サノフィ株式会社

オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

CTD 第二部 ― 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 37

目　　次

2.4 非臨床試験の概括評価 1

目　　次 2

表　目　次 4

略号と用語の定義 5

1　　非臨床試験計画概略 7

1.1　　ASMDにおける酵素補充療法の背景の要約 7

1.2　　酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子ノックアウト（ASMKO）マウスモデル 9

1.3　　試験計画 10

2　　薬理試験 13

2.1　　効力を裏付ける試験 14

2.2　　副次的薬理試験 15

2.3　　安全性薬理試験 16

2.4　　薬力学的薬物相互作用試験 16

3　　薬物動態試験 18

3.1　　分析法 19

3.2　　単回投与薬物動態／トキシコキネティクス試験 20

3.3　　反復投与薬物動態／トキシコキネティクス試験 20

3.4　　組織分布試験 21

4　　毒性試験 23

4.1　　単回投与毒性試験 25

4.1.1　　げっ歯類－BALB/cマウス、C57BL/6マウス及びSDラット 25

4.1.2 げっ歯類－ASMKOマウス 25
4.1.3 非げっ歯類 27
4.2 反復投与毒性試験 27
4.2.1 げっ歯類－正常ラット 27
4.2.2 げっ歯類－ASMKOマウス 27
4.2.3 非げっ歯類 28
4.3 遺伝毒性試験 28
4.4 がん原性試験 29
4.5 生殖発生毒性試験 30
4.6 局所刺激性試験 30
4.7 その他の毒性試験 30
5 総括及び結論 32
6 参考文献一覧 35
7 付録 36
7.1 付録 1－データ欠損の理由 36

表　目　次

表 1 - 製剤の情報 7
表 2 - オリプダーゼ アルファ製品開発における製造プロセス概要 9
表 3 - 薬理試験の概要 13
表 4 - 薬物動態／トキシコキネティクス及び組織分布試験の概要 18
表 5 - 毒性試験の概要 23
表 6 - オリプダーゼ アルファの反復投与毒性試験 33

略号と用語の定義

ADA：	抗オリプダーゼ アルファ抗体（Anti-olipudase alfa antibody）
ASM：	酸性スフィンゴミエリナーゼ（Acid sphingomyelinase）
ASMD：	酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（Acid sphingomyelinase deficiency）
ASMKO：	酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト（Acid sphingomyelinase knock-out）
AUC：	血清中濃度―時間曲線下面積（Area under the concentration versus time curve）
BD：	組織分布（Biodistribution）
C_{24}：	投与後 24 時間の血清中濃度（Concentration at 24 hours）
CHO：	チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary）
CL：	全身クリアランス（Total body clearance）
CNS：	中枢神経系（Central nervous system）
DLco：	一酸化炭素肺拡散能（Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide）
DNA：	デオキシリボ核酸（Deoxyribonucleic acid）
DPH：	ジフェンヒドラミン（Diphenhydramine）
ELISA：	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay）
ERT：	酵素補充療法（Enzyme replacement therapy）
FIASMA：	酸性スフィンゴミエリナーゼ機能的阻害薬（Functional inhibitors of acid sphingomyelinase）
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 Practices）
HMWS：	高分子量体（High molecular weight species）
ICH：	医薬品規制調和国際会議（International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use）
INN：	国際医薬品一般名（International non-proprietary name）
IV：	静脈内（Intravenous）
JAN：	日本医薬品一般名（Japanese approved name）
MIP：	マクロファージ炎症性タンパク質（Macrophage inflammatory protein）
NOAEL：	無毒性量（No observed adverse effect level）
NOEL：	無影響量（No observed effect level）
NPD：	ニーマン・ピック病（Niemann-Pick disease）
NZW：	ニュージーランドホワイト（New Zealand White）
PD：	薬力学（Pharmacodynamics）
PK：	薬物動態（Pharmacokinetic）
rhASM：	遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ（Recombinant human acid sphingomyelinase）
SAA：	血清アミロイド A（Serum amyloid A）
SAP：	血清アミロイド P（Serum amyloid P）
SD：	Sprague Dawley
SMPD1：	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 1（Sphingomyelin phosphodiesterase 1）
SSRI：	選択的セロトニン再取り込み阻害薬（Selective serotonin reuptake inhibitor）
TK：	トキシコキネティクス（Toxicokinetic）

TNFα ： 腫瘍壊死因子 α（Tumor necrosis factor alpha）

1　非臨床試験計画概略

本資料には、酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）に対するオリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（以下、オリプダーゼ アルファ）の長期使用を支持することを目的として、本薬の薬理、薬物動態及び非臨床安全性プロファイルを評価し、特徴付けるための非臨床試験計画概略及び実施した非臨床試験プログラムを要約する。薬理、薬物動態及び毒性試験の詳細な結果及び考察は、それぞれ Module 2.6.2 薬理試験の概要文、Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文及び Module 2.6.6 毒性試験の概要文に示す。

本資料を通して、一般名であるオリプダーゼ アルファ（国際一般名：Olipudase alfa）を使用しており、本申請に関する資料及び裏付けとなる試験報告書では GZ402665 又は遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ（rhASM）と称されている（表 1）。

表 1 - 製剤の情報

国際医薬品一般名（INN） 日本医薬品一般名（JAN）	Olipudase alfa オリプダーゼ　アルファ（遺伝子組換え）
化学名	遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ（rhASM）
社内コード	rhASM、GZ402665
他の一般的名称	無し
CAS 登録番号	Sphingomyelinase C (synthetic human) 927883-84-9

1.1　ASMD における酵素補充療法の背景の要約

ASMD はニーマン・ピック病（NPD）とも称され、1914 年に最初に報告された。以前、ASMD は NPD A 型又は B 型と診断されていた。A 型（NPD A）は若齢で発症する NPD の急性神経障害型であり、3 歳までに発育不全、肝脾腫、急速進行性の神経変性及び死亡に至ることが多い。ニーマン・ピック病 B 型（NPD B）はそれより軽症であり、神経症状はほとんど又は全く認められない。最もよく認められる症状は肝脾腫と脂質異常である。その他に認められる様々な症状には、肝機能障害、肺疾患、網膜斑及び成長遅延がある。ニーマン・ピック病 B 型は、小児期に臓器肥大が認められて診断されることが多く、通常は 2 歳以降で認められる。B 型と診断された患者の大半は成人まで生存する。ASMD は常染色体劣性単一遺伝子疾患であるため、広範な表現型が現れることが知られている。した

がって、典型的な A 型と B 型の中間に分類される症例も報告されている。この中間型（NPD A/B）の患者は、小児期に神経症状が発現し、慢性神経変性疾患の経過をたどる。

SMPD1 遺伝子の変異により酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）が欠損すると、種々の臓器に常在している単核食細胞系細胞及び肝細胞においてスフィンゴミエリンが蓄積する。正常組織では、細胞のリン脂質の 5%～20%がスフィンゴミエリン（主に形質膜に局在）であるが、ASMD 患者の組織では、この割合が 70%と高くなる場合がある(1)。スフィンゴミエリン、並びにそれより軽度にコレステロール及びその他の脂質が進行性に蓄積すると、細胞が泡沫状の組織像を呈するようになる。ASMD 患者では、これらの泡沫細胞が常在組織に浸潤することにより組織障害が引き起こされ、その結果、臓器に機能障害が生じる。肝臓において、スフィンゴミエリンの異常な蓄積により、肝臓の機能障害及び線維化が起こり、肝硬変及び肝不全に進行する場合もある。脾臓の単核食細胞系細胞は、循環血中の老化した又は障害された血液細胞に由来するスフィンゴミエリンの豊富な膜状物質などの細胞残屑を活発に内部に取り込んでいるため、脾臓に広範な病変が認められる。肺胞マクロファージにはスフィンゴミエリンが豊富に含まれているため、肺も特に影響を受けやすく、血液への酸素の移行及び血液からの二酸化炭素の移行が妨げられる。この機能障害は、一酸化炭素肺拡散能（DL_{co}）の異常として現れる。肺病変を有する ASMD 患者では、進行性の息切れが認められ、酸素吸入に依存する状態となり、再発性肺感染症を発症する。その他の主な病変部位は、骨髄、心臓及び末梢神経などであり、より重度の疾患では脳にも病変が認められる。

ASM のようなライソゾーム加水分解酵素は、通常、生体内では、付加された糖鎖（一般的にマンノース-6-リン酸及び高マンノース構造）を介してライソゾームに局在化する。これらの糖鎖モチーフは、ゴルジ装置内で酵素に付加し、新規に合成された酵素のライソゾームへの局在化を、特異的受容体を介して誘導する。同様の糖鎖受容体が細胞表面にあると、細胞外に分泌されたライソゾーム酵素の取込みが促進される。オリプダーゼ アルファは酵素補充療法（ERT）の薬剤であり、静脈内へ投与され、これが全身に分布し、受容体を介したエンドサイトーシスによって種々の組織及び細胞に取り込まれ、ライソゾームへと輸送される。しかし、オリプダーゼ アルファは、その分子サイズにより血液脳関門を通過しないことから、中枢神経系（CNS）の症状を変化させることはないと考えられる。

オリプダーゼ アルファは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて製造される rhASM である。オリプダーゼ アルファは糖タンパク質であり、570 個のアミノ酸残基からなる（627 アミノ酸から 57 のシグナル配列アミノ酸を差し引いたもの）。シグナル配列切断後の成熟オリプダーゼ アルファペプチド鎖の分子量は、糖鎖による翻訳後修飾及びジスルフィド結合を考慮しない場合、63,648 と算出される。

