定され、変異原性及びがん原性がないことを証明するデータは不十分であった。変異原性の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌の 5 種類の菌株（TA1535、TA1537、TA98、TA100 及び TA102）を用いる復帰突然変異試験を、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実施した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.17.2]及び[HIS2317 試験]）。プレート法を用いて、S9-mix の存在下及び非存在下で細菌を処理した。各濃度当たり 3 枚のプレートを使用した。特定の最小寒天培地上で増殖させた復帰変異コロニー数を、処理の 48 時間後に測定した。細菌に対する被験物質の毒性を、増殖抑制又は復帰変異コロニー数の減少により評価した。陰性対照は注射用水とし、菌株の種類及び S9-mix の有無に応じた数種類の参照化合物を陽性対照とした。

不　純　物　U　*のプレート上での沈殿は、検討した最高濃度である 5000 µg/プレートまで認められなかった。細菌への毒性、すなわち増殖抑制又は復帰変異コロニー数の減少はみられなかった。陽性対照は、予想どおりの復帰変異コロニー数増加作用を示した。

不　純　物　U　*は、5000 µg/プレート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、復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上、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。これらの結果に基づくと、不　純　物　U　*はクラス 5 の不純物に分類される。

8.2 不純物／分解物の評価

原薬又は製剤中の不純物の安全性確認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　*［図 1］）の毒性を、サルを用いた不純物 T *添加 AVAL の 13 週間反復投与毒性試験、*in vitro* の細菌を用いる復帰突然変異試験及び *in vitro* 哺乳類細胞を用いた染色体異常試験により評価した。

図 1 - 不　純　物　T　*の構造式



＊新薬承認情報提供時に置換

8.2.1 不純物 T *添加 AVAL のカニクイザルを用いた 13 週間反復点滴静注毒性試験及び 4 週間回復性試験

不純物 T *（バッチ[redacted]及び[redacted]）を添加した AVAL（バッチ[redacted]及び[redacted]）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（Module 2.6.7、[表 2.6.7.17.3]及び[TXC1530 試験]）。サルに、不純物 T *（3、6 又は 12.55 mg/kg）を添加した AVAL を、0（溶媒）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（表 18）。それぞれの投与液を合計 7 回投与した。1 群雌雄各 5 匹の動物を試験に使用した。1 群雌雄各 4 匹は 13 週間の投与期間終了時の主剖検用とし、1 群雌雄各 1 匹を 4 週間の回復期間に割り付けた。投与容量は、AVAL について 20 mL/kg、不純物 T *について 20 mL/kg とした。サルには DPH を投与しなかった。

表 18 - 群構成及び用量

群	サルの数		用量	
	雄	雌	AVAL （mg/kg、2 週に 1 回）	不純物 T *（mg/kg、2 週に 1 回）
1	5	5	0	0
2	5	5	50	3
3	5	5	50	6
4	5	5	50	12.55

評価パラメータは、生死、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、バイタルサイン（体温、呼吸数、心拍数）、血圧、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査とした。TK 測定用の血清検体を採取した。投与期間終了時にサルを安楽死させ剖検した。肉眼的観察及び特定の器官の重量測定を行い、代表的な組織検体について病理組織学的検査を実施した。

TK パラメータを表 19 に要約した。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。

表 19 - サルにおける AVAL の平均血清中 TK パラメータ

性	AVAL の用量（mg/kg、2 週に 1 回）	不純物 T *の用量（mg/kg、2 週に 1 回）	C_{max} (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}54h}$ (µg·h/mL)	
			1 日目	85 日目	1 日目	85 日目
雄	50	3	606	740	2580	3560
		6	1030	683	4470	3180
		12.55	876	784	3770	3920

＊新薬承認情報提供時に置換

性	AVAL の用量（mg/kg、2 週に 1 回）	不純物 T *の用量（mg/kg、2 週に 1 回）	C_{max} (μg/mL)		$AUC_{0\text{-}54h}$ (μg·h/mL)	
			1 日目	85 日目	1 日目	85 日目
雌	50	3	557	652	2420	2860
		6	676	667	2860	2800
		12.55	798	565	3530	2450

略語：C_{max}： 最高血清中濃度、AUC：血清中濃度－時間曲線下面積
注：値は有効数字 3 桁に丸めた。

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 匹で 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。

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。NOAEL は、不純物 T *12.55 mg/kg を添加した高用量の AVAL 50 mg/kg（2 週に 1 回）であった。

8.2.2 細菌を用いる復帰突然変異試験

不純物 T *（バッチ ■/■/■）の突然変異誘導能を評価するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を、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実施した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.17.4]及び[HIS2129 試験]参照）。独立した 5 つの実験において、不純物 T *による細菌の処理を、プレート法及びプレインキュベーション法を用いて、S9-mix の存在下及び非存在下で実施した。各濃度について 3 枚のプレートを使用した。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。細菌に対する被験物質の毒性を、増殖抑制又は復帰変異コロニー数の減少により評価した。陰性対照は注射用水とし、菌株の種類及び S9-mix の有無に応じた数種類の参照化合物を陽性対照とした。

不純物 T *のプレート上での沈殿は、検討した最高濃度である 5000 μg/プレートまで認められなかった。細菌への毒性、すなわち増殖抑制又は復帰変異コロニー数の減少はみられなかった。

不純物 T *は、5000 μg/プレート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、復帰変異コロニー数を増加させなかった。

以上、不純物 T *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。

8.2.3 ヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験

培養ヒト末梢血リンパ球における 不純物 T *（バッチ ■/■/■）の染色体構造異常誘発能を、代謝活性化の存在下及び非存在下で評価した（Module 2.6.7、[表 2.6.7.17.5]及び[MAF0153 試験]参照）。フィトヘマグルチニンの添加によりリンパ球増殖を刺激した。2 例の異なる健康ドナーから採取した細胞を、S9-mix 非存在下では 3 又は 20 時間、S9-mix 存在下では 3 時間、被験物質に曝露した。

＊新薬承認情報提供時に置換

3 時間のインキュベーションによる実験には 17 時間の回復期間をおいた。回収の 2～2.5 時間前にコルセミドを添加して有糸分裂を阻害し、分裂中期細胞を蓄積させた。処理開始の 20 時間後に細胞を回収した。細胞を固定して染色し、顕微鏡により染色体構造異常を評価した。それぞれの濃度及び処理時間につき 200 個の分裂中期細胞を分析した。水を陰性対照とし、マイトマイシン C 及びシクロホスファミドを、それぞれ代謝活性化の非存在下及び存在下での陽性対照とした。

培養中に被験物質の沈殿はみられなかった。3 時間の実験では明らかな細胞毒性は認められなかった。20 時間の連続処理後に、軽微な細胞毒性が 350 µg/mL 以上でみられた。いずれの実験条件においても、ICH S2 ガイドラインに基づき、最高評価濃度を 500 µg/mL とした。

被験物質で処理した培養において、溶媒対照と比較して統計学的に有意又は生物学的に意義のある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。

以上、不純物 T *は、ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験において、500 µg/mL までの濃度で陰性であった。

8.3 その他の評価

8.3.1 薬物乱用性の評価

AVAL について薬物乱用性評価を実施した。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。更に、18 年間にわたる ALGLU の臨床使用において乱用のエビデンスはみられず、AVAL の 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。

＊新薬承認情報提供時に置換

9　考察及び結論

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。このヒトタンパク質に対する過敏症反応が散見され、マウスで最も顕著であったことから、マウスでは 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、50 mg/kg の用量での 2 日に 1 回投与により、精巣、精巣上体及び肝臓で所見が観察されたが、その後の試験では、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と AVAL との関連性はないと考えられる。マウスでは AVAL に対する過敏症反応がみられたため、長期反復投与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。サルを用いた長期反復投与毒性試験における AVAL の曝露量比（サルにおける NOAEL での血清中曝露量／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 倍であった（Module 2.4、[5 項]参照）。

ICH S6 (R1)及び CDER ガイドライン案に基づき、AVAL についての最終的な 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 の用量（合計 150 mg/kg になるように、投与日に 50 mg/kg を 3 回投与）ま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。しかし、AVAL の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の放出の有無を評価することにより、AVAL のがん原性リスク評価を実施した。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ないと考えられた。そのため、がん原性試験は実施しなかった。

以下の試験において、AVAL の投与による毒性変化はみられなかった。

- 50 mg/kg の用量でマウスに 2 日に 1 回静脈内投与し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
- 100 mg/kg/日までの用量で妊娠ウサギに投与した胚・胎児発生に関する試験における胎児
- 50 mg/kg までの用量でマウスに 2 日に 1 回静脈内投与し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

妊娠マウスに AVAL を静脈内投与したところ、最高用量の 50 mg/kg/日において、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

＊新薬承認情報提供時に置換

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、発生に関する NOAEL は 20 mg/kg/日であった。

幼若マウスに AVAL を最高用量 100 mg/kg までの用量で 2 週に 1 回、9 週間静脈内投与しても、忍容性は良好であり、発育への影響は認められなかった。幼若マウスに 2 週に 1 回静脈内投与したときの NOAEL は 100 mg/kg と判断された。

サルの反復投与毒性試験において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。

得られた安全性及び品質データにより、AVAL に関連した潜在的変異原性不純物からのヒトへの明らかなリスクは認められなかった。

製剤中における不純物 T *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 をカニクイザルに 2 週に 1 回、13 週間投与したところ、検討した最高用量である AVAL 50 mg/kg /不純物 T *12.55 mg/kg までの用量で、毒性変化は認められなかった。また、不純物 T *は、細菌を用いる復帰突然変異試験及び *in vitro* 哺乳類細胞を用いた染色体異常試験において遺伝毒性を示さなかった。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。

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はないと予想された。このため、薬物乱用性試験は実施しなかった。

以上の非臨床安全性評価結果は、AVAL の安全性を十分に特徴付けており、ポンペ病の患者を対象とした AVAL の承認申請をサポートするものであった。

＊新薬承認情報提供時に置換

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

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 57

目　　次

2.6.7 毒性試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　毒性試験一覧表 4

2　　トキシコキネティクス試験の一覧表 9

3　　トキシコキネティクス試験成績の一覧 11

4　　毒性試験使用ロット 13

5　　単回投与毒性試験 15

6　　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 16

7　　反復投与毒性試験 19

8　　*In Vitro*遺伝毒性試験 21

9　　*In Vivo*遺伝毒性試験 22

10　　がん原性試験 25

11　　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験 26

12　　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 27

13　　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験 30

14　　生殖発生毒性試験－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 35

15　　幼若動物を用いた試験 42

16　　局所刺激性試験 45

17　　その他の毒性試験 46

表 目 次

表2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program 4
表2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies 9
表2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data 11
表2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance 13
表2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies 16
表2.6.7.7.1 - Repeat-Dose Toxicity – 26-week IV monkey study with a 4-week recovery 19
表2.6.7.9.1- Genotoxicity: In vivo micronucleus test by the intravenous route in the GAKKO mouse 22
表2.6.7.9.2- Genotoxicity: In vivo micronucleus test by the intraperitoneal route in the GAKKO mouse – positive Control Validation 23
表2.6.7.9.3- Genotoxicity: In vivo micronucleus test by the intravenous route in the GAKKO mouse 24
表2.6.7.11 - Reproductive and Developmental Toxicity - Nonpivotal Studies – Noteworthy Findings 26
表2.6.7.12.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic, Development to Implantation 27
表2.6.7.13.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development 30
表2.6.7.13.2 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development – rabbit 33
表2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function 35
表2.6.7.15 - Studies in Juvenile Animals 42
表2.6.7.17.1 - Other Toxicity Studies - overview 46
表2.6.7.17.2 - Other Toxicity Studies: in vitro – Ames test 47
表2.6.7.17.3 - Other Toxicity Studies – 13-week intermittent IV monkey study with elevated levels of 不純物T* with a 4-week recovery 49
表2.6.7.17.4 – Genotoxicity: in vitro – Ames test 51
表2.6.7.17.5 – Genotoxicity: in vitro – Mammalian chromosome aberration test in human lymphocytes 56

