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 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 10

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

表　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　緒言 5

2　　参考文献一覧 10

表　目　次

表 1　製剤の情報.....6

略号と用語の定義

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（ASM knockout）
cDNA：	相補的デオキシリボ核酸（Complementary deoxyribonucleic acid）
CHO：	チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary）
CL：	クリアランス（Clearance）
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）
HMWS：	高分子量体（High molecular weight species）
ICH：	医薬品規制調和国際会議（The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
IV：	静脈内（Intravenous）
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（Pharmacokinetics）
QOW：	隔週（Every other week）
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）
SD：	Sprague-Dawley
TK：	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）

1　緒言

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）は、遺伝子組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼ（rhASM）であり、成人及び小児における非神経型酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）の治療を目的とした酵素補充療法（ERT）の薬剤として開発されている。

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。

酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）が欠損すると、種々の器官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、泡沫細胞の常在組織への浸潤により組織障害が引き起こされ、その結果、器官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。脾臓では、単核食細胞系細胞が、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取り込むため、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、肺は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（肺胞マクロファージが微生物感染に対する第一線防御の一環であるため）。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、より重症になると、脳にも病変が認められる。

2.6.1 緒言
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

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。原薬の名称を表 1に示す。

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

オリプダーゼ アルファは、無菌凍結乾燥粉末として提供され、無菌注射用水を用いて再溶解した後、輸液バッグ又はシリンジ内の注射用0.9%塩化ナトリウムで投与容量に基づく所定の総容量まで更に希釈して持続静注により投与する。本剤は単回使用 20 mL タイプ 1 ガラスバイアルで提供され、各バイアルにはオリプダーゼ アルファ 20 mg を採取できるように充填されている。

ライソゾーム加水分解酵素は、通常、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り込みが促進される。ERT において酵素を静脈内に投与すると、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、分子量が大きく脳血液関門を通過しないため、中枢神経系疾患の症状を変化させることは期待されていない。オリプダーゼ アルファは、医薬品開発用に高度に精製されたものであり、その製剤は天然タンパク質の酵素活性及びライソゾーム局在性を保持している。

ASMD の治療にオリプダーゼ アルファを使用する根拠の証明が、ASM 遺伝子ノックアウト（ASMKO）マウスモデルを用いた非臨床試験結果によって得られた。遺伝子組換え酵素の作用により、脾臓、肝臓、肺及びその他の組織でスフィンゴミエリンが減少し、その結果、臨床転帰としてのスフィンゴミエリンの過剰な蓄積が予防又は改善された。

非臨床薬力学（PD）試験、薬物動態（PK）／トキシコキネティクス（TK）試験、組織分布試験及び毒性試験に基づき、オリプダーゼ アルファの包括的な評価及び統合的な安全性評価を実施し、これらを臨床開発の指針として使用した。臨床的に重要な標的器官で蓄積した基質（スフィンゴミエリン）に対するオリプダーゼ アルファの減少作用を確認するため、予測モデルとして ASMKO マウスを使用した。ASMKO マウスモデルは、疾患の神経型と非神経型の中間的な表現型を有する ASMD の生化学的モデルであり、ヒト疾患における ASMD A/B 型の表現型に最も近く、ASMD の検討及び治療効果の評価に使用されている(2)(3)。

ASMKO マウスはオリプダーセ アルファの安全性及び有効性を評価するために用いられた。これらのマウスにオリプダーゼ アルファを投与すると、蓄積した基質の有意な減少が肝臓、脾臓及び腎臓で最も顕著に、肺でより軽度に認められ、投与を中止した場合又は投与間隔が長い場合には、時間とともに基質が再蓄積した。別の単回及び反復投与試験では、スフィンゴミエリンが用量反応的に減少し、投与 2～4 週間後に再蓄積した。これらのデータから、ASMD においてオリプダーゼ アルファを隔週投与法で使用することが支持された。

更に、高分子量体（HMWS）オリプダーゼ アルファの影響、及びオリプダーゼ アルファの臨床バッチの Process A からのロット間 PK 変動性を評価するための試験も実施した。ASMKO マウスで評価したロット間で、曝露量及びクリアランスに僅かな差が認められた。これらの間で認められた PK パラメータの差の理由は不明であるが、これらの差がオリプダーゼ アルファの組織分布及び PD に影響を及ぼさなかったことに留意することが重要である。

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(4)。FIASMA のほとんどは *in silico* 解析によって同定されたもので、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。フルオキセチンは、ASM の強固な阻害を示すこれまでの *in vitro* 試験成績(5)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、1 mg/kg のオリプダーゼ アルファによる脾臓スフンゴミエリン減少のばらつきが大きかったことから、脾臓における作用は否定することができなかった。阻害薬濃度はシタロプラム及びフルオキセチンとも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。

カニクイザルにおいてオリプダーゼ アルファの持続静注での反復投与に伴い、曝露量の変化並びにクリアランス（CL）の増加及び最終相消失半減期（$t_{1/2}$）の短縮が認められ、これらと相関して抗オリプダーゼ アルファ抗体価が上昇した。組織分布試験において、オリプダーゼ アルファの大半が肝臓に認められ、腎臓、脾臓及び肺でも低濃度ながら認められたが、脳では認められなかった。

安全性薬理試験では、ビーグル犬及びカニクイザルにおける心血管系及び呼吸系機能への影響は認められなかったが、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。

毒性試験を、BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD-1 マウス、Sprague Dawley（SD）ラット、ビーグル犬、ニュージーランドホワイト（NZW）ウサギ及びカニクイザルを用いて実施した。毒性試験に用いる動物種の選択は、これらに対応する種類の試験で標準的に使用されている動物種であること、これらの動物種では十分な背景データがあること、並びに評価した全ての動物種は、細胞にオリプダーゼ アルファを取り込ませ、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(6)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行った。試験で使用した投与法は、単回投与、用量漸増投与から、ASMD 患者での生涯にわたる投与をサポートするための最長 6 か月間の隔週投与まで様々である。BALB/c マウス、C57BL/6 マウス、CD1 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た試験において、オリプダーゼ アルファの忍容性は良好であり、毒性所見は認められなかった。

オリプダーゼ アルファの毒性評価には、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。ASMKO マウスに 10 mg/kg 以上の用量で単回投与したとき急性毒性所見が認められたが、その他の動物種では 30 mg/kg までの用量で毒性所見が認められなかったことから、ASMKO マウスが最も感受性の高い毒性試験動物種であると考えられた。評価したその他の非臨床試験動物種では、オリプダーゼ アルファの同程度の用量及び曝露量で毒性所見は認められなかったことから、ASMKO マウスでみられた用量に関連する毒性は、基質分解の速度及び量に起因することが示唆された。

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 アルファの初期の試験では、オリプダーゼ アルファ濃度に基づく最大投与可能用量を設定し、その後の試験では、臨床で使用予定の高用量と比較して 10 倍の安全係数が得られる用量を設定した（予定最高臨床用量を低用量として設定した）。

ASMKO マウスでみられた毒性の原因がスフィンゴミエリンの異化代謝産物の速やかな蓄積であるという仮説を検証するため、及び保健医療当局の要求に従ってこの動物種での毒性メカニズムを検討するため、用量を徐々に増加させることによりスフィンゴミエリンの減少がより緩やかになり、高用

量のオリプダーゼ アルファの単回投与でみられた毒性が抑制されるか否かを検討する試験を実施した。ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で隔日投与により 4 回静脈内（IV）投与し、72 時間後に 20 mg/kg の用量で単回 IV 投与したとき、死亡は認められず、その他の毒性所見の重症度が低下した。また、この投与法では、血清中サイトカイン及びセラミド濃度の上昇が抑制された。オリプダーゼ アルファの用量 20 mg/kg でのボーラス投与の前に、用量 3 mg/kg での投与を隔日投与ではなく週 1 回投与で行ったときも忍容性は良好であった。更に、ASMKO マウスを用いた試験において、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で隔日投与により 4 回投与した後、3、10 又は 30 mg/kg の用量で 13 週間隔週投与（計 7 回投与）したとき、忍容性は良好であり、無毒性量（NOAEL）は 30 mg/kg であった。

CD-1 マウス及び NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験では、オリプダーゼ アルファの試験最高用量（30 mg/kg）において毒性変化は認められなかった。

以上、広範な非臨床薬理試験、PK 試験及び毒性試験においてオリプダーゼ アルファを詳細に検討した。これらの試験は該当する ICH 及び国際的ガイドラインに従って実施しており、臨床開発プログラムの実施、及び ASMD を適応症とするオリプダーゼ アルファの承認申請を支持するものである。

2　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. Dhami R, He X, Gordon R, Schuchman E. Analysis of the lung pathology and alveolar macrophage function in the acid sphingomyelinase-deficient mouse model of Niemann-Pick disease. Lab Invest. 2001; 81:987-99.
4. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMAs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. Cell Physiol Biochem. 2010;26:9-20.
5. 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.
6. Dhami R, Schuchman E. Mannose 6-Phosphate Receptor-mediated Uptake Is Defective in Acid Sphingomyelinase-deficient Macrophages; Implications for Niemann-Pick Disease Enzyme Replacement Therapy. Journal of Biological Chemistry. 2004; 279:1526-32.

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

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 75

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 6

略号と用語の定義 8

1　　まとめ 10

1.1　動物モデルの説明 12

1.2　分析法の概要 13

1.2.1　スフィンゴミエリンの定量 13

1.2.2　血清及び組織中オリプダーゼ アルファの定量 13

1.2.3　血清中オリプダーゼ アルファ特異的抗体の測定 14

1.2.4　放射性標識オリプダーゼ アルファの定量 14

1.2.5　組織形態計測分析を用いたスフィンゴミエリンの定量 14

1.2.6　セラミド、スフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸の測定 15

1.2.7　血清中サイトカイン濃度の測定 15

1.2.8　免疫組織化学法を用いたアポトーシスの分析 15

2　　効力を裏付ける試験 16

2.1　オリプダーゼ アルファを単回投与したときの薬力学的作用 16

2.2　ASMKOマウスに3ロットのオリプダーゼ アルファを単回投与したときのスフィンゴミエリン減少作用の比較 20

2.3 ASMKOマウスへの単回投与によるオリプダーゼ アルファの2つの製造Process（ 製法A* 及び 製法B* ）の評価 22

2.4 オリプダーゼ アルファの様々な高分子量体化合物によるスフィンゴミエリンの減少及び再蓄積の評価 25

2.5 ASMKOマウスに12週間隔週反復投与したときの用量反応関係 27

3 副次的薬理試験 31

3.1 オリプダーゼ アルファを単回投与したときのスフィンゴミエリンの異化代謝産物及びサイトカインの評価 32

3.2 オリプダーゼ アルファを反復投与したときのサイトカインの評価 36

3.3 オリプダーゼ アルファを単回及び反復投与したときの循環血中セラミドの評価 40

3.4 ASMKOマウスにおける高分子量体オリプダーゼ アルファの評価 48

4 安全性薬理試験 52

4.1 テレメトリー装着覚醒ASMKOマウスにおける心血管系血行動態に対するオリプダーゼ アルファの影響 53

4.2 ASMKOマウスのベースライン心電図データの採取 56

4.3 ECGenieを用いたC57BL/6マウスのベースライン心電図データの採取 59

4.4 カニクイザルにおける心血管系及び呼吸系の評価 61

4.5 イヌを用いたオリプダーゼ アルファの単回静脈内投与毒性試験及び2週間回復性試験 64

5 薬力学的薬物相互作用試験 67

6 考察及び結論 72

参 考 文 献 75

＊新薬承認情報提供時に置換

表 目 次

表 1 - 薬理試験一覧 10

表 2 - オリプダーゼ アルファを単回投与したときのスフィンゴミエリンの減少及び再蓄積（[redacted]-0428Pnp、[redacted]-1223Pnp及び[redacted]-0110Pnp試験） 18

表 3 - [redacted]-0129Pnp試験の試験デザイン 21

表 4 - ASMKOマウスに3種類のロットのオリプダーゼ アルファを3 mg/kgの用量で単回静脈内投与したときの組織中スフィンゴミエリン含量（[redacted]-0129Pnp試験） 22

表 5 - [redacted]-06259試験の試験デザイン 23

表 6 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを0.1、0.3又は1 mg/kgの用量で12週間隔週投与したときの組織中スフィンゴミエリン含量（[redacted]-1084Pnp試験） 29

表 7 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを0.3、1又は3 mg/kgの用量で12週間隔週投与したときの組織中スフィンゴミエリン含量（[redacted]-0813Pnp試験） 30

表 8 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを1日目に3 mg/kg、3日目に20 mg/kgの用量で投与したときのサイトカイン濃度（pg/mL）（[redacted]-1009Pnp試験） 37

表 9 - オリプダーゼ アルファを1日目に3 mg/kg、6日目に20 mg/kgの用量で投与したときのサイトカイン濃度（pg/mL）（[redacted]-1240Pnp及び[redacted]-0127Pnp試験） 37

表 10 - [redacted]-0437Pnp試験の試験デザイン 38

表 11 - [redacted]-04646試験の試験デザイン 48

表 12 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファ及びHMWS-オリプダーゼ アルファ（低、中及び高含量）を3 mg/kgの用量で単回静脈内投与したときの投与後540分の時点におけるサイトカイン及び急性期タンパク質（[redacted]-04646試験） 50

表 13 - [redacted]-0533Pnp試験の試験デザイン 53

表 14 - [redacted]002試験の試験デザイン 62

表 15 - カニクイザルにオリプダーゼ アルファを30 mg/kgの用量で持続静注により単回投与したときのトキシコキネティクスパラメータ（[redacted]002試験） 63

表 16 - [redacted]026試験の試験デザイン 65

表 17 - [redacted]-01094試験の試験デザイン 68

図 目 次

図 1 - オリプダーゼ アルファを単回投与したときの肝臓中スフィンゴミエリンの減少及び再蓄積（[redacted]-0428Pnp、[redacted]-1223Pnp及び[redacted]-0110Pnp試験） 19

図 2 - オリプダーゼ アルファを単回投与したときの脾臓中スフィンゴミエリンの減少及び再蓄積（[redacted]-0428Pnp、[redacted]-1223Pnp及び[redacted]-0110Pnp試験） 20

図 3 - ASMKOマウスに 製法A* 由来オリプダーゼ アルファ及び 製法B* 由来オリプダーゼ アルファを単回投与したときの投与後3日の組織中スフィンゴミエリン濃度（[redacted]-06259試験） 24

図 4 - ASMKOマウスに 製法A* 由来オリプダーゼ アルファ及び 製法B* 由来オリプダーゼ アルファを3 mg/kgの用量で単回投与したときのセラミド濃度（[redacted]-06259試験） 25

図 5 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファ及びHMWS-オリプダーゼ アルファ（低、中、高）を3 mg/kgの用量で単回静脈内投与した後の肝臓、脾臓、腎臓中のスフィンゴミエリン含量（[redacted]-04646試験） 27

図 6 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを隔週投与したときの組織中におけるスフィンゴミエリン含量のMetaMorph®分析（[redacted]-1084Pnp試験） 28

図 7 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときのセラミド濃度（[redacted]-0129Pnp試験） 33

図 8 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの血清中SPH及びS1P濃度（[redacted]-0129Pnp試験） 33

図 9 - 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IL-6濃度（[redacted]-0127Pnp試験及び[redacted]-0374Pnp試験） 34

図 10 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの一酸化窒素濃度（[redacted]-0127Pnp試験） 35

図 11 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを反復投与したときのIL-6濃度（[redacted]-0437Pnp試験） 39

図 12 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを反復投与したときのG-CSF濃度（[redacted]-0437Pnp試験） . 39

図 13 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの生存例及び非生存例における総セラミド濃度（[redacted]-1346試験） 41

図 14 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの生存例及び非生存例におけるC16セラミド濃度（[redacted]-1346試験） 41

図 15 - 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総セラミド濃度（[redacted]-0778試験） 42

＊新薬承認情報提供時に置換

図 16 - 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総セラミド濃度（[redacted]-0778試験）43

図 17 - ASMKO、C57BL/6又はASMKO-HETマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの総セラミド濃度（[redacted]-0778試験）43

図 18 - 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C16-セラミド濃度（[redacted]-0778試験）44

図 19 - ASMKO、ASMKO-HET及び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C16-セラミド濃度（[redacted]-0778試験）45

図 20 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与又はデバルキング投与法（[redacted]-1578及び[redacted]-0129試験）を用いて投与したときのセラミド濃度46

図 21 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与（[redacted]-0129試験）又はデバルキング投与法を用いて投与（[redacted]-1578試験）したときのSPH及びS1P濃度47

図 22 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファ及びHMWS-オリプダーゼ アルファ（低、中及び高含量）を3 mg/kgの用量で単回静脈内投与したときのセラミドの分析（[redacted]-04646試験）49

図 23 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを10又は20 mg/kgの用量で単回投与したときの心拍数（[redacted]-0533Pnp試験）55

図 24 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを3 mg/kgの用量で反復投与したときの心拍数（[redacted]-0533Pnp試験）56

図 25 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの心拍数（[redacted]-0302Pnp試験）58

図 26 - ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときのQT間隔（[redacted]-0302Pnp試験）58

図 27 - C57BL/6及びASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを20 mg/kgの用量で単回投与したときの心拍数（[redacted]-0292Pnp及び[redacted]-0302Pnp試験）61

図 28 - 雌雄のカニクイザルにオリプダーゼ アルファを30 mg/kgの用量で持続静注により単回投与したときの血清中濃度（[redacted]002試験）64

図 29 - オリプダーゼ アルファ（rhASM）投与3日後の肝臓及び脾臓のスフィンゴミエリン含量（平均 ± SD）（[redacted]-01094試験）69

図 30 - 試験3日目及び6日目におけるシタロプラムの血中濃度（平均 ± SD）（[redacted]-01094試験）70

図 31 - 試験3日目及び6日目におけるフルオキセチンの血中濃度（平均 ± SD）（[redacted]-01094試験）70

略号と用語の定義

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）
ASMKO-HET：	酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウトヘテロ接合型（Acid sphingomyelinase knock-out heterozygous）
CDER：	医薬品評価研究センター（Center for Drug Evaluation and Research）
cpm：	1 分間あたりの計数率（Counts per minute）
DAP：	拡張期動脈圧（Diastolic arterial pressure）
DBS：	乾燥血液スポット（Dried blood spot）
ECG：	心電図（Electrocardiogram）
EDTA：	エチレンジアミン四酢酸（Ethylenediaminetetraacetic acid）
ELISA：	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme linked immunosorbent assay）
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）
G-CSF：	顆粒球コロニー形成刺激因子（Granulocyte-colony stimulating factor）
HCO_3^-：	血中重炭酸塩（Blood bicarbonate）
HMWS：	高分子量体（High molecular weight species）
HRP：	西洋ワサビペルオキシダーゼ（Horseradish peroxidase）
ICH：	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
IL：	インターロイキン（Interleukin）
IV：	静脈内（Intravenous）
KC/GRO	ケラチノサイト走化性／成長調節性癌遺伝子（Keratinocyte chemoattractant/growth-regulated oncogene）
LC-MS/MS：	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（Liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry）
MAP：	平均動脈圧（Mean arterial pressure）
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 observable adverse effect level）
NPD：	ニーマン・ピック病（Nieman-Pick disease）
NPDKO：	ニーマン・ピック病遺伝子ノックアウト（Niemann-Pick disease knockout）
OD：	光学濃度（Optical density）

PBS：　リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline）
pCO_2：　二酸化炭素分圧（Partial pressure of carbon dioxide）
PD：　薬力学（Pharmacodynamics）
PK：　薬物動態（Pharmacokinetics）
pO_2：　酸素分圧（Partial pressure of oxygen）
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）
S1P：　スフィンゴシン-1-リン酸（Sphingosine-1-phosphate）
SAA：　血清アミロイド A（Serum amyloid A）
SAP：　血清アミロイド P（Serum amyloid P, systolic arterial pressure）
SSRI：　選択的セロトニン再取り込み阻害薬（Selective serotonin reuptake inhibitors）
TNFα：　腫瘍壊死因子 α（Tumor necrosis factor alpha）
SO_2：　酸素飽和度（Saturated oxygen）
SPH：　スフィンゴシン（Sphingosine）
SPM：　スフィンゴミエリン（Sphingomyelin）
TUNEL：　TUNEL（Terminal transferase dUTP nick end labeling）

1　まとめ

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）の有効性及び安全性を評価する包括的な非臨床試験プログラムを実施した。効力を裏付ける試験では、酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症（ASMD）マウスモデルとして、酸性スフィンゴミエリナーゼノックアウト（ASMKO）マウスを使用した。このモデルの詳細については以下に述べるが、簡単に説明すると、ASMKO マウスは *Asm* 遺伝子の両方の対立遺伝子が破壊されているため、酵素活性が完全に欠乏している。ASMKO マウスの標的組織にスフィンゴミエリンが蓄積するため、このモデルを用いてオリプダーゼ アルファによるスフィンゴミエリン減少効果を評価することができる。患者への投与は静脈内（IV）投与で行うため、全ての試験においてこの投与経路を使用した。薬理試験プログラムの一部として、ASMKO マウスを用いてスフィンゴミエリン減少効果を評価した効力を裏付ける試験、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みられた毒性のメカニズムを ASMKO 及び野生型マウスを用いて評価した副次的薬理試験、並びにマウス、ビーグル犬、及びカニクイザルを用いてオリプダーゼ アルファの心血管系及び呼吸系への影響の有無を評価した安全性薬理試験において、様々な用量及び投与法を評価した。