開発中のオリプダーゼ アルファ製造プロセスの概要を表 2 に示す。

表 2 - オリプダーゼ アルファ製品開発における製造プロセス概要

製造プロセス	原薬製造場所	バイオリアクタースケール	ドナーウシ血清の種類	製剤製造場所	使用した試験
初期製法*	Sanofi（旧 Genzyme）: Framingham、Massachusetts 州、USA	[redacted]L	[redacted]	Sanofi: Framingham、Massachusetts 州、USA	非臨床薬理、動態、毒性 臨床: 第 Ia 相
製法A*	Sanofi: Framingham、Massachusetts 州、USA	[redacted]L	[redacted]	Sanofi: Framingham、Massachusetts 州、USA 又は Sanofi: Frankfurt、Germany	非臨床動態、毒性 臨床: 第 Ib 相 第 II / III 相 小児第 I / II 相 LTS
製法B* *a*	[redacted]、USA	[redacted]L	[redacted]	Sanofi: Waterford、Ireland	非臨床毒性 臨床: 第 II / III 相及び ETP 小児第 I / II 相 LTS
申請製法* *b*	[redacted]、USA	[redacted]L	[redacted]	Sanofi: Waterford、Ireland	非臨床毒性 臨床: LTS ETP

a 製法B* - 培養ハーベスト期間が[redacted]間。臨床試験 LTS13632、DFI12712、DFI13803 で使用。
b 申請製法* - 培養ハーベスト期間が[redacted]間。市販用製造プロセス。
第 Ia 相試験：SPHINGO0065（成人第 I 相試験）
第 Ib 相試験：DFI13412 (SPHINGO00812) 成人第 I 相試験
第 II / III 相試験：DFI12712 (ASCEND) 成人第 II / III 試験 PAP (primary analysis period) 及び ETP (extension treatment period)
小児第 I / II 相試験: DFI13803 ASCEND-Peds 小児小児第 I / II 相試験
LTS：LTS13632、DFI13412 及び DFI13803 のための長期試験

1.2 酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子ノックアウト（ASMKO）マウスモデル

非臨床試験では、Horinouchi ら(2)によって作製された酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト（ASMKO）マウスを、Sanofi（旧 Genzyme Corporation、USA、Massachusetts 州、Framingham）において使用した。Horinouchi らは、マウス *Asm* 遺伝子のエクソン 2 にネオマイシン耐性（neo）遺伝子を遺伝子ターゲティングにより挿入し、コーディング領域を破壊した。この *Asm* 遺伝子破壊についてのホモ接合型マウスは酵素活性が欠失し、ヒト ASMD と類似した様式でスフィンゴミエリンが蓄積する。

この ASMKO マウスモデルは、「NPD A 型の確実なモデル」である(2)。このマウスは出生時には外見上正常であり、約 8 週齢で初めて運動失調及び軽度の振戦の表現型が現れる。12～16 週齢までに嗜

＊新薬承認情報提供時に置換

眠、刺激に対する無反応、及び疾患の進行による摂餌困難の状態となる。4 か月齢までに重度の運動失調を発症し、6～8 か月齢で死亡する。

ASMKO マウスでは ASM 酵素活性が欠失していることから、このマウスにオリプダーゼ アルファを臨床的に意義のある用量で投与したときの薬物動態（PK）、組織分布及び薬力学（PD）を評価することができる。ASMKO マウスでは、肝臓、脾臓及び肺といった標的臓器にスフィンゴミエリンが蓄積するため、これを用いてオリプダーゼ アルファ投与による薬力学的作用としてスフィンゴミエリン減少作用を評価することができる。この動物は神経障害型 ASMD と類似した顕著な神経学的表現型を示すが、オリプダーゼ アルファは血液脳関門を通過しないため、非臨床試験でこの表現型に関する評価は実施しなかった。また、ASMKO マウスでは ASMD の特徴である臓器肥大が認められない。ASMKO マウスは、表現型に違いがあるものの、スフィンゴミエリン除去効果を評価するための優れたモデルであり、オリプダーゼ アルファの適切な用量及び投与法に関する知見を与えるものである(3)。

1.3 試験計画

上記の背景及び情報に基づき、オリプダーゼ アルファを一連の非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験で評価した。これらの試験は、オリプダーゼ アルファの非臨床安全性及び *in vivo* 動物モデルにおける有効性を評価することを目的として実施した。

オリプダーゼ アルファ 初期製法及び製法A*、 製法A及び製法B* 、並びに 製法B及び申請製法* の分析による同等性／同質性評価の結果、種々のプロセスの同等性／同質性が確認された（Module [3.2.S.2.6] 「製造工程の開発の経緯」参照）。したがって、この試験計画においてこれらの様々なスケール／プロセスを採用した試験結果は、スケール／プロセス全体を通して評価することが可能で、実生産スケールを支持するのに妥当なものである。

薬理試験は、試験施設内での方法及び手順に従って実施しており、予見することができなかった結果の信頼性及び解釈に影響を及ぼす疑いのある事態はなかった。効力を裏付ける試験では、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを様々な用量及び投与法で投与したときの標的組織におけるスフィンゴミエリンの減少を評価するとともに、スフィンゴミエリンの減少及び再蓄積の経時変化を測定した。オリプダーゼ アルファのロット間変動、高分子量体（HMWS）の含量、製造プロセス変更に伴う評価も実施した。製造プロセスの概要については表 2 を参照。副次的薬理試験では、ASMKO マウスに高用量のオリプダーゼ アルファを投与したときに認められた毒性のメカニズムを検討するため、サイトカイン、急性期タンパク質及びセラミドのプロファイルを評価した。

＊新薬承認情報提供時に置換

薬物動態及び毒性試験は、毒性試験に使用した動物種を含む非臨床試験動物種にオリプダーゼ アルファを静脈内（IV）投与したときの曝露量を適切に評価できるようにデザインした。ASMKO マウスを用いた試験で、オリプダーゼ アルファの標的臓器への組織分布を評価した。トキシコキネティクスパラメータを、単回投与毒性試験（ラット及びビーグル犬）、反復投与毒性試験（ラット及びカニクイザル）及び胚・胎児発生に関する試験（正常マウス及びウサギ）で測定した。また、毒性試験で抗オリプダーゼ アルファ抗体（ADA）の産生について評価を行い、曝露量に対する ADA の影響及び毒性と ADA 産生との関連性を検討した。

オリプダーゼ アルファの安全性プロファイルは、ASMKO マウス、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、Sprague Dawley（SD）ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いた予備検討を含む単回及び反復投与毒性試験において評価した。CD-1 マウス及びニュージーランドホワイト（NZW）ウサギを用いた生殖発生毒性試験も実施した。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の独立した安全性薬理試験をカニクイザルで実施するとともに、ビーグル犬を用いた GLP 適用のオリプダーゼ アルファ単回投与試験の一部として心血管系、呼吸系及び中枢神経系の評価を行った。

In vivo 毒性試験に用いる動物種は、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、SD ラット、NZW ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルとした。これらの動物種は、それぞれの毒性試験で標準的に使用されていること、頑健な背景データベースがあること、並びに細胞にオリプダーゼ アルファを取り込みライソゾームへ輸送させるマンノース受容体及びマンノース-6-リン酸受容体が存在しているため、薬理学的に意義があると考えられたことに基づいて選択した。

オリプダーゼ アルファの毒性及びスフィンゴミエリン異化代謝産物産生作用の評価には、標準的な非臨床試験動物種のほかに ASMKO マウスモデルも使用した。

オリプダーゼ アルファの非臨床試験は、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 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FDA ドラフトガイダンス「Investigational Enzyme Replacement Therapy Products: Nonclinical Assessment（治験用酵素補充治療薬：非臨床評価）」（2015 年 5 月）を考慮してデザインした。

重要な非臨床毒性及び安全性薬理試験は、1 試験を除き GLP 適用下で適切に実施した。マウス 13 週間試験[[redacted]-00262 試験]は ASMKO マウスを用いて当局の要請により実施したが、動物の脆弱性のため遠方の GLP 試験委託研究機関までの長距離を輸送することができなかったことから、既に GLP 体制を閉鎖していた Sanofi（旧 Genzyme）社内にて非 GLP 下で実施した。ただし、本試験は標準的社内手順に従って実施し、試験の信頼性に影響を及ぼすような不測の事態はなかった。また試験実施中に記録された逸脱は軽微であり、試験の完全性及び解釈に有害な影響を及ぼさないと考えられた。

標準的ながん原性試験は、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」及び FDA ドラフトガイダンス「Investigational Enzyme Replacement Therapy Products: Nonclinical Assessment（治験用酵素補充治療薬：非臨床評価）」（2015 年 5 月）によると、バイオ医薬品においては一般的に必要ないと考えられている。オリプダーゼ アルファは血液脳関門を通過しないため、薬物乱用性試験は必要ないと考えられた。その他、代謝及び排泄試験、遺伝毒性試験などは、オリプダーゼ アルファの本申請適応症での承認申請には適切ではないか、又は必要ないため、これらの非臨床試験は実施しなかった。これらの試験を実施しなかった理由を7.1項に記載した。