＊新薬承認情報提供時に置換

1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/dose) or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity – Not applicable							
Repeat-Dose Toxicity							
Mouse (CD-1)	IV bolus (rhGAA, avalglucosidase alfa (sialic acid modification or SAM), or galactose modification (GAM) or IP (DPH)	Every other day for 2 weeks	0 mg/kg 50 mg/kg rhGAA 50 mg/kg avalglucosidase alfa 50 mg/kg galactose modification of alglucosidase alfa 5 mg/kg DPH (7 doses)	No	[redacted], USA	[FFA00125]	4.2.3.2-1
Mouse (CD-1)	IV bolus (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	Every week for 4 weeks	avalglucosidase alfa/DPH: 0/5, 4/5, 40/5, <u>120/5</u> (4 doses)	No	Genzyme Corporation Framingham, MA, USA	[[redacted]-00183]	4.2.3.2-2
Monkey (Cynomolgus)	IV Infusion (6 hours)	Every week for 4 weeks	0, 4, 40, <u>120</u> (4 doses)	No	[redacted], USA	[1213-004]	4.2.3.2-3

Abbreviations: IP: intraperitoneal, IV: intravenous, DPH: diphenhydramine

a Unless otherwise specified, for repeat-dose toxicity studies, the highest NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) is underlined.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses[a] (mg/kg/dose) or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Repeat-Dose Toxicity							
Monkey (Cynomolgus)	IV Infusion (6 hours)	Every other week for 26 weeks 4-week recovery period	0, 50, 200 (13 doses)	Yes	[redacted], USA	[0658-11097]	4.2.3.2-4
Genotoxicity							
Mouse (GAAKO)	IV bolus	1 day	0, 50, 50, 100, 150 (cumulative doses)	No	Genzyme Corporation Framingham, MA, USA	[redacted-3559]	4.2.2.3-2
Mouse (GAAKO)	IP	3 days	methyl methane-sulfonate: 75 mg/kg/day	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[redacted-00333]	4.2.3.3.2-1
Mouse (GAAKO)	IV bolus	1 day	0 or 50 mg/kg at 0, 4, and 8 hr (total dose 150 mg/kg/day)	No	Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA	[redacted-00184]	4.2.3.3.2-2

Abbreviations: IP: intraperitoneal, IV: intravenous

a Unless otherwise specified, for repeat-dose toxicity studies, the highest NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) is underlined.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/dose) or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Fertility and Early Embryonic Development							
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV bolus (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	M: Once every other day beginning 10 weeks prior to cohabitation, through cohabitation and continuing until euthanasia F: Once every other day beginning 2 weeks prior to cohabitation, through cohabitation (maximum of 13 days) and continuing until GD 7	avalglucosidase alfa/DPH: 0/0, 0/5, 10/5, 20/5, 50/5	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted] USA	[FER0511]	4.2.3.5.1-1
Embryo-Fetal Development							
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV bolus (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	GD6 to 15	avalglucosidase alfa/DPH: 0/0, 0/5, 10/0, 20/0, 50/0	Yes	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted] USA	[TER0685]	4.2.3.5.2-1

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, GD: gestation day, LD: lactation day, IP: intraperitoneal, IV: intravenous

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/dose) or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Embryo-Fetal Development							
Rabbit/New Zealand White (Crl:KBL(NZW))	IV infusion (approximately 10 minutes)	Control: Days 1 to 9 Groups 2-4: Days 1 to 7	0, 20, 40, 80	No	[redacted] USA	[DDO1378]	4.2.3.5.2-2
Rabbit (Hra:(NZW)SPF)	IV infusion (10 minutes)	Control: GD6 to 19 Group 2: GD6 to 19 Group 3: GD6 to 12 Group 4: GD13 to 19 Group 5: GD 6, 10, 13, 16, 19	0, 40	No	[redacted] USA	[TEP0366]	4.2.3.5.2-3
Rabbit (Hra:(NZW)SPF)	IV infusion (10 minutes)	GD6 to 19	0, 30, 60, 100	Yes	[redacted] USA	[TER0686]	4.2.3.5.2-4
Pre and Post Natal Development							
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	GD6 to LD19	avalglucosidase alfa/DPH: 0/0, 0/5, 10/5, 20/5, 50/5	Yes	[redacted] USA	[DPN0378]	4.2.3.5.3-1

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, F: female, GD: gestation day, LD: lactation day, IV: intravenous, IP: intraperitoneal, M: male

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Species (Strain)	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/dose) or Concentration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Juvenile Toxicity							
Mouse (Crl:CD1(ICR))	IV (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	Every other week for 9 weeks PND21 through 77 (or PND91 for males in the fertility cohort only)	avalglucosidase alfa/DPH: 0/0, 0/5, 20 (25)/5 (F/M), 50/5, 100/5	Yes	[redacted], USA	[JUV0033]	4.2.3.5.4-1
Local Tolerance – Not applicable							
Other Toxicity Studies							
Salmonella typhimurium/ TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	In vitro incubation	48 hours	不純物U*: 5, 16, 50, 160, 500, 1600, and 5000 µg/plate	Yes	Sanofi Germany, Frankfurt, Germany	[HIS2317]	4.2.3.7.6-1
Monkey (Cynomolgus)	Intermittent IV infusion	Every other week for 13 weeks 4-week recovery period	avalglucosidase alfa/不純物T・ 0/0, 50/3 50/6, 50/12.55 (7 doses)	Yes	[redacted], USA	[TXC1530]	4.2.3.7.6-2
Salmonella typhimurium/ TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	In vitro incubation	48 hours	不純物T*: 0, 5, 16, 50, 160, 500, 1600, 5000 µg/plate	Yes	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany	[HIS2129]	4.2.3.7.7-1
Human peripheral blood lymphocytes	In vitro incubation	3 or 20 hours	不純物T*: 100, 300, 500 µg/mL	Yes	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany	[MAF0153]	4.2.3.7.7-2

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, F: female, IV: intravenous, IP: intraperitoneal, M: male, PND: postnatal day

＊新薬承認情報提供時に置換

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies

Test Article: avalglucosidase alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity – Not applicable						
Repeat-Dose Toxicity						
4-week toxicity	Mouse	IV bolus (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	avalglucosidase alfa/DPH: 0/5, 4/5, 40/5, 120/5	No	[[redacted]-00183]	4.2.3.2-2
4-week toxicity	Monkey	IV Infusion (6 hours)	0, 4, 40, 120	No	[1213-004]	4.2.3.2-3
26-week toxicity	Monkey	IV Infusion (6 hours)	0, 50, 200	Yes	[0658-11097]	4.2.3.2-4
Genotoxicity – Not applicable						
Carcinogenicity – Not applicable						
Reproductive and Developmental Toxicity						
Embryo-fetal development	Mouse	IV bolus (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	avalglucosidase alfa/DPH: 0/0, 0/5, 10/0, 20/0, 50/0	Yes	[TER0685]	4.2.3.5.2-1

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, F: female, IV: intravenous; M: male

表 2.6.7.2 - Overview of Toxicokinetics Studies (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Study Number	Location
Reproductive and Developmental Toxicity						
Embryo-fetal development	Rabbit	IV infusion (10 minutes)	0, 30, 60, 100	Yes	[TER0686]	4.2.3.5.2-4
Juvenile toxicity	Mouse	IV (avalglucosidase alfa) or IP (DPH)	avalglucosidase alfa/DPH: 0/0, 0/5, 20 (25)/5 (F/M), 50/5, 100/5	Yes	[JUV0033]	4.2.3.5.4-1
Local Tolerance – Not applicable						
Other Toxicity Studies						
13-week toxicity (avalglucosidase alfa/不純物Ｔ・)	Monkey	Intermittent IV infusion	avalglucosidase alfa/不純物Ｔ・ 0/0, 50/3 50/6, 50/12.55	Yes	[TXC1530]	4.2.3.7.6-2

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, F: female, IV: intravenous; M: male

＊新薬承認情報提供時に置換

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data

Test Article: avalglucosidase alfa

Biweekly Dose (mg/kg/dose)	Steady-State AUC (µg.h/mL) [a]						
	Mouse		Monkey		Rabbit	Human	Clinical Safety Margin (Based on AUC) [a]
	M	F	M	F	F	M/F	-
Human dose 20 mg/kg	-	-	-	-	-	1530	-
Human dose 40 mg/kg	-	-	-	-	-	2630	-
4	50.0		NA			-	-
10	-	163 [b]	-	-	-	-	-
20	-	582 [b]	-	-	-	-	-
20	550 [c]	469 [c]	-		-	-	-
30	-	-	-		1260 [b]	-	-
40	1498		954		-	-	-
50	-	2080 [b]	3712		-	-	-
50	2730 [c]	1490 [c]	-		-	-	-
50/3 (avalglucosidase alfa/不純物Ｔ・)	-	-	3560	2860	-	-	-

Abbreviations: M: male, F: female, AUC: area under the time-concentration curve

a: All data from repeat dose GLP and nonGLP studies. Source of data - **Mouse:** 4, 40, 120 mg/kg/dose (Study ■-00183, $AUC_{0\text{-}inf}$, nonGLP), 10, 20, 50 mg/kg/dose (Study TER0685, $AUC_{0\text{-}24}$, GLP), 20(25), 50, 100 mg/kg/dose (Study JUV0033, $AUC_{0\text{-}24}$, GLP); **Rabbit**, 30, 60, 100 (Study TER0686, $AUC_{0\text{-}24}$, GLP); **Monkey**, 4, 40, 120 mg/kg/dose (Study 1213-004, $AUC_{0\text{-}inf}$, nonGLP); 50, 200 mg/kg/dose (Study 0658-11097, $AUC_{0\text{-}inf}$,GLP), 50/3, 50/6, 50/12.55 of avalglucosidase alfa/不純物Ｔ・mg/kg/dose (Study TXC1530, $AUC_{0\text{-}54}$, GLP); **Human**, 20 mg/kg biweekly dose (Study EFC14028); 40 mg/kg biweekly dose (Study ACT14132 in IOPD patients)., ***b***: In pregnant animals, ***c***: In juvenile animals

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetics Data (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa

Biweekly Dose (mg/kg/dose)	Steady-State AUC (µg.h/mL) [a]						
	Mouse		Monkey		Rabbit	Human	Clinical Safety Margin (Based on AUC) [a]
	M	F	M	F	F	M/F	-
50/6 (avalglucosidase alfa/不純物T・)	-	-	3180	2800	-	-	-
50/12.55 (avalglucosidase alfa/不純物T・)	-	-	3920	2450	-	-	-
60	-	-	-	-	3310 *b*	-	-
100	8140 *c*	5400 *c*	-	-	7910 *b*	-	2X to 3X *c*
120	4513		5900		-	-	-
200	-	-	28162		-	-	23x

Abbreviations: M: male, F: female, AUC: area under the time-concentration curve

a: All data from repeat dose GLP and nonGLP studies. Source of data - **Mouse:** 4, 40, 120 mg/kg/dose (Study [redacted]-00183, $AUC_{0\text{-}inf}$, nonGLP), 10, 20, 50 mg/kg/dose (Study TER0685, $AUC_{0\text{-}24}$, GLP), 20(25), 50, 100 mg/kg/dose (Study JUV0033, $AUC_{0\text{-}24}$, GLP); **Rabbit**, 30, 60, 100 (Study TER0686, $AUC_{0\text{-}24}$, GLP); **Monkey**, 4, 40, 120 mg/kg/dose (Study 1213-004, $AUC_{0\text{-}inf}$, nonGLP); 50, 200 mg/kg/dose (Study 0658-11097, $AUC_{0\text{-}inf}$,GLP), 50/3, 50/6, 50/12.55 of avalglucosidase alfa/不純物T・mg/kg/dose (Study TXC1530, $AUC_{0\text{-}54}$, GLP); **Human**, 20 mg/kg biweekly dose (Study EFC14028); 40 mg/kg biweekly dose (Study ACT14132 in IOPD patients)., ***b***: In pregnant animals, ***c***: In juvenile animals