本資料で考察する薬理試験を、表 1 及び Module 2.6.3 薬理試験の概要表に要約する。一部の試験報告書において、オリプダーゼ アルファは酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）又は遺伝子組換えヒト ASM（rhASM）と称されているが、一貫性を持たせるため、本資料を通してオリプダーゼ アルファと称する。複数の製造プロセスによるものが使用されており、その同等性／同質性比較については Module [3.2.S.2.6]「製造工程の開発の経緯」に記載している。

表 1 - 薬理試験一覧

試験	動物種	投与経路	用量 (mg/kg)	オリプダーゼ アルファ 製造プロセス	ロット	試験番号
効力を裏付ける試験						
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	5	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0110Pnp
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	1	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0428Pnp
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	3	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0129Pnp
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	3	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1223Pnp

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.2 薬理試験の概要文
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

試験	動物種	投与経路	用量 (mg/kg)	オリプダーゼ アルファ 製造プロセス	ロット	試験番号
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	5	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0495Pnp
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	1, 3	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0790Pnp
単回投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	3	製法A* 製法B*	[redacted]	[redacted]-06259
反復投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	0.1, 0.3, 1	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1084Pnp
反復投与 PD	ASMKO マウス	ボーラス静注	0.3, 1, 3	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0813Pnp
副次的薬理試験						
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1008Pnp
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0127Pnp
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	0.3, 3, 10	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0374Pnp
サイトカイン プロファイリング	C57BL/6 マウス	ボーラス静注	20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0436Pnp
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	Day 1, 4, 6, 8 は 3 で Day 11 は 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0437Pnp
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	Day 1 は 3 で Day 3 は 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1009Pnp
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	Day 1 は 3 で Day 6 は 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1010Pnp
サイトカイン プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	Day 1 は 3 で Day 6 は 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1240Pnp
セラミド及び脂質プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0129Pnp
セラミドプロファイリング	ASMKO、ASM ヘテロ接合及び C57BL/6 マウス	ボーラス静注	1, 3, 10, 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0778
セラミドプロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	10, 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1346

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.2 薬理試験の概要文
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

試験	動物種	投与経路	用量 (mg/kg)	オリプダーゼ アルファ 製造プロセス	ロット	試験番号
セラミドプロファイリング	C57BL/6 マウス	ボーラス静注	10	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1511
セラミド及び脂質プロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	3 を 4 日連続後 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-1578
セラミド及びサイトカインプロファイリング	ASMKO マウス	ボーラス静注	3	製法A*	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted]	[redacted]-04646
安全性薬理試験						
心血管系評価	ASMKO マウス	ボーラス静注	3, 10, 20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0533Pnp
心血管系評価	ASMKO マウス	ボーラス静注	20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0302Pnp
心血管系評価	C57BL/6 マウス	ボーラス静注	20	初期製法*	[redacted]	[redacted]-0292Pnp
心血管系評価	カニクイザル	持続静注	30	初期製法*	[redacted]	[redacted]002
心血管系評価	ビーグル犬	ボーラス静注	3, 10, 30	初期製法*	[redacted]	[redacted]026*
呼吸系評価	カニクイザル	持続静注	30	初期製法*	[redacted]	[redacted]002
呼吸系評価	ビーグル犬	ボーラス静注	3, 10, 30	初期製法*	[redacted]	[redacted]026*
薬力学的薬物相互作用						
薬物相互作用	ASMKO マウス	ボーラス静注	1	製法B*	[redacted]	[redacted]-01094

略号: ASMKO: 酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子ノックアウト; PD: 薬力学

*** 安全性薬理のエンドポイントは、GLP 適用毒性試験の中で評価している。**

オリプダーゼ アルファの非臨床安全性プログラムは、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」及び ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」、並びに CDER 企業向け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）」を考慮して計画された。

1.1 動物モデルの説明

非臨床試験では、Horinouchi ら(1)によって作製された ASMKO マウス（別名：ニーマン・ピックマウス又はニーマン・ピック病［NPD］遺伝子ノックアウト［NPDKO］マウス）を、Sanofi（旧 Genzyme Corporation、USA、Massachusetts 州、Framingham）において使用した。マウス *Asm* 遺伝子のエクソン 2 にネオマイシン耐性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。

＊新薬承認情報提供時に置換

この破壊によって作製されたホモ接合型マウスは酵素活性が欠乏し、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(1)。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。ASMD でみられるように、単核食細胞が常在している臓器と同じ臓器にスフィンゴミエリンが蓄積する。ASMKO マウスでは、非神経障害型 ASMD でよくみられる顕著な臓器肥大は認められないが、特徴的な脂質蓄積泡沫細胞が多くの臓器、特に骨髄及び脾臓に認められる。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）を酵素活性の測定により評価することができる。ASMKO マウスは、肝臓、脾臓及び肺といった標的臓器におけるスフィンゴミエリンの蓄積に対するオリプダーゼ アルファの薬力学的作用並びにスフィンゴミエリンの減少を評価するための優れたモデルである。

1.2 分析法の概要

1.2.1 スフィンゴミエリンの定量

組織中スフィンゴミエリン含量の分析には、2 種類の生化学アッセイ（ライセニンを用いた酵素結合免疫吸着測定法[ELISA]及び Amplex Red®アッセイ）を使用した。いずれのアッセイも Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した。ライセニンはシマミミズの体腔液から精製されたタンパク質であり、スフィンゴミエリンに特異的に結合する(2)。開発の過程で、より頑健な Amplex Red®アッセイを実施し、ライセニンを用いた ELISA からそれに置き換えた。Amplex Red®アッセイは、ELISA ベースアッセイではなく蛍光酵素（スフィンゴミエリナーゼ）結合アッセイである。いずれのアッセイでも組織中スフィンゴミエリンを定量し、データを組織湿重量 1 g あたりのスフィンゴミエリン重量（mg）で示した。

1.2.2 血清及び組織中オリプダーゼ アルファの定量

[redacted]GSTR019 試験（Module [4.2.2.1-2]）
[redacted]GSTR033 試験（Module [4.2.2.1-4]）
DOS1690 試験（Module [4.2.2.1-1]）

血清及び組織中に存在するオリプダーゼ アルファの量は、ELISA ベースの方法を用いて測定した（[redacted]GSTR019 試験、[redacted]GSTR033 試験、DOS1690 試験）。試料中に存在するオリプダーゼ アルファに抗オリプダーゼ アルファモノクローナル抗体（Sanofi）を結合させた。オリプダーゼ アルファ含量の評価は、Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した。

1.2.3 血清中オリプダーゼ アルファ特異的抗体の測定

[redacted]GSTR035 試験（Module [4.2.2.1-6]）
[redacted]GSTR034 試験（Module [4.2.2.1-8]）
DOS1706 試験（Module [4.2.2.1-5]）

抗オリプダーゼ アルファ抗体の生化学分析は、抗オリプダーゼ アルファ抗体用 ELISA を用いて、Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した（[redacted]GSTR035 試験、[redacted]GSTR034 試験、DOS1706 試験）。抗オリプダーゼ アルファ抗体が結合する抗原としてオリプダーゼ アルファを被覆したマイクロタイタープレートを使用し、酵素-抗体複合体を、血清を採取した動物種に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合二次抗体を用いて検出した。このアッセイは、血清希釈と、試料から得られた吸光がもはや検出できなくなった点（すなわちカットポイント）との間の比を決定することによって、抗オリプダーゼ アルファ抗体の相対的な尺度を提供する。カットポイントは、各アッセイプレートに含まれる陰性対照血清の平均光学濃度（OD）に基づく。

1.2.4 放射性標識オリプダーゼ アルファの定量

オリプダーゼ アルファの放射性標識及び定量は、Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した。オリプダーゼ アルファは、製造業者の指示に従って Iodogen®（Pierce）を用いて調製し、NAP 10 カラムを用いて PBS で溶出させることにより精製した。^{125}I-オリプダーゼ アルファは使用時まで 4℃ で保存した。

^{125}I-オリプダーゼ アルファを投与したマウス由来の血清及び組織試料は、Cobra ガンマカウンターを用いて分析した。^{125}I-オリプダーゼ アルファの比放射能に基づいて、1 分間あたりの計数率（cpm）をオリプダーゼ アルファ重量（µg）に変換し、血清 1 mL 又は組織湿重量 1 g あたりのオリプダーゼ アルファ重量（µg）として表示した。血清データは、薬物動態解析ソフトウェア WinNonlin を用いて解析した。

1.2.5 組織形態計測分析を用いたスフィンゴミエリンの定量

スフィンゴミエリンの生化学的な定量に加えて、組織形態計測分析も Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した。タンニン酸及びトルイジンブルーで染色された組織を、MetaMorph® ソフトウェアを用いたコンピューターによる形態計測で定量した。これらの組織切片で紫色に染色された物質がスフィンゴミエリンであることは、スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンを用いた連続切片の免疫組織化学染色により確認された。更に、連続切片の電子顕微鏡検査からもこの物質がスフィンゴミエリンであることが確認された。スフィンゴミエリン含量は、総組織面積に対してスフィンゴミエリンが占める割合（%）として表した。

1.2.6 セラミド、スフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸の測定

セラミド、スフィンゴシン（SPH）及びスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて、Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で測定した。血清又は乾燥血液スポットから脂質を抽出し、内部標準由来のイオンを含む分析対象物ごとに 4～10 のトランジション（ペプチドの m/z 比及びその対応するプロダクトイオンの m/z 比）をモニタリングした。内部標準に対する各分析対象物のピーク面積の比に基づいて定量を行った。各分析対象物の濃度を標準曲線から内挿し、ng/mL で報告した。

1.2.7 血清中サイトカイン濃度の測定

Bio-Plex™ Mouse Cytokine 18-Plex Panel アッセイ（Bio-Rad Laboratories, Inc.、カタログ番号 171-304000、USA、California 州、Hercules）を使用した。Bio-Plex™ サイトカインアッセイは、捕捉によるサンドイッチイムノアッセイ法を利用したものである。抗サイトカイン抗体を着色ビーズに共有結合させ、試料と反応させた。血清中サイトカイン濃度の定量は、Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した。

1.2.8 免疫組織化学法を用いたアポトーシスの分析

アポトーシス細胞を標的とする免疫組織化学染色（ApopTag®アッセイ）によりアポトーシスを評価した。ApopTag®は、アポトーシス細胞でみられる 1 本鎖及び 2 本鎖 DNA の切断を検出する TUNEL（terminal transferase dUTP nick end labeling）法を利用したものである。ApopTag®アッセイは、Sanofi（USA、Massachusetts 州、Framingham）で実施した。

2　効力を裏付ける試験

Module 2.6.3 の [2 項]

効力を裏付ける試験では、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを投与したときの標的組織におけるスフィンゴミエリン減少効果を評価した。様々な用量及び投与法で試験を実施し、投与後の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 アルファの様々なロット、オリプダーゼ アルファの高分子量体（HMWS）及び製造 Process の同等性／同質性を評価する試験も実施した。

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投与開始前濃度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裏付けられた。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、特定の疾患関連組織で効果がみられることが裏付けられた。

2.1　オリプダーゼ アルファを単回投与したときの薬力学的作用

[redacted]-0428Pnp 試験（Module [4.2.1.1-1]）
[redacted]-1223Pnp 試験（Module [4.2.1.1-2]）
[redacted]-0110Pnp 試験（Module [4.2.1.1-3]）

ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 1、3 及び 5 mg/kg の用量で単回投与したときのスフィンゴミエリン減少効果を評価した（それぞれ[redacted]-0428Pnp 試験、[redacted]-1223Pnp 試験、[redacted]-0110Pnp 試験）。オリプダーゼ アルファ投与後 1 日～4 週間におけるスフィンゴミエリン含量を生化学アッセイで測定した。スフィンゴミエリンの測定には、[redacted]-0110Pnp 試験及び[redacted]-0428Pnp 試験では ELISA を、[redacted]-1223Pnp 試験では Amplex Red®アッセイを使用した。

血漿中スフィンゴミエリン濃度は、いずれの時点においても投与前と比較して変化が認められなかったが（[redacted]-0110Pnp 試験）、その他の標的組織における濃度はいずれも低下した。全ての結果について、投与前スフィンゴミエリン濃度との比較によりスフィンゴミエリン減少率を算出した。検討した

全ての組織でスフィンゴミエリンの用量依存的な減少が認められた（表 2、図 1、図 2）。肝臓中スフィンゴミエリン濃度には、オリプダーゼ アルファ投与後 1 日の時点で 48%～74%の減少が認められ、用量 5 mg/kg の投与後 1 週間の時点で 95%の減少が認められた。脾臓にも同様の減少が認められた（投与後 1 日の時点で 44%～75%の減少、投与後 1 週間の時点で 80%の減少）。オリプダーゼ アルファ投与後の肺及び腎臓中スフィンゴミエリン濃度は、1 及び 5 mg/kg の用量のみで測定したが、個体間のばらつきがより大きかった。肺における最大減少率は、1 及び 5 mg/kg のいずれの用量においても投与後 1 週間に認められた（それぞれ 46%及び 43%）。腎臓では、オリプダーゼ アルファを 1 mg/kg の用量で投与したときにはほとんど減少がみられなかったが、5 mg/kg の用量では投与後 1 週間の時点で 71%の減少が認められた。全ての組織において、投与後 2～3 週間でスフィンゴミエリンが再蓄積し始めた。オリプダーゼ アルファを 1 mg/kg の用量で単回投与したとき、スフィンゴミエリン濃度は投与後 4 週間までに投与前のレベルに戻った。しかし、用量 5 mg/kg の単回投与では、投与後 4 週間たっても持続的な減少がみられ、肝臓及び脾臓では 55%、肺では 22%、腎臓では 11%の減少が認められた。オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で単回投与したときの最終測定時点は投与後 3 週間であった。この時点におけるスフィンゴミエリン濃度には、依然として肝臓で 48%、脾臓で 30%の減少が認められた。

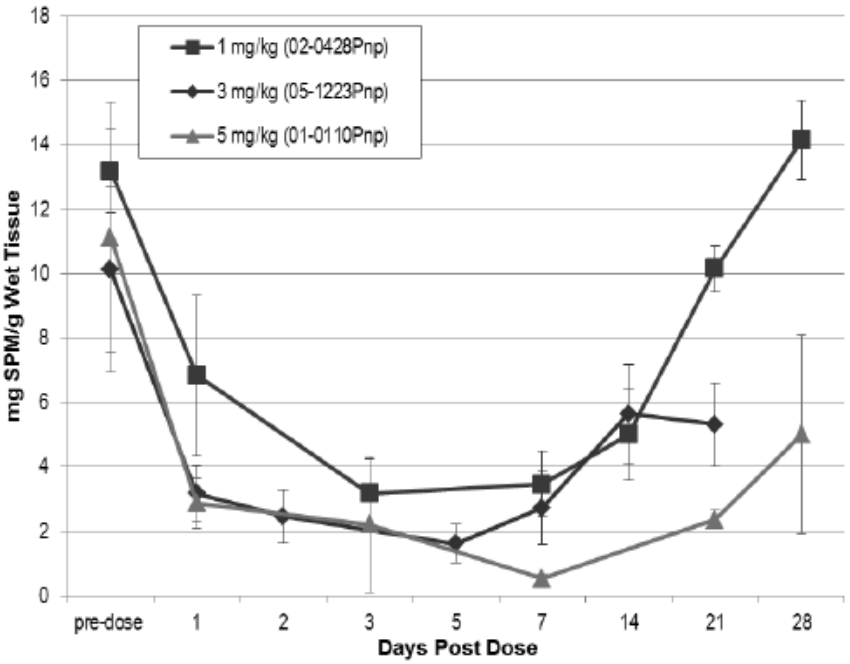
表 2 - オリプダーゼ アルファを単回投与したときのスフィンゴミエリンの減少及び再蓄積（[redacted]-0428Pnp、[redacted]-1223Pnp 及び [redacted]-0110Pnp 試験）

	肝臓	減少率 (%)	脾臓	減少率 (%)	肺	減少率 (%)	腎臓	減少率 (%)
[redacted]-0428Pnp 試験（1 mg/kg）								
投与前（mg SPM /g 組織湿重量）	13.19 ± 1.32		16.59 ± 1.24		10.25 ± 4.09		20.89 ± 6.03	
投与後 1 日	6.84 ± 2.50	48	9.28 ± 2.85	44	11.85 ± 3.33	-16	20.18 ± 9.99	3
投与後 3 日	3.17 ± 1.07	76	5.44 ± 1.38	67	10.87 ± 4.95	-6	16.14 ± 7.03	23
投与後 7 日	3.46 ± 1.01	74	8.61 ± 2.01	48	5.55 ± 2.85	46	20.14 ± 5.43	4
投与後 14 日	5.01 ± 1.44	62	16.07 ± 1.55	3	7.18 ± 0.60	30	20.72 ± 4.17	1
投与後 21 日	10.15 ± 0.71	23	11.92 ± 2.43	28	14.60 ± 3.32	-42	22.31 ± 9.65	-7
投与後 28 日	14.14 ± 1.24	-7	18.13 ± 4.16	-9	10.40 ± 1.48	-1	33.40 ± 3.71	-60
[redacted]-1223Pnp 試験（3 mg/kg）								
投与前（mg SPM /g 組織湿重量）	10.12 ± 2.58		11.85 ± 2.53		測定せず			
投与後 1 日	3.17 ± 0.87	69	3.01 ± 1.01	75				
投与後 2 日	2.47 ± 0.83	76	3.01 ± 1.08	75				
投与後 5 日	1.62 ± 0.61	84	2.92 ± 0.91	76				
投与後 7 日	2.73 ± 1.14	73	2.80 ± 1.13	76				
投与後 14 日	5.65 ± 1.52	44	4.89 ± 4.00	59				
投与後 21 日	5.31 ± 1.30	48	8.34 ± 5.05	30				
[redacted]-0110Pnp 試験（5 mg/kg）								
投与前（mg SPM /g 組織湿重量）	11.12 ± 4.18		19.95 ± 13.78		7.51 ± 4.42		11.26 ± 4.12	
投与後 1 日	2.88 ± 0.78	74	7.00 ± 0.97	65	4.78 ± 3.36	40	7.86 ± 2.79	30
投与後 3 日	2.21 ± 2.11	80	6.49 ± 3.91	67	5.55 ± 2.71	26	8.63 ± 0.22	23
投与後 7 日	0.53 ± 0.16	95	4.04 ± 3.16	80	4.25 ± 2.00	43	3.29 ± 0.33	71
投与後 21 日	2.36 ± 0.28	79	10.69 ± 6.11	46	7.34 ± 3.09	2	18.46 ± 12.86	-64
投与後 28 日	5.00 ± 3.09	55	8.96 ± 10.04	55	5.83 ± 3.52	22	10.00 ± 11.36	11

平均値 ± SD を示す。SPM=スフィンゴミエリン

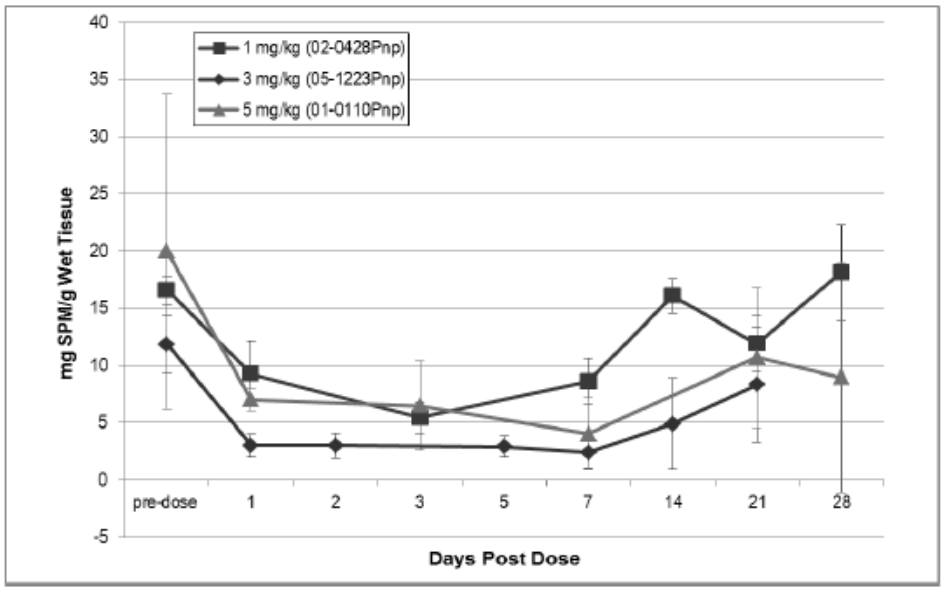
これらのデータから、オリプダーゼ アルファは標的組織におけるスフィンゴミエリンを再現性よく用量依存的に減少させることが示された。スフィンゴミエリンは、概して単回投与後 2 週間で再蓄積し始めたことから、隔週投与による投与法が支持された。

図 1 - オリプダーゼ アルファを単回投与したときの肝臓中スフィンゴミエリンの減少及び再蓄積
（[redacted]-0428Pnp、[redacted]-1223Pnp 及び [redacted]-0110Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。

図 2 - オリプダーゼ アルファを単回投与したときの脾臓中スフィンゴミエリンの減少及び再蓄積
（[redacted]-0428Pnp、[redacted]-1223Pnp 及び [redacted]-0110Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。

2.2 ASMKO マウスに 3 ロットのオリプダーゼ アルファを単回投与したときのスフィンゴミエリン減少作用の比較

[redacted]-0129Pnp 試験（Module [4.2.1.1-4]）

この 05-0129Pnp 試験の目的は、ASMKO マウスに 3 ロットのオリプダーゼ アルファを投与したときのスフィンゴミエリン減少作用を測定することであった。この比較は、Module 2.6.6 毒性試験の概要文及び Module 2.6.7 毒性試験概要表に要約する毒性試験におけるこれらの被験物質ロットの使用をサポートするために行った。マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で単回投与し、投与後 24 又は 72 時間に組織を採取してスフィンゴミエリン濃度を Amplex Red®アッセイで分析した（試験デザインについては表 3参照）。