2　薬理試験

効力を裏付ける試験では、オリプダーゼ アルファの有効性を評価するため、ASMKO マウスを用いて標的組織におけるスフィンゴミエリンの減少及び再蓄積を生化学アッセイで測定した。副次的薬理試験では、ASMKO マウス、ASMKO ヘテロ接合型マウス及び C57BL/6 マウスを用いて、サイトカイン、急性期タンパク質及びスフィンゴミエリン分解産物の濃度を測定した。これらの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験では、オリプダーゼ アルファの様々な用量及び投与法を評価した。ASMKO マウス、C57BL/6 マウス、カニクイザル及びビーグル犬を用いたオリプダーゼ アルファの安全性薬理試験も実施した。実施した薬理試験の要約を表 3及び Module 2.6.3 [表 2.6.3.1]に示す。

表 3 - 薬理試験の概要

試験の種類	動物種	GLP 適用	投与経路	オリプダーゼ アルファの用量 (mg/kg)	ロット（プロセス）	試験番号
効力を裏付ける試験	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	5	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0110Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0428Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0129Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted] 初期製法*	[redacted]-1223Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	5	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0495Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0790Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1 及び 3	[redacted] 製法A* [redacted] 製法B*	[redacted]-06259
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0.1、0.3 及び 1	[redacted] 初期製法*	[redacted]-1084Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0.3、1.0 及び 3	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0813Pnp
副次的薬理試験	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted] 初期製法*	[redacted]-1008Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0127Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0.3、3 及び 10	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0374Pnp
	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0436Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1、4、6 及び 8 日目に 3 mg/kg、11 日目に 20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0437Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1 日目に 3 mg/kg、3 日目に 20 mg/kg	[redacted] 初期製法*	[redacted]-1009Pnp

＊新薬承認情報提供時に置換

2.4 非臨床試験の概括評価
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

試験の種類	動物種	GLP 適用	投与経路	オリプダーゼ アルファの用量 (mg/kg)	ロット（プロセス）	試験番号
副次的薬理試験（続き）	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1 日目に 3 mg/kg、6 日目に 3 mg/kg	[redacted]初期製法*	[redacted]-1010Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1 日目に 3 mg/kg、6 日目に 20 mg/kg	[redacted]初期製法*	[redacted]-1240Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted]初期製法*	[redacted]-0129Pnp
	ASMKO、ASM ヘテロ接合型及び C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	1、3、10 及び 20	[redacted]初期製法*	[redacted]-0778
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	10 及び 20	[redacted]初期製法*	[redacted]-1346
	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	10	[redacted]初期製法*	[redacted]-1511
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3 mg/kg 又は 3 mg/kg 隔日を 4 回投与後 20 mg/kg	[redacted]初期製法*	[redacted]-1578
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted]製法A*	[redacted]-04646
安全性薬理試験	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3.0、10 及び 20、単回又は反復投与	[redacted]初期製法*	[redacted]-0533Pnp
	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted]初期製法*	[redacted]-0302Pnp
	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted]初期製法*	[redacted]-0292Pnp
	カニクイザル	適用	持続静注	30	[redacted]初期製法*	[redacted]002
	ビーグル犬	適用	ボーラス静注	3.0、10 及び 30	[redacted]初期製法*	[redacted]026
薬力学的薬物相互作用試験	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1	[redacted]製法B*	[redacted]-01094

略号：ASMKO: 酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト

2.1 効力を裏付ける試験

ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを1、3又は5 mg/kgの用量で単回静脈内投与した試験では、肝臓、脾臓、腎臓及び肺においてスフィンゴミエリンが有意に減少した。ASMKOマウスに1又は5 mg/kgの用量で単回投与したとき、評価したいずれの組織においても投与後2～4週間でスフィンゴミエリンが再蓄積し始めた又は背景レベルまで戻ったことから、隔週投与法でスフィンゴミエリンの最大減少が得られることが支持された。ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを0.1、0.3、1又は3 mg/kgの用量で隔週投与により6～7回投与したとき、最終投与後24時間にスフィンゴミエリンの顕著な減少

＊新薬承認情報提供時に置換

が、肝臓（全用量とも 90%超）及び脾臓（0.1 mg/kg で最大 80%、評価したその他全ての用量で 95%超）で認められた。肺中スフィンゴミエリン濃度は、1 及び 3 mg/kg の用量でそれぞれ 61%及び 58%低下した。これらの結果から、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを隔週投与したとき、特定の組織で効果が見られることが裏付けられた。

オリプダーゼ アルファの製造プロセスが開発中に変更されたことから、 製法A* と 製法B* の薬力学的同等性／同質性比較を実施した（Module [3.2.S.2.6]「製造工程の開発の経緯」参照）。製法A* 又は製法B* により製造されたオリプダーゼ アルファを単回静脈内投与後 3 日目に、肝臓、脾臓及び腎臓中のスフィンゴミエリン濃度を測定した。また、投与 10、45、120 及び 540 分後にセラミド分析用に血液を採取した。スフィンゴミエリン減少又はセラミド産生における統計的差異は認められなかった。したがって、オリプダーゼ アルファの効力は、 製法A* と 製法B* の間で同等／同質と判断された。

2.2 副次的薬理試験

ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 10 mg/kg 以上の用量で投与したとき、有害な作用（死亡を含む）が認められた。これらの有害な作用を評価する試験を ASMKO 及び C57BL/6 マウスで実施した。ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3、10 又は 20 mg/kg の用量で単回投与したとき、用量反応的なサイトカイン（IL-6、G-CSF、IL-1α、IL-1β 及びマクロファージ炎症性タンパク質［MIP］-1α）の増加が認められたが、オリプダーゼ アルファを ASMKO マウスに 0.3 mg/kg の用量で投与したとき又は C57BL/6 マウスに 20 mg/kg の用量で単回投与したときにはサイトカインの明らかな増加は認められなかった。ASMKO マウスに高用量（10 mg/kg 以上）のオリプダーゼ アルファを投与したとき、サイトカインの濃度増加に加え、蓄積したスフィンゴミエリンの異化代謝産物であるセラミド、スフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸の濃度が上昇した。これらの結果から、より高いオリプダーゼ アルファの用量では、毒性反応を抑制するために用量漸増法が必要である可能性が示唆された。

実際、用量漸増法を使用して、有害な作用を引き起こすことが知られている用量（20 mg/kg）で 11 日目に投与する前に、1、4、6 及び 8 日目に低用量の 3 mg/kg で投与することにより基質を緩やかに減少させると、サイトカイン反応が軽減された。これらのデータから、ASMKO マウスにおけるサイトカイン放出は、基質（スフィンゴミエリン）分解の速度及び量に関連しており、基質の除去を制御するとこれが軽減されるとの仮説が裏付けられた。高用量のオリプダーゼ アルファに対する毒性反応及びこれらの分解産物の増加は、用量漸増法では認められなかった。この試験において、総セラミド及び C16-セラミドの血漿中濃度の上昇と、致死率及び不良な臨床転帰の増加との間に相関性があることが示唆された。これらの結果から、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを投与したときに見られ

＊新薬承認情報提供時に置換

る毒性を軽減又は予防する方法として、用量漸増法を用いた基質減量法が有用であることが裏付けられた。

ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 0.3、3 及び 10 mg/kg の用量で投与し、急性期タンパク質である血清アミロイド A（SAA）及び血清アミロイド P（SAP）(4) を評価した。投与後 24 時間の時点で SAA 及び SAP の増加が認められ、これらの値は投与後 72 時間までに溶媒対照レベルに戻ったか、又は戻る傾向が認められた。このことから、急性期タンパク質の幾つかは、臨床試験において有用な安全性バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

2.3 安全性薬理試験

独立した GLP 適用安全性薬理試験をカニクイザルで実施するとともに、ビーグル犬を用いた GLP 適用のオリプダーゼ アルファ単回投与試験の一部として心血管系、呼吸系及び中枢神経系の評価を行った（それぞれ Module 2.6.2 の [4.4 項] 及び [4.5 項]）。評価項目には、ICH S7A 及び S7B ガイドラインで定義されているコアバッテリーを含めた。その結果、最高用量の 30 mg/kg IV で投与したとき、神経学的行動、心電図（ECG）パラメータ、心拍数、体温、活動性及び呼吸数に被験物質に関連した変化は認められなかった。

ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg 以上の用量で投与したとき、スフィンゴミエリン分解産物に起因する用量依存的な心拍数及び血圧の変化が認められた。

2.4 薬力学的薬物相互作用試験

2 つの酸性スフィンゴミエリナーゼ機能的阻害薬（FIASMA）の潜在的薬力学的薬物相互作用を評価するために 1 つの試験を実施した。FIASMA は、ASM とライソゾーム膜との相互作用を阻害する可能性のあるカチオン性両親媒性分子の大きな分子群である(5)。FIASMA のほとんどは *in silico* 解析によって同定されたものであるが、実質的な *in vitro* 又は *in vivo* のデータは不足している。ASM に対する予測阻害活性の程度が異なる 2 つの一般的な抗うつ薬（シタロプラム及びフルオキセチン）をオリプダーゼ アルファと同時投与し、薬力学的反応に対する影響を評価した。フルオキセチン及びシタロプラムは、いずれも選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）に属し、*in vitro* で程度の異なる阻害活性を示したため選択した。フルオキセチンは、*in vitro* 阻害薬アッセイでは残存する ASM 活性が約 13% であることからより強力な阻害薬であると予測された一方、シタロプラムでは約 80%の ASM 活性が残存していた(6)。1 mg/kg のオリプダーゼ アルファの単回投与後のスフィンゴミエリン減少に対するフルオキセチンとシタロプラムの効果を、ASMKO マウスの脾臓と肝臓で評価した。フルオキセチンは、ASM の強固な阻害を示すこれまでの *in vitro* 試験成績(6)にもかかわらず、オリプダーゼ アルファ