＊新薬承認情報提供時に置換

4　毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Batch or Lot No.	Concentration (mg/mL)	% Purity			% Impurity		Study No.	Type of Study	Location
		By SDS-PAGE Non Reduced	By SDS-PAGE Reduced	By HPLC-UV	[redacted] By HPLC-UV	Residual [redacted] (µg/mL)			
[redacted]	-	-	-	-	-	-	[FFA00125] [b]	2-week IV mouse	4.2.3.2-1
[redacted]	Not available						[redacted]-00183]	4-week IV mouse	4.2.3.2-2
	12.41 [a]	99.4%	99.4%	-	-	-	[1213-004]	4-week IV monkey	4.2.3.2-3
	Not available						[redacted]-00184]	Micronucleus test	4.2.3.3.2-2
[redacted]	9.8 [a]	>98%	98%	-	-	-	[0658-11097]	26-week IV monkey	4.2.3.2-4
[redacted]	10.2 [a]	>98%	98%	-	-	-			
[redacted]	10.2 [a]	>98%	98%	-	-	-			
[redacted]	10.1 [a]	97%	97%	-	-	-			
[redacted]	Not available						[redacted]-3559]	Micronucleus test	4.2.2.3-2

a A_{280}

b Certificate of analysis not included in the final report

表 2.6.7.4 - Toxicology Drug Substance (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa or as indicated

Batch or Lot No.	Concentration (mg/mL)	% Purity			% Impurity		Study No.	Type of Study	Location
		By SDS-PAGE Non Reduced	By SDS-PAGE Reduced	By HPLC-UV	[redacted] By HPLC-UV	Residual [redacted] (µg/mL)			
[redacted]	10.2	99% (TM-016)	97% (TM-017)	-	-	23	[DDO1378]	EFD rangefinding rabbit	4.2.3.5.2-2
							[FER0511]	Mouse fertility	4.2.3.5.1-1
							[TEP0366]	EFD rangefinding rabbit	4.2.3.5.2-3
[redacted]	10.3 *a*	97%	97%	-	-	23.1	[TER0685]	Mouse EFD	4.2.3.5.2-1
							[JUV0033]	Mouse juvenile toxicity	4.2.3.5.4-1
[redacted], [redacted]	10.2	99%	97%				[TER0686]	Rabbit EFD	4.2.3.5.2-4
[redacted]	10.1	99% (TM-016)	97% (TM-017)	-	-	19	[DPN0378]	Mouse PPD	4.2.3.5.3-1
[redacted]	10.0 *a*	96%	96%	-	-	11.2	[TXC1530]	13-week monkey (spiked with 不純物T*)	4.2.3.7.6-2
[redacted]	10.2 *a*	97%	96%	-	-	9.2			
(不純物 T *) [redacted]	-	-	-	97%	0.3%	-	[HIS2129]	Ames test	4.2.3.7.7-1
							[MAF0153]	Chromosome aberration test	4.2.3.7.7-2

Abbreviations: EFD: embryofetal development; PPD: pre- and post-natal development

a A_{280}

b Certificate of analysis not included in the final report

＊新薬承認情報提供時に置換

5　単回投与毒性試験

該当なし

6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies

Test Article: avalglucosidase alfa

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/ day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (CD-1)	IV Bolus (rhGAA control article)	Every other day for 2 weeks	0 mg/kg 50 mg/kg rhGAA (alglucosidase alfa) 50 mg/kg avalglucosidase alfa (SAM) 50 mg/kg galactose modification of alglucosidase alfa (GAM; results not discussed) (7 doses) + DPH 5 mg/kg, IP, 10 to 20 minutes before dosing on the fifth dose (Day 9)	10/sex/ group	Not determined	No effects on mortality, clinical signs, body weight or food consumption related to alglucosidase alfa or avalglucosidase alfa. Increased reticulocyte counts, and equivocally increased serum calcium, phosphorus, and potassium were observed in the avalglucosidase alfa males. Spleen weights were increased in alglucosidase alfa male (28%) and avalglucosidase alfa males and females (41% and 32%, respectively), although a microscopic correlate was not observed. Macroscopic findings of small testis, black and red foci over testis, discoloration of testis, discoloration of seminal vesicle, discoloration of scrotal skin, and small epididymis were observed in alglucosidase alfa and avalglucosidase alfa mice. Microscopic examination of these tissues was not performed; therefore, a relationship to the test article is unknown. In the liver, minimal to mild multifocal necrosis and inflammatory infiltrates were observed with avalglucosidase alfa.	[FFA00125]	4.2.3.2-1

Abbreviations: DPH: diphenhydramine, GAM: galactose modification, IP: intraperitoneal, IV: intravenous, NOAEL: no-observed-adverse-effect-level, rhGAA: recombinant human acid-α-glucosidase, SAM: sialic acid modification

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/ day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Mouse (CD-1)	IV Bolus (10 mM L-Histidine, 2% Glycine, 2% Mannitol, 0.01% Polysorbate 80, pH 6.5)	Every week for 4 weeks	0, 4, 40, 120 (4 doses) +DPH, 10 or 20 mg/kg, IP, administered upon signs of hypersensitivity	3/sex/group Main; 6/sex/avalglucosidase alfa treated groups TK	120	Clinical signs of lethargy, consistent with hypersensitivity, were observed after the third dose in all avalglucosidase alfa-treated groups. Thereafter, mice were administered 10 or 20 mg/kg intraperitoneal (IP) diphenhydramine hydrochloride (DPH) prior to dosing with avalglucosidase alfa. Mortality occurred in 3 out of 9 mice (2 found dead males and 1 moribund euthanasia female) at 4 mg/kg/week within 1 hour following the fourth dose of avalglucosidase alfa, also consistent with hypersensitivity. There was no mortality in other groups. Mild leukocytosis (due to an increase in absolute lymphocyte counts) and eosinophilia was observed in the 120 mg/kg/week male mice and was considered likely related to hypersensitivity. There were no test article-related effects on body weight, clinical pathology, organ weights, macroscopic or microscopic findings. The NOAEL was 120 mg/kg/week, the highest dose tested. The Day 22 $AUC_{0\text{-}inf}$ exposure at the NOAEL was 4513 µg.h/mL for combined sexes.	[[redacted]-00183]	4.2.3.2-2

Abbreviations: DPH: diphenhydramine, IP: intraperitoneal, IV: intravenous, NOAEL: no-observed-adverse-effect-level

表 2.6.7.6 - Repeat-Dose Toxicity - Nonpivotal Studies (continued)

Test Article: avalglucosidase alfa

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/ day)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Monkey (Cynomolgus)	IV Infusion (6 hours) (10 mM L-Histidine, 2% w/v Glycine, 2% w/v Mannitol, 0.01% Polysorbate 80, pH 6.5)	Every week for 4 weeks	0, 4, 40, 120 (4 doses)	2/sex/group	120	There were no test article-related effects on mortality, clinical observations, physical examinations, body weight, food consumption, clinical pathology, organ weights, macroscopic or microscopic examinations. The NOAEL was 120 mg/kg/week, the highest dose tested. The Day 22 $AUC_{0\text{-}inf}$ exposure at the NOAEL was 5900 µg.h/mL for combined sexes.	[1213-004]	4.2.3.2-3

Abbreviations: DPH: diphenhydramine, IV: intravenous, NOAEL: no-observed-adverse-effect-level,

7 反復投与毒性試験

表 2.6.7.7.1 - Repeat-Dose Toxicity – 26-week IV monkey study with a 4-week recovery

Report Title: A 26-week intravenous infusion GLP toxicity study of neoGAA in cynomolgus monkeys						
Species/Strain: Monkey (Cynomolgus)		**Duration of Dosing:** 26 weeks		**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])		
Initial Age: At least 18 months		**Duration of Recovery:** 4 weeks		**Study No.:** [0658-11097]		
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted] (in-life start date)		**Method of Administration:** IV Infusion (6 hours) Every other week (13 doses)		**Location:** 4.2.3.2-4		
Vehicle Control Article: 10 mM L-Histidine, 2% w/v Glycine, 2% w/v Mannitol, 0.01% Polysorbate 80, pH 6.2				**GLP Compliance:** Yes		
Special Features: Following the dosing phase, up to 4 monkeys/sex/group were euthanized for postmortem examinations; the remaining monkeys were allowed to recover for 4 weeks and then were euthanized for postmortem examinations.						
No Observed Adverse Effect Level: 200 mg/kg/dose						
Dose (mg/kg/dose)		**0 (Vehicle Control)**		**50**		**200**
Number of Animals on Study (Main Study)		**M: 6**	**F: 6** [a]	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6** [a]
Toxicokinetics:						
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg.h/mL)	**Dose 1**	NA		2423 ± 682 (N=12)		18728 ± 2866 (N=12)	
	Dose 7	NA		3341 ± 748 (N=11)		22463 ± 6268 ((N=11)	
	Dose 13	NA		3712 ± 977 (N=10)		28162 ± 10694 (N=8)	
C_{max} (µg/mL)	**Dose 1**	NA		566 ± 157 (N=12)		3892 ± 506 (N=12)	
	Dose 7	NA		818 ± 177 (N=11)		4347 ± 894 (N=11)	
	Dose 13	NA		861 ± 189 (N=10)		5284 ± 1440 (N=8)	
Additional Information: N= 8 to 12/group/timepoint (M and F combined) for toxicokinetic analysis of avalglucosidase alfa; the lower limit of quantitation was 100 ng/mL							
Abbreviations: M: male, F: female, AUC: area under the time-concentration curve, C_{max}: observed maximum concentration during a dosing interval; NA: not applicable							
[a] Due to an apparently compromised venous access port, one of the females at 200 mg/kg was replaced on Day 8. Due to the death of the replacement monkey on Day 13, a control female was moved to the high-dose group.							

表 2.6.7.7.1 - Repeat-Dose Toxicity – 26-week IV monkey study with a 4-week recovery (continued)

Report Title: Report Title: A 26-week intravenous infusion GLP toxicity study of neoGAA in cynomolgus monkeys (continued)

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Vehicle Control)**		**50**		**200**	
Number of Animals on Study (Main Study)	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Anti-avalglucosidase alfa Antibodies (+ / total number analyzed):						
Day 1 (Pre-dose)	2/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Day 7 (Pre-dose)	2/6	3/5	6/6	6/6	6/6	6/6
Day 13 (Pre-dose)	2/6	1/5	6/6	6/6	6/6	6/6
Anti-avalglucosidase alfa Antibodies (mean titer ± SD):						
Day 1 (Pre-dose)	189 ± 39		BDL		BDL	
Day 7 (Pre-dose)	144 ± 48		26905 ± 16941		43822 ± 46623	
Day 13 (Pre-dose)	258 ± 171		43704 ± 33863		62121 ± 54629	
Died or Sacrificed Moribund						
	-	-	-	D168 *a*	-	D8 *b*, D13 *c*
Recovery						
Noteworthy findings	-	-	-	-	-	-

Additional Information: There were no test article-related effects on mortality, clinical observations, physical examinations, ophthalmoscopic examination, electrocardiogram (ECG) parameters, neurologic examinations, respiratory rates, body temperature, body weight, food consumption, clinical pathology, organ weights, macroscopic or microscopic examinations.

Conclusion: In conclusion, the NOAEL of avalglucosidase alfa following IV administration to cynomolgus monkeys for 26 weeks was 200 mg/kg qow, the highest dose tested.

Abbreviations: M: male, F: female, SD: standard deviation, BDL: below detectable limits, ECG: electrocardiogram, qow: every other week, +: number of positive samples, -: no noteworthy findings

a On Day 168, monkey DEW2F29 was sacrificed in a moribund condition with lower body paralysis. Microscopic examination revealed suppurative inflammation of the meninges surrounding the lumbar spinal cord and hemorrhage into the submeningeal and interstitial areas of the spinal cord and cauda equina. Axonal swelling was noted throughout the nerve tracts comprising the cauda equina. There was marked inflammation and necrosis around the access port. Acute hemorrhage was noted throughout the lobes of the lung and distension of the urinary bladder was noted as a result of the paralysis. These findings were most likely the result of systemic inflammation resulting from contamination of the venous access port and unrelated to the test article.

b On Day 8, monkey DEW3F32 (female at 200 mg/kg) was removed alive from the study due to an apparently compromised venous access port and replaced with monkey DEW3F37 (control).

c On Day 13, monkey DEW3F37 was sacrificed in a moribund condition without receiving any test article. Microscopic evaluation of the tissues revealed profound lymphoid depletion of the thymus, spleen, and lymph nodes. There was also focal necrosis in the liver. The findings of lymphoid depletion indicate severe stress, possibly from the surgical procedure of implanting the venous access port. One control female was moved to the high-dose group as replacement.