表 3 - [redacted]-0129Pnp 試験の試験デザイン

群	動物数	被験物質（ロット）	用量 (mg/kg)	投与法／投与経路	組織採取時点	組織採取
1	3	N/A	N/A	N/A	投与前	肝臓、脾臓、肺及び腎臓（スフィンゴミエリン濃度測定用）
2	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	3	単回投与／IV	投与後 24 時間	
3	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])			投与後 24 時間	
4	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])			投与後 24 時間	
5	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])			投与後 72 時間	
6	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])			投与後 72 時間	
7	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])			投与後 72 時間	

略語：N/A=該当せず、IV=静脈内

ロット [redacted]、[redacted] 及び [redacted] のオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で単回投与したとき、標的組織におけるスフィンゴミエリンの減少が時間依存的に認められた。肝臓、脾臓及び肺におけるスフィンゴミエリンの減少に、3 ロット間で有意差は認められなかった。腎臓中スフィンゴミエリン濃度は、投与後 24 時間の時点でロット [redacted] 投与動物の方がロット [redacted] 投与動物よりも低かったが、そのほかに差は認められなかった。結果を表 4に示す。これらのデータから、ロット [redacted]、[redacted] 及び [redacted] の有効性が確認され、毒性試験でこれらのロットを使用することが支持された。

表 4 - ASMKO マウスに 3 種類のロットのオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの組織中スフィンゴミエリン含量（[redacted]-0129Pnp 試験）

群	動物数	被験物質（ロット）	投与後の採取時点	肝臓 (mg SPM/g 組織湿重量)	脾臓 (mg SPM/g 組織湿重量)	肺 (mg SPM/g 組織湿重量)	腎臓 (mg SPM/g 組織湿重量)
1	3	N/A	N/A	43.05 ± 12.78	37.33 ± 7.77	21.62 ± 3.80	32.35 ± 13.45
2	2	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	24 時間	6.18 ± 2.78	10.79 ± 5.07	24.38 ± 11.66	20.14 ± 8.31
3	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	24 時間	5.96 ± 0.74	13.01 ± 1.54	27.52 ± 2.15	10.97 ± 3.12
4	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	24 時間	4.57 ± 0.81	11.41 ± 1.48	23.57 ± 2.46	16.51 ± 2.20
5	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	72 時間	3.17 ± 0.70	10.50 ± 4.83	17.58 ± 5.54	13.39 ± 3.00
6	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	72 時間	2.57 ± 0.89	10.78 ± 2.06	24.30 ± 7.26	18.05 ± 2.51
7	3	オリプダーゼ アルファ ([redacted])	72 時間	2.75 ± 0.25	7.88 ± 0.91	20.35 ± 5.95	17.11 ± 1.61

略号：N/A=該当せず、SPM=スフィンゴミエリン
平均値 ± SD を示す。

2.3 ASMKO マウスへの単回投与によるオリプダーゼ アルファの 2 つの製造 Process（ 製法B* 及び 製法B* ）の評価

[redacted]06259 試験（Module [4.2.1.1-5]）

開発中にオリプダーゼ アルファの製造工程を変更したため、旧工程と新工程（それぞれ 製法A* 及び 製法B* の非臨床での同等性／同質性の評価が必要となった。これらの製造工程及び同等性／同質性の分析的評価については、Module [3.2.S.2.6]「製造工程の開発の経緯」で考察している。この非臨床の同等性／同質性評価には、2つの製造工程で製造されたオリプダーゼ アルファを ASMKO マウスに投与したときの薬力学的作用の評価（[redacted]06259 試験）が含まれている。

15-06259 試験において、 製法A* 又は 製法B* で製造されたオリプダーゼ アルファを 0、1 又は 3 mg/kg の用量で ASMKO マウスに単回投与した（溶媒： 製法A* は 20 mmol/L $NaPO_4$、100 mmol/L メチオニン、0.1 mmol/L EDTA、5%精製白糖、pH6.5、 製法B* は 20 mmol/L $NaPO_4$、100 mmol/L メチオニン、5%精製白糖、pH6.5）。表 5に要約するように、投与後 3 日に肝臓、脾臓及び腎臓中スフィンゴミエリン濃度を測定し、投与後 10、45、120 及び 540 分及び 3 日にセラミド分析用に血液を採取した。

＊新薬承認情報提供時に置換

表 5 - ■-06259 試験の試験デザイン

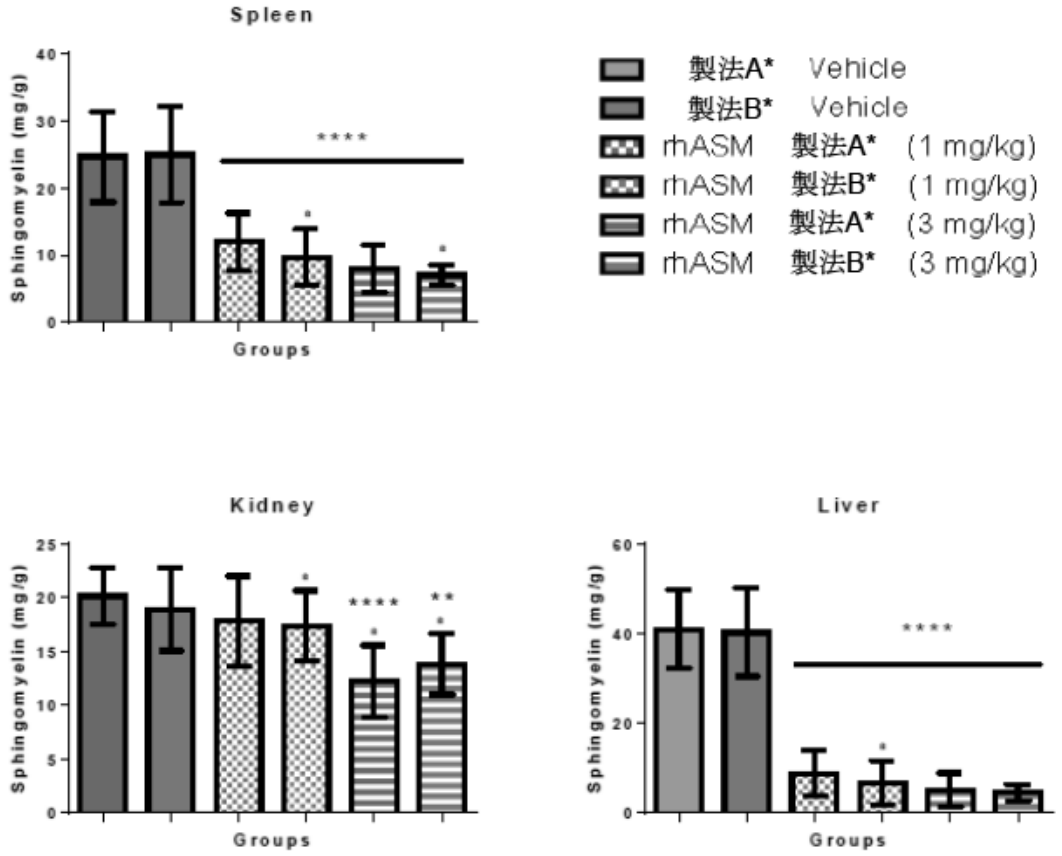
群	動物数 (雄/雌)	被験物質 （製造工程）	用量 (mg/kg)	投与法／投与経路	血液試料の採取時点及び分析	組織試料の採取時点及び分析
1	12 (8/4)	溶媒 (製法A*	-	単回投与／IV	セラミド分析用試料を 0 日目の投与後 10、45、120 及び 540 分、並びに 3 日目（安楽殺前）に採取。分析は第 1、2、5 及び 6 群のみで実施した。	3 日目（投与後 3 日）に第 1～6 群を安楽殺し、以下の組織を採取した：スフィンゴミエリン分析用：肝臓、脾臓及び腎臓。
2	12 (8/4)	溶媒 (製法B*	-			
3	12 (7/5)	オリプダーゼ アルファ (製法 A*	1			
4	12 (7/5)	オリプダーゼ アルファ (製法B*	1			
5	12 (7/5)	オリプダーゼ アルファ (製法A*	3			
6	12 (7/5)	オリプダーゼ アルファ (製法B*	3			

略語：IV=静脈内

製法A* 及び 製法B* で製造したオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量でマウスに投与したとき、肝臓、脾臓及び腎臓中スフィンゴミエリン濃度の有意な低下が認められた（図 3）。スフィンゴミエリン減少作用又はセラミド生成作用に統計学的有意差は認められなかった。 製法A* 及び 製法B* のいずれで製造したオリプダーゼ アルファも、マウスへの投与時にセラミド濃度を上昇させた（図 4）。したがって、本試験の分析結果から、 製法A* と 製法B* の間でオリプダーゼ アルファの有効性は同等／同質と判断された。

＊新薬承認情報提供時に置換

図 3 - ASMKO マウスに　製法A*　由来オリプダーゼ アルファ及び　製法B*　由来オリプダーゼ アルファを単回投与したときの投与後 3 日の組織中スフィンゴミエリン濃度（[redacted]-06259 試験）

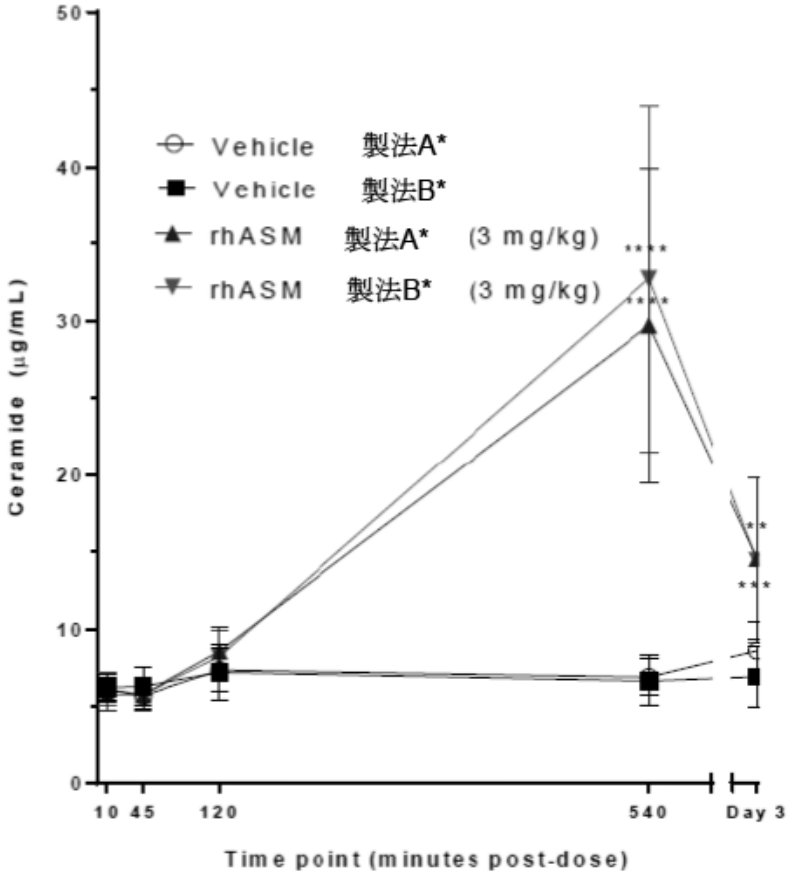


a One sample excluded as it was calculated to be an outlier according to Grubb's test

, *, **** indicate that the value is statistically significant at p> 0.01, 0.001, and 0.0001, respectively, compared to respective vehicle group.

＊新薬承認情報提供時に置換

図 4 - ASMKO マウスに　製法A*　由来オリプダーゼ アルファ及び　製法B*　由来オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で単回投与したときのセラミド濃度（[redacted]-06259 試験）



, *, **** indicates that the values is statistically significant at p>0.01, 0.001, 0.0001, respectively, compared to respective vehicle group. No statistically significant difference was observed between rhASM Process B and C at any of the timepoints analyzed.

2.4　オリプダーゼ アルファの様々な高分子量体化合物によるスフィンゴミエリンの減少及び再蓄積の評価

[redacted]-0495Pnp 試験（Module [4.2.1.1-6]）
[redacted]-0790Pnp 試験（Module [4.2.1.1-7]）
[redacted]-04646 試験（Module [4.2.1.2-14]）

オリプダーゼ アルファの製造において HMWS が認められている。最初、これらの HMWS は還元ゲル電気泳動において移動の遅いバンドとして認められた。その後、サイズ排除クロマトグラフィーでこれらの HMWS には共有結合性及び非共有結合性の二量体が主に含まれていることが確認された。オリプダーゼ アルファの有効性に対するこれらの HMWS の影響を評価するため、2 つの試験（[redacted]-0495Pnp

＊新薬承認情報提供時に置換

及び02-0790Pnp）を実施し、単回投与後の標的組織におけるスフィンゴミエリン濃度を測定した。ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファ又はHMWS-オリプダーゼ アルファを1 mg/kg（[redacted]-0790Pnp試験）又は5 mg/kg（[redacted]-0495Pnp試験）の用量で単回投与し、投与後24又は72時間に組織を採取して生化学的にスフィンゴミエリンを分析した。3つ目の試験（[redacted]-04646試験）では、HMWSを少量、中等量又は多量に含む3ロットのオリプダーゼ アルファが用いられた。この試験ではオリプダーゼ アルファ中のHMWSの安全性に対する潜在的影響を評価しており、それについては3.4項で考察する。

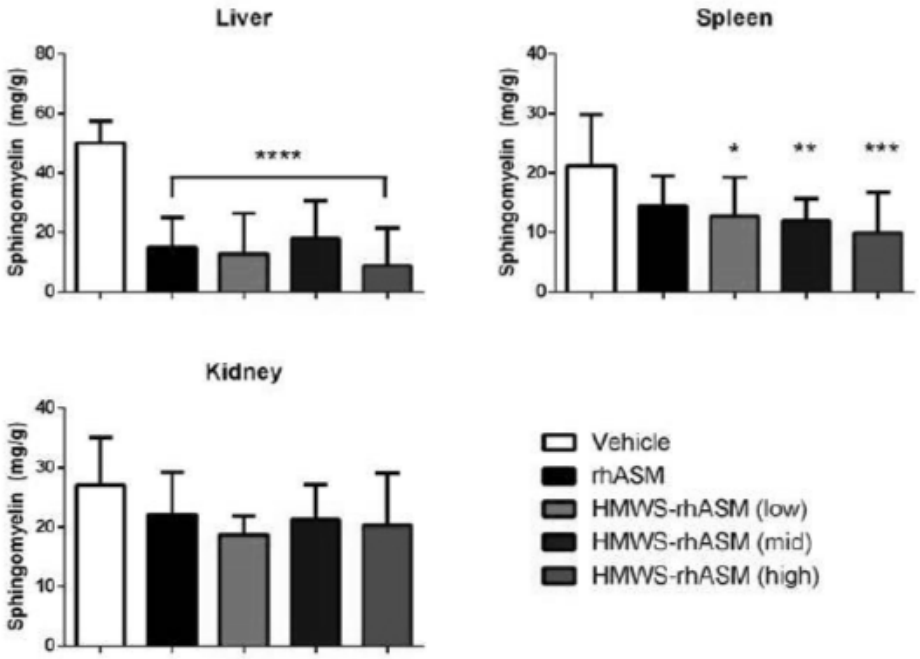
オリプダーゼ アルファを1 mg/kgの用量で単回投与したとき、投与後24及び72時間の時点における肝臓中スフィンゴミエリンの減少率はそれぞれ73%及び76%であった。HMWS-オリプダーゼ アルファでは、スフィンゴミエリン濃度が統計学的に有意に高かった（投与後24及び72時間の時点における減少率はそれぞれ59%及び64%）。脾臓では有意差は認められず、オリプダーゼ アルファ投与後24及び72時間の時点における減少率はそれぞれ62%及び57%、HMWS-オリプダーゼ アルファ投与後24及び72時間の時点における減少率はそれぞれ44%及び67%であった。腎臓では投与後24時間の時点のみで有意差が認められた。腎臓におけるオリプダーゼ アルファ投与後24及び72時間の時点における減少率はそれぞれ45%及び34%、HMWS-オリプダーゼ アルファ投与後24及び72時間の時点における減少率はそれぞれ14%及び39%であった。肺におけるスフィンゴミエリン減少率はそれらよりはるかに低く、ばらつきがみられ、オリプダーゼ アルファとHMWS-オリプダーゼ アルファの間に統計学的有意差は認められなかった。肺におけるオリプダーゼ アルファの単回投与後24及び72時間の時点での減少率はそれぞれ17%及び30%であったが、HMWS-オリプダーゼ アルファの単回投与後24時間の時点では減少が認められず、72時間の時点における減少率はわずか5%であった。

オリプダーゼ アルファ又はHMWS-オリプダーゼ アルファを5 mg/kgの用量で単回投与したとき、いずれの組織においてもスフィンゴミエリン減少率に差は認められなかった。いずれの組織においても、用量5 mg/kgの単回投与でスフィンゴミエリン濃度は背景レベル近くまで低下した。これらの結果は、別の試験でオリプダーゼ アルファを1及び5 mg/kgの用量で投与したときの結果と類似していた。これらのデータから、HMWSはオリプダーゼ アルファの有効性に影響を及ぼさないことが示唆された。

13-04646試験では、ASMKOマウスに3 mg/kgの用量で、HMWS含量が低（目標15% HMWS）、中（目標30% HMWS）又は高（目標65% HMWS）のHMWS-オリプダーゼ アルファを投与し、投与3日後に肝臓、脾臓及び腎臓中のスフィンゴミエリン含量を評価した（図5）。肝臓では、スフィンゴミエリン含量は、溶媒と比較して、オリプダーゼ アルファ及び全てのHMWS-オリプダーゼ アルファ投与群で有意に低かった（$p<0.0001$）。脾臓では、スフィンゴミエリン含量は、全てのHMWS-オリプダーゼ アルファ投与群で溶媒と比較して低かった（低、中、高でそれぞれ$p<0.05$、0.01、0.001）。オリプダーゼ アルファを投与した動物でもスフィンゴミエリン含量が低下したが、溶媒を投与した動物と比較した場合、統計学的有意差は認められなかった。腎臓では、オリプダーゼ アルファ及び全て

の HMWS-オリプダーゼ アルファ投与群におけるスフィンゴミエリン含量は溶媒投与群と比較して低かったが、統計学的有意差は認められなかった。肝臓、脾臓と腎臓で、オリプダーゼ アルファと全ての HMWS-オリプダーゼ アルファ処理群の間でスフィンゴミエリン含量に統計的有意差は認められなかった。

図 5 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファ及び HMWS-オリプダーゼ アルファ（低、中、高）を 3 mg/kg の用量で単回静脈内投与した後の肝臓、脾臓、腎臓中のスフィンゴミエリン含量（[redacted]-04646 試験）



データは平均±SD で示した。 *, **, *, **** : それぞれ溶媒投与群と比べて p<0.05, 0.01, 0.001, 0.0001**

2.5 ASMKO マウスに 12 週間隔週反復投与したときの用量反応関係

[redacted]-0813Pnp 試験（Module [4.2.1.1-9]）

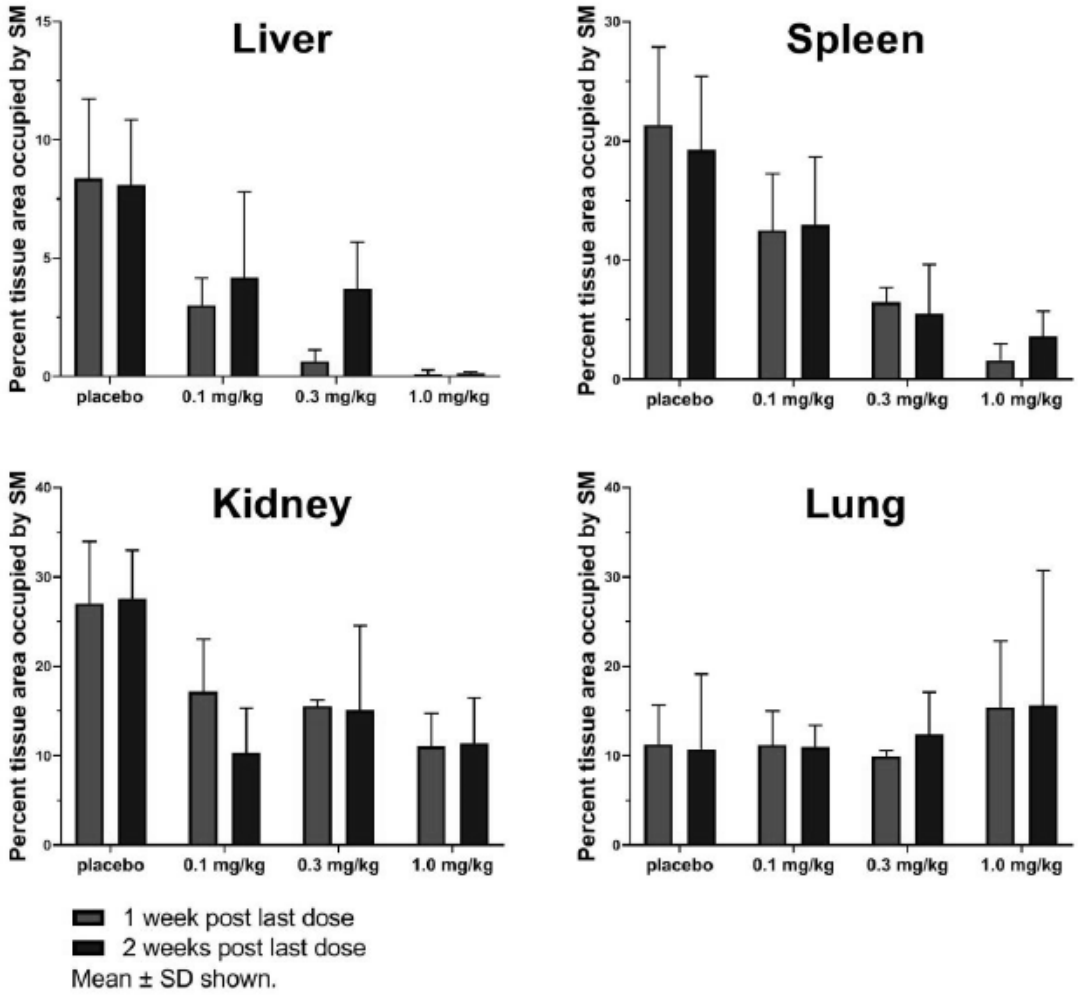
[redacted]-1084Pnp 試験（Module [4.2.1.1-8]）

ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを隔週で 12 週間反復投与した際の薬効薬理を評価するため、2 つの試験を実施した。04-0813Pnp 試験では 0.3、1 又は 3 mg/kg の用量で評価を行い、[redacted]-1084Pnp 試験では治療用量を下回ると考えられる用量のみで評価した。

[redacted]-1084Pnp 試験では、ASMKO マウスに 0.1、0.3 又は 1 mg/kg の用量で隔週投与により 12 週間、計 6 回投与した。スフィンゴミエリン濃度を、Amplex Red® ELISA アッセイで生化学的に測定するとともに、タンニン酸及びトルイジンブルー染色切片のコンピューターによる形態計測で組織学的に測定

した。各試料中スフィンゴミエリン含量の病理組織学的分析において、MetaMorph®ソフトウェアを用いたコンピューターによる形態計測で定量した結果を図 6 に要約する。肝臓及び脾臓のデータを最終投与後 1 週間と 2 週間の時点で比較したところ、最終投与後 2 週間の時点でスフィンゴミエリンが少し再蓄積している可能性が示唆された。肝臓及び脾臓のいずれにおいても明らかな用量反応関係が認められ、腎臓では用量反応関係がそれらより弱かった。

図 6 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを隔週投与したときの組織中におけるスフィンゴミエリン含量の MetaMorph®分析（[redacted]-1084Pnp 試験）



各投与群で 2 時点を平均したところ、肝臓及び脾臓では用量反応関係がみられるが、肺では本試験で評価した 0.1、0.3 及び 1 mg/kg のいずれの用量においてもスフィンゴミエリンの減少がみられないことが明らかになった。肝臓において、溶媒投与時と比較したときのスフィンゴミエリン減少率はそれぞれ 56%、77%及び 99%であった。腎臓において、溶媒投与時と比較したときのスフィンゴミエリ

ン減少率はそれぞれ 50%、44%及び 59%であった。脾臓において、溶媒投与時と比較したときのスフィンゴミエリン減少率はそれぞれ 37%、70%及び 88%であった。これらのデータは表 6に要約したスフィンゴミエリン含量の組織生化学分析の結果とよく相関した。

表 6 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 0.1、0.3 又は 1 mg/kg の用量で 12 週間隔週投与したときの組織中スフィンゴミエリン含量（[redacted]-1084Pnp 試験）

群	動物数（投与終了後 1 週間/2 週間）	被験物質/用量 (mg/kg)	肝臓 (mg SPM/g 組織湿重量)		脾臓 (mg SPM/g 組織湿重量)		肺 (mg SPM/g 組織湿重量)		腎臓 (mg SPM/g 組織湿重量)	
			投与終了後 1 週間	投与終了後 2 週間	投与終了後 1 週間	投与終了後 2 週間	投与終了後 1 週間	投与終了後 2 週間	投与終了後 1 週間	投与終了後 2 週間
1	4/4	0	52.25 ± 8.18	50.76 ± 10.62	73.98 ± 12.68	52.62 ± 7.44	38.33 ± 10.21	41.77 ± 10.86	54.93 ± 10.55	62.91 ± 32.10
2	4/4	0.1	27.28 ± 9.09	29.19 ± 7.78	36.18 ± 12.62	43.98 ± 3.99	30.40 ± 14.64	43.58 ± 10.13	60.92 ± 9.97	56.03 ± 8.90
3	4/3	0.3	6.86 ± 2.63	12.21 ± 0.40	17.93 ± 4.61	21.68 ± 7.69	45.45 ± 5.89	44.24 ± 2.63	37.86 ± 9.94	42.82 ± 9.79
4	4/3	1	2.33 ± 0.75	9.53 ± 2.82	6.49 ± 1.09	12.45 ± 0.65	36.43 ± 9.66	32.60 ± 14.12	27.7 ± 2.29	34.47 ± 2.88

略語：SPM=スフィンゴミエリン
平均値 ± SD を示す。

[redacted]-1084Pnp 試験で認められたように、[redacted]-0813Pnp 試験では，12 週間の隔週投与により，スフィンゴミエリンの用量反応性の低下が認められた。Amplex Red アッセイで測定したスフィンゴミエリン含量は、1 及び 3 mg/kg 群では脾臓でバックグラウンドレベル付近まで低下し、0.3 mg/kg 群では溶媒群と比較して 83%低下した（表 7）。肝臓スフィンゴミエリン含量は、全ての投与群でほぼバックグラウンドレベルまで低下した。肺中スフィンゴミエリン含量は、0.3、1 及び 3 mg/kg 群で溶媒群と比較して 32、61 及び 58%低下した。最終投与から 4 週間後に、0 又は 3 mg/kg のオリプダーゼ アルファを投与した ASMKO マウスの組織においても、スフィンゴミエリン含量が評価された。肝臓と脾臓はスフィンゴミエリン含量の増加を示したが、溶媒投与マウスと比較して、それぞれ 71%と 82%低かった。肺中のスフィンゴミエリン含量は、最終投与から 4 週間後までに投与前のレベルに戻った。

表 7 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 0.3、1 又は 3 mg/kg の用量で 12 週間隔週投与したときの組織中スフィンゴミエリン含量（[redacted]-0813Pnp 試験）

群	動物数	用量 (mg/kg)	肺 (mg SPM/g 組織湿重量)	肝臓 (mg SPM/g 組織湿重量)	脾臓 (mg SPM/g 組織湿重量)
1	6	0	33.96 ± 6.47	91.48 ± 13.76	67.35 ± 14.94
3	6	0.3	23.00 ± 3.13	2.33 ± 4.04	11.58 ± 3.03
4	5	1	13.41 ± 2.82	5.57 ± 8.01	0.83 ± 1.66
5	5	3	14.34 ± 7.11	6.25 ± 7.74	0.00 ± 0.00
2	6	0（4 週間回復）	27.09 ± 7.10	108.43 ± 13.79	76.54 ± 13.38
7	6	3（4 週間回復）	29.19 ± 3.87	31.76 ± 9.70	13.68 ± 3.44

略号：SPM=スフィンゴミエリン
平均値 ± SD を示す。

これら 2 つの試験の条件下では、オリプダーゼ アルファを 12 週間隔週投与したところ、スフィンゴミエリン含量に用量反応性の低下が認められた。スフィンゴミエリン含量は投与後 2 週間で再蓄積し始めており、隔週投与による投与法を支持していた。

3　副次的薬理試験

Module 2.6.3 の [3 項]

オリプダーゼ アルファの薬力学的作用を検討する過程で、ASMKO マウスでは 10 mg/kg 以上の用量で死亡が認められたが、C57BL/6 マウスでは認められなかった。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み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する副次的薬理試験を実施した。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にみられた有害な作用について検討した。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、サイトカインと同様に、セラミド、SPH 及び S1P（蓄積したスフィンゴミエリンの異化代謝産物）の濃度が上昇した。総セラミド及び C16-セラミドの両方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が認められた。これらの異化代謝産物の急速な増加が、高用量投与後にみられた毒性の原因と考えられる。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、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、スフィンゴミエリンの分解及びその異化代謝産物生成の速度及び量に関連してい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みられる毒性を軽減又は除く方法として、用量漸増法を用いた基質減量法が有用であることが支持された。

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）［マウスにおける主要な急性期タンパク質(3)］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。

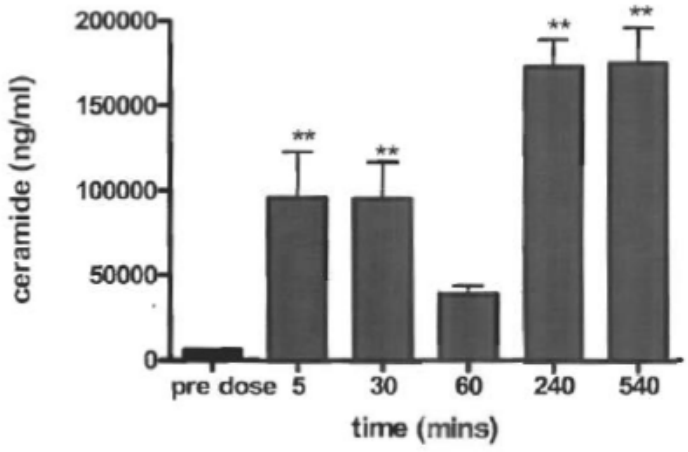
3.1 オリプダーゼ アルファを単回投与したときのスフィンゴミエリンの異化代謝産物及びサイトカインの評価

[redacted]-1008Pnp 試験（Module [4.2.1.2-1]）
[redacted]-0127Pnp 試験（Module [4.2.1.2-2]）
[redacted]-0374Pnp 試験（Module [4.2.1.2-3]）
[redacted]-0129Pnp 試験（Module [4.2.1.2-4]）
[redacted]-0436Pnp 試験（Module [4.2.1.2-5]）

ASMKO マウス（[redacted]-1008Pnp 試験、[redacted]-0127Pnp 試験、[redacted]-0374Pnp 試験、[redacted]-0129Pnp 試験）及び C57BL/6 マウス（[redacted]-0436Pnp 試験）に高用量のオリプダーゼ アルファを単回投与したときの毒性作用を検討する 5 つの試験を実施した。[redacted]-0374Pnp 試験では 0.3、3 及び 10 mg/kg の用量で評価したが、それ以外の試験ではいずれもオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与した。ASMKO マウスでは 2 分～9 時間、C57BL/6 マウスでは 2～48 時間の様々な時点で血清を採取した。血清中炎症誘発性サイトカインプロファイルは全て Bio-Plex™ Mouse Cytokine 18-Plex Panel アッセイで評価した。また、スフィンゴミエリンの異化代謝産物であるセラミド、SPH 及び S1P の血中濃度は全て LC-MS/MS を使用して測定した。

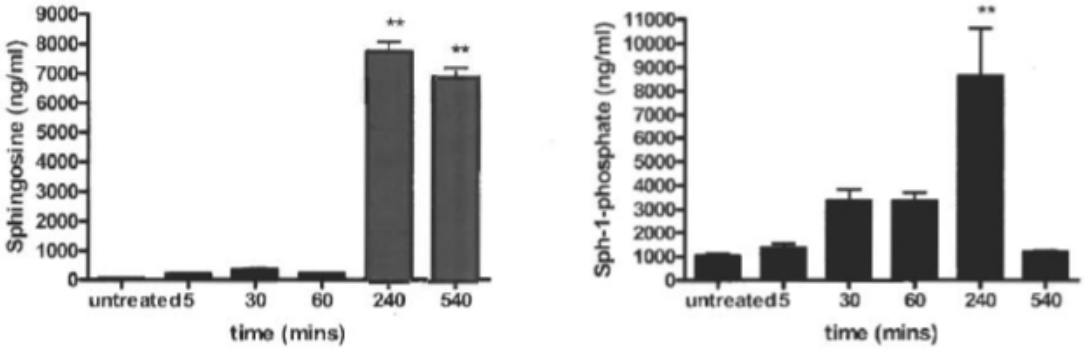
ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したとき、循環血中セラミド（図 7）、SPH 及び S1P（図 8）が有意に増加した。セラミドの増加は投与後 2～5 分で認められ、概して 9 時間にわたり増加したまま維持された（[redacted]-1008Pnp 試験、[redacted]-0129Pnp 試験）。投与後 60 分に血中濃度の低下がみられたことから、セラミドの増加は一過性のものと考えられた。しかし、その後、投与後 4 及び 9 時間に再び増加が認められた。SPH 及び S1P についても、程度がより小さいものの、より遅い時点において有意な増加が認められた。SPH は 66 ± 31 ng/mL から 7744 ± 1639 ng/mL（$p<0.01$、4 時間）へと増加し、S1P は 1040 ± 174 ng/mL から 8652 ± 4464 ng/mL（$p<0.01$、4 時間）へと増加した（図 8）。セラミドの濃度は、SPH 及び S1P（それぞれセラミダーゼ及び SPH キナーゼによる異化代謝によって生じるセラミド分解産物）の 100 倍であった。

図 7 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときのセラミド濃度（[redacted]-0129Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。
**p<0.01（投与前との比較）

図 8 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの血中 SPH 及び S1P 濃度（[redacted]-0129Pnp 試験）

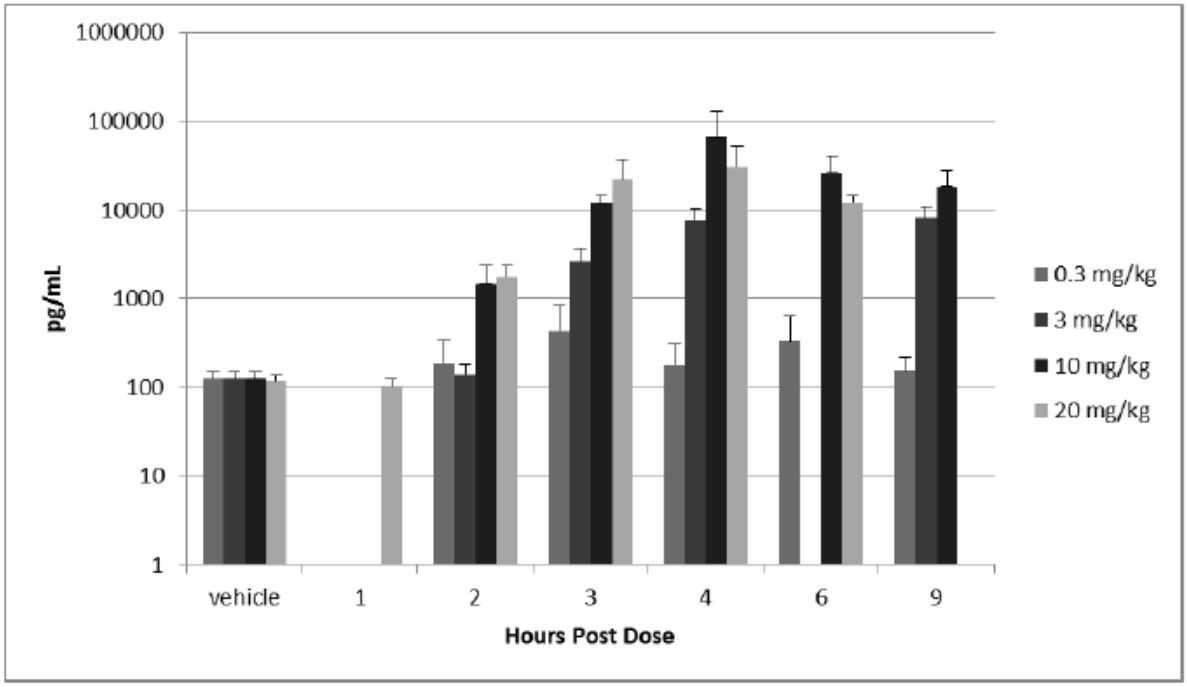


平均値 ± SD を示す。
**p<0.01（投与前との比較）

セラミド、SPH 及び S1P が増加した後に、炎症誘発性サイトカインが増加した。投与後 3 及び 4 時間に IL-6 及び G-CSF 濃度の用量反応的な上昇が認められた（図 9）。投与後 3、4、6 及び 9 時間に、溶媒と比較して、IL-1α、IL-1β 及び MIP-1α の増加が認められたが、IL-6 及び G-CSF と同程度まで増

加することはなかった。0.3 mg/kg を除く全ての用量のオリプダーゼ アルファで、投与後 3、4、6 及び 9 時間に KC/GRO の増加がみられたが、その値はしばしば範囲外の高値であった。一方、オリプダーゼ アルファを 0.3 mg/kg の用量で単回投与したときには、いずれの時点においても各サイトカインの有意な増加は認められなかった。腫瘍壊死因子 α（TNFα）については、オリプダーゼ アルファをいずれの用量で投与したときも、各時点で有意な増加は認められなかった。C57BL/6 マウスでは、オリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したときに、このような炎症誘発性サイトカインの増加は認められなかった。

図 9 - 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 IL-6 濃度（[redacted]-0127Pnp 試験及び [redacted]-0374Pnp 試験）

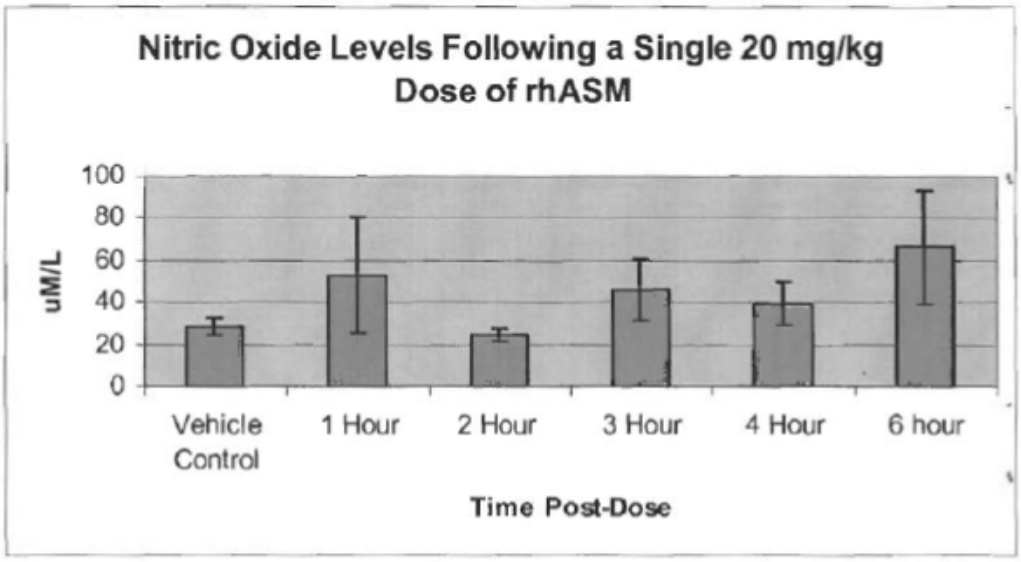


平均値 ± SD を示す。

IL-1α、IL-1β、IL-6 及び G-CSF の増加は、急性期炎症反応と一致していることが知られている。血圧低下に寄与する可能性のある潜在的血管作動性メディエーターの増加にこれらのサイトカインが関与しているか否かを検討するため、オリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与し、最終産物である亜硝酸塩及び硝酸塩を測定することにより、血清試料中一酸化窒素濃度を分析した([redacted]-0127Pnp 試験）。この分析結果から、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したとき、投与後 6 時間の時点で亜硝酸塩／硝酸塩濃度に約 2 倍の上昇がみられることが示された（図 10）。投与後 6 時間より後の時点では亜硝酸塩／硝酸塩濃度を測定しなかったが、その時点ではこの試験で測定された濃度よりも増加している可能性がある一方、局所組織中濃度はより低く、血清中で検出さ

れるほど十分なレベルはない可能性も考えられた。本資料の4項に要約する安全性薬理試験で心毒性を評価した。

図 10 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの一酸化窒素濃度（[redacted]-0127Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。

結論として、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したとき、血清中セラミド、SPH 及び S1P の急速な増加が認められた。セラミドの生成には 2 つの異なる相が存在し、これを反映して初期に急速増加相が、後期により緩徐な相が認められた。このことは、スフィンゴミエリンの供給源の違いによって、スフィンゴミエリン分解の事象が異なることを示している可能性がある。初期相はオリプダーゼ アルファが静脈内投与後すぐ局在化できる「アクセスが容易な」供給源（すなわち形質膜）を表していると考えられ、後期相は恐らく組織への局在化により数時間を要すると考えられる。

ASMKO マウスに 3 mg/kg 以上の用量で単回投与したとき、IL-6 及び G-CSF を含む炎症誘発性サイトカインの増加に先立って、セラミド濃度の上昇が認められた。しかし、C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したときには、いずれの時点においてもサイトカインの増加は認められなかった。これらのデータから、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みられた毒性は、炎症反応を誘発するスフィンゴミエリンの異化代謝産物の急速な増加が原因であることが示唆された。患者におけるオリプダーゼ アルファの基質分解による毒性を軽減する

ために、スフィンゴミエリンの異化代謝産物の大量生成を抑えるための用量漸増法が必要と考えられる。

3.2 オリプダーゼ アルファを反復投与したときのサイトカインの評価

[redacted]-1009Pnp 試験（Module [4.2.1.2-6]）
[redacted]-1010Pnp 試験（Module [4.2.1.2-7]）
[redacted]-1240Pnp 試験（Module [4.2.1.2-8]）
[redacted]-0437Pnp 試験（Module [4.2.1.2-9]）