が媒介する肝臓及び脾臓のスフィンゴミエリン減少に影響を及ぼさなかった。シタロプラムの同時投与は、肝臓におけるオリプダーゼ アルファが媒介するスフィンゴミエリンクリアランスに影響を及ぼさなかった。しかしながら、脾臓スフィンゴミエリン含量は、シタロプラムとオリプダーゼ アルファの同時投与後、溶媒対照と比較して有意に低下しなかった。これらの含量は、オリプダーゼ アルファを単独投与した動物の脾臓中スフィンゴミエリン含量と有意差がなかったことから、この結果はシタロプラム阻害の真の作用ではなく、この用量における薬力学的作用のばらつきを反映している可能性が示唆された。阻害薬濃度はシタロプラム及びフルオキセチン共に治療域の下限にあり、これらの結果の解釈には限界があった。この試験のデータから、フルオキセチンは *in vivo* では FIASMA ではないことが示唆されたが、シタロプラムの阻害活性に関して結論づけることはできなかった。

3　薬物動態試験

オリプダーゼ アルファの薬物動態（PK）、組織分布及びトキシコキネティクス（TK）特性を評価するため、包括的非臨床試験を実施した。C57BL/6 マウス及び酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子ノックアウト（ASMKO）マウスを用いた単回静脈内投与試験でオリプダーゼ アルファの PK 及び組織分布を評価した。これらの試験では用量として 1、3、5 及び 10 mg/kg を使用した。さらに、ASMKO マウスを用いた試験を実施し、放射性標識オリプダーゼ アルファを 5 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの脳内分布を評価した。また、ASMKO マウスを用いた用量 0.3、1 及び 3 mg/kg でのオリプダーゼ アルファの反復投与試験における組織分布も評価した。

毒性試験の一部として、SD ラットに用量 3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを単回静脈内投与したときの TK 及び肝臓内分布を評価するとともに、ビーグル犬に用量 3、10 及び 30 mg/kg、カニクイザルに用量 30 mg/kg を単回静脈内投与したときの TK も評価した。さらに、カニクイザル、妊娠 CD-1 マウス及び妊娠 NZW ウサギに用量 3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを反復投与したときの TK も評価した。オリプダーゼ アルファはタンパク質性医薬品であり、非飽和性の蛋白質分解異化経路により除去されると予想されることから、代謝及び排泄試験は実施しなかった。

実施した PK、組織分布及び TK 試験の概要を表 4及び Module 2.6.5 [表 2.6.5.1]に示す。

表 4 - 薬物動態／トキシコキネティクス及び組織分布試験の概要

試験の種類	動物種	GLP 適用	投与経路	投与量 (mg/kg)	ロット（プロセス）	試験番号
単回投与時の PK	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1, 5	[redacted]初期製法*	[redacted]-0986Pnp
単回投与時の PK	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted]初期製法*	[redacted]-0841Pnp
単回投与時の PK	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	10	[redacted]初期製法*	[redacted]-0134Pnp
単回投与時の PK	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted]初期製法*	[redacted]-03252
単回投与時の PK	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1	[redacted]初期製法*	[redacted]-0266Pnp
単回投与時の PK	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted]初期製法*	[redacted]-0142Pnp
単回投与時の TK	SD ラット	適用	ボーラス静注	3, 10, 30	[redacted]初期製法*	[redacted]-0622Pnp (02025)
単回投与時の TK	ビーグル犬	適用	ボーラス静注	3, 10, 30	[redacted]初期製法*	[redacted]-0623Pnp (02026)
単回投与時の TK	カニクイザル	適用	持続静注	30	[redacted]初期製法*	[redacted]002

＊新薬承認情報提供時に置換

2.4 非臨床試験の概括評価
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

試験の種類	動物種	GLP 適用	投与経路	投与量 (mg/kg)	ロット （プロセス）	試験番号
反復投与時の TK	SD ラット	適用	ボーラス静注	3, 10, 30（隔週）	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0604Pnp ([redacted]027)
反復投与時の TK	カニクイザル	適用	持続静注	3, 10, 30（隔週）	[redacted] 初期製法*	[redacted]007
反復投与時の TK	CD-1 マウス	適用	ボーラス静注	3, 10, 30（1 日 1 回 10 日間）	[redacted] 製法B*	TER0694
反復投与時の TK	NZW ウサギ	適用	持続静注	3, 10, 30（1 日 1 回 14 日間）	[redacted] 申請製法*	TER0698
単回投与時の BD	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	5	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0715Pnp
単回投与時の BD	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	1	[redacted] 初期製法*	[redacted]0266Pnp
単回投与時の BD	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0142Pnp
単回投与時の BD	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	5	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0380Pnp
単回投与時の BD	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	3	[redacted] 初期製法*	[redacted]0094Pnp
反復投与時の BD	SD ラット	適用	ボーラス静注	3, 10, 30（隔週）	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0604Pnp ([redacted]027)
反復投与時の BD	ASMKO マウス	適用	ボーラス静注	0.3, 1, 3（隔週）	[redacted] 初期製法*	[redacted]-0813Pnp ([redacted]005)

略号: ASMKO: 酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト、PK: 薬物動態、BD: 組織分布、SD: Sprague-Dawley、NZW: ニュージーランドホワイト

3.1 分析法

非臨床試験でのオリプダーゼ アルファの測定は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いて、Sanofi（Framingham, MA, USA）又は [redacted]（[redacted], USA）で実施した。オリプダーゼ アルファの ^{125}I を用いた放射性標識及び定量は Sanofi（Framingham, MA, USA）で実施した。

ELISA 法は抗オリプダーゼ アルファ IgG、IgA 及び IgM 抗体の検出にも使用し、Sanofi（Framingham, MA, USA）又は [redacted]（[redacted], USA）で実施した。

全ての分析法はクオリファイ又はバリデートされたものであり、詳細は Module 2.6.4 [2 項]に示す。これらのクオリファイ又はバリデートされた分析法は、PD、PK 及び毒性試験のデータ評価において、再現性のある結果を得るために使用された。

＊新薬承認情報提供時に置換

3.2　単回投与薬物動態／トキシコキネティクス試験

ASMKO マウスを用いた 4 件の単回投与 PK 試験及び C57BL/6 マウスを用いた 2 件の単回投与 PK 試験が終了している（Module 2.6.4 [4.1 項]参照）。また、SD ラット及びビーグル犬を用いた合計 2 件の単回投与毒性試験及びカニクイザルを用いた安全性薬理試験でオリプダーゼ アルファの TK 特性を評価した（Module 2.6.4 [4.1 項]参照）。

オリプダーゼ アルファを単回投与したときの PK プロファイルは、複数の異なる動物種及び用量を通して同様であった。ASMKO マウスを用いて評価したとき、統計的に有意なクリアランスの低下（24%）及び曝露量の増加（26%）が 初期製法* 製剤の異なるロット間で認められた。これらのロット間で PK パラメータに差が認められた理由は不明であるが、重要な点は、これらの差はオリプダーゼ アルファの PD に影響しなかったことである。実際に、ASMKO マウスの肝臓や脾臓などの標的臓器でのスフィンゴミエリンの減少は、これらオリプダーゼ アルファのロット間で類似しており、認められたクリアランス及び曝露量の差は有効性に対する影響を及ぼさないことが示された。

概して、曝露量を投与量で補正したときの評価より、ラット及びイヌの TK パラメータと投与量（3～30 mg/kg）の間に線形性が認められた。また、概して、雌雄間で TK は類似していた。

3.3　反復投与薬物動態／トキシコキネティクス試験

SD ラット及びカニクイザルを用いた 6 か月間反復投与毒性試験の一部として、オリプダーゼ アルファを 26 週間にわたり隔週反復投与したときの TK を評価した（Module 2.6.6 [3 項]）。さらに、CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の一部として、反復投与時の TK を評価した（Module 2.6.6 [6 項]）。雌雄いずれのラットにおいてもオリプダーゼ アルファ曝露量の増加は用量（3～30 mg/kg）に比例せず、用量が 10 倍増加しても曝露量は約 7 倍しか増加しなかった。また、85 及び 183 日目の 3 及び 30 mg/kg 群の雄ラットでは、雌ラットに比べて、オリプダーゼ アルファ濃度が統計的有意に高く（20～38%）、これに伴い全身曝露量も大きかった（24～37%）。ADA 産生は低頻度で散発的であり、雌雄間で類似しており、オリプダーゼ アルファの曝露量には影響しなかった。

カニクイザルでの初回投与後の TK に用量比例性は認められず、用量増加に伴って、消失半減期は延長し、クリアランスは低下した（Module 2.6.6 [3.3.1 項]参照）。さらに、反復投与に伴うクリアランスの増加及び消失半減期の短縮が認められ、6 回目及び 13 回目投与後の曝露量は初回投与後に比べて約 30～50%低下した。曝露量の低下は ADA 抗体価上昇と相関が認められた。

妊娠 CD-1 マウスに静脈内投与したときの曝露量は用量にほぼ比例した（Module 2.6.6 [6.1.2 項]参照）。オリプダーゼ アルファを投与したマウスの約 25%が ADA 陽性であった。ADA 発現率は、10 及び 30 mg/kg