8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当なし

9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

表 2.6.7.9.1- Genotoxicity: In vivo micronucleus test by the intravenous route in the GAKKO mouse

Report Title: Biodistribution and genotoxicity of SAM6-beta following single or multiple IV bolus injections in GAA knockout mice

Test for Induction of: peripheral blood micronucleus	**Treatment Schedule:** 1, 2, or 3 times within an 8 hour period	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])
Species/Strain: Mouse/GAAKO	**Sampling Time:** 6 or 24 hours after last dose	**Study No.:** [[redacted]-3559]
Age: 3 to 6 months	**Method of Administration:** IV (bolus)	**Location:** 4.2.2.3-2
Cells Evaluated: erythrocytes	**Vehicle/Formulation:** 25 mM Sodium Phosphate pH 6.4, 2% Mannitol, 0.005% Polysorbate 80	**GLP Compliance:** No
No. of Cells Analyzed/Animal: Not provided	**Date of Treatment:** [redacted] to [redacted] 20[redacted]	

Special Features: The purpose of this study was to evaluate the biodistribution of avalglucosidase alfa (SAM6-beta) following single or multiple 50 mg/kg intravenous (IV) administrations to acid-alfa glucosidase (GAA) knockout mice, and evaluate the potential genotoxicity of avalglucosidase alfa using an in-vivo micronucleus assay for the evaluation of micronuclei formation.

Toxic/Cytotoxic Effects: All pre- and post-dose clinical observations were normal and there was no mortality observed during the study.

Genotoxic Effects: None

Evidence of Exposure: Dose dependent biodistribution to the bone marrow was observed in this study.

Group	Cumulative Dose (mg/kg)	Blood Collection Time (hours)	Number of animals (M + F)	% RET (Mean ± SD)	% MN-RET (Mean ± SD)	% NCE (Mean ± SD)	% MN-NCE (Mean ± SD)
Positive Control	0	0	8	0.98 ± 0.04	2.96 ± 0.62	1.22 ± 0.05	0.27 ± 0.01
Negative Control	0	0	8	2.07 ± 0.20	0.23 ± 0.01	2.24 ± 0.19	0.17 ± 0.00
Vehicle dosed at Time 0 hour	0	24	8	2.13 ± 0.50	0.25 ± 0.08	2.28 ± 0.53	0.16 ± 0.06
50 mg/kg avalglucosidase alfa dosed at Time 0 hour	50	6	8	1.47 ± 0.64	0.17 ± 0.07	1.59 ± 0.67	0.13 ± 0.04
50 mg/kg avalglucosidase alfa dosed at Time 0 hour	50	24	8	1.85 ± 0.62	0.22 ± 0.07	1.98 ± 0.64	0.14 ± 0.04
50 mg/kg avalglucosidase alfa dosed at Time 0 and 4 hour	100	24	8	1.87 ± 0.58	0.21 ± 0.10	1.99 ± 0.59	0.13 ± 0.05
50 mg/kg avalglucosidase alfa dosed at Time 0, 4, and 8 hour	150	24	8	1.74 ± 0.26	0.22 ± 0.09	1.87 ± 0.28	0.13 ± 0.04

Conclusion: The administration of single or multiple doses of avalglucosidase alfa at 50 mg/kg (up to 150 mg/kg cumulative dose) resulted in dose dependent biodistribution to the bone marrow and did not result in the formation of mouse micronuclei as measured under the conditions of this study.

Abbreviations: M: male, F: female, RET: reticulocytes; MN-RET: micronucleated reticulocytes, NCE: normochromatic erythrocytes; MN- NCE: micronucleated normochromatic erythrocytes, SD: standard deviation.

表 2.6.7.9.2- Genotoxicity: In vivo micronucleus test by the intraperitoneal route in the GAKKO mouse – positive Control Validation

Report Title: The collection of blood from GAAKO mice following administration of methyl methanesulfonate for the induction of micronuclei

Test for Induction of: peripheral blood micronucleus	**Treatment Schedule:** once daily for 3 days	**Test Article (Batch):** MMS ([redacted])
Species/Strain: Mouse/GAAKO	**Sampling Time:** 24 hours after last dose	**Study No.:** [[redacted]-00333]
Age: 8 to 10 weeks	**Method of Administration:** IP	**Location:** 4.2.3.3.2-1
Cells Evaluated: erythrocytes	**Vehicle/Formulation:** 0.9% Saline	**GLP Compliance:** No
No. of Cells Analyzed/Animal: Not provided	**Date of Treatment:** [redacted] to [redacted] [redacted] 20[redacted]	

Special Features: The purpose of this study was to determine whether micronuclei formation occurs in GAAKO mice following dosing with a known genotoxic agent, MMS

Toxic/Cytotoxic Effects: All animals had normal clinical observations recorded pre- and post-dosing on Study Days 1, 2, and 3. At the time of necropsy there were 2 instances of animals with calcification in the bladder and one animal with a distended uterus. These abnormalities were collected with the entire carcass; however they were not evaluated histologically.

Genotoxic Effects: increased in number of micronucleated reticulocytes

Evidence of Exposure: Observation of increased in number of micronucleated reticulocytes.

Test Article	Dose (mg/kg)	Number of animals M:	F:	% MN-RET	% MN-NCE
Positive Control (Kit provided reference range)	0	0	0	2.98 (2.08 to 4.68)	0.29 (0.19 to 0.42)
Negative Control (Kit provided reference range)	0	0	0	0.25 (0.19 to 0.44)	0.20 (0.12 to 0.26)
MMS (Mean ± SD)	75	5	5	1.37 ± 0.31	0.15 ± 0.03

Conclusion: Under the conditions of this study, dosing MMS at 75 mg/kg on Study Days 1, 2, and 3 resulted in an increase in the number of micronucleated reticulocytes 24 hours following the final dose. These results indicate that the MicroFlow® assay is capable of detecting micronuclei in the GAAKO mouse.

Abbreviations: MMS: methyl methanesulfonate M: male, F: female, MN-RET: micronucleated reticulocytes, MN- NCE: micronucleated normochromatic erythrocytes, SD: standard deviation, IP: intraperitoneal

表 2.6.7.9.3- Genotoxicity: In vivo micronucleus test by the intravenous route in the GAKKO mouse

Report Title: 2-week repeat dose genotoxicity study of neoGAA administered intravenously to GAAKO mice

Test for Induction of: peripheral blood micronuclei	**Treatment Schedule:** 3 doses over an 8 hour period (0, 4, 8 hours)	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])
Species/Strain: Mouse/GAAKO	**Sampling Time:** 7 or 14 days after last dose	**Study No.:** [redacted-00184]
Age: 8 to 10 weeks	**Method of Administration:** IV	**Location:** 4.2.3.3.2-2
Cells Evaluated: erythrocytes	**Vehicle/Formulation:** 10 mM L-Histidine, 2% Glycine, 2% Mannitol, 0.01% Polysorbate 80, pH 6.5	**GLP Compliance:** No
No. of Cells Analyzed/Animal: Not provided	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]	
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		
Evidence of Exposure: see [redacted-3559]		

Test Article	Dose (mg/kg)	Number of animals M:	F:	% MN-RET	% MN-NCE
Positive Control (Kit provided reference range)	0	0	0	3.38 (2.08 to 4.68)	0.33 (0.19 to 0.42)
Negative Control (Kit provided reference range)	0	0	0	0.30 (0.19 to 0.44)	0.20 (0.12 to 0.26)
Day 8					
Vehicle Control (Mean ± SD)	0	5	5	0.25 ± 0.12	0.13 ± 0.03
avalglucosidase alfa (Mean ± SD)	50	5	5	0.22 ± 0.09	0.13 ± 0.03
Day 15					
Vehicle Control (Mean ± SD)	0	5	5	0.28 ± 0.09	0.14 ± 0.04
avalglucosidase alfa (Mean ± SD)	50	5	5	0.24 ± 0.04	0.14 ± 0.03

Conclusion: Under the conditions of this study, dosing avalglucosidase alfa IV at doses of 50 mg/kg/dose at hours 0, 4, and 8 on Day 1 did not result in an increase in the number of MN-RET or MN-NCE one or two weeks following the final dose compared to the vehicle group and the kit provided negative control.

Abbreviations: M: male, F: female, MN-RET: micronucleated reticulocytes, MN- NCE: micronucleated normochromatic erythrocytes, SD: standard deviation, IV: intravenous

10　がん原性試験

該当なし

11　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11 - Reproductive and Developmental Toxicity - Nonpivotal Studies – Noteworthy Findings

Test Article: avalglucosidase alfa

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study No.	Location
Rabbit/New Zealand White / [Crl:KBL (NZW)	IV infusion (approximately 10 minutes) (10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, 2% (w/v) glycine)	Control: Days 1-9 [a] Groups 2-4: Days 1-7	0, 20, 40, 80	3F	Administration of avalglucosidase alfa by once daily intravenous infusion was well tolerated in nonpregnant rabbits at levels up to 80 mg/kg/dose.	[DDO1378]	4.2.3.5.2-2
Rabbit/Hra:(NZW)SPF	IV infusion (10 minutes) (10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, 2% (w/v) glycine)	Control: GD6 to19 Group 2: GD6 to19 Group 3: GD6 to 12 Group 4: GD13 to19 Group 5: GD 6, 10, 13, 16, 19	0, 40	6F	There were no effects on maternal survival, clinical observations, body weights, and food consumption at 40 mg/kg/day of avalglucosidase alfa when administered once daily during GD6 to 19, 6 to 12, 13 to 19, or on GD6, 10, 13, 16 and 19. Intrauterine growth and survival and fetal morphology (external) were unaffected by test article administration,	[TEP0366]	4.2.3.5.2-3

Abbreviations: M: male, F: female, IV: intravenous, GD: gestation day

[a] Deviation occurred and the Control Group was dosed Study Days 1-9.

12　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

表 2.6.7.12.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic, Development to Implantation

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Male and Female Fertility Study in Mice

Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** M: Once every other day beginning 10 weeks prior to cohabitation, through cohabitation and continuing until euthanasia F: Once every other day beginning 2 weeks prior to cohabitation, through cohabitation (maximum of 13 days) and continuing until GD 7	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])
Initial Age: M: 87 days / F: 94 days	**Day of Mating:** F: GD 0	**Study No.:** [FER0511]
Date of First Dose: [redacted]	**Day of C-Section:** GD 14	**Location:** 4.2.3.5.1-1
Special Features: None	**Method of Administration:** Intravenous (avalglucosidase alfa) or Intraperitoneal (DPH)	**GLP Compliance:** Yes
Design similar to ICH S5 (R2): Yes	**Vehicle/Formulation:** 10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, and 2% (w/v) glycine	

No Observed Adverse Effect Level: F0 Males: 50 mg/kg/dose; F0 Females: 50 mg/kg/dose; F1 Litters: 50 mg/kg/dose

Daily Dose (mg/kg/dose)	0/0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
Male					
No. Evaluated	22	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	4	7	3
Clinical Observations (Total Observations/Number of mice)					
Decreased Motor Activity [a]	0/0	1/1	18/12	7/5	6/5
Hyperreactivity to Touch [a]	0/0	0/0	0/0	0/0	9/4
Low Carriage [a]	0/0	0/0	6/4	11/4	1/1
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Body Weight Gains Days 1 to 102 (g)	3.7	3.8	5.2	5.2	4.5
Food Consumption Days 1 to 71 (g)	5.4	5.8	6.2	5.4	5.5
Mean No. Days Prior to Mating	2.6	2.6	2.5	2.5	3.6

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, F: female, GD: gestation day, M: male, -: No noteworthy findings.

[a] Not considered test article-related

表 2.6.7.12.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic, Development to Implantation (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Male and Female Fertility Study in Mice

Daily Dose (mg/kg/dose)	0/0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
Male					
No. of Males that Mated	19	21	19	14	14
No. of Fertile Males	18	21	18	14	14
Organ weight	-	-	-	-	-
Sperm motility	-	-	-	-	-
Sperm density	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, GD: gestation day, M: male, -: No noteworthy findings.