ASMKO マウスに高用量のオリプダーゼ アルファを単回投与したとき、スフィンゴミエリンの異化代謝産物の急速な大量生成が原因と考えられる毒性反応が誘発され、その結果、炎症反応及び死亡が認められた。この反応を軽減するため、非臨床試験プログラムの一部として用量漸増法を評価した。ASMKO マウスを用いた 4 つの試験（[redacted]-1009Pnp、[redacted]-1010Pnp、[redacted]-1240Pnp、[redacted]-0437Pnp）において、様々な用量漸増法で投与したときのサイトカイン濃度を測定した。各試験で異なる投与法を使用したが、オリプダーゼ アルファの初回投与量はいずれの試験においても 3 mg/kg であった。いずれの試験でも最終投与後 4 及び 8 又は 9 時間に血清を採取し、Bio-Plex™ Mouse Cytokine 18-Plex Panel アッセイを用いてサイトカイン濃度を測定した。

単回投与試験（例えば図 9）でみられたように、オリプダーゼ アルファの 3 mg/kg の用量での初回投与後 4 及び 9 時間の両方の時点で、IL-6、IL-1α、IL-1β 及び G-CSF といった炎症誘発性サイトカインの増加が認められた（表 8、表 9）。しかし、これらの増加は概して 3 日目の 3 又は 20 mg/kg の用量での 2 回目の投与後には認められなかった。05-1009Pnp 試験において、オリプダーゼ アルファの 20 mg/kg の用量での 2 回目の投与後 8 時間に KC/GRO 及び G-CSF の軽微な増加が認められた（表 8）。同様の結果が、6 日目にオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg（[redacted]-1010Pnp 試験）又は 20 mg/kg（[redacted]-1240Pnp 試験）の用量で 2 回目に投与したときにも認められた（表 9）。重要なこととして、3 日目に 20 mg/kg の用量で投与したとき、一般状態に有害な所見は認められず、マウスは 4 週間の試験終了時まで生存した。これは、過去の単回投与試験において、これらと同じ時点で幾つかの炎症誘発性サイトカインの顕著な増加がみられ、12～24 時間以内に死亡した（[redacted]-0374Pnp 試験参照）こととは著しく対照的である。

表 8 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 1 日目に 3 mg/kg、3 日目に 20 mg/kg の用量で投与したときのサイトカイン濃度（pg/mL）（[redacted]-1009Pnp 試験）

	投与前 （[redacted]-0374Pnp 試験のデータ）	2 回目投与後 4 時間	2 回目投与後 8 時間
IL-1α	90.88 ± 15.89	86.86 ± 34.43	66.67 ± 17.79
IL-3	22.76 ± 4.62	13.23 ± 5.17	9.46 ± 3.16*
IL-6	126.39 ± 26.00	43.25 ± 22.01	86.76 ± 56.48
IL-12 (p40)	1653.21 ± 160.44	658.09 ± 40.54*	626.51 ± 151.22*
IL-12 (p70)	1103.08 ± 212.54	939.18 ± 635.72	595.76 ± 188.44
IL-17	989.22 ± 167.30	133.48 ± 32.46*	88.82 ± 22.55*
G-CSF	172.47 ± 98.74	205.20 ± 49.57	978.14 ± 555.9*
KC/GRO	84.23 ± 16.16	514.37 ± 115.96	904.53 ± 551.19*
MIP-1α	216.23 ± 39.23	190.85 ± 18.26	169.10 ± 47.27
RANTES	477.63 ± 86.11	308.00 ± 49.45	255.46 ± 97.53*

平均値 ± SD を示す。

* p<0.05［投与前（05-0374Pnp）との比較］

表 9 - オリプダーゼ アルファを 1 日目に 3 mg/kg、6 日目に 20 mg/kg の用量で投与したときのサイトカイン濃度（pg/mL）（[redacted]-1240Pnp 及び [redacted]-0127Pnp 試験）

	[redacted]-0127Pnp 投与後 4 時間 （20 mg/kg 単回投与）	[redacted]-1240Pnp 2 回目投与後 4 時間 （1 日目に 3 mg/kg、6 日目に 20 mg/kg）	[redacted]-1240Pnp 2 回目投与後 9 時間 （1 日目に 3 mg/kg、6 日目に 20 mg/kg）
IL-1α	261.10 ± 27.38	61.70 ± 22.85*	43.42 ± 15.86*
IL-3	38.38 ± 11.39	8.96 ± 3.45*	5.29 ± 2.33*
IL-6	30294.35 ± 22748.93	94.79 ± 42.86*	99.71 ± 123.48*
IL-12 (p40)	1418.12 ± 271.89	546.12 ± 25.98*	893.43 ± 276.45*
IL-12 (p70)	260.07 ± 81.44	653.06 ± 310.20*	408.16 ± 167.02
IL-17	83.64 ± 41.26	166.84 ± 70.29*	74.53 ± 26.67
G-CSF	82809.63 ± 51174.63	143.00 ± 31.80*	402.95 ± 255.92*
KC/GRO	測定範囲外－高値	173.84 ± 171.56	300.78 ± 229.87
MIP-1α	443.98 ± 68.63	194.82 ± 49.29*	127.08 ± 40.73*
RANTES	419.18 ± 112.80	171.19 ± 65.22*	161.40 ± 70.50*

平均値 ± SD を示す。

* p<0.05（05-0127Pnp の 20 mg/kg 投与後 4 時間との比較）

2.6.2 薬理試験の概要文
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

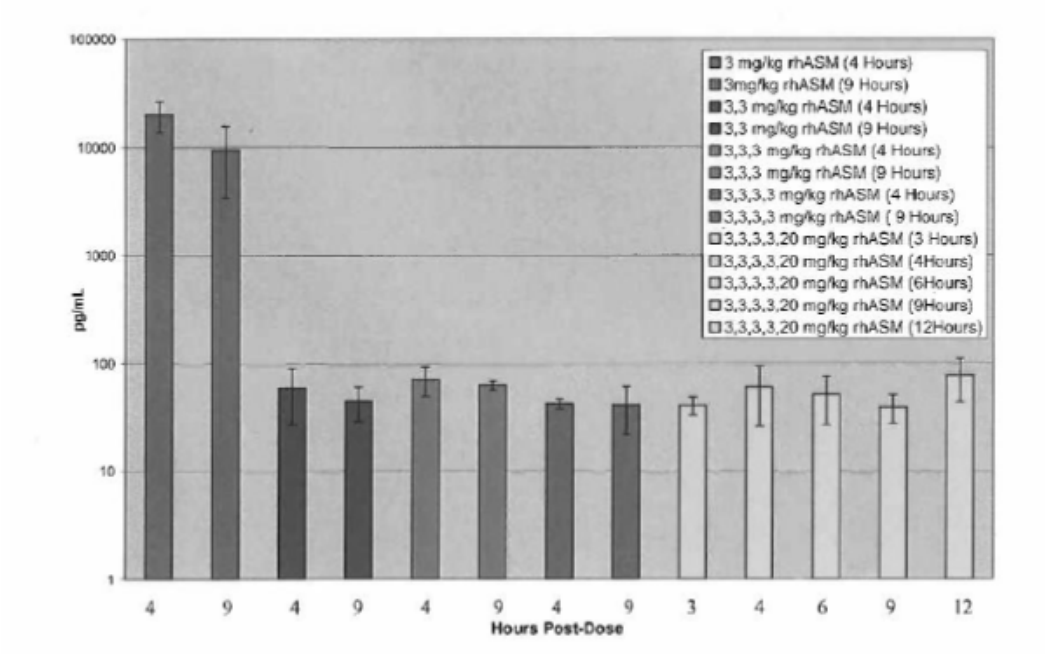
[redacted]-0437Pnp 試験において、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で反復投与した後に 20 mg/kg の用量で投与する投与法の評価を行った（試験デザインについては表 10参照）。過去の試験でみられたように、オリプダーゼ アルファの 3 mg/kg の用量での初回投与後 4 及び 9 時間に、IL-6（図 11）、IL-1α、IL-1β、G-CSF（図 12）及び MIP-1α といった炎症誘発性サイトカインの増加が認められた。その後 3 mg/kg の用量で投与しても、最初の 3 mg/kg 投与時と比較して、これらのサイトカインの更なる増加は認められなかった。3 mg/kg の用量で 4 回投与した後に 20 mg/kg の用量で投与したときも、炎症誘発性サイトカインの増加は認められなかった。一方、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与した過去の試験では、IL-6、IL-1α、IL-1β、G-CSF 及び MIP-1α の顕著な増加が認められた。

表 10 - [redacted]-0437Pnp 試験の試験デザイン

群	動物数	用量 (mg/kg)	投与日	最終投与からの時点	投与経路	試料採取
1	6	3	試験 1 日目	4 及び 9 時間	IV	血清
2	6	3、3	試験 1 及び 4 日目	4 及び 9 時間		
3	6	3、3、3	試験 1、4 及び 6 日目	4 及び 9 時間		
4	6	3、3、3、3	試験 1、4、6 及び 8 日目	4 及び 9 時間		
5	3	3、3、3、3、20	試験 1、4、6、8 及び 11 日目	3 時間		
6	3	3、3、3、3、20	試験 1、4、6、8 及び 11 日目	4 時間		
7	3	3、3、3、3、20	試験 1、4、6、8 及び 11 日目	6 時間		
8	3	3、3、3、3、20	試験 1、4、6、8 及び 11 日目	9 時間		
9	3	3、3、3、3、20	試験 1、4、6、8 及び 11 日目	12 時間		

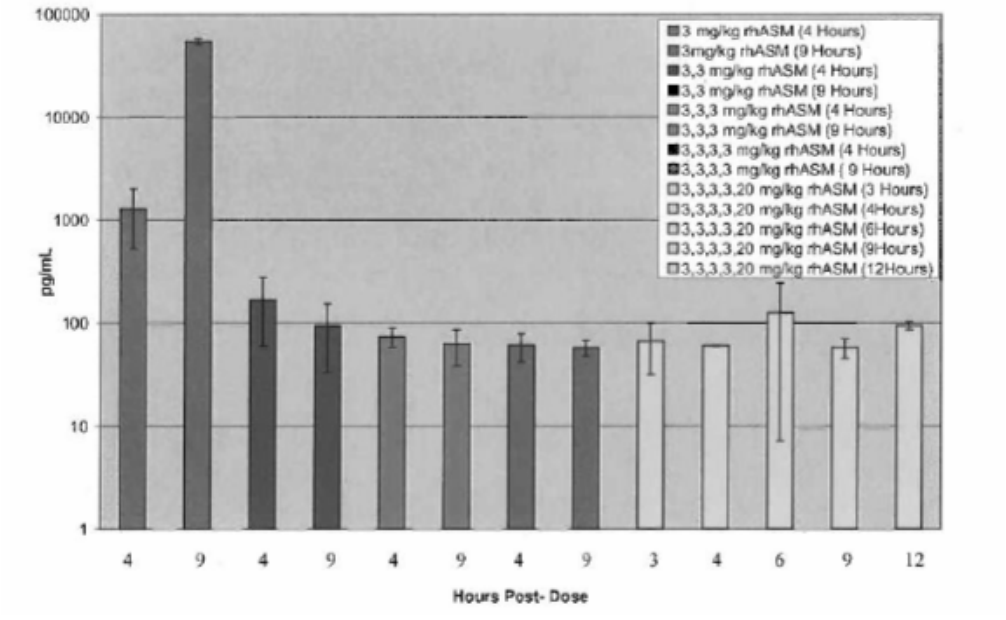
略語：IV=静脈内
動物の週齢：8～10 週齢

図 11 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを反復投与したときの IL-6 濃度（[redacted]-0437Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。

図 12 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを反復投与したときの G-CSF 濃度（[redacted]-0437Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。

要約すると、これらの試験及び過去の試験において、ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを3 mg/kgの用量で単回投与したとき、炎症誘発性サイトカインが中等度に増加した。一方、ASMKO マウスに20 mg/kg の用量で単回投与したときには、炎症誘発性サイトカインが顕著に増加し、24 時間以内に死亡した。オリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与する前に 3 mg/kg の用量で 1 回以上投与すると、毒性が軽減された。ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で反復投与したとき、又は 3 mg/kg の用量で投与した後に 20 mg/kg の用量で投与したとき、炎症誘発性サイトカインの増加は認められなかった。また、この用量漸増法において、用量 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与後に死亡は認められなかった。これらのデータから、患者にオリプダーゼ アルファを投与する際、用量漸増法を使用することが支持された。

3.3 オリプダーゼ アルファを単回及び反復投与したときの循環血中セラミドの評価

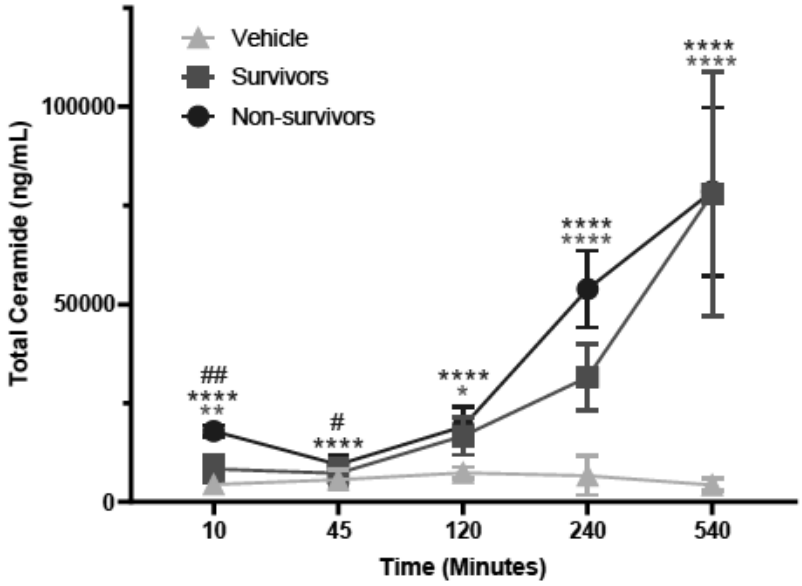
■-1346 試験（Module [4.2.1.2-10]）
■-0778 試験（Module [4.2.1.2-11]）
■-1511 試験（Module [4.2.1.2-12]）
■-1578 試験（Module [4.2.1.2-13]）

ASMKO マウスに高用量のオリプダーゼ アルファを単回投与したとき、循環血中セラミド濃度の大幅かつ急速な上昇が認められた。これらの試験では死亡も認められた。セラミド濃度と ASMKO マウスでみられた毒性との間の関連性を検討するため、4 つの試験を実施した。様々な用量及び投与法を評価したが、いずれの試験においても血中のセラミド及びセラミドアイソフォームを LC-MS/MS で測定した。

■-1346試験において、セラミド及びセラミドアイソフォームの量と致死率とを直接比較した。ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを 10 又は 20 mg/kg の用量で単回投与し、それぞれ 72 又は 24 時間にわたりモニタリングした。10 mg/kg 群の 7 匹中 5 匹は投与後 72 時間まで生存せず、20 mg/kg 群の 8 匹中 4 匹は一般状態の毒性スコアが高値となったため投与後 9 時間に安楽殺した。

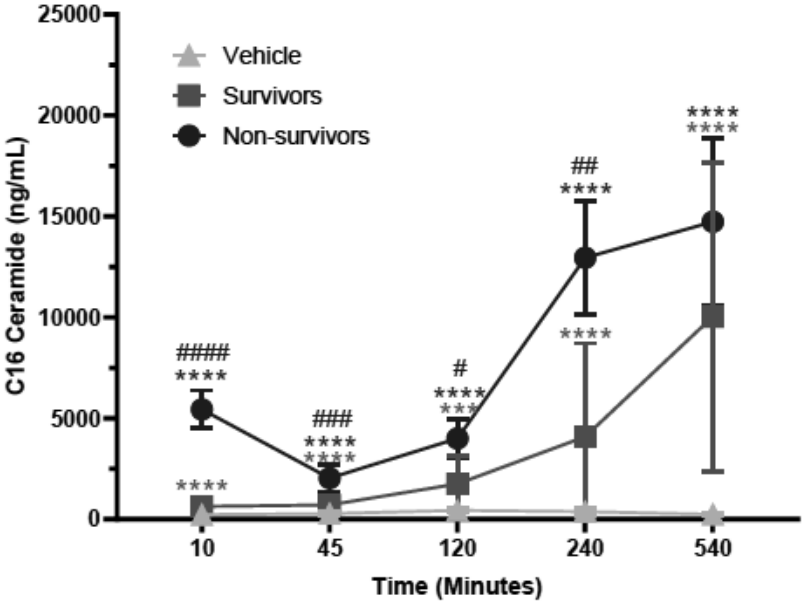
全体として、10 又は 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファの投与後、生存例と非生存例との間にセラミド濃度の差は認められなかった（図 13）。しかし、C16 セラミド濃度は、20 mg/kg の用量での致死率及び不良な臨床転帰の増加と相関性が認められた（図 14）。最終的に死亡した全ての動物が、10 又は 20 mg/kg のオリプダーゼアルファの投与後の毒性に関連して死亡していることに注意することが重要である。以上のデータから、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 10 mg/kg 以上の用量で投与したときにみられた致死率の増加にセラミド及びC16-セラミド濃度の持続的な上昇が寄与する可能性があるとの仮説が裏付けられた。

図 13 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの生存例及び非生存例における総セラミド濃度（[redacted]-1346 試験）



Mean ± SD shown. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 compared to Vehicle. #p<0.05, ##p<0.01 compared to Survivors.

図 14 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの生存例及び非生存例における C16 セラミド濃度（[redacted]-1346 試験）



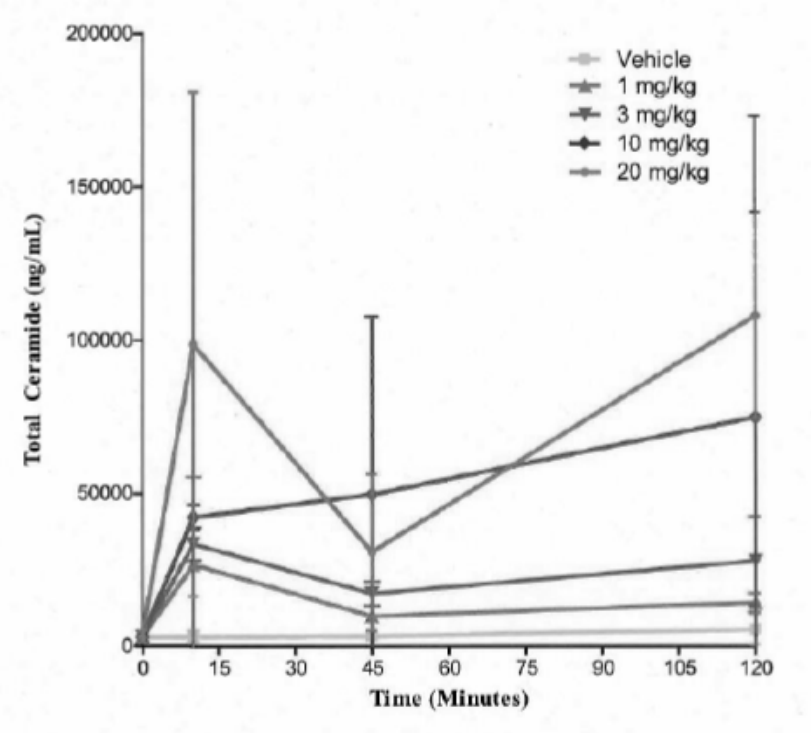
Mean ± SD shown. ***p<0.001, ****p<0.0001 compared to Vehicle. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 compared to Survivors.