＊新薬承認情報提供時に置換

投与群のマウス（13%）に比べて、3 mg/kg 投与群のマウス（47%）で高かった。ADA 産生の有無はオリプダーゼ アルファの C_{24h} に影響を及ぼし、ADA 陽性マウスで C_{24h} が最大 73%減少した。しかし、ADA 陽性の個体数が限られていたこと及びオリプダーゼ アルファの C_{24h} に大きな変動が認められたことから、この結果の解釈には注意が必要である。

妊娠 NZW ウサギ（Module 2.6.6 [6.2.1 項]）では、試験した全ての用量において（3、10 及び 30 mg/kg/日）、血清中の全サンプリング期間中、妊娠雌全例にてオリプダーゼ アルファに対する曝露が認められた。オリプダーゼ アルファを投与した妊娠雌 7 匹中 6 匹は妊娠 12 日に ADA 陽性結果を示したが、ADA 発現の有無と妊娠 12 日のオリプダーゼ アルファ曝露量との間に明らかな相関は認められなかった。最高血清中濃度到達時間は全ての妊娠雌で注入終了後 2 又は 10 分のいずれかであった。平均血清中オリプダーゼ アルファ曝露量は、3 mg/kg から 30 mg/kg への用量増加に比例して増加した。平均消失半減期は 3、10 及び 30 mg/kg でそれぞれ 6.36、8.00 及び 8.91 時間であった。平均全身クリアランス（CL）は 3、10 及び 30 mg/kg でそれぞれ 5.13、5.01 及び 4.73 mL/hr/kg であった。平均分布容積は 3、10 及び 30 mg/kg でそれぞれ 46.1、58.0 及び 60.8 mL/kg であった。

概して、動物への 2 週に 1 回反復投与したときに蓄積は認められず、毒性試験で用いられた用量範囲内での曝露量の増加は用量増加比未満であった（SD ラット）。曝露量の性差には一貫した傾向はなく、ADA による曝露量の減少も観察された。

3.4　組織分布試験

C57BL/6 及び ASMKO マウスを用いて組織分布試験を実施し、用量 1、3 又は 5 mg/kg のオリプダーゼ アルファを単回静脈内投与した後、様々な時点で肝臓、脾臓、腎臓及び肺組織中のオリプダーゼ アルファ濃度を測定した（Module 2.6.4[4.1 項]参照）。C57BL/6 マウスに用量 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した組織分布試験では、様々なロット（同じ製造プロセス）のオリプダーゼ アルファの評価を行った。これらの試験の結果から、オリプダーゼ アルファは様々なロットを通して、肝臓、脾臓、腎臓及び肺への分布は、試験、用量及びロットを通して類似していた。

単回投与組織分布試験でオリプダーゼ アルファの大部分は肝臓中（投与量の約 40%）に認められ、腎臓、脾臓及び肺中濃度は肝臓中に比べて低かった（各組織でそれぞれ投与量の 1%未満）。

オリプダーゼ アルファの血液脳関門通過を評価するための組織分布試験において、ASMKO マウスに用量 5 mg/kg の ^{125}I-オリプダーゼ アルファを投与した（Module 2.6.4[4.1.1 項]参照）。最終評価時点である投与後 8 時間まで、脳内にオリプダーゼ アルファは検出されなかった。

ラットを用いた6か月間反復投与慢性毒性試験及びASMKOマウスを用いた12週間反復投与毒性試験において、肝臓中でのオリプダーゼ アルファの残存を検討する目的でオリプダーゼ アルファの肝臓中濃度を測定した（Module 2.6.4 [4.2 項]参照）。26 週間にわたり 2 週に 1 回投与後 24 時間又は 28 日に屠殺したラットの肝臓中オリプダーゼ アルファ濃度を測定したところ、最終投与後 24 時間の雄及び雌ラットの肝臓中オリプダーゼ アルファ濃度は同程度で、用量増加に伴う濃度増加が認められた。最終投与後 28 日の雄及び雌ラットの肝臓中オリプダーゼ アルファ濃度は、全ての用量で同程度であり、生物学的に意味のある濃度のオリプダーゼ アルファの肝臓中での残存は認められなかった。ASMKOマウスを用いた 2 週に 1 回投与による 12 週間反復投与毒性試験でも、最終投与後 24 時間又は 28 日に屠殺し、肝臓中オリプダーゼ アルファ濃度を測定した。最終投与後 24 時間の時点で、1 mg/kg 群のマウス 5 例中 4 例及び 3 mg/kg 群の 5 例中 1 例の肝臓中でオリプダーゼ アルファが検出された。0.3 mg/kg 群及び溶媒投与対照群では、オリプダーゼ アルファは検出されなかった。いずれの投与群でも、最終投与後 28 日にはオリプダーゼ アルファは検出されなかった。

概して、静脈内投与後、オリプダーゼ アルファ主に肝臓に分布し、続いて腎臓、脾臓、肺に分布し、血液脳関門を通過しなかった。

4　毒性試験

ASMKO マウス、CD-1 マウス、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、SD ラット、NZW ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルを用いた一連の毒性試験でオリプダーゼ アルファの安全性プロファイルを検討した。重要な GLP 適用試験として、単回投与試験（ASMKO マウス、SD ラット及びビーグル犬）、3 か月間試験（ASMKO マウス）及び 6 か月間試験（SD ラット及びカニクイザル）を実施した。生殖発生毒性試験として、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する毒性試験（CD-1 マウス）、胚・胎児発生に関する毒性試験（CD-1 マウス及び NZW ウサギ）、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する毒性試験（CD-1 マウス）を実施した。さらに、数々の探索的単回及び反復投与毒性試験を実施した（ASMKO マウス、BALB/c マウス及び C57BL/6 マウス）。局所刺激性は反復投与毒性試験の中で評価した。

オリプダーゼ アルファの非臨床安全性評価を支持する毒性試験の一覧を表 5に示す。

表 5 - 毒性試験の概要

試験の種類	動物種	GLP 適用	投与経路	オリプダーゼ アルファの用量 (mg/kg)	ロット（プロセス）	試験番号
単回投与毒性試験						
単回投与	BALB/c マウス	非適用	ボーラス静注	0, 4, 8, 12	[redacted]初期製法*[redacted]	[redacted]-0032Pnp
単回投与	BALB/c マウス	非適用	ボーラス静注	0, 4, 8, 12	[redacted]初期製法*	[redacted]-0024Pnp
単回投与	C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	75	[redacted]初期製法*	[redacted]-0976Pnp
単回投与	SD ラット	適用	ボーラス静注	0, 3, 10, 30	[redacted]初期製法*	[redacted]025
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	30	[redacted]初期製法*	[redacted]-0788Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	10, 20	[redacted]初期製法*	[redacted]-0047Pnp
単回投与	ASMKO マウス、C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	0, 3, 10	[redacted]初期製法*	[redacted]-0025Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0, 0.1, 0.3, 1.0	[redacted]初期製法*	[redacted]-0158Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0, 10, 20, 30	[redacted]初期製法*	[redacted]-0975Pnp
単回投与	ASMKO マウス、C57BL/6 マウス	非適用	ボーラス静注	0, 20	[redacted]初期製法*	[redacted]-1329
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 10	[redacted]初期製法*	[redacted]-0836Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0, 0.1, 0.3	[redacted]初期製法*	[redacted]-0060Pnp

＊新薬承認情報提供時に置換

2.4 非臨床試験の概括評価
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

試験の種類	動物種	GLP適用	投与経路	オリプダーゼアルファの用量 (mg/kg)	ロット（プロセス）	試験番号
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注、腹腔内	20 NAC：140, 70（腹腔内）	[redacted]初期製法*	[redacted]-0870Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注、腹腔内	20 NAC：140, 70（腹腔内） SAM：165（腹腔内）	[redacted]初期製法*	[redacted]-0839Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	10, 20	[redacted]初期製法*	[redacted]-0058Pnp
単回投与	ASMKO マウス	非適用	皮下	30	[redacted]初期製法*	[redacted]-0741Pnp
単回投与	ASMKO マウス	適用	ボーラス静注	0, 0.03, 0.1, 0.3	[redacted]初期製法*	[redacted]041
単回投与	ビーグル犬	適用	ボーラス静注	0, 3, 10, 30	[redacted]初期製法*	[redacted]026
反復投与毒性試験						
26週間及び4週間回復性	SD ラット	適用	ボーラス静注	0, 3, 10, 30（隔週）	[redacted]初期製法*	[redacted]027
12週間及び4週間回復性	ASMKO マウス	適用	ボーラス静注	0, 0.3, 1, 3（隔週）	[redacted]初期製法*	[redacted]005
13週間及び4週間回復性	ASMKO マウス	適用	ボーラス静注	0, 0.3, 1, 3（隔週）	[redacted]初期製法*	[redacted]031
1日にわたる反復投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	5（2時間ごとに4回）	[redacted]初期製法*	[redacted]-0506Pnp
6日間用量漸増投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	0, 3, 20, 30（Day 1に3、Day 6に0, 20, 30のどれか）	[redacted]初期製法*	[redacted]0099Pnp
6日間用量漸増投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 10, 30（Day 1に3、Day 6に30か Day 8に10）	[redacted]初期製法*	[redacted]-0505Pnp
3日間用量漸増投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 20（Day 1に3、Day 3に20）	[redacted]初期製法*	[redacted]-1239Pnp
11日間用量漸増投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 20（Day 1, 4, 6, 8に3、Day 11に20）	[redacted]初期製法*	[redacted]-0889Pnp
13週間用量漸増投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 10, 30（3を隔週で4回の後に隔週で3, 10, 30）	[redacted]初期製法*	[redacted]-00262
13週間用量漸増投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 20（第1群は隔日3で Day 9に20、第2群は毎週3で Day 29に20、第3群は隔週3で Day 57に20）	[redacted]初期製法*	[redacted]-03293
26週間及び4週間回復性	カニクイザル	適用	持続静注	0, 3, 10, 30（隔週）	[redacted]初期製法*	[redacted]007