表 2.6.7.12.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and Early Embryonic, Development to Implantation (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Male and Female Fertility Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg/dose)	0/0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
Females:					
No. Evaluated	22	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	2	4	1
Clinical Observations (Total Observations/Number of mice)					
Decreased Motor Activity [a]	0/0	0/0	7/5	11/9	7/7
Hyper-reactive to Touch [a]	0/0	0/0	2/2	0/0	4/4
Ataxia [a]	0/0	0/0	3/3	5/5	6/6
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Premating Body Weight Gain Days 1 to 15 (g)	0.9	0.4	0.7	1.0	0.9
Gestation Body Weight Gain GD 0 to 14 (g)	16.9	16.3	16.4	16.2	15.7
Premating Food Consumption Days 1 to 15 (g/day)	4.8	3.8	4.5	5.4	5.7
Gestation Food Consumption GD 0 to 14 (g/day)	24.4	17.0	18.0	21.5	17.8
Mean No. Estrous cycles/14 days	2.41	2.64	2.60	2.67	2.55
No. of Pregnant Females	20	22	19	17	20
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0	0
Mean No. Corpora Lutea	14.5	13.7	14.0	14.6	13.0
Mean No. Implantations	14.1	13.1	13.6	13.7	12.6
Mean % Preimplantation Loss	2.4	3.7	2.9	4.9	2.9
Mean No. Live Conceptuses	12.9	12.3	12.7	12.9	11.8
Mean No. Resorptions	1.2	0.8	0.8	0.8	0.8
No. Nonviable Conceptuses	24	18	16	14	15
Mean % Postimplantation Loss	8.0	6.5	6.2	5.9	6.2

Conclusion: On the basis of these data, the paternal and maternal no-observable-adverse-effect levels (NOAELs) for avalglucosidase alfa were 50 mg/kg/dose, the highest dose tested. The male and female reproductive NOAELs were also 50 mg/kg/dose. Administration of avalglucosidase alfa had no effects on mating and fertility of the male or female mice or cesarean-sectioning and litter parameters of female mice evaluated at mid-gestation.

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, GD: gestation day, -: No noteworthy findings; NOAEL: no-observable-adverse-effect levels

[a] After 4 weeks of dosing.

13　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Mice

Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** GD 6 though 15	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])
Initial Age: 70 days at start of study	**Day of Mating:** GD 0	**Study No.:** [TER0685]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Day of C-Section:** GD 18	**Location:** 4.2.3.5.2-1
Special Features: Toxicokinetics, Placental Transfer	**Method of Administration:** Intravenous (bolus)	**GLP Compliance:** Yes
Design similar to ICH S5 (R2) - Yes	**Vehicle/Formulation:** 10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, and 2% (w/v) glycine	

No Observed Adverse Effect Level: F0 Females: 50 mg/kg/day; F1 Litters: 20 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**0 (Control/DPH) [a]**	**10 (avalglucosidase alfa)**	**20 (avalglucosidase alfa)**	**50 (avalglucosidase alfa)**
Toxicokinetics: AUC_{0-24} (µg.h/mL)	NA	NA	163	582	2080
C_{max} (µg/mL)	NA	NA	145	454	1440
Maternal Liver Concentrations (µg/g)	16.421	15.191	194.995	350.596	887.593
Placental Concentrations (µg/g)	5.806	5.803	71.461	112.199	187.039
Fetal Liver Concentrations (µg/g)	7.821	9.592	7.813	7.813	7.847
No. Pregnant	22	21	20	22	22
No. Died or Euthanized Moribund	0	0	0	0	2 [b]
No. Aborted of with Total Resorption of Litter	0	0	0	0	0

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, NA: Not Applicable, GD: gestation day

a Included as a control for intraperitoneal DPH administration if needed, however, was not required to counteract signs of anaphylaxis that may have occurred following test article administration

b Female 6089 was found dead 2 hours and 22 minutes after dose administration, and female 6099 was found dead 2 hours and 17 minutes after dose administration. Causes of deaths were undetermined based on the time of death relative to dosing, since there were no adverse clinical observations, no noted effects on body weight, no necropsy findings for either of these mice, and the low incidence the deaths are possibly related to an immunologlic response (including an analphylactoid response).

表 2.6.7.13.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Mice

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0 (Control/DPH) [a]	10 (avalglucosidase alfa)	20 (avalglucosidase alfa)	50 (avalglucosidase alfa)
Clinical Observations [c]					
Activity decreased	0	0	1/1	3/3	5/2
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Mean Body Weight GD 6 (%) [d]	29.98	0.71	0.23	0.00	0.59
Mean Body Weight GD 16 (%) [d]	49.70	2.53	-0.19	-1.49	2.01
Mean Body Weight GD 18 (%) [d]	57.58	2.45	-0.62	-3.36	0.30
Mean Body Weight Change GD 6 to 16 (%) [d]	19.73	5.29	-0.82	-3.76	4.04
Mean Body Weight Change GD 6 to 18 (%) [d]	27.60	4.35	-1.54	-7.00	-0.11
Mean Body Weight Change GD 16 to 18 (%) [d]	7.87	1.98	-3.34	-15.13	-10.51
Mean No. Corpora Lutea	13.9	15.2	14.9	14.3	14.9
Mean No. Implantations	13.6	14.8	14.1	14.0	14.7
Mean % Preimplantation Loss	1.45	3.01	4.78	3.92	1.30

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, -: No noteworthy findings, GD: gestation day

a Included as a control for intraperitoneal DPH administration if needed, however, was not required to counteract signs of anaphylaxis that may have occurred following test article administration

c x/x = Frequency of observation/number of affected animals

d For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

表 2.6.7.13.1 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	0 (Control/DPH)	10 (avalglucosidase alfa)	20 (avalglucosidase alfa)	50 (avalglucosidase alfa)
Litters:	No. Litters Evaluated	22	21	20	21	20
	No. Live Fetuses	12.8	13.7	13.2	12.3	12.5
	Mean No. Resorptions	0.7	1.0	0.8	1.7	2.3
	Mean No. Early Resorptions	0.6	0.6	0.7	1.2	0.9
	Mean No. Late Resorptions	0.1	0.5	0.1	0.5	1.4
	No. of Dead Fetuses	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0
	Mean % Postimplantation Loss	5.69	7.19	6.48	11.43	15.68
	Mean Fetal Body Weight – Combined (g)	1.307	1.313	1.272	1.237 *	1.255
	Mean Male Fetal Body Weight (g)	1.327	1.333	1.298	1.262	1.278
	Mean Female Fetal Body Weight (g)	1.296	1.294	1.247	1.208 **	1.231
	Fetal Sex Ratios (Live Male Fetuses-%)	44.50	51.62	47.47	52.57	51.96
	Fetal Anomalies:					
	Gross External	-	-	-	-	-
	Visceral Anomalies	-	-	-	-	-
	Skeletal Anomalies	-	-	-	-	-
	Fetal Ossification Site	-	-	-	-	-

Conclusion: On the basis of these data, the maternal no-observable-adverse-effect level (NOAEL) following administration of avalglucosidase alfa by intravenous (bolus) injection to the lateral tail vein once daily on GDs 6 through 15 was 50 mg/kg/day. The developmental NOAEL was 20 mg/kg/day Postimplantation loss and late resorptions were increased at 50 mg/kg/day.

Abbreviations: DPH: diphenhydramine hydrochloride, -: No noteworthy findings, GD: gestation day; NOAEL: no-observable-adverse-effect levels

* p≤0.05 ** p≤0.01 (Dunnett)

表 2.6.7.13.2 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development – rabbit

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Rabbits		
Species/Strain: Rabbit/Hra:(NZW)SPF	**Duration of Dosing:** GD 6 though 19	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted], [redacted])
Initial Age: 9 months	**Day of Mating:** GD 0	**Study No.:** [TER0686]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Day of C-Section:** GD 29	**Location:** 4.2.3.5.2-4
Special Features: Toxicokinetics	**Method of Administration:** Intravenous infusion (10 minutes)	**GLP Compliance:** Yes
Design similar to ICH S5 (R2) - Yes	**Vehicle/Formulation:** 10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, and 2% (w/v) glycine	

No Observed Adverse Effect Level: F0 Females: 30 mg/kg/day **No Observed Effect Level:** F1 Litters: 100 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**30**	**60**	**100**
Females: Toxicokinetics:					
AUC_{0-24} (µg.h/mL)	**GD 6**	NA	2160	4330	8110
	GD 19	NA	1260	3310	7910
C_{max} (µg/mL)	**GD 6**	NA	991	1830	3220
	GD 19	NA	772	1530	2530
No. Evaluated		24	24	24	24
No. Pregnant		24	24	24	24
No. Died		0	1	0	0
No. with Total Resorption of Litter		1	0	0	0
Clinical Observations		-	-	-	-
Body Weight, g (%)		-	-	-	-
Body Weight Changes, g					
GD 19-20		26	35	5	-6*
GD 13-20		156	174	115	120

Abbreviations: -: No noteworthy findings; GD: Gestation Day; NA: not applicable

* -p<0.05 (Dunnett's Test)

表 2.6.7.13.2 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Embryofetal, Development - rabbit (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous Embryo-Fetal Toxicity Study in Rabbits (continued)

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	30	60	100
	Food Consumption, g/animal/day				
	GD 13-14	110	108	80*	88
	GD 15-16	122	110	83**	100
	GD 16-17	125	119	91*	99
	GD 17-18	138	132	94**	103*
	GD 18-19	138	131	96**	102**
	GD 19-20	153	152	108**	110**
	GD 13-20	128	121	90**	99*
	GD 6-20	127	121	99**	107
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Mean No. of Corpora Lutea	10.6	10.3	10.2	10.0
	Mean No. of Implantations	9.3	8.5	9.6	8.8
	Mean % Pre-implantation Loss	13.0	16.5	5.3	11.6
Litters:	No. Litters Evaluated	23	23	24	24
	Mean No. of Viable Fetuses	8.8	8.1	9.1	8.6
	Mean No. Resorptions				
	Early	0.5	0.3	0.3	0.1
	Late	0.1	0.1	0.2	0.1
	Mean No. Dead Fetuses	0.0	0.0	0.0	0.0
	Mean % Postimplantation Loss	8.6	5.9	4.8	1.8
	Mean % Viable Fetuses	91.4	94.1	95.2	98.2
	Mean Fetal Body Weight, g (%) [a]	41.8	41.9 (0.2)	41.7 (-0.2)	41.5 (-0.7)
	Mean Sex Ratio (% Males per Litter)	49.4	41.3	48.9	50.1
	Fetal Anomalies	-	-	-	-

Conclusion: Based on lower mean maternal body weight gains and food consumption at 60 and 100 mg/kg/day, a dosage level of 30 mg/kg/day was considered to be the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for maternal toxicity when avalglucosidase alfa was administered by intravenous infusion to time-mated New Zealand White rabbits. Based on the lack of effects on embryo-fetal survival and development at all dosage levels, the no-observed-effect level (NOEL) embryo-fetal development was considered to be 100 mg/kg/day.