2.6.2 薬理試験の概要文
オリプダーゼ アルファ（遺伝子組換え）

オリプダーゼ アルファは 10 mg/kg 以上の用量で投与したとき ASMKO マウスでは致死性を示したが、野生型 C57BL/6 マウスでは致死性が認められなかった。ASMKO マウスにおけるこの毒性は、セラミドの大量生成が原因と考えられる。この仮説を検証するため、ASMKO マウス、野生型 C57BL/6 マウス及び ASMKO ヘテロ接合型（ASMKO-HET）マウスにおける循環血中セラミド及びセラミドアイソフォームの変化を ■-0778 試験で評価した。この試験において、ASMKO-HET マウスを用いて、セラミド生成と ASM 遺伝子投与量との関連性を評価した。

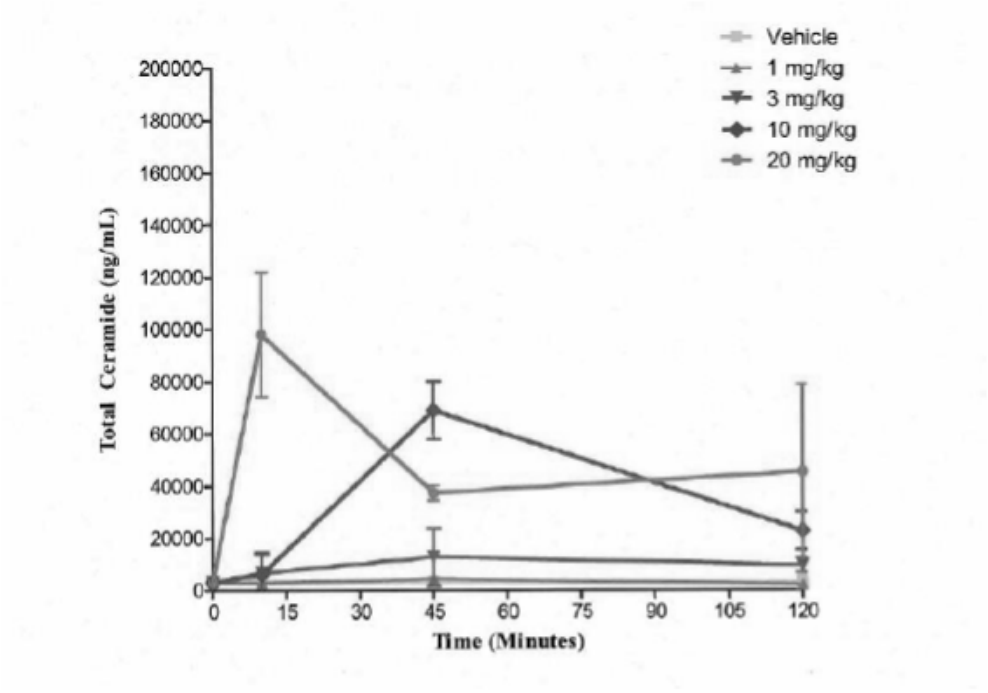
3 つの全ての系統のマウスで、オリプダーゼ アルファ投与後にセラミドの用量反応的な増加がみられたが、増加の程度及びタイミングは異なっていた。投与後 10 及び 45 分の時点における循環血中総セラミド濃度は、ASMKO マウスと C57BL/6 マウスで同程度であった（図 15及び図 16）。しかし、投与後 120 分の時点におけるセラミド濃度は、ASMKO マウスの方が同時点の C57BL/6 マウスよりも有意に高かった。C57BL/6 マウスと同様に、ASMKO-HET マウスにおいても、用量 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与後のセラミド濃度の上昇は一過性で、投与後 120 分には濃度に低下傾向が認められた（図 17）。

図 15 - 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総セラミド濃度（■-0778 試験）



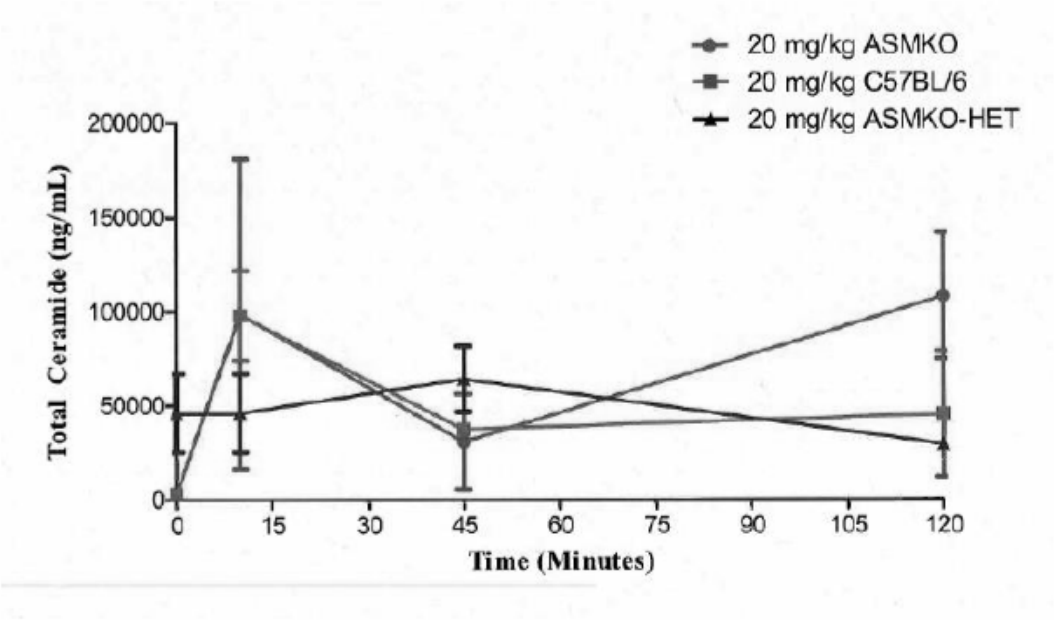
平均値 ± SD を示す。

図 16 - 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総セラミド濃度（[redacted]-0778 試験）



平均値 ± SD を示す。

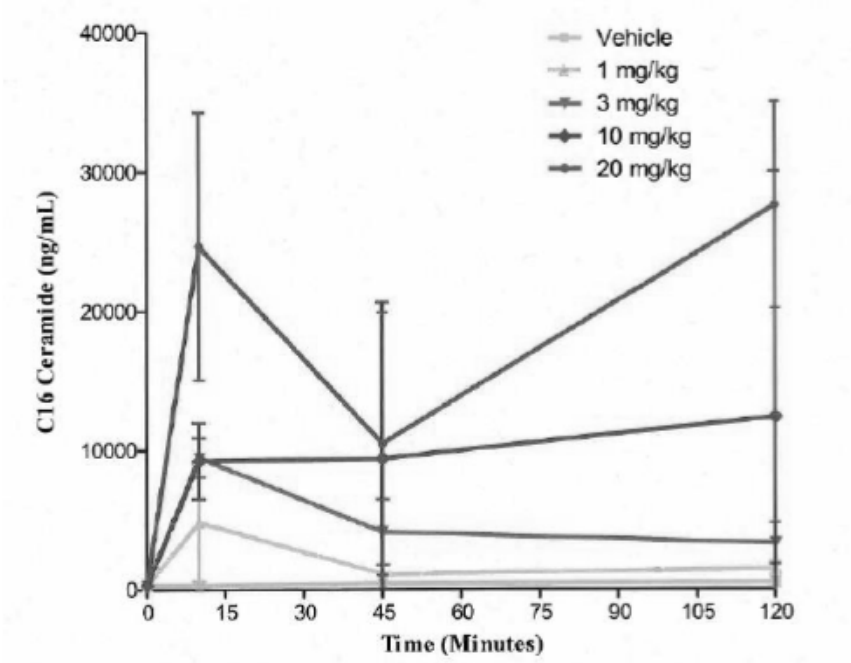
図 17 - ASMKO、C57BL/6 又は ASMKO-HET マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの総セラミド濃度（[redacted]-0778 試験）



平均値 ± SD を示す。

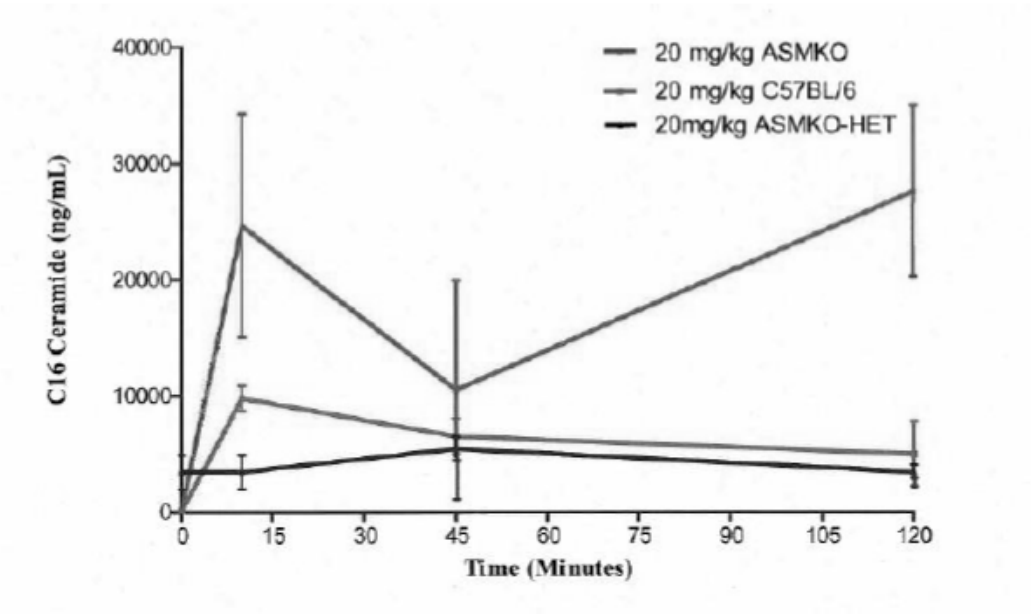
C57BL/6及びASMKO-HETマウスと比較して、ASMKOマウスではC16-セラミドが特異的に増加し、高いまま維持された（図 18）。総セラミド濃度でみられたように、C16-セラミドについても、ASMKOマウスでは用量 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与後に二相性の増加がみられたが、ASMKO-HET又はC57BL/6マウスでは増加は認められなかった（図 19）。同様の結果が、07-1511 試験においてC57BL/6マウスにオリプダーゼ アルファを 10 mg/kg の用量で単回投与したときにも得られている。このアイソフォームの変化はオリプダーゼ アルファの毒性発現において重要と考えられる。総セラミド及びC16-セラミドの初期の増加は、C57BL/6 及び ASMKO-HET マウスでも認められたことから、ASMKOマウスでみられた毒性の原因ではないと考えられる。第二相のセラミド増加は ASMKO マウスのみで認められたことから、このマウスでみられた毒性に寄与していると考えられる。[redacted]-0778 試験及び[redacted]-1511 試験ではサイトカインのプロファイリングを実施しなかったが、C 反応性タンパク質を測定したところ、ASMKO マウスと C57BL/6 マウスの間に差はみられなかった。

図 18 - 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 C16-セラミド濃度（[redacted]-0778 試験）



平均値 ± SD を示す。

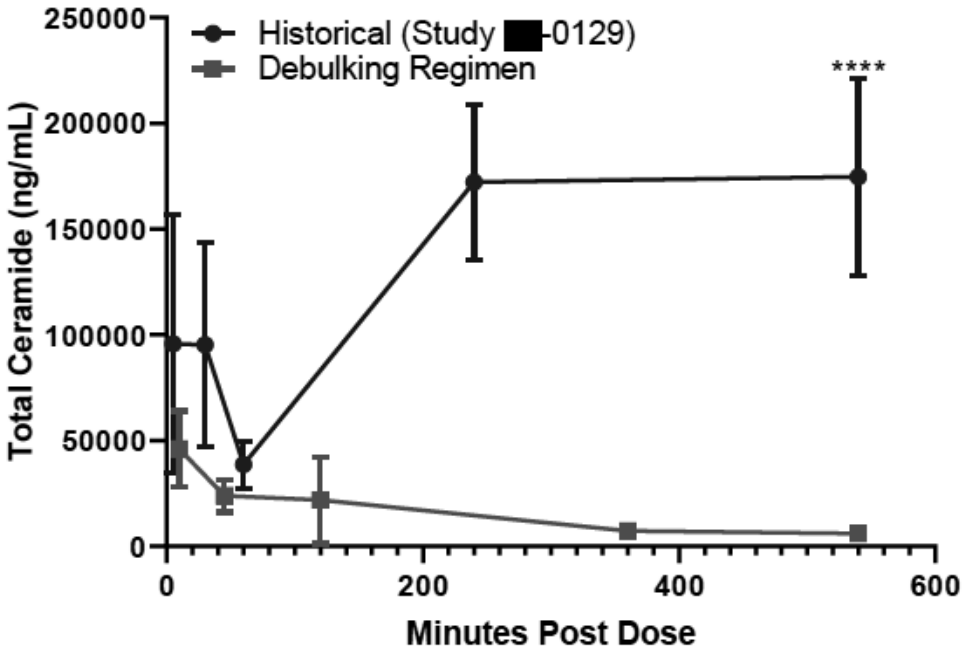
図 19 - ASMKO、ASMKO-HET 及び C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを単回投与したときの C16-セラミド濃度（[redacted]-0778 試験）



平均値 ± SD を示す。

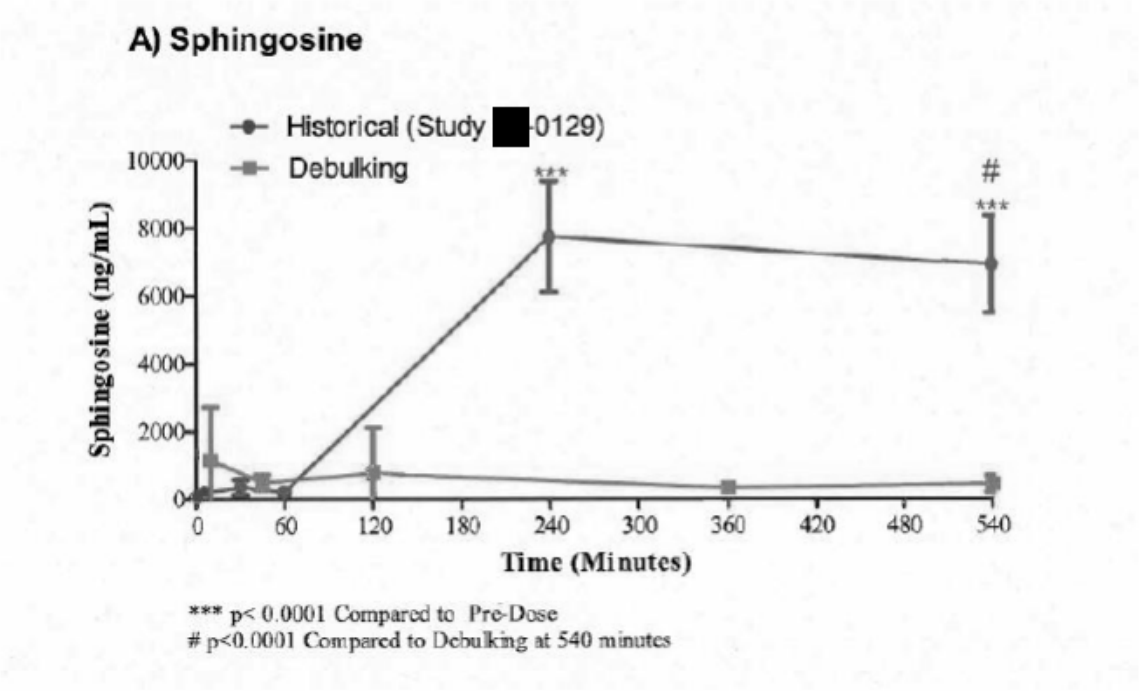
循環血中セラミド、SPH 及び S1P に対する用量漸増法の効果を評価するため、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で 1、3、5 及び 8 日目に計 4 回投与した後、10 日目に 20 mg/kg の用量で投与した（07-1578 試験）。総セラミド及びセラミドアイソフォーム濃度、並びに SPH 濃度は、最終投与後 10 分にピークとなった。しかし、これらのデータを背景データと比較すると、用量漸増法では、最終投与後 120～540 分におけるセラミド、SPH 及び S1P 濃度が有意に低かった（図 20及び図 21）。更に、単回投与で使用した際に致死性を示した 20 mg/kg の用量でオリプダーゼ アルファを投与しても、全例が生存した。これらの一般状態所見及びセラミド、SPH 及び S1P の解析から、高用量のオリプダーゼ アルファに対する毒性反応は、用量漸増法を使用すると消失することが示された。

図 20 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与又はデバルキング投与法（[redacted]-1578 及び [redacted]-0129 試験）を用いて投与したときのセラミド濃度

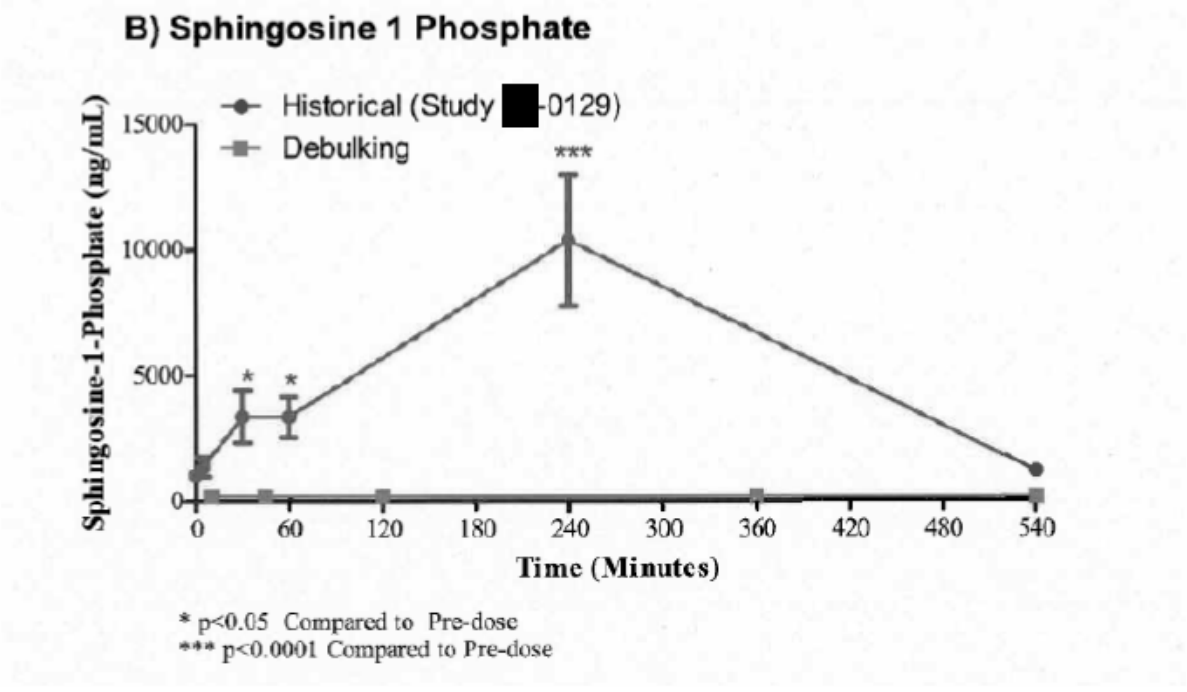


平均値 ± SD を示す。

図 21 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与（[redacted]-0129 試験）又はデバルキング投与法を用いて投与（[redacted]-1578 試験）したときの SPH 及び S1P 濃度



平均値 ± SD を示す。



平均値 ± SD を示す。

3.4 ASMKO マウスにおける高分子量体オリプダーゼ アルファの評価

[redacted]-04646 試験（Module [4.2.1.2-14]）

2.4項に述べたように、高分子量体（HMWS）がオリプダーゼ アルファ製造中に認められた。ASMKO マウスに 3 mg/kg の用量で投与した場合、種々の含量の HMWS は、オリプダーゼ アルファの有効性を変化させなかった（図 5）。HMWS-オリプダーゼ アルファの安全性への影響を検討するため、ASMKO マウスに低含量（目標 15%）、中含量（目標 30%）、又は高含量（目標 65%）の HMWS を含むオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で投与後に、セラミド及びサイトカイン濃度を評価した（[redacted]-04646 試験）。また、組織を採取し、被験物質に関連する所見について病理組織学的に評価した。試験デザインを表 11に要約する。

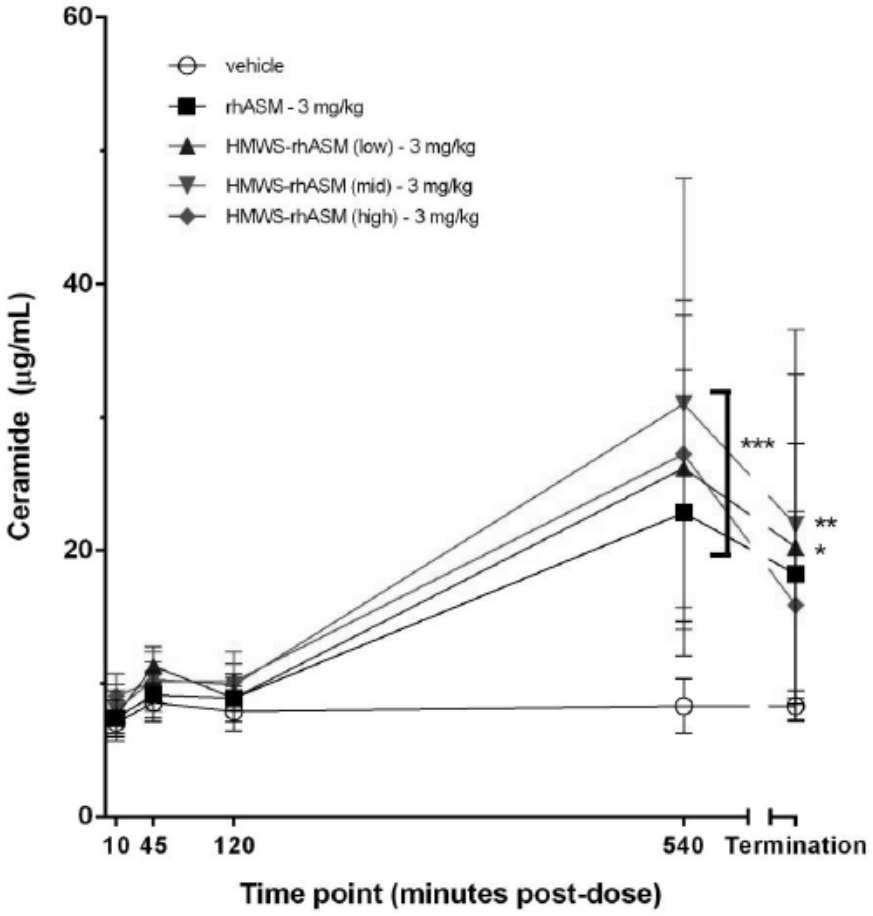
表 11 - [redacted]-04646 試験の試験デザイン

群	動物数 (雄/雌)	被験物質	用量 (mg/kg)	投与法／投与経路	血液試料の採取時点及び分析	組織試料の採取時点及び分析
1	12 (4/8)	溶媒	N/A	単回投与／IV	セラミド及びスフィンゴミエリン分析用試料を 1 日目（第 1～5 群）の投与後 10、45、120 及び 540 分に採取。 サイトカイン及び急性期タンパク質分析用試料を 1 日目（第 1～5 群）の投与後 540 分に採取。 セラミド及びスフィンゴミエリン分析用試料を 4 日目（第 1～5 群）の安楽殺時に採取。	4 日目（投与後 3 日）に第 1～5 群を安楽殺し、以下の組織を採取した：病理組織学的分析用：肝臓、副腎、心臓、腎臓、脾臓及び肉眼的病変、スフィンゴミエリン分析用：肝臓、脾臓及び腎臓。
2	12 (6/6)	オリプダーゼ アルファ	3			
3	12 (6/6)	HMWS-オリプダーゼ アルファ（低含量：目標 15%）	3			
4	12 (6/6)	HMWS-オリプダーゼ アルファ（中含量：目標 30%）	3			
5	12 (6/6)	HMWS-オリプダーゼ アルファ（高含量：目標 65%）	3			