＊新薬承認情報提供時に置換

試験の種類	動物種	GLP 適用	投与経路	オリプダーゼ アルファの用量 (mg/kg)	ロット（プロセス）	試験番号
生殖発生毒性試験						
受胎能	CD-1 マウス	適用	ボーラス静注	0, 3.16, 10, 30（隔日） 雄：同居 28 日前～同居期間中 雌：同居 15 日前～同居期間中～妊娠 7 日	[redacted] 製法B*	FER0510
胚・胎児	CD-1 マウス	適用	ボーラス静注	0, 3, 10, 30（1 日 1 回） 妊娠 6～15 日	[redacted] 製法B*	TER0694
胚・胎児	NZW ウサギ	適用	持続静注	0, 3, 10, 30（1 日 1 回） 妊娠 6～19 日	[redacted] 申請製法*	TER0698
出生前及び出生後の発生	CD-1 マウス	適用	ボーラス静注	0, 3.16, 10, 30（隔日） 妊娠 6 日～ 授乳 21/22 日	[redacted] 製法B*	DPN0380
その他の毒性試験						
溶血性	該当せず	適用	該当せず	1.1 mg/mL	[redacted] 初期製法* [redacted]009	
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	20	[redacted] 初期製法* [redacted]-0372Pnp	
単回投与	ASMKO マウス	非適用	ボーラス静注	3, 10	[redacted] 製法A* [redacted]-02784	

略号：ASMKO: 酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト、SD: Sprague-Dawley、NZW: ニュージーランドホワイト
GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、NAC=N-アセチル-L-システイン、SAM=S-アデノシル-L-メチオニン

4.1 単回投与毒性試験

4.1.1 げっ歯類ーBALB/c マウス、C57BL/6 マウス及び SD ラット

探索的単回投与毒性試験では、BALB/c マウスに 0、4、8 及び 12 mg/kg の用量で、C57BL/6 マウスに 75 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した（Module 2.6.6 [2.1 項]参照）。オリプダーゼ アルファの最大耐量は、BALB/c マウスで 12 mg/kg（投与可能な最大用量）、C57BL/6 マウスで 75 mg/kg であった。

GLP 適用単回投与毒性試験では、SD ラットに 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを単回 IV ボーラス投与した（Module 2.6.6 [2.1.3 項]参照）。試験成績から、無毒性量（NOAEL）及び無影響量（NOEL）は 30 mg/kg と判断した。

4.1.2 げっ歯類ーASMKO マウス

＊新薬承認情報提供時に置換

ASMKOマウスを用いた単回投与毒性試験では、10 mg/kg以上のオリプダーゼ アルファを急速IVボーラス投与すると死亡が発現した（Module 2.6.6 [2.2 項]参照）。一般状態所見（嗜眠、接触時冷感、移動を嫌がる）と合わせて病理組織学的検査で副腎に出血が認められたことから、低血圧性ショックが死因である可能性が示唆された。これらの所見は、蓄積したスフィンゴミエリンの異化代謝産物であるセラミド､スフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸の血清中濃度の増加に付随して発現した。サイトカイン及び急性期タンパク質などの炎症性物質の血清中濃度も増加した。病理組織学的検査では肝臓及び副腎の両方で用量依存的な所見が観察され、肝臓及び副腎では限局的な壊死及びアポトーシスが、副腎では出血も認められた。これらの試験から、C57BL/6マウスにオリプダーゼ アルファを単回投与したときのNOAELは10 mg/kgであり、ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを単回投与したときのNOAELは0.3 mg/kgであった。同程度の用量のオリプダーゼ アルファをBALB/cマウス、C57BL/6マウス、ラット、イヌ及びサルに投与しても毒性所見が認められなかったことから、ASMKOマウスで認められた用量依存的な毒性所見は基質の分解速度及び量に起因する可能性が示唆された。

オリプダーゼ アルファに関連する毒性、及び肝臓のアポトーシスが一般状態の毒性徴候に及ぼす影響を更に検討するため､追加試験を実施した（Module 2.6.6 [2.2.6 項]参照）。ASMKOマウス及びC57BL/6マウスに、0及び20 mg/kgのオリプダーゼ アルファを単回投与した。この試験では、溶媒を投与されたASMKOマウス、又は溶媒若しくはオリプダーゼ アルファを投与されたC57BL/6マウスに比べ、オリプダーゼ アルファを投与されたASMKOマウスで肝臓内のアポトーシス細胞の割合が経時的に（投与2、6及び18時間後）増加した。オリプダーゼ アルファ投与により発現するアポトーシスは軽微であり、肝臓の実質は破壊されなかったことから、投与後に認められた一般状態所見の重症度に明確に関与する可能性は低い。

その他の試験では､オリプダーゼ アルファを皮下投与したとき（Module 2.6.6 [2.2.9 項]参照）､ASMKOヘテロ接合型マウス若しくは脾臓摘出ASMKOマウスに投与したとき、又は腫瘍壊死因子-α（TNF-α）阻害薬と併用したとき（Module 2.6.6 [2.2.4 項]参照）のいずれかにより毒性が抑制されるか否かを検討した。ASMKOヘテロ接合型マウスでは、オリプダーゼ アルファを30 mg/kgまでの用量で投与しても毒性が発現しなかった。脾臓摘出ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを投与したところ､10 mg/kgの用量では死亡は発現しなかったが、20 mg/kgの用量では脾臓を摘出していないASMKOマウスよりも遅い時点ながら死亡が発現した。オリプダーゼ アルファを皮下投与すると、一般状態の毒性所見が発現する時点が遅延した。ただし､病理組織学的検査ではIV投与と同様の毒性所見が発現した。TNF-α阻害薬をオリプダーゼ アルファと併用投与しても毒性は抑制されなかった。これらの結果からも、ASMKOマウスで認められた毒性は基質の分解速度及び量に起因するとの仮説が確認された。

上記の仮説に基づき、ASMKOマウスでスフィンゴミエリン蓄積量が増加すると毒性が悪化するか否かを調べる探索的試験を実施した。従来、ASMKOマウスの試験では8～10週齢の動物を使用していたが、この週齢では未処置時の基質レベルが低い。基質蓄積量と毒性との関連をより深く調べるた

め、22～28 週齢の ASMKO マウスに 0.1～10 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与して毒性を観察した（Module 2.6.6 [2.2.7 項]参照）。病理組織学的検査において、22～28 週齢の ASMKO マウスでは 0.3 mg/kg 群のみでオリプダーゼ アルファ投与の影響が認められた。これらの所見は 8～10 週齢のマウスで観察された所見（Module 2.6.6 [2.2.3 項]参照）に類似している。つまり、22～28 週齢の ASMKO マウスではスフィンゴミエリン蓄積量が増加しているが、低用量（0.1 又は 0.3 mg/kg）のオリプダーゼ アルファ投与後の毒性が 8～10 週齢の ASMKO マウスに比べて悪化するわけではなかった。なお、高齢の ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファ 10 mg/kg を投与したところ、スフィンゴミエリン蓄積量が低い若齢マウスよりも早期にオリプダーゼ アルファを介した毒性が発現した。

GLP 適用単回投与毒性試験において、ASMKO マウスに 0.03、0.1 又は 0.3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを IV ボーラス投与した（Module 2.6.6 [2.2.10 項]参照）。肉眼検査、血液生化学的検査、血液学的検査、一般状態観察及び体重のパラメータにおいてオリプダーゼ アルファに関連する変化は認められなかったことから、NOEL は 0.1 mg/kg と判断した。病理組織学的所見として肝臓の炎症病巣がごく軽度増加したが、これに対応した肝酵素の増加がなかったことから、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを IV 投与したときの NOAEL は、最高用量である 0.3 mg/kg と判断した。

4.1.3 非げっ歯類

GLP 適用単回投与毒性試験において、ビーグル犬に 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを単回 IV ボーラス投与した（Module 2.6.6 [2.3.1 項]参照）。オリプダーゼ アルファの忍容性は良好で投与に関連する毒性所見は見られなかった。本試験の成績から、NOAEL は検討した最高用量である 30 mg/kg と判断した。

4.2 反復投与毒性試験

4.2.1 げっ歯類－正常ラット

GLP 適用反復投与毒性試験において、SD ラットに 0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔週で 26 週間 IV ボーラス投与した後、4 週間の回復期間を設けた（Module 2.6.6 [3.1.1 項]参照）。本試験で顕著な毒性所見は認められず、NOAEL は 30 mg/kg と判断した。

4.2.2 げっ歯類－ASMKO マウス

ASMKO マウスを用いて 2 件の GLP 適用反復投与毒性試験を実施した（Module 2.6.6 [3.2.1 項]、[3.2.2 項]参照）。いずれの試験でも、ASMKO マウスに 0、0.3、1 及び 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔週で 12 又は 13 週間 IV ボーラス投与した。2 つ目の 06031 試験では、各群の個体数を 20 匹／