Abbreviations: -: No noteworthy findings; GD: Gestation Day; NOAEL: no-observable-adverse-effect level; NOEL: no-observable-effect level * -p<0.05 ** -p<0.01 (Dunnett's Test)

a: For all groups, means are shown. For test article-treated groups, percent differences from control are shown in parentheses. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

14　生殖発生毒性試験－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

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice

Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** GD 6 to LD 19	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])	
Initial Age: 69 Days	**Day of Mating:** GD0	**Study No.** [DPN0378]	**Location:** 4.2.3.5.3-1
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Intravenous (avalglucosidase alfa) or Intraperitoneal (DPH)		
Vehicle/Formulation: 10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, and 2% (w/v) glycine		**GLP Compliance:** Yes	
Special Features: None	**Design similar to ICH S5 (R2) -** Yes	**Litters Culled/Not Culled:** Not culled	

No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females:** 50 mg/kg/dose **F_1 Males:** 50 mg/kg/dose **F_1 Litters:** 50 mg/kg/dose

Daily Dose (mg/kg)	0/0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
F_0 Females:					
No. Pregnant	21	23	25	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	2	1	0
No. Aborted of with Total Res. of Litter	0	0	0	0	1
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-
Gestation Body Weight (%)	-	-	-	-	-
Gestation Body Weight Change (%)	-	-	-	-	-
Lactation Body Weight (%)	-	-	-	-	-
Lactation Body Weight Change (%)	-	-	-	-	-
Mean Duration of Gestation (days)	-	-	-	-	-
Abnormal Parturition	-	-	-	-	-

Abbreviations: GD: Gestation day, LD: Lactation day, DPH: Diphenhydramine hydrochloride, - : No noteworthy findings

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
F_1 Litters:	No. Litters Evaluated	21	23	24	22	21
(Preweaning)	Mean No. of Implantations	14.2	12.6	14.0	13.7	13.4
	Dams with No Liveborn Pups	0	1	0	1	0
	Gestation Index (%) [a]	100.0	95.6	100.0	95.4	100.00
	No. Dams with All Pups Dying LDs 1 to 4	0	1	0	2	0
	No. Dams with All Pups Dying LDs 5 to 21	0	0	0	1	0
	Mean No. Liveborn Pups/Litter	13.0	12.4	12.8	12.1	11.9
	No. Liveborn Pups	273	274	306	255**	250
	Mean No. of Stillborn Pups/Litter	0.0	0.0	0.0	1.0	0.3
	No. Stillborn Pups	1	1	1	21**	6
	Unknown Vital Status	0	1	1	1	0
	No. Pups Found Dead or Presumed Cannibalized					
	LD 1	0	0	2	1	1
	LDs 2 to 4	4	5	11	10	8
	LDs 5 to 7	2	2	1	12**	0
	LDs 8 to 10	0	0	0	0	1
	LDs 11 to 14	0	0	1	1	0
	LDs 15 to 18	1	0	0	0	0
	LDs 19 to 21	0	1	0	1	0
	Viability Index (%) [b]	98.5	98.2	95.8	95.7	96.4
	Lactation Index (%) [c]	98.9	98.9	94.5	94.3	99.6

Abbreviations: LD: Lactation day, DPH: Diphenhydramine hydrochloride

a: Number of mice with live offspring/number of pregnant mice

b: Number of live pups on Day 4 postpartum/number of liveborn pups on Day 1 postpartum

c: Number of live pups on Day 21 (weaning) postpartum/number of live pups on Day 4 postpartum

** Significantly different from the Group 2 value ($p \leq 0.01$); analyses restricted to Groups 2 through 5.

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
Mean No. Surviving Pups Per Litter [d]					
LD 1 [e]	13.0	12.4	12.8	12.1	11.9
LD 4	12.8	12.2	12.2	11.6	11.5
LD 7	12.7	12.1	12.2	11.0	11.5
LD 10	12.7	12.1	12.2	11.0	11.4
LD 14	12.7	12.1	12.2	11.0	11.4
LD 18	12.7	12.1	12.2	11.0	11.4
LD 21	12.7	12.1	12.2	11.0	11.4
Pup Sex Ratios (% males)					
LD 1 [e]	54.1	52.6	52.0	53.1	49.3
LD 4	54.5	54.8	51.8	50.9	48.9
LD 7	54.0	54.8	52.0	51.1	48.9
LD 10	54.0	54.8	52.0	51.1	49.1
LD 14	54.0	54.8	51.5	50.9	49.1
LD 18	54.1	54.8	51.5	50.9	49.1
LD 21	54.1	54.6	51.5	50.7	49.1

Abbreviations: LD: Lactation day, DPH: Diphenhydramine hydrochloride

d: Average number of live pups per litter, including litters with no surviving pups

e: Includes liveborn pups and pups that died before weighing on Day 1 postpartum.

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
Mean Live Litter Size at Weighing					
LD 1	13.0	12.4	12.7	11.9	11.8
LD 4	12.8	12.8	12.2	12.8	11.5
LD 7	12.7	12.7	12.2	12.9	11.5
LD 10	12.7	12.7	12.2	12.9	11.4
LD 14	12.7	12.7	12.0	12.8	11.4
LD 18	12.7	12.7	12.0	12.8	11.4
LD 21	12.7	12.7	12.0	12.8	11.4
Mean Pup Weight/Litter (grams)					
LD 1	1.6	1.6	1.5	1.4	1.6
LD 4	2.6	2.5	2.6	2.3	2.6
LD 7	3.9	3.8	3.9	3.7	4.0
LD 10	5.1	5.0	5.1	4.9	5.3
LD 14	6.4	6.3	6.6	6.1	6.8
LD 18	7.4	7.3	7.7	7.0	8.0
LD 21	9.7	9.6	10.2	9.2	10.5
Pup Clinical Observations	-	-	-	-	-
Pup Necropsy Observations	-	-	-	-	-

Abbreviations: LD: Lactation day, DPH: Diphenhydramine hydrochloride, - : No noteworthy findings

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
F_1 Males:	No. Evaluated Postweaning	25	25	25	25	25
(Postweaning)	No. Died or Sacrificed Moribund	0	1	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-	-
	Mean Body Weight (%)	-	-	-	-	-
	Mean Body Weight Change (%)	-	-	-	-	-
	Mean Food Consumption (%)	-	-	-	-	-
	Mean Age of Preputial Separation (days)	-	-	-	-	-
	Passive Avoidance	-	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-	-
	Acoustic Startle	-	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	-	-	-	-	-
	No. of Males that Mated	-	-	-	-	-
	No. of Fertile Males	-	-	-	-	-
	Terminal Body Weights	-	-	-	-	-
	Organ Weights	-	-	-	-	-
	Ratio (Organ Weights to Terminal Body Weights)	-	-	-	-	-

Abbreviations: DPH: Diphenhydramine hydrochloride, - : No noteworthy findings

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
F_1 Females:	No. Evaluated Postweaning	25	25	25	25	25
(Postweaning)	No. Died or Sacrificed Moribund	1	0	0	1	0
	Clinical Observations	-	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-	-
	Premating Body Weight (g)	-	-	-	-	-
	Premating Body Weight Change (g)	-	-	-	-	-
	Gestation Body Weight (g)	-	-	-	-	-
	Gestation Body Weight Change (g)	-	-	-	-	-
	Mean Age of Vaginal Patency (days)	-	-	-	-	-
	Passive Avoidance	-	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-	-
	Acoustic Startle	-	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	-	-	-	-	-
	No. of Pregnant Females	23	25	24	23	23
	Mean No. Corpora Lutea	16.4	15.4	16.2	15.3	15.1
	Mean No. Implantations	15.7	14.6	15.6	14.7	14.2
	Mean % Preimplantation Loss	3.8	4.6	3.2	4.4	6.4

Abbreviations: DPH: Diphenhydramine hydrochloride, - : No noteworthy findings

表 2.6.7.14 - Reproductive and Developmental Toxicity - Effects on Pre- and Postnatal, Development, Including Maternal Function (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous (IV) Pre- and Postnatal Developmental Toxicity Study in Mice (continued)

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control)	0/5 (Control/DPH)	10/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	20/5 (avalglucosidase alfa/DPH)	50/5 (avalglucosidase alfa/DPH)
F_2 Litters:	Mean No. Live Conceptuses/Litter	14.5	13.6	14.0	13.3	13.8
	Mean No. Nonviable Conceptuses/Litter	1.3	1.0	1.6	1.4	0.4
	No. of Litters with Nonviable Conceptuses	14	12	14	15	7
	No. Nonviable Conceptuses	29	26	38	32	9
	Dams with all Nonviable Conceptuses	0	0	0	1	0
	Mean % Postimplantation Loss	8.0	8.2	10.1	11.2	4.5

Conclusions: On the basis of these data, the maternal no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for avalglucosidase alfa was 50 mg/kg/dose. The NOAEL for reproduction in the dams and for viability and growth in the offspring was 50 mg/kg/dose. There were no effects on maternal (F1) reproductive function. There were no toxicologically important differences in any developmental and reproductive parameters evaluated in the F1 generation male and female offspring.

Abbreviations: DPH: Diphenhydramine hydrochloride, NOAEL: no-observed-adverse-effect level

15　幼若動物を用いた試験

表 2.6.7.15 - Studies in Juvenile Animals

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous 9-week toxicity study in juvenile mice with a 4-week recovery period

Species/Strain: Mouse / Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** 9 weeks (every other week for a total of 5 or 6 doses)	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])
Initial Age: PND 21	**Duration of Post-Dose:** 28-days	**Study No.:** [JUV0033]
Date of First Dose: [redacted]20[redacted]	**Method of Administration:** IV (slow bolus)	**Location:** 4.2.3.5.4-1
Vehicle/Formulation: 10 mM histidine, pH 6.2 ± 0.5, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, and 2% (w/v) glycine		**GLP Compliance:** Yes

Special Features: Additional mice (20/sex/group) were assigned for fertility evaluation, (3 or 9/sex/group) for.toxicokinetic analysis. Anti-drug antibody analysis was performed on the recovery animals (5/sex/group). Following dose administration, 10 animals/sex/group were sacrificed at the dosing phase sacrifice. The remaining ≤ 5 animals/sex/group underwent a 28-day recovery phase.

No Observed Adverse Effect Level: 100 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)	0 (control)/ 0 (saline)		0 (saline)/ 5 (DPH)		20 (25) avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)		50 avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)		100 avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)	
Toxicokinetics:										
Number of Toxicokinetic Animals on Study	**M: 3**	**F: 3**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**	**M: 9**	**F: 9**
$AUC_{0\text{-}24}$ (µg.h/mL) **PND 77**	ND	ND	ND	ND	550	469	2730	1490	8140	5400
C_{max} (µg/mL) **PND 77**	ND	ND	ND	ND	611	422	1750	1170	3120	2480
Anti-avalglucosidase alfa Antibodies (+ / total number analyzed):										
PND 48	1/5	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
PND 76	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
PND 110/111	0/5	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5

Additional Information: N= 3 /sex/timepoint for toxicokinetic analysis of avalglucosidase alfa; the lower limit of quantitation was 1.00 µg/mL

Abbreviations: M: male, F: female, PND: postnatal day, ND: not determined, DPH: Diphenhydramine hydrochloride

表 2.6.7.15 - Studies in Juvenile Animals (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous 9-week toxicity study in juvenile mice with a 4-week recovery period (continued)

Dose (mg/kg/day)	0 (control)/ 0 (saline)		0 (saline)/ 5 (DPH)		20 (25) avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)		50 avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)		100 avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)	
Number of Animals (Main)	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Number of Animals (Fertility)	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**	**M: 20**	**F: 20**
Number of Animals (Recovery)	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Noteworthy Findings:										
Died or Killed Moribund (Main)	0	0	0	0	2 (FD)	4 (FD)	1 (FD)	0	0	0
Died or Killed Moribund (Fertility)	1 (UE)	1 (DE)	0	0	4 (FD)	1 (FD)	1 (FD)	1 (UE)	0	0
Died or Killed Moribund (Recovery)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Died or Killed Moribund (TK)	0	0	0	0	3 (FD)/1 (UE)	2 (FD)	1 (FD)	1 (FD)	1 (FD)	0
Died or Killed Moribund (Total) [a]	1	1	0	0	10	7	3	2	1	0
Hematology [b]										
Leukocytes (10^3/cmm)										
PND 80/81/82	4.70	5.29	3.59	3.89	5.78	6.50	6.90	4.80	8.33*[c]	4.21
PND 111/112	5.89	5.06	4.61	3.63	6.57	2.28	9.65	5.22	10.24*[c]	4.09
Lymphocytes (10^3/cmm)										
PND 80/81/82	3.23	4.02	2.81	2.98	4.14	4.70	5.50	3.45	6.56*[c]	2.99
PND 111/112	4.46	4.26	3.40	3.03	5.13	1.81	5.53	4.41	6.49	3.28
Monocytes (10^3/cmm)										
PND 80/81/82	0.15	0.11	0.06	0.09	0.15	0.12	0.15	0.12	0.13	0.07
PND 111/112	0.09	0.09	0.09	0.06	0.13	0.04	0.26	0.07	0.25	0.06

Abbreviations: M: male, F: female, DE: delivered early, FD: found dead, UE: unscheduled euthanasia, PND: postnatal day, DPH: Diphenhydramine hydrochloride

[a] Four of these (1 male and 1 female at 0 mg/kg, 1 male at 20 mg/kg, and 1 female at 50 mg/kg) were unrelated to avalglucosidase alfa administration. The cause of death in the remaining mice was undetermined but was likely related to an immunologic response (including an anaphylactoid response) as would be expected based on the timing of death (up to approximately 3 hours postdose) and the low incidence of deaths across all dose groups, with a slightly higher incidence in the low dose groups.