略語：N/A=該当せず、HMWS=高分子量体、IV=静脈内

投与後 10 分、45 分、120 分、540 分、終了時に、乾燥血液スポット（DBS）カードによりセラミドを分析した（図 22）。いずれの時点においても、オリプダーゼ アルファ投与群と全ての HMWS-オリプダーゼ アルファ投与群との間で、セラミド濃度に統計学的有意差は認められなかった。投与 540 分後では、オリプダーゼ アルファ投与群及び全ての HMWS-オリプダーゼ アルファ投与群のセラミド濃度は、溶媒投与群と比較して有意に高かった（$p<0.001$）。終了時、オリプダーゼ アルファ投与群及び全ての HMWS-オリプダーゼ アルファ投与群はそれぞれの 540 分値から低下したが、溶媒投与群と比較して依然として上昇していた。しかし、HMWS-オリプダーゼ アルファ低及び中含量投与群のみが、その時点で溶媒と比較して統計学的に高かった（それぞれ $p<0.05$ 及び 0.01）。

図 22 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファ及び HMWS-オリプダーゼ アルファ（低、中及び高含量）を 3 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときのセラミドの分析（[redacted]-04646 試験）



データを平均値 ± SD で示す。*、**、*** それぞれ p<0.05、 0.01、0.001（溶媒との比較）

投与後 540 分にサイトカインを分析した結果を表 12 に示す。オリプダーゼ アルファ及び HMWS-オリプダーゼ アルファの全投与群において、評価した全てのサイトカイン（IL-17A を除く）が溶媒投与群と比較して増加した。オリプダーゼ アルファ投与群と各 HMWS-オリプダーゼ アルファ投与群との間で、評価したいずれのサイトカインについても統計学的有意差は認められなかった。特記すべきこととして、HMWS-オリプダーゼ アルファ（低含量）投与群における IL-6、KC/GRO、IL-1α、IL-1β 及び IL-12p70 濃度は、溶媒投与群と比較して統計学的に有意に高かった。急性期タンパク質である SAP も投与後 540 分に分析した。いずれの群間においても SAP 濃度に差はみられなかった。

表 12 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファ及び HMWS-オリプダーゼ アルファ（低、中及び高含量）を 3 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの投与後 540 分の時点におけるサイトカイン及び急性期タンパク質（[redacted]-04646 試験）

	第 1 群-溶媒	第 2 群-rhASM	第 3 群-HMWS rhASM（低）	第 4 群-HMWS rhASM（中）	第 5 群-HMWS rhASM（高）
C 反応性タンパク質 (µg/mL)	6.5 ± 1.8	7.1 ± 1.9	7.7 ± 3.0	8.6 ± 4.1	7.6 ± 2.7
KC/GRO (ng/mL)	0.13 ± 0.08	2.98 ± 3.60	5.02 ± 6.30*	3.35 ± 3.95	3.10 ± 2.46
IL-1α (pg/mL)	70 ± 32	656 ± 678	737 ± 660*	605 ± 506	533 ± 361
IL-1β (ng/mL)	7.6 ±1.4	10.1 ± 3.0	11.1 ± 1.9 **	9.9 ± 2.3	10.1 ± 2.4
IL-3 (pg/mL)	3 ± 0	13 ± 14	14 ± 11	12 ± 9	10 ± 7
IL-6 (pg/mL)	83 ± 77	3806 ± 4394	4027 ± 3853*	3607 ± 3628	2865 ± 2360
IL-12 サブユニット 70 (ng/mL)	0.18 ± 0.0	0.57 ± 0.46	0.63 ± 0.47*	0.54 ± 0.36	0.47 ± 0.25
IL-17A (ng/mL)	0.150 ± 0.000	0.031 ± 0.020	0.029 ± 0.019	0.031 ± 0.015	0.022 ± 0.008
MIP-1α (ng/mL)	10 ± 1	12 ± 2	11 ± 2	11 ± 1	11 ± 1
RANTES (pg/mL)	0.062 ± 0.000	0.09 ± 0.048	0.091 ± 0.035	0.08 ± 0.026	0.068 ± 0.011
SAP 含量(µg/mL)	51 ± 11	53 ± 12	53 ± 17	58 ± 15	57 ± 16
TNFα (ng/mL)	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.00
VEGF-a (pg/mL)	275 ± 44	500 ± 301	550 ± 293	561 ± 325	472 ± 190

平均値 ± SD を示す。
* p<0.05（溶媒との比較）
** p<0.01（溶媒との比較）
N=12/群

オリプダーゼ アルファ及び HMWS-オリプダーゼ アルファの全投与群において、副腎、肝臓及び脾臓の所見は同様であった。副腎では、被験物質に関連する所見として、索状帯で壊死及びアポトーシス、並びにそれに伴う出血、異栄養性石灰化及び好中球浸潤が、髄質で有糸分裂像の増加が認められた。肝臓では、被験物質に関連する所見として、多巣性壊死、アポトーシス、炎症性浸潤の発現頻度増加、及び肝細胞有糸分裂像の増加が認められた。脾臓では、被験物質に関連する所見として、赤脾髄でアポトーシス細胞数の増加及びそれに伴う造血前駆細胞の減少が認められた。これらの所見は、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で静脈内投与した試験で既に報告されている（Module 2.6.6 [2.2.7 項]参照）。

結論

結論として、ASMKO マウスに HMWS-オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で単回投与したとき、血中セラミド、サイトカイン濃度に対する HMWS 含量の影響は認められなかった。また、副腎、肝臓及び脾臓における被験物質関連の所見に差は認められなかった。これらのデータに基づくと、本

試験条件下において、HMWS-オリプダーゼ アルファとオリプダーゼ アルファの間で安全性及び有効性プロファイルに差がないことが示された。

これらの試験結果から、ASMKO マウスにおける組織中スフィンゴミエリンの減少は、HMWS-オリプダーゼ アルファの HMWS 含量及び比活性の違いによる影響を受けないことが示された。

4　安全性薬理試験

Module 2.6.3 の [4 項]

心臓で S1P 受容体が活性化すると徐脈が生じる。したがって、オリプダーゼ アルファの投与により高濃度の S1P 及びスフィンゴミエリンのその他の代謝物が生成すると、心毒性が生じる可能性がある。スフィンゴミエリンの異化代謝産物の放出により安全性上の懸念が生じるか否かを検討するため、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安全性薬理試験を実施した。ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3、10 及び 20 mg/kg の用量で単回投与し、心機能（血行動態学的反応、心拍数、血圧及び運動活動性）をテレメトリーで評価した。投与後約 60 分に用量依存的な心拍数の低下がみられ、これに伴って運動活動性の低下が認められた後、投与後約 130～140 分から血圧の緩徐な低下が認められた。しかし、このような心拍数の低下は、C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したときには認められなかったことから、心毒性はオリプダーゼ アルファ自身ではなく高濃度のスフィンゴミエリン分解産物が原因であることが示唆された。心機能におけるスフィンゴミエリンの異化代謝産物の役割を明らかにするため、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 及び 10 mg/kg の用量で 2 回投与した。オリプダーゼ アルファの 2 回目投与後に心拍数の軽度の低下のみが認められたが、心拍数が 550 拍/分（bpm）未満に低下することはなかった。これらのデータから、低用量のオリプダーゼ アルファを反復投与することによりスフィンゴミエリンの異化代謝産物の放出を制御すると、心毒性が生じないことが示唆された。

心臓への影響の有無を更に検討するため、カニクイザル及びビーグル犬を用いて安全性薬理試験を実施した。カニクイザルにオリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で 1 回又は 2 回投与した。血圧、心拍数、体温、心電図（ECG）間隔、呼吸数、1 回換気量及び血液ガスパラメータに有害な影響は認められなかった。ビーグル犬にオリプダーゼ アルファを 30 mg/kg までの用量で単回投与したとき、血圧、直腸体温及び呼吸数への影響は認められなかった。

これらの安全性試験のデータから、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みられた心毒性は、スフィンゴミエリンの異化代謝産物の急速な生成が原因と考えられた。オリプダーゼ アルファをより低用量で投与したときには同様の変化は認められず、患者への使用において許容可能な安全性プロファイルが認められた。

2項に述べたように、オリプダーゼ アルファの製造及び精製時に HMWS が生成する。HMWS には触媒活性を有する共有結合性及び非共有結合性のオリプダーゼ アルファ二量体が主に含まれている。HMWS が存在しても薬効への大きな影響はないことが ■-0495Pnp 試験（Module [4.2.1.1-6]）及び

[redacted]-0790Pnp 試験（Module [4.2.1.1-7]）で示されたが、毒性については評価されていない。安全性エンドポイントは副次的薬理試験の [redacted]-04646 試験（Module [4.2.1.2-14]）に組み込み、種々の量の HMWS を含むオリプダーゼ アルファを ASMKO マウスに単回投与して評価した。3.4項に示したように、ASMKO マウスに 3 mg/kg の用量で単回投与したとき、HMWS の含有による血中セラミド、サイトカイン及び組織中スフィンゴミエリン濃度への影響は認められなかった。また、副腎、肝臓及び脾臓における被験物質関連の所見に差は認められなかった。したがって、HMWS の存在により、オリプダーゼ アルファの有効性及び安全性プロファイルが変わることはない。

4.1 テレメトリー装着覚醒 ASMKO マウスにおける心血管系血行動態に対するオリプダーゼ アルファの影響

[redacted]-0533Pnp 試験（Module [4.2.1.3-1]）

試験目的

本試験の目的は、心血管系に対するオリプダーゼ アルファの影響の有無を検討することであった。具体的には、本試験において、テレメトリー装着覚醒 ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを静脈内投与（反復、単回投与）したときの血行動態（心拍数及び血圧）パラメータへの影響を検討した（[redacted]-0533Pnp 試験）。

試験デザイン

12 匹を 3 つの群に均等に割り付けた。投与前に、全ての試験動物にラジオテレメトリー装置を装着させた。1 日目に溶媒（第 1 群）又は用量 10 mg/kg（第 2 群）若しくは 20 mg/kg（第 3 群）のオリプダーゼ アルファを投与した。5 日目に、第 1 群の動物にオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で投与した。9 日目に、第 1 群の動物にオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で、第 2 群の残りの動物に 10 mg/kg の用量で投与した。試験デザインを表 13に示す。

表 13 - [redacted]-0533Pnp 試験の試験デザイン

群	動物数	投与経路	セッション 1 の投与（1 日目）	セッション 2 の投与（5 日目）	セッション 3 の投与（9 日目）
1	4	IV	溶媒	3 mg/kg	3 mg/kg
2	4		10 mg/kg	NA	10 mg/kg
3	4		20 mg/kg	NA	NA

略語：IV=静脈内、NA=該当せず

試験結果

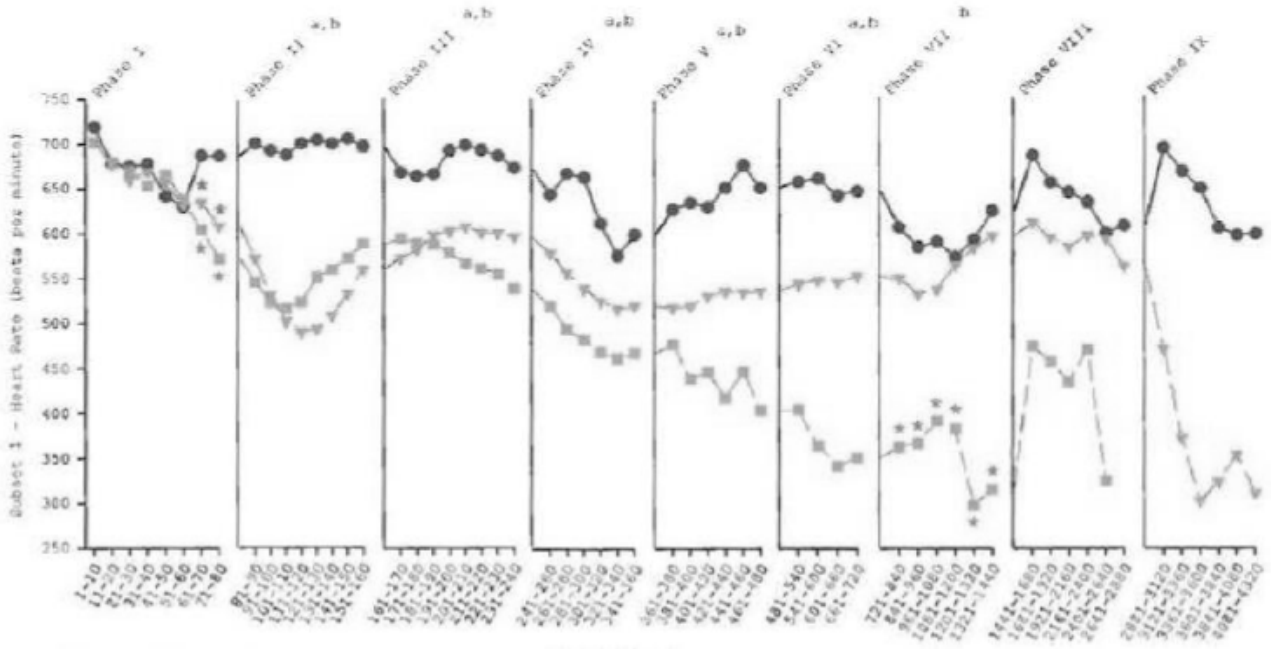
各投与セッションで全例を投与前 24 時間～投与後 72 時間にわたりモニタリングした（モニタリング終了時まで動物が生存しなかった場合を除く）。第 3 群（20 mg/kg オリプダーゼ アルファ）の全例

が投与後 43 時間以内に安楽殺又は死亡発見された。第 2 群（10 mg/kg オリプダーゼ アルファ）の 4 匹中 3 匹が 1 日目の投与後約 56～75 時間に安楽殺された。

オリプダーゼ アルファの投与前及び投与後の両方で細目が認められた。投与前に細目がみられたことから、これはオリプダーゼ アルファの投与に直接起因するものではないと考えられた。眼からの白色分泌物が第 3 群の全例及び第 2 群の 1 匹に認められた。嗜眠、円背位及び接触時冷感が心拍数又は血圧の低下に伴って認められ、テレメトリーによるモニタリングでみられた用量依存的な活動性の低下とよく相関した。

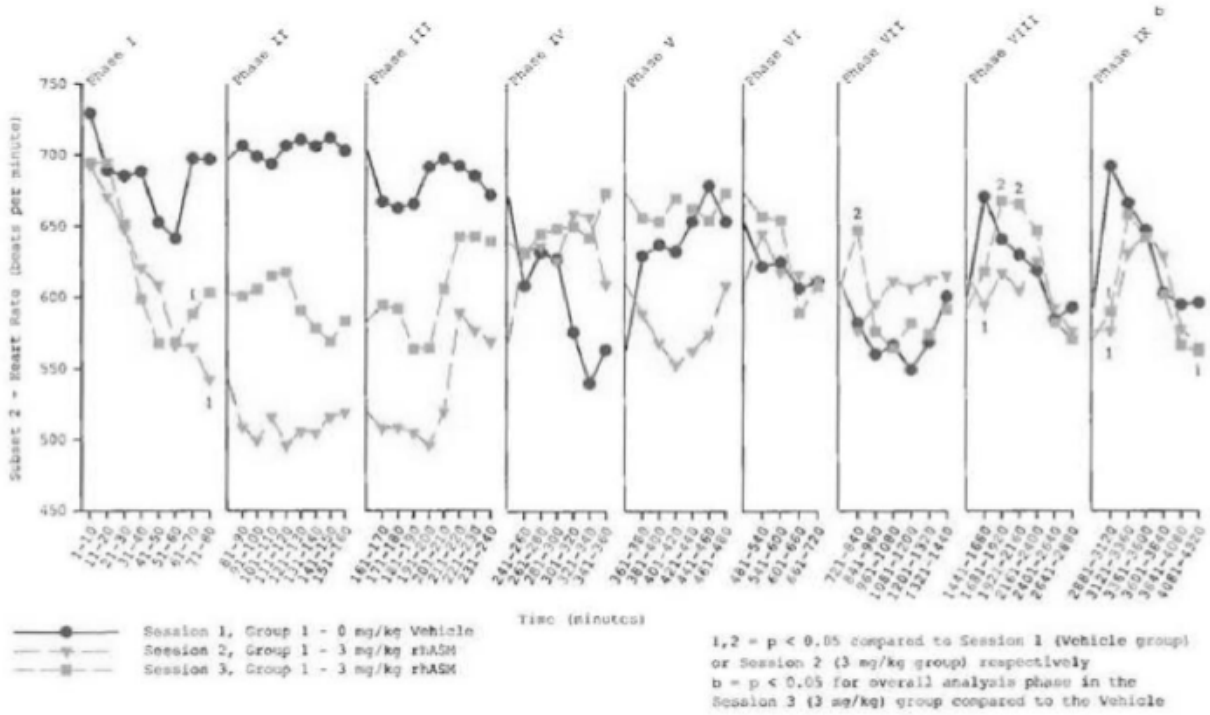
オリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、心拍数（図 23）、血圧及び活動性の低下がみられ、投与後 43 時間以内に死亡するか、又は瀕死のため安楽殺が必要となった。オリプダーゼ アルファを 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、心拍数、血圧及び活動性の低下がみられ、4 匹中 3 匹が投与後 75 時間以内に死亡するか、又は瀕死のため安楽殺が必要となった。用量 10 及び 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファ投与により、有意かつ用量依存的な変化が、最初、投与後約 60 分に心拍数にみられ、その直後に活動性に、最終的（投与後約 130～140 分）に血圧に認められた。3 mg/kg の用量において心拍数及び活動性の軽度の低下がみられたが、この用量で単回投与及び反復投与したときのいずれにおいても忍容性は良好であった（図 24）。オリプダーゼ アルファを 10 mg/kg の用量で反復投与したとき、1 匹で重度ではあるが急性の血圧及び心拍数の低下が投与後約 10 分から認められ、投与後約 180 分には回復した。

図 23 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 10 又は 20 mg/kg の用量で単回投与したときの心拍数（■-0533Pnp 試験）



茶色の丸をつないだ線はセッション 1 の第 1 群（0 mg/kg、溶媒）である。
橙色の三角をつないだ線はセッション 1 の第 2 群（10 mg/kg オリプダーゼ アルファ）である。
緑色の四角をつないだ線はセッション 1 の第 3 群（20 mg/kg オリプダーゼ アルファ）である。
* p<0.05（溶媒との比較）
a p<0.05（全解析期間における 10 mg/kg 群と溶媒群の比較）
b p<0.05（全解析期間における 20 mg/kg 群と溶媒群の比較）
注：オリプダーゼ アルファの高用量で死亡がみられたため、第 VIII 又は IX 相の統計解析は実施しなかった。

図 24 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で反復投与したときの心拍数（[redacted]-0533Pnp 試験）



茶色の丸をつないだ線はセッション 1 の第 1 群（0 mg/kg、溶媒）である。
橙色の三角をつないだ線はセッション 2 の第 1 群（3 mg/kg オリプダーゼ アルファ）である。
緑色の四角をつないだ線はセッション 3 の第 1 群（3 mg/kg オリプダーゼ アルファ）である。
1, 2 p<0.05［それぞれセッション 1（溶媒群）又はセッション 2（3 mg/kg 群）との比較］
b p<0.05［セッション 3（3 mg/kg 群）の全解析期間における溶媒群との比較］

結論

オリプダーゼ アルファを 10 又は 20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、心拍数、血圧及び活動性の用量依存的な低下がみられ、最終的には投与後 2～4 日以内に死亡するか、又は瀕死のため安楽殺が必要となった。しかし、3 mg/kg の用量では心拍数及び活動性の軽度の減少しかみられず、忍容性が良好であった。本試験条件下において、オリプダーゼ アルファを 3 mg/kg の用量で静脈内投与したとき、血行動態パラメータを指標とした忍容性は良好であった。

4.2 ASMKO マウスのベースライン心電図データの採取

[redacted]-0302Pnp 試験（Module [4.2.1.3-2]）

試験目的

本試験の目的は、ASMKO マウスのベースライン ECG を測定することであった（[redacted]-0302Pnp 試験）。本試験の副次的目的は、Sanofi が入手した新たなシステムである覚醒下非侵襲的心機能測定用 ECGenie

のバリデーションを行うことであった。本試験は 2 つのパートに分かれており、パート 1 ではいかなる介入も行わずに ECG を測定し、パート 2 ではオリプダーゼ アルファの投与後に ECG を測定した。パート 1 で薬物非投与時に安静時心拍数が一定に維持された場合に、更に試験を進めて、パート 2 で ASMKO マウスの静止時心拍出量に対するオリプダーゼ アルファの影響を検討することとした。

試験デザイン

パート 1 では、20 匹の雄又は雌の ASMKO マウスを個別に ECGenie に乗せ、ECG を測定した。全ての動物について、測定前に測定器の上で約 10 分間休息させた。これは動物を馴化させ、新規環境が動物に及ぼす可能性のある影響を低減して正確な ECG を得るために行った。