性に増加した。これらの試験条件下で、雌雄 ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを隔週で 12 又は 13 週間 IV 投与したときの忍容性は良好であり、NOAEL は 3 mg/kg であった。

ASMKO マウスを用いて、用法を変えてスフィンゴミエリン濃度減少を調節することで、オリプダーゼ アルファを高用量で単回投与したときの毒性が軽減されるか否かを調べる探索的反復投与試験を実施した（Module 2.6.6 [3.2.3 項]参照）。ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV ボーラス投与した後、その 3 日後に 20 mg/kg を単回 IV ボーラス投与したところ、顕著な毒性は抑制され、全例が生存した。本用量漸増法により血清中のサイトカイン及びセラミド濃度も減少した。

用量漸増法を更に探索するため、ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV ボーラス投与した後、3、10 又は 30 mg/kg の用量を隔週で 13 週間 IV ボーラス投与した。この結果から、雌雄 ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを用量漸増相に続いて隔週で 13 週間投与したところ、NOAEL は検討した最高用量である 30 mg/kg であった。最後の用量漸増試験では、用量漸増相で 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与する時期を隔日、毎週又は隔週として検討した。隔日及び毎週の用量漸増投与の忍容性は良好であった。ただし、オリプダーゼ アルファを隔週で用量漸増投与してから高用量を投与することは可能であったが、本群の 1 匹が死亡し、病理組織学的所見は先に高用量のオリプダーゼ アルファ投与により認められた毒性に一致していたことから、ASMKO マウスにおいて隔週投与は他の用法ほど忍容性が良好ではないことが示された。

これらの結果から、高用量のオリプダーゼ アルファによる毒性は、用量漸増投与によりスフィンゴミエリンの分解を調節すると改善されることが示唆された。

4.2.3 非げっ歯類

カニクイザルを用いた 1 件の GLP 適用反復投与毒性試験を実施した。0、3、10 及び 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファの 30 分間 IV 持続投与を隔週で 26 週間実施し、4 週間の回復期間を設けた（Module 2.6.6 [3.3.1 項]参照）。この試験で年齢 2.5～5 歳の思春期前後のサルを用いたが、有害な作用は見られなかった。NOAEL は、検討した最高用量である 30 mg/kg と判断した。

4.3 遺伝毒性試験

オリプダーゼ アルファの非臨床安全性評価プログラムは ICH S6「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」を考慮して計画した。オリプダーゼ アルファは、原薬の構造（組換えヒトタンパク質）、その不純物プロファイル及び最終製剤中の添加剤（Module [3.2.S.3.2]「不純物」、及び Module [3.2.P.4]「添加剤の管理」を参照）に基づくと、遺伝毒性及び変異原性がないと予想され

る。添加剤は全て一般的に使用されているもので、適切な薬局方に適合している。ICH S6 に基づき、オリプダーゼ アルファの変異原性を評価する試験は必要ないと判断し、遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4 がん原性試験

ICH S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」には、バイオ医薬品においては、がん原性に対する懸念がある場合を除き、標準的ながん原性試験は不要であると記載されている。ICH S6 ガイドラインが反映された EMA/CHMP/ICH/731268/1998 には「バイオ医薬品（製剤）の製品特有のがん原性評価の必要性については、臨床対象集団及び投与期間の観点から判断すべきである（ICH S1A ガイドライン参照）」と記載されている。さらに、FDA の産業界向けガイダンス「Investigational enzyme replacement therapy products: nonclinical assessment（治験用酵素補充治療薬：非臨床評価）」のドラフト（2015 年 5 月）では、酵素補充療法（ERT）の薬剤の販売承認を支持するためのがん原性試験は通常必要ないと考えられている。

申請者は、以下に基づくとオリプダーゼ アルファにがん原性はないため更なる評価は必要ないと考えている。

- ラット及びサルでの 6 か月反復投与試験、並びに ASMKO マウスでの 3 か月反復投与試験を含むオリプダーゼ アルファの非臨床毒性試験いずれにおいても、腫瘍性所見及び非腫瘍性の増殖所見は見られなかった。
- オリプダーゼ アルファは DNA と反応する可能性の低いヒト酸性スフィンゴミエリナーゼの組換えタンパク質である。
- 最終製剤の構造は変異原性及びがん原性を示唆する構造を持っていない。
- げっ歯類ではジフェンヒドラミンを併用投与しても過敏性反応が見られるため、オリプダーゼ アルファを長期投与したときに忍容性が得られる可能性が低い。したがって、げっ歯類を用いた長期試験は実施できないと考えられる。
- 酸性スフィンゴミエリナーゼと腫瘍増殖又はがんとの関係に関する公表文献の調査を行った結果、該当する報告は見出されなかった。加えて、オリプダーゼ アルファのファーマコビジランス安全性報告データベースの調査でも悪性新生物に関連する報告はなかった。

以上、本薬はヒト組換えタンパクであることと、毒性試験結果、並びに利用可能なデータベースの調査結果から、科学的根拠の重要度（weight-of-evidence）に基づく評価として、オリプダーゼ アルファによりがんのリスクが増加するという示唆はないと結論した。さらに、げっ歯類に一生涯投与する

と重大な過敏性反応が生じる可能性があるため、がん原性試験で意義のある結果が得られない。申請者は、オリプダーゼ アルファの非臨床がん原性試験は必要ないと考えた。

4.5　生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験、すなわち雌雄 CD-1 マウスを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、妊娠 CD-1 マウスを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する毒性試験、妊娠 CD-1 マウス及び妊娠 NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験において、オリプダーゼ アルファは評価した最高用量（30 mg/kg）でも被験物質に関連する毒性作用を示さなかった（Module 2.6.6 [6 項]参照）。

幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。正常動物を用いた幼若動物毒性試験では、既に実施した毒性試験で得られている以上の新たな情報は得られないと考えられる。ASMKO マウスは最も感受性の高い動物モデルであるが、生殖機能及び神経学的な欠陥があるため、幼若動物毒性試験には使用できない。ASMKO マウスは同腹児数の減少、出生児数の減少、精子運動性の低下及び精子形態の問題といった生殖系の欠陥が認められ、身体サイズが小型でコレステロール濃度が高いとの文献報告がある。ASMKO マウスは 2～4 か月齢までに運動失調及び神経学的障害を発現し、6～8 か月齢で死亡する。オリプダーゼ アルファは血液脳関門を通過しないため（Module 2.6.4 [6.1.1 項]参照）、バックグラウンドとしての神経行動学的異常を、被験物質投与群も対照群も同程度示すことが予想される。これらの異常と、結果として生じる嗜眠及び最終的に死亡に至る点を合わせると、ASMKO マウスの表現型と評価されるべき毒性とを区別することは困難であるため、神経行動学的評価を適切に実施することはできないと考えられる。

4.6　局所刺激性試験

局所刺激性の評価は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の中で実施した。IV 持続投与部位の肉眼観察及び病理組織学的評価の結果、オリプダーゼ アルファ投与に関連する所見は認められなかった（Module 2.6.6 [3.3.1 項]参照）。

4.7　その他の毒性試験

In vitro 溶血試験を実施した結果、オリプダーゼ アルファは溶血性陰性であった（Module 2.6.6 [8.1 項]参照）。

また、ASMKO マウスを用いてオリプダーゼ アルファの様々なロットの毒性を評価し、認められた毒性がロットに起因するものではないことを確認する 2 件の試験を実施した（Module 2.6.6 [8.2 項]参照）。これらの結果から、試験したロットで認められた毒性は、以前毒性が認められたロットと同様であることが示された。

5　総括及び結論

オリプダーゼ アルファの包括的非臨床研究プログラムを、幾つかの動物種、並びに様々な用量及び用法を用いて実施した。皮下投与で評価した 1 試験を除き、いずれの試験でも、静脈内ボーラス投与か、患者に使用される予定の持続静注で動物に投与した。これらの試験から、ASMD マウスモデルにオリプダーゼ アルファを用量漸増法で投与すると、スフィンゴミエリンを安全かつ有効に減少させることが示された。

薬力学的試験は ASMKO マウス及び C57BL/6 マウスを用いて実施した。ASMKO マウスに 1、3 又は 5 mg/kg のオリプダーゼ アルファを単回投与すると、肝臓、脾臓、腎臓及び肺中のスフィンゴミエリン濃度が有意に低下した。最終投与 2～4 週間後に、スフィンゴミエリンは再蓄積が始まるかベースラインレベルまで回復した。このことから、隔週投与によりスフィンゴミエリンの最大減少が得られることが裏付けられる。実際、ASMKO マウスに 0.1、0.3、1 又は 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔週で 6～7 回投与したところ、最終投与後 24 時間にスフィンゴミエリンの顕著な減少が、肝臓（全用量とも 90%超）及び脾臓（0.1 mg/kg で最大 80%、評価したその他全ての用量で 95%超）で認められた。肺中スフィンゴミエリン濃度は、1 及び 3 mg/kg の用量でそれぞれ 61%及び 58%低下した。これらの成績から、ASMKO マウスに隔週投与したとき、特定の組織でオリプダーゼ アルファの効果が見られることが裏付けられる。