[b] N=3 to 5/sex/group; group means are shown.

[c] ANOVA/Dunnett-Test * $p<0.05$ compared to DPH/saline control group (Group 2)

表 2.6.7.15 - Studies in Juvenile Animals (continued)

Report Title: GZ402666 (neoGAA): Intravenous 9-week toxicity study in juvenile mice with a 4-week recovery period (continued)

Dose (mg/kg/day)	0 (control)/ 0 (saline)		0 (saline)/ 5 (DPH)		20 (25) avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)		50 avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)		100 avalglucosidase alfa/ 5 (DPH)	
Hematology (continued) *a*										
Segmented Neutrophils (10^3 /cmm)										
PND 80/81/82	1.14	0.83	0.58* *b*	0.60	1.34	0.92	1.03	0.81	1.25	0.86
PND 111/112	1.04	0.54	0.86	0.42	0.99	0.37	6.45	0.58	3.07* *c*	0.50
Eosinophils (10^3 /cmm)										
PND 80/81/82	0.15	0.28	0.10	0.20	0.09	0.72	0.15	0.41	0.30	0.25
PND 111/112	0.26	0.13	0.23	0.10	0.25	0.05	0.30	0.13	0.31	0.22
Basophils (10^3 /cmm)										
PND 80/81/82	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.03	0.01	0.04	0.02
PND 111/112	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.00	0.04*d	0.01	0.05*d	0.01

Conclusions: Based on the results of this study, the no-observed-adverse-effect level was 100 mg/kg.

Abbreviations: PND: postnatal day, DPH: Diphenhydramine hydrochloride

Additional Information: No avalglucosidase alfa-related clinical signs or cause any effects on mean body weight or mean body weight gain, food consumption, in vivo and ex vivo femur measurements (length and bone densitometry as assessed by Peripheral Quantitative Computed Tomography [pQCT]), organ weights, and macroscopic or microscopic observations. In addition, there were no avalglucosidase alfa-related effects on any of the functional behavioral tests performed in male and female mice (open field, passive avoidance, auditory startle habituation, or motor activity) and there were no effects on sexual maturation, estrous cyclicity, mating and fertility parameters, ovarian and uterine parameters or sperm parameters (sperm motility, sperm concentration, testicular spermatid concentrations, and sperm morphology).

a N=3 to 5/sex/group; group means are shown.

b ANOVA/Dunnett-Test * p<0.05 compared to control/saline control group (Group 1)

c Kruskal-Wallis/Dunn's * p<0.05 compared to DPH/saline control group (Group 2)

d ANOVA/Dunnett-Test * p<0.05 compared to DPH/saline control group (Group 2)

16　局所刺激性試験

該当なし

17　その他の毒性試験

表 2.6.7.17.1 - Other Toxicity Studies - overview

Test Article: avalglucosidase alfa or as noted in bold text

Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Monkey/ Cynomolgus	Intermittent intravenous infusion	Every other week for 13 weeks 4-week recovery period	avalglucosidase alfa/不純物T* 0/0, 50/3 50/6, 50/12.55 (7 doses)	5M, 5F	There was no difference between the groups administered avalglucosidase alfa with various amounts of spiked synthetic 不純物T*. The NOAEL was the high dose 50 mg/kg avalglucosidase alfa spiked with 12.55 mg/kg 不純物T* qow.	[TXC1530]	4.2.3.7.6-2
Salmonella typhimurium/ TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	In vitro incubation	48 hours	不純物U*: 5, 16, 50, 160, 500, 1600, and 5000 µg/plate	NA	不純物U*was negative in the bacterial reverse mutation test in the presence and absence of S9.	[HIS2317]	4.2.3.7.6-1
Salmonella typhimurium/ TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	In vitro incubation	48 hours	不純物T*: 0, 5, 16, 50, 160, 500, 1600, 5000 µg/plate	NA	不純物T* was negative in the bacterial reverse mutation test in the presence and absence of S9.	[HIS2129]	4.2.3.7.7-1
Human peripheral blood lymphocytes	In vitro incubation	3 or 20 hours	不純物T*: 100, 300, 500 µg/mL	NA	不純物T* was negative in the chromosome aberration test in human peripheral blood lymphocytes in the presence and absence of S9.	[MAF0153]	4.2.3.7.7-2

Abbreviations: NA: not applicable, qow: every other week, NOAEL: no-observed-adverse-effect level

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.2 - Other Toxicity Studies: in vitro – Ames test

Report Title: 不　純　物　U　***- Bacterial reverse mutation test (Standard Ames test)**

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial strains	**No. of Independent Assays:** 1	**Test Article (Batch):** 不　純　物　U　*([redacted])
Test system: *Salmonella typhimurium*	**No. of Replicate Cultures:** 3	**Study No.:** [HIS2317]
Metabolizing System: Aroclor 1254 induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** NA	**Location:** 4.2.3.7.6-1
Vehicle: For Test Article: water for injection	**For positive controls:** sterile ultrapure water or dimethyl sulfoxide (DMSO)	**GLP Compliance:** Yes
Treatment: 48 hours		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Genotoxic Effects: None		

Metabolizing system	Test Article	Concentration (µg/plate)	Plate incorporation method Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Without S9 mix	不　純　物　U　*	5	15.7 ± 2.3	108.0 ± 7.0	195.0 ± 3.6	10.0 ± 2.6	7.3 ± 4.0
		16	14.0 ± .4.4	119.3 ± 10.1	177.0 ± 20.1	11.7 ± 1.5	7.0 ± 3.0
		50	14.7 ± 3.5	118.7 ± 8.5	195.7 ± 11.4	8.7 ± 1.5	6.3 ± 4.0
		160	13.3 ± 4.0	117.7 ± 10.2	202.7 ± 26.6	7.0 ± 2.0	7.3 ± 4.5
		500	16.3 ± 5.5	113.0 ± 19.2	184.0 ± 16.1	7.0 ± 3.6	8.0 ± 4.6
		1600	19.0 ± 1.0	114.3 ± 5.0	174.0 ± 4.4	9.7 ± 1.5	7.7 ± 2.3
		5000	16.3 ± 3.2	117.0 ± 10.4	176.3 ± 2.1	7.7 ± 2.5	6.7 ± 4.2
	2-nitrofluorene	2.5	460.7 ± 44.5	NA	NA	NA	NA
	sodium-azide	2.0	NA	574.7 ± 6 7	NA	NA	NA
	Mitomycin C	0.3	NA	NA	584.7 ± 6.5	NA	NA
	sodium-azide	1.0	NA	NA	NA	369.7 ± 11.0	NA
	ICR 191	0.3	NA	NA	NA	NA	106.0 ± 9.6

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation
Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.2 - Other Toxicity Studies: in vitro – Ames test (continued)

Report Title: 不　純　物　U　　***- Bacterial reverse mutation test (Standard Ames test)**

Metabolizing system	Test Article	Concentration (µg/plate)	Plate incorporation method Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
With S9 mix	不　純　物　U　*	5	25.3 ± 5.1	139.7 ± 5.0	219.7 ± 9.5	9.7 ± 2.5	9.3 ± 4.2
		16	19.7 ± 1.5	142.3 ± 22.1	233.3 ± 17.7	8.7 ± 2.5	9.0 ± 2.6
		50	22.3 ± 1.2	127.3 ± 11.6	235.0 ± 8.2	9.0 ± 3.6	9.7 ± 2.3
		160	16.7 ± 2.3	134.3 ± 18.0	221.7 ± 17.6	8.3 ± 0.6	8.0 ± 2.0
		500	19.0 ± 1.7	125.0 ± 10.5	230.3 ± 16.4	8.3 ± 4.5	7.0 ± 3.6
		1600	21.7 ± 3.5	141.7 ±12.1	234.0 ± 15.9	6.3 ± 3.5	6.7 ± 2.1
		5000	25.7 ± 5.1	139.7 ± 23.8	206.0 ± 29.5	9.0 ± 4.4	5.3 ± 1.5
	2-aminoanthracene	1.5	1099.3 ± 47.5	1105.7 ± 35.4	NA	135.7 ± 4.5	104.7 ± 17.2
	2-aminoanthracene	8	NA	NA	1137.7 ± 71.7	NA	NA

Conclusion: In conclusion, under the experimental conditions of the study, 不　純　物　U　*was found negative in the bacterial reverse mutation test conducted on Salmonella typhimurium strains TA100, TA1535, TA1537, TA98, and TA102 in the presence and absence of metabolic activation, at dose levels up to 5000 µg/plate.

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation

Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.3 - Other Toxicity Studies – 13-week intermittent IV monkey study with elevated levels of 不純物T* with a 4-week recovery

Report Title: 13-Week Intermittent Intravenous Infusion Toxicity and Toxicokinetic Study of neoGAA with Elevated Levels of 不純物T* in Cynomolgus Monkeys with a 4-Week Recovery

Species/Strain: Monkey (Cynomolgus)	**Duration of Dosing**: 13 weeks	**Test Article (Batch):** avalglucosidase alfa ([redacted])
Initial Age: 2 to 3 years	**Duration of Recovery**: 4 weeks	**Study No.:** [TXC1530]
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration** [a]: Intermittent intravenous infusion	**Location:** 4.2.3.7.6-2
Vehicle Control Article: 10 mM histidine, 0.01% (v/v) Tween® 80, 2% (w/v) mannitol, and 2% (w/v) glycine, pH 6.2		**GLP Compliance**: Yes

Special Features: The test article, avalglucosidase alfa, was spiked with required volumes of 不純物T* stock solution (2.5 mg/mL) and vehicle control article (v:v:v) using aseptic procedures to achieve the desired concentration of avalglucosidase alfa and 不純物T* in each dose formulation.

No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg avalglucosidase alfa spiked with 12.55 mg/kg 不純物T*

Sex		**Male**				**Female**			
Dose (mg/kg) - avalglucosidase alfa/不純物T*		**0/0 (Control)**	**50/3 (Low)**	**50/6 (Mid)**	**50/12.55 (High)**	**0/0 (Control)**	**50/3 (Low)**	**50/6 (Mid)**	**50/12.55 (High)**
Number of Animals at Study Start		5	5	5	5	5	5	5	5
Dosing Phase									
Toxicokinetics:									
$AUC_{0\text{-}54}$ (µg.h/mL)	Day 1	BLQ [b]	2580	4470	3770	BLQ [b]	2420	2860	3530
	Day 85	BLQ [b]	3560	3180	3920	BLQ [b]	2860	2800	2450
C_{max} (µg/mL)	Day 1	BLQ [b]	606	1030	876	BLQ [b]	557	676	798
	Day 85	BLQ [b]	740	683	784	BLQ [b]	652	667	565
Noteworthy Findings:									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: - : No noteworthy findings; $AUC_{(0\text{-}54)}$: Area under serum concentration time curve calculated by the linear trapezoidal method from time 0 to 54h from the start of IV infusion; BLQ: Below the limit of quantitation; C_{max} : Maximum observed concentration

a: Animals were dosed once every 14 days (Days 1, 15, 29, 43, 57, 71, and 85 of the dosing phase) for approximately 6 hours/day for 13 weeks (a total of seven doses) at a volume of 20 mL/kg/day (3.33 mL/kg/hour).

b: Concentrations of avalglucosidase alfa were greater than the lower limit of quantitation (0.100 µg/mL) consistently in a few males of the control group (2/5 on Day 1 and 1/5 on Day 85). Concentrations of avalglucosidase alfa were less than the lower limit of quantitation mostly in all females of the vehicle control group.

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.3 - Other Toxicity Studies – 13-week intermittent IV monkey study with elevated levels of 不純物T* with a 4-week recovery (continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg) - avalglucosidase alfa/不純物T*	0/0 (Control)	50/3 (Low)	50/6 (Mid)	50/12.55 (High)	0 (Control)	50/3 (Low)	50/6 (Mid)	50/12.55 (High)
Number of Animals at Study Start	5	5	5	5	5	5	5	5
Dosing Phase (Continued)								
Clinical Observations	-	-	c	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Vital Signs	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure Determination	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology/Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Urine Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Recovery Phase								
Number of Animals in Recovery	1	1	1	1	1	1	1	1

Conclusion: In conclusion, 50 mg/kg avalglucosidase alfa spiked with up to 12.55 mg/kg 不純物T* once every 14 days for approximately 6 hours/day via intermittent intravenous infusion was well tolerated in cynomolgus monkeys when administered for at least 13 weeks (total of seven doses). No difference was noted between the groups with various amounts of spiked 不純物T*. No compound-related adverse effects were seen and no delayed effects were observed after a 4-week recovery phase. Thus, the no observed adverse effect level (NOAEL) is 50 mg/kg avalglucosidase alfa spiked with up to 12.55 mg/kg 不純物T*.