薬物動態試験では、隔週反復投与後に蓄積は見られず、毒性試験で試験された用量範囲において全身暴露の増加は用量比よりも少なく（用量比例増加に近いマウスを除く）、曝露における性差の一貫した傾向はなく、ADA による曝露の減少が認められた。肝臓、脾臓、腎臓、及び肺への分布が明らかであり、血液脳関門通過は認められなかった。

BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、SD ラット、ビーグル犬、NZW ウサギ及びカニクイザルを用いて毒性試験を実施した。用法は単回投与、用量漸増投与から ASMD 患者への生涯投与を支持する最長 6 か月間の隔週投与まで多岐に渡った。BALB/C マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、NZW ウサギ、SD ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いて実施した試験で、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり毒性所見は特定されなかった。

重要な毒性試験における用量は、得られたデータに基づいて設定した。高用量として、オリプダーゼ アルファの初期のバッチでは、オリプダーゼ アルファ濃度に基づく最大投与可能量を設定し、その後のバッチでは、臨床で使用予定の最高用量と比較して 10 倍の安全係数が得られる用量を設定した。重要な毒性試験の低用量には臨床最高用量を選択した。

ASMKO マウスはヒト ASMD の表現型と生化学的及び生理学的に類似していることから、このマウスを用いた毒性試験も実施した。ASMKO マウスに単回投与すると 10 mg/kg 以上の用量で急性毒性所見が発現すること、他の全ての種では 30 mg/kg まで毒性が見られないことから、ASMKO マウスは毒性試験の動物種として最も感受性が高いと考えられた。評価した他の非臨床動物種では、オリプダーゼ アルファの投与量及び曝露量が同程度でも毒性所見が見られないことから、ASMKO マウスで認められた被験物質に関連した毒性は基質の分解速度及び量に起因することが示唆された。

その後実施した試験の結果からこの仮説が裏付けられた。ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV 投与し、その 72 時間後に 20 mg/kg を単回 IV 投与したところ、死亡は認められず、その他の毒性所見も重症度が低下し、血清中のサイトカイン及びセラミド濃度の上昇が抑制された。さらに、ASMKO マウスに 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを隔日で 4 回 IV 投与した後、3、10 又は 30 mg/kg の用量を隔週で 13 週間（計 7 回）IV 投与した試験では、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり、NOAEL は 30 mg/kg であった。

オリプダーゼ アルファの曝露量比（動物／ヒト）について、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の NOAEL での曝露量と、ヒトに 3 mg/kg の用量を隔週投与したときの曝露量に基づき要約し、表 6に示す。ラット及びサルを用いた長期毒性試験の曝露量比（ラット及びサルの NOAEL における血清中曝露量／成人 ASMD 患者に対し 3 mg/kg を隔週投与したときの血清中曝露量）はそれぞれ 2.3 倍及び 3.9 倍である。

表 6 - オリプダーゼ アルファの反復投与毒性試験

動物種	試験の種類（期間／投与経路）	投与量	NOAEL	NOAEL における AUC[a, b] (µg•h/mL) 平均±SD	曝露量比[c]
SD ラット	26 週、IV (GLP 適用)	0, 3, 10, 30 mg/kg 隔週	30 mg/kg 隔週	1374 ± 368	2.3 倍
カニクイザル	26 週、IV (GLP 適用)	0, 3, 10, 30 mg/kg 隔週	30 mg/kg 隔週	2393 ± 803	3.9 倍

略号： IV=静脈内、NOAEL=無毒性量、AUC=濃度-時間曲線下面積

a 雌雄併合。

b 最終投与後の曝露量。

c 目標用量 3.0 mg/kg でのヒト定常状態 $AUC_{0-\tau}$ = 607 ±120 µg•h/mL に基づく（Module 2.7.2 [3.1 項]参照）。

CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験において、オリプダーゼ アルファは評価した最高用量（30 mg/kg）でも被験物質に関連する影響を示さなかった。

幼若動物を用いた毒性試験は、ASMKO マウスではこの試験に必要な評価が困難であるため実施しなかった。また、オリプダーゼ アルファは酵素補充療法の薬剤であることから、遺伝毒性、がん原性、薬物乱用に関する試験の実施は必要とされない。

結論として、適切な ICH ガイドライン及び国際ガイダンスに基づき実施されたオリプダーゼ アルファの非臨床試験は、ASMD 患者におけるオリプダーゼ アルファの承認申請を支持するものである。

6　参考文献一覧

1. Pavlu-Pereira H, Asfaw B, Poupctova H, Ledvinova J, Sikora J, Vanier MT, et al. Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. J Inherit Metab Dis. 2005;28:203-27.
2. Horinouchi K, Erlich S, Perl D, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, et al. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. Nat Genet. 1995;10:288-93.
3. Miranda S, He X, Simonaro C, Gatt S, Dagan A, Desnick RJ, et al. Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into Niemann-Pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology. FASEB. 2000;14:1988-95.
4. Gentry PA. Acute Phase Proteins 12b. In: Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Chapter 19. Taylor & Francis. 1999. 336-98.
5. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, et al. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMAs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. Cell Physiol Biochem. 2010;26:9-20.
6. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Terfloth L, Bleich S, Wiltfang J, Gulbins E. Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model. J Med Chem. 2008;51:219-37.

7　付録

7.1　付録 1ーデータ欠損の理由

CTD の項	理由
4.2.2 薬物動態	
4.2.2.4 代謝	タンパク質性医薬品であるオリプダーゼ アルファの代謝経路は一般的に理解されていることから、標準的な代謝試験は実施しなかった[a]（Module 2.6.4 [7 項] 参照)。
4.2.2.5 排泄	オリプダーゼ アルファは酵素補充療法に用いる酵素（タンパク質性医薬品）であり、ライソゾームに取り込まれて分解されると予想されることから、排泄試験は実施しなかった[a]（Module 2.6.4 [8 項] 参照）。
4.2.2.6 薬物動態学的薬物相互作用	オリプダーゼ アルファの薬物動態学的薬物相互作用試験は実施しなかった（Module 2.6.4 [9 項] 参照）。
4.2.2.7 その他の薬物動態試験	その他の PK 試験は実施しなかった（Module 2.6.4 [10 項] 参照）。
4.2.3 毒性試験	
4.2.3.3 遺伝毒性試験 4.2.3.3.1 *In vitro* 試験 4.2.3.3.2 *In vivo* 試験	オリプダーゼ アルファは、原薬の構造（組換えヒトタンパク質）、その不純物プロファイル及び最終製剤中の添加剤（CMC を相互参照）に基づくと遺伝毒性及び変異原性がないと予想される（Module [3.2.S.3.2]「不純物」及び Module [3.2.P.4]「添加剤の管理」参照）。添加剤は全て一般的に使用されているもので、適切な薬局方に適合している。ICH S6 に一致して、オリプダーゼ アルファの変異原性を評価する試験は実施しておらず、オリプダーゼ アルファの遺伝毒性試験は必要ない[a]。さらに、動物を用いた遺伝毒性試験は規制当局から要請されなかった（Module 2.6.6 [4 項] 参照）。
4.2.3.4　がん原性試験	がん原性試験は実施しなかった。科学的根拠の重要度（weight-of-evidence）から、オリプダーゼ アルファによりがんのリスクが増加するとはいえない。さらに、げっ歯類に長期投与すると重大な過敏性反応が生じる可能性があるため、がん原性試験で意義のある結果が得られない。また、動物を用いたがん原性試験は規制当局から要請されなかった（Module 2.6.6 [5 項] 参照）。
4.2.3.5.4 出生児（幼若動物）を用いた試験	幼若動物を用いた試験は実施しなかった。 幼若 ASMKO マウスを用いた毒性試験は適切ではなく、野生型の幼若動物を用いた毒性試験を実施しても、既に実施した毒性試験で得られている以上の新たな情報は得られないと考えられる。ASMKO マウスは最も感受性が高い動物モデルであるが、生殖機能及び神経学的な欠陥があるため、幼若動物毒性試験には使用できない。ASMKO マウスでは、同腹児数の減少、出生児数の減少、精子運動性の低下及び精子形態の問題といった生殖系の欠陥が認められ、身体サイズが小型でコレステロール濃度が高いとの文献報告がある。ASMKO マウスは 2～4 か月齢までに運動失調及び神経学的障害を発症し、6～8 か月齢で死亡する。オリプダーゼ アルファは血液脳関門を通過しないため（Module 2.6.4、[redacted]-0715Pnp 試験参照）運動失調及び振戦といったバックグラウンドの神経行動学的異常は投与群と対照群で同程度となる。これらの異常と、結果として生じる嗜眠及び最終的に死亡に至る点を合わせると、ASMKO の表現型と評価されるべき毒性と区別することは困難であるため、神経行動学的評価は適切に実施できないと考えられる。

CTD の項	理由
4.2.3.6 局所刺激性試験	従来の局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性評価として、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験で投与動物の IV 持続投与部位（肉眼観察、剖検及び病理組織学的検査）を評価した。IV 持続投与部位においてオリプダーゼ アルファに関連する毒性所見は見られなかった。
4.2.3.7.1 抗原性試験 4.2.3.7.2 免疫毒性試験 4.2.3.7.3 毒性発現の機序に関する試験 4.2.3.7.4 依存性試験 4.2.3.7.5 代謝物の試験 4.2.3.7.6 不純物の毒性試験	一般毒性試験において、試験結果の解釈を補助するためこれらの試験が必要となる所見は見られず、あるいは生物学的製剤には必要ないことから、これらの試験は実施しなかった。

a ICH S6 (R1) ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に基づく根拠