Abbreviations: - : No noteworthy findings; NOAEL: no-observed-adverse-effect level

c: One male was noted with erythema and swelling on Day 29 of the dosing phase. These clinical observations were consistent with an infusion-related hypersensitivity reaction and were not considered adverse because they were transient, not dose-limiting, and resolved without veterinary intervention.

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.4 – Genotoxicity: in vitro – Ames test

Report Title: 不 純 物 T *- **Bacterial reverse mutation test (Ames test)**

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial strains	**No. of Independent Assays:** 5	**Test Article (Batch):** 不純物 T *([redacted])
Test system: *Salmonella typhymurium*	**No. of Replicate Cultures:** 3	**Study No.:** [HIS2129]
Metabolizing System: Aroclor 1254 induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:** NA	**Location:** 4.2.3.7.7-1
Vehicle: For Test Article: water for injection	**For positive controls:** sterile ultrapure water or dimethyl sulfoxide (DMSO)	**GLP Compliance:** Yes
Treatment: 48 hours		**Date of Treatment:**
Genotoxic Effects: None		Plate incorporation: [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted] (first repeat), [redacted] 20[redacted] (second repeat) Preincubation: [redacted] 20[redacted], [redacted] 20[redacted] (first repeat)

Metabolizing system	Test Article	Concentration (µg/plate)	Plate incorporation method Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Without S9 mix	不純物 T *	5	9.3 ± 4.2	103.0 ± 6.1	174.0 ± 14.5	10.0 ± 3.6	4.3 ± 0.6
		16	13.0 ± 2.6	98.7 ± 4.9	164.7 ± 11.9	11.7 ± 3.1	6.3 ± 2.1
		50	13.0 ± 4.6	108.3 ± 5.8	154.0 ± 9.8	11.0 ± 2.0	4.0 ± 1.0
		160	11.3 ± 6.0	115.3 ± 12.4	170.0 ± 1.0	8.7 ± 4.5	6.0 ± 2.0
		500	11.3 ± 3.5	96.3 ± 2.5	166.0 ± 12.0	9.3 ± 3.1	5.7 ± 2.1
		1600	11.0 ± 3.6	106.7 ± 13.8	160.7 ± 21.6	10.3 ± 1.5	7.3 ± 1.2
		5000	10.0 ± 2.6	92.3 ± 14.8	167.3 ± 1.5	11.0 ± 4.6	6.3 ± 1.5
	2-nitrofluorene	2.5	368.0 ± 10.8	NA	NA	NA	NA
	sodium azide	2.0	NA	572.7± 77.8	NA	NA	NA
	Mitomycin C	0.3	NA	NA	693.7 ± 21.5	NA	NA
	sodium azide	1.0	NA	NA	NA	324.3 ± 35.2	NA
	ICR 191	0.3	NA	NA	NA	NA	110.7 ± 9.3

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation
Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.4 – Genotoxicity: in vitro – Ames test (continued)

Report Title: 不 純 物 T *- **Bacterial reverse mutation test (Ames test) (continued)**

Metabolizing system	Test Article	Concentration (µg/plate)	Plate incorporation method Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
With S9 mix	不純物 T *	5	15.7 ± 4.0	111.7 ± 11.0	212.7 ± 10.6	13.3 ± 1.5	6.0 ± 2.6
		16	13.0 ± 2.0	105.7 ± 4.5	213.0 ± 5.3	14.7 ± 2.9	5.7 ± 0.6
		50	11.3 ± 0.6	108.7 ± 6.1	202.0 ± 20.2	12.0 ± 2.0	5.0 ± 1.7
		160	17.3 ± 3.2	98.0 ± 14.2	209.7 ± 7.5	12.7 ± 8.0	5.3 ± 0.6
		500	13.0 ± 1.7	98.0 ± 1.0	214.0 ± 16.5	8.7 ± 0.6	7.0 ± 1.0
		1600	16.0 ± 4.6	101.3 ± 5.5	203.0 ± 25.6	11.7 ± 1.5	7.3 ± 4.2
		5000	8.3 ± 3.1	106.7 ± 22.6	200.3 ± 4.6	12.0 ± 3.0	5.0 ± 3.0
	2-aminoanthracene	1.5	1233.3 ± 46.3	1309.0 ± 74.5	NA	193.7 ± 14.0	143.7 ± 9.0
		8	NA	NA	867.0 ± 32.1	NA	NA

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation

Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.4 – Genotoxicity: in vitro – Ames test (continued)

Report Title: 不 純 物 T ***- Bacterial reverse mutation test (Ames test) (continued)**

Test Article	Concentration (µg/plate)	Plate incorporation method (First Repeat) Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)	Plate incorporation method (Second Repeat) Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)	
		TA98 (with S-9)	TA98 (without S-9)	TA98 (with S-9)
不純物 T *	5	11.3 ± 1.2	19.3 ± 5.1	15.7 ± 1.5
	16	12.7 ± 6.5	17.7 ± 2.5	16.3 ± 2.3
	50	12.0 ± 3.0	18.3 ± 5.7	17.7 ± 2.3
	160	15.7 ± 3.1	15.0 ± 3.5	19.0 ± 5.6
	500	10.7 ± 0.6	19.0 ± 3.6	14.3 ± 2.3
	1600	13.3 ± 1.5	17.7 ± 8.3	14.0 ± 5.2
	5000	11.7 ± 1.5	16.0 ± 5.0	14.7 ± 2.9
2-nitrofluorene	2.5	NA	416.3 ± 42.2	NA
2-aminoanthracene	1.5	459.3 ± 65.6	NA	1237.7 ± 15.7

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation

Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.4 – Genotoxicity: in vitro – Ames test (continued)

Report Title: 不純物 T *- Bacterial reverse mutation test (Ames test) (continued)

Metabolizing system	Test Article	Concentration (µg/plate)	Preincubation method Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537
Without S9 mix	不純物 T *	5	7.7 ± 4.0	103.3 ± 12.5	152.7 ± 4.0	9.3 ± 2.3	7.7 ± 7.2
		16	13.3 ± 5.5	105.7 ± 7.5	163.0 ± 8.7	7.0 ± 2.6	10.3 ± 2.5
		50	11.7 ± 2.5	103.0 ± 9.6	148.3 ± 7.2	8.0 ± 3.6	10.0 ± 4.0
		160	11.0 1.0	114.0 ± 11.0	160.3 ± 12.4	8.3 ± 2.1	9.7 ± 4.9
		500	9.3 ± 4.0	104.0 ± 3.6	161.0 ± 6.2	7.7 ± 4.6	12.0 ± 0.0
		1600	11.0 ± 1.7	106.7 ± 13.0	147.7 ± 9.7	7.3 ± 2.5	11.3 ± 2.1
		5000	11.7 ± 1.2	102.0 ± 8.2	142.0 ± 11.0	12.0 ± 2.0	10.3 ± 1.5
	2-nitrofluorene	2.5	437.3 ± 86.2	NA	NA	NA	NA
	sodium-azide	2.0	NA	509.7 ± 88.2	NA	NA	NA
	Mitomycin C	0.3	NA	NA	1644.0 ± 191.0	NA	NA
	sodium-azide	1.0	NA	509.7 ± 88.2	NA	16.5 ± 16.5	NA
	ICR 191	0.3	NA	NA	NA	NA	211.0 ± 19.5

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation
Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.4 – Genotoxicity: in vitro – Ames test (continued)

Report Title: 不 純 物 T *- **Bacterial reverse mutation test (Ames test) (continued)**

Test Article	Concentration (µg/plate)	Preincubation method (First Repeat) Number of His+ Revertant Colonies (Mean ± SD)	
		TA98 (without S-9)	TA98 (with S-9)
不純物 T *	5	19.0 ± 5.2	19.7 ± 4.0
	16	15.7 ± 9.1	20.3 ± 2.1
	50	18.3 ± 7.6	21.0 ± 4.6
	160	14.7 ± 2.1	18.3 ± 4.6
	500	19.7 ± 0.6	16.0 ± 3.6
	1600	18.7 ± 2.5	15.0 ± 3.5
	5000	14.0 ± 7.2	17.0 ± 5.0
2-nitrofluorene	2.5	126.0 ± 20.0	
2-aminoanthracene	1.5	NA	1398.0 ± 58.2

Conclusion: In conclusion, under the experimental conditions of the study, 不純物 T *was found negative in the bacterial reverse mutation test conducted on the five Salmonella typhimurium strains TA1535, TA1537, TA98, TA100 and TA102 in the presence and absence of metabolic activation, testing up to 5000 µg/plate.

Abbreviations: NA: not applicable; SD: standard deviation

Toxic effects and precipitate: NA

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.7.17.5 – Genotoxicity: in vitro – Mammalian chromosome aberration test in human lymphocytes

Report Title: 不 純 物 T *- **In vitro chromosome aberration test in cultured human peripheral blood lymphocytes**

Test for Induction of: Chromosome aberrations	**No. of Independent Assays:** 2	**Test Article (Batch):** 不純物 T *([redacted])
Test system: Cultured human peripheral blood lymphocytes	**No. of Replicate Cultures:** 2	**Study No.:** [MAF0153]
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver homogenate (S9-mix)	**No. of Cells Analyzed:** 200	**Location:** 4.2.3.7.7-2
Vehicle: For Test Article: water for injection	**For positive controls:** water for injection	**GLP Compliance:** Yes
Treatment: 3 or 20 without S9-mix and 3 hours with S9-mix	**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted] (3 hour treatment); [redacted] 20[redacted] (20 hour treatment)	

Genotoxic Effects: None

Treatment group	Concentration µg/mL	Relative mitotic index in %	Polyploid cells in %	Endoredupli-cated cells in %	Cells with structural aberrations in % incl. gaps **#	excl. gaps **	exchanges #
Experiment I: 3-hour treatment/ 17-hour recovery (without S9-mix)							
Positive control (Mitomycin C)	0.3	81.6	0.0	0.0	15.5	12.5*	3.0
不純物 T *	100.0	105.8	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0
不純物 T *	300.0	111.5	0.5	0.0	1.5	0.5	0.0
不純物 T *	500.0	103.5	0.5	0.0	1.5	1.0	0.0
Experiment I: 3-hour treatment/ 17-hour recovery (with S9-mix)							
Positive control (Cyclophosphamide)	7.5	71.4	0.0	0.0	16.5	15.5*	2.5
不純物 T *	100.0	115.7	0.5	0.0	1.0	1.0	0.0
不純物 T *	300.0	111.4	1.0	0.0	1.5	0.5	0.0
不純物 T *	500.0	104.3	0.5	0.0	0.5	0.5	0.0
Experiment II: 20-hour treatment/ 0-hour recovery (without S9-mix)							
Positive control (Mitomycin C)	0.2	59.5	0.0	0.0	21.5	21.0*	6.0
不純物 T *	100.0	99.1	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0
不純物 T *	300.0	87.4	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0
不純物 T *	500.0	85.6	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0
Experiment II: 3-hour treatment/ 17-hour recovery (with S9-mix)							
Positive control (Cyclophosphamide)	7.5	62.6	0.0	0.0	21.5	17.0*	4.0
不純物 T *	100.0	100.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
不純物 T *	300.0	104.7	0.0	0.0	2.5	1.5	0.0
不純物 T *	500.0	98.1	0.0	0.0	3.0	1.5	0.0

Conclusion: In conclusion, 不純物 T *was negative in the chromosome aberration test in cultured human peripheral blood lymphocytes in the presence and in the absence of metabolic activation, up to a concentration of 500 µg/mL, the highest recommended test article concentration for this test system.

Statistical significance: * Aberration frequency statistically significantly higher than corresponding control values ($p \leq 0.05$); # No statistics performed ** Inclusive cells carrying exchanges

＊新薬承認情報提供時に置換