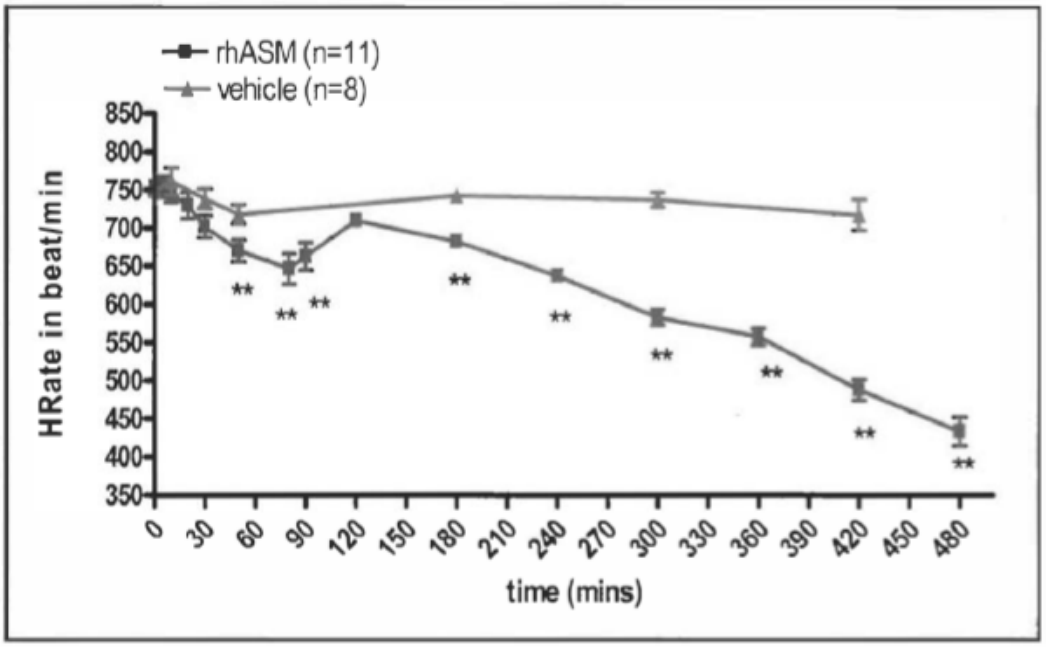
ECG 測定の前又は後で、マウスに異常はみられなかった。これら 20 匹の ASMKO マウスから得られたベースラインデータにおける正常な安静時心拍数は平均 755 ± 41 bpm であり、雌雄間に統計学的有意差は認められなかった。また、ベースラインの安静時心拍数に不整脈は認められなかった。これらの結果から、パート 2 においてオリプダーゼ アルファ投与後の心周期を検討する非侵襲的試験を実施するため、ECGenie を更に使用して検討することとした。

パート 2 では、パート 1 で 20 匹の雄又は雌の ASMKO マウスから覚醒下ベースライン ECG 測定値を得た後に、それらのマウスを 2 つの群に割り付けた。12 匹に用量 20 mg/kg のオリプダーゼ アルファを、8 匹に溶媒を静脈内投与した。覚醒下 ECG 測定は投与後 8 時間まで行った。

試験結果

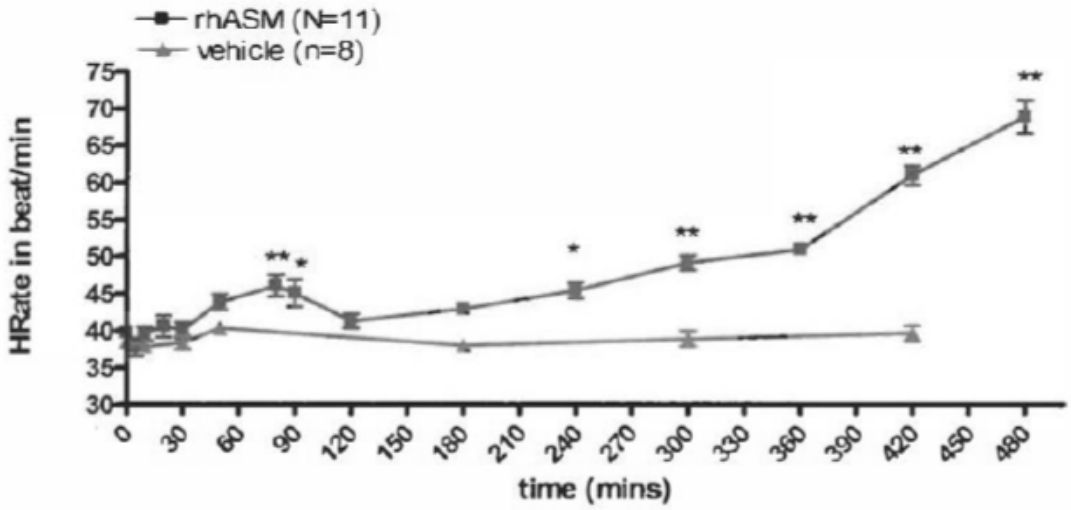
ASMKO マウスにおいて、オリプダーゼ アルファの投与により有意な徐脈が生じた。心拍数は、投与後約 50 分に最初に低下し、代償性に変化した後、投与後 3 時間付近で更に低下した（図 25）。ASMKO マウスに溶媒を投与したとき、心拍数への影響は認められなかった。ECGenie の結果は、テレメトリー試験の [redacted]-0533Pnp 試験（Module [4.2.1.3-1]）及び [redacted]002 試験（Module [4.2.1.3-4]）の結果と非常に類似していた。この徐脈に伴って、対応する QT 間隔の延長が認められ、この所見も有意な変化であった（図 26）。QT 間隔は、投与後 80 分に最初に延長し、正常値まで短縮した後、投与後 4 時間から着実に延長した。溶媒を投与したとき、QT 間隔の有意な変化は認められなかった。ASMKO マウスへのオリプダーゼ アルファ投与後約 3 時間に立毛が認められた。

図 25 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの心拍数（[redacted]-0302Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。
** p<0.01

図 26 - ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの QT 間隔（[redacted]-0302Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。
** p<0.01

結論

テレメトリーを用いた過去の試験でみられたように、ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与すると心拍数が低下し、有意な徐脈が引き起こされることがこれらのデータから示された。オリプダーゼ アルファを投与した ASMKO マウスで QT 延長も認められた。これらの結果から、徐脈及び QT 延長の原因に焦点を合わせて、心拍数に対するオリプダーゼ アルファの影響を更に検討した。

4.3 ECGenie を用いた C57BL/6 マウスのベースライン心電図データの採取

[redacted]-0292Pnp 試験（Module [4.2.1.3-3]）

[redacted]-0302Pnp 試験（Module [4.2.1.3-2]）

試験目的

本試験の目的は、C57BL/6 マウスのベースライン時及びオリプダーゼ アルファ投与後の ECG を測定することであった（[redacted]-0292Pnp 試験）。C57BL/6 マウスは ASMKO マウスモデルの背景系統であったため、このマウスについても ECGenie でモニタリングした。過去の試験において、C57BL/6 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は明らかな毒性は認められないが、ASMKO マウスでは毒性がみられることが示されている。[redacted]-0302Pnp 試験と同様に、本試験も 2 つのパートにより実施した。パート 1 ではベースライン時に測定し、パート 2 ではオリプダーゼ アルファの単回投与後に測定した。本試験は、C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したとき、心臓パラメータに影響がみられるか否かをより明らかにするため、続けて実施した。本試験で得られたデータは、ASMKO マウスにおいてベースライン時及びオリプダーゼ アルファ投与後に ECG を測定した [redacted]-0302Pnp 試験のデータとも比較した。

試験デザイン

パート 1 では、20 匹の雄又は雌の C57BL/6 マウスを個別に ECGenie に乗せ、ECG を測定した。全ての動物について、測定前に測定器の上で約 10 分間休息させた。これは動物を馴化させ、新規環境が動物に及ぼす可能性のある影響を低減して正確な ECG を得るために行った。ECG 測定の前又は後で、異常はみられなかった。

パート 2 では、最初の C57BL/6 マウスのうち 10 匹にオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。それらのマウスを一般状態観察及び ECGenie により投与後 6 時間まで厳密にモニタリングした。ECG の測定は、最初の 1 時間は 30 分ごとに、その後は 2 時間ごとに行った。この測定期間において、異常な行動は認められなかった。

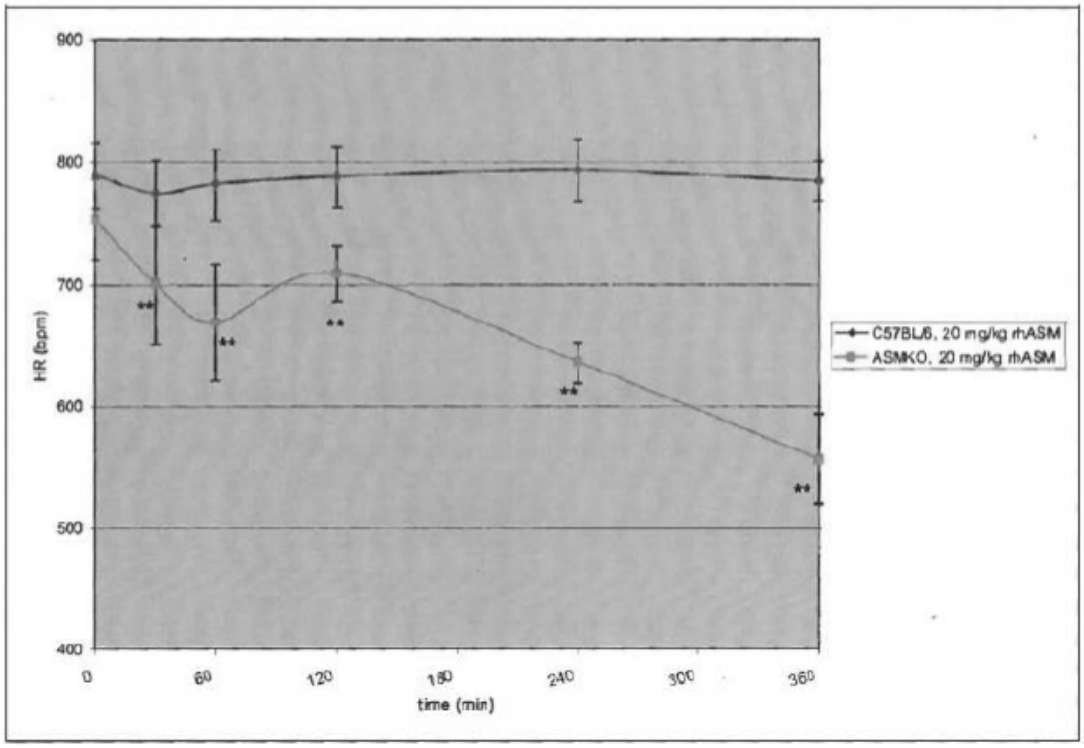
試験結果

C57BL/6 マウスから得られたベースラインデータにおける正常な安静時心拍数は平均 759 ± 33 bpm であり、雌雄間に差は認められなかった。また、C57BL/6 マウスのベースラインデータに不整脈は認められなかった。C57BL/6 マウスと ASMKO マウスの間で、ベースライン心拍数に差はみられなかった。両系統ともに正常な安静時心拍数は約 750～760 bpm であった。

C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で投与したとき、ECG モニタリング期間の 6 時間を通して心拍数の有意な低下は認められなかった（図 27）。投与後 30 分に心拍数の軽度低下がみられたが有意差はなく、これはオリプダーゼ アルファ自身ではなくオリプダーゼ アルファの注射による変化と考えられた。これは一般状態に異常がみられなかったことと一致している。このことから、C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で静脈内投与しても心毒性はみられないことが示唆された。オリプダーゼ アルファによる有意な変化が認められなかったことから、溶媒との差はみられないと予想されたため、溶媒は投与しなかった。

[redacted]-0292Pnp 試験のデータと本試験のデータを比較すると、C57BL/6 マウスと ASMKO マウスとの間で、オリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの心拍数に劇的な差がみられた（図 27）。投与後 30 分から ASMKO マウスの心拍数が C57BL/6 マウスよりも有意に低くなった。この傾向は投与後 6～8 時間の観察期間を通して持続した。

図 27 - C57BL/6 及び ASMKO マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与したときの心拍数（[redacted]-0292Pnp 及び [redacted]-0302Pnp 試験）



平均値 ± SD を示す。
** p<0.01

結論

本試験のデータから、C57BL/6 マウスにオリプダーゼ アルファを 20 mg/kg の用量で単回投与しても心毒性はみられないことが示唆された。C57BL/6 マウスと ASMKO マウスとの間で差がみられたことから、スフィンゴミエリンの大量の分解産物が毒性を示すとの仮説が更に裏付けられた。

4.4 カニクイザルにおける心血管系及び呼吸系の評価

[redacted]002 試験（Module [4.2.1.3-4]）

試験目的

本試験の目的は、ヒトの安全性に関連すると考えられる心血管系及び呼吸系に対するオリプダーゼ アルファの影響の有無を検討することであった（08002 試験）。具体的には、本試験において、テレメトリー装着覚醒カニクイザルにオリプダーゼ アルファを静脈内投与したときの血行動態及び呼吸系パラメータ並びに ECG 活動性への影響を検討した。

試験デザイン

全ての試験動物にあらかじめラジオテレメトリー装置及び血管アクセスポートを装着させた。本試験は2つの群で構成されており、第1群には雌雄各2匹のカニクイザルが、第2群には雌雄各3匹のカニクイザルが含まれた。第1群の動物には、1日目に陽性対照のモルヒネを0.033 mL/kgの容量で単回皮下投与した。第2群の動物には、1及び4/5日目にそれぞれ溶媒（20 mmol/L $NaPO_4$、0.1 mmol/L EDTA、0.1 mol/L L-メチオニン、5%精製白糖、pH 6.5）又は被験物質である用量30 mg/kgのオリプダーゼ アルファを、シリンジポンプを介した30分間の持続静注により7.7 mL/kgの容量で投与した。試験デザインを表14に示す。

表 14 - ■002 試験の試験デザイン

セッション[a]	群	動物数[b] (雄/雌)	被験物質	用量 (mg/kg)[c]	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与法	モニタリング期間
1	1	2/2	陽性対照	0.5	15	0.033	皮下投与	各投与前2時間～各投与後24時間
2	2	3/3	溶媒	0	0	7.7	各セッションに1回30分間の持続静注	
3			オリプダーゼ アルファ	30	3.9			

a セッション1及び3の投与の間は48時間以上あけた。セッション3の終了後に投与を終了した。
b 各セッション（セッション2及び3）で同じ動物に投与したが、例外としてセッション1の陽性対照動物（第1群）には別のコホートの動物を使用した。
c オリプダーゼ アルファを30 mg/kgの用量で投与したときに定量的な一般状態の変化がみられなかったことから、10及び3 mg/kgの用量での投与は行わなかった。

本試験は用量漸減デザインで計画されており、第2群で溶媒（セッション2）を1日目に投与した動物に、用量30 mg/kgのオリプダーゼ アルファ（セッション3）も4/5日目に投与した。用量30 mg/kgのオリプダーゼ アルファの投与で、一般状態の評価パラメータに定量的な変化がみられた場合は、休薬後に、より低用量のオリプダーゼ アルファを投与し、これを定量的な変化がみられない用量が特定されるか、又は予定最低用量（3 mg/kg）に到達するまで続けた。用量30 mg/kgのオリプダーゼ アルファの投与で定量的な変化がみられなかった場合は、より低用量の評価は行わずに試験を終了した。

薬理学的に誘発された呼吸系パラメータの変化をモニタリングするLifeShirt®システムの適切性を確認するため、陽性対照群（第1群）を設けた。投与前約2時間～投与後約20時間に、呼吸系パラメータ（呼吸数及び1回換気量）をLifeShirt®システムで測定した。動脈血液試料を採取し、pH、二酸化炭素分圧（pCO_2）、酸素分圧（pO_2）、酸素飽和度（SO_2）及び血中重炭酸塩（HCO_3^-）を分析した。

各投与前2時間以前～各投与後24時間に第2群の動物の血行動態パラメータ［直接血圧（収縮期動脈圧、拡張期動脈圧及び平均動脈圧を算出）及び心拍数］、ECG及び深部体温をテレメトリーで測定した。ECG波形を獣医循環器認定医に送り、定性的な異常の評価及び定量的な評価［PR、QRS、RR、QT及びQTcB（Bazett補正）間隔］を行った。各投与前約2時間～各投与後約20時間に第2群の動物

の呼吸系パラメータ（呼吸数及び 1 回換気量）を LifeShirt®システムで測定した。第 2 群の動物から動脈血液試料を採取して pH、pCO_2、pO_2、SO_2 及び HCO_3^-を分析した。血液試料を第 2 群の動物から採取した。セッション 3（30 mg/kg オリプダーゼ アルファ）に血清試料を採取して被験物質の濃度を分析した。試験計画書に記載した時点での一般状態の観察も行い、投与量を算出する目的で体重を測定した。

試験結果

モルヒネの投与後に、予想された呼吸数の変化がみられたが、1 回換気量及び動脈血液ガスパラメータの変化は認められなかった。これらの変化は低用量のモルヒネを投与したときの作用と一致していた。

オリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で投与したとき、一般状態の変化は認められなかった。オリプダーゼ アルファの静脈内投与による心拍数、血圧、ECG 間隔（PR、QRS、QT 及び QTc）、体温、呼吸数、1 回換気量及び動脈血液ガスパラメータ（pH、pCO_2、pO_2、SO_2 及び HCO_3^-）への影響は認められなかった。

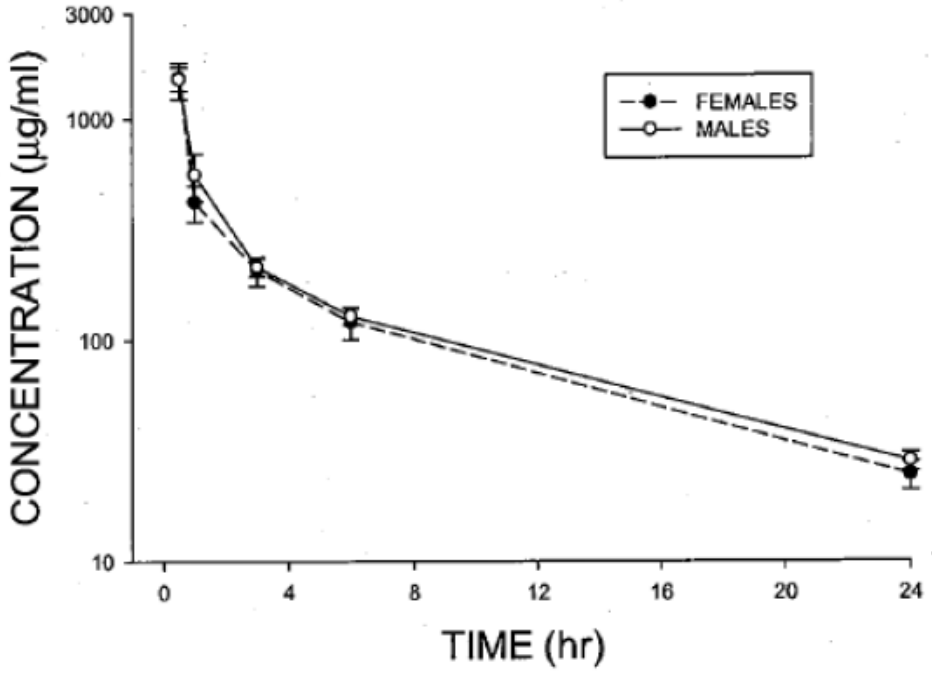
カニクイザルにオリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で 30 分間の持続静注により単回投与したときのトキシコキネティクスも評価した。雌雄のサルで同様の結果が得られ、オリプダーゼ アルファの平均最終相消失半減期は 7.31 時間であった（表 15及び図 28）。これらの結果から、オリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で 30 分間の持続静注により投与したときに十分な曝露量が得られることが示された。

表 15 - カニクイザルにオリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で持続静注により単回投与したときのトキシコキネティクスパラメータ（[redacted]002 試験）

パラメータ	全動物 (n=5)	雄 (n=2)	雌 (n=3)
$\alpha t_{1/2}$ (hr)	0.21 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.18 ± 0.01
$Bt_{1/2}$	7.31 ± 0.43	7.52 ± 0.03	7.17 ± 0.55
CL (mL/hr)	28.6 ± 3.31	28.9 ± 2.51	28.4 ± 4.31
V_{ss} (mL)	233 ± 36.6	242 ± 29.3	228 ± 46.3
AUC (µg•hr/mL)	3378 ± 415	3552 ± 461	3262 ± 434
C_{max} (µg/mL)	1521 ± 191	1512 ± 282	1527 ± 183

略語：$t_{1/2}$=半減期、CL=クリアランス、AUC=曲線下面積、C_{max}=最高濃度、V_{ss}=分布容積
値は平均値 ± SD を示す。

図 28 - 雌雄のカニクイザルにオリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で持続静注により単回投与したときの血清中濃度（[redacted]002 試験）



平均値 ± SD を示す。

結論

結論として、本試験条件下において、オリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で静脈内投与したときの忍容性は、全ての試験動物で良好であった。血圧、心拍数、体温、ECG 間隔、呼吸数、1 回換気量、及び血液ガスパラメータに、用量に関連した変化、生物学的意義のある変化、又は毒性変化は認められなかった。オリプダーゼ アルファの無毒性量（NOAEL）は 30 mg/kg と考えられた。オリプダーゼ アルファを 30 mg/kg の用量で投与したとき、定量的な一般状態の変化は認められなかったことから、10 及び 3 mg/kg の用量での投与は行わなかった。

4.5 イヌを用いたオリプダーゼ アルファの単回静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

[redacted]026 試験（Module [4.2.3.1-19]）

試験目的

本試験の目的は、イヌにオリプダーゼ アルファを単回静脈内投与した後、2 週間回復させたときの毒性の有無を検討することであった（02026 試験）。更に、トキシコキネティクス評価用の試料も採取した。

試験デザイン

雌雄のビーグル犬を4つの群（1群雌雄各4匹）に割り付けた。各群に溶媒（20 mmol/L $NaPO_4$、5%(w/v)精製白糖、0.06%ポリソルベート 80、0.1 mmol/L EDTA 及び 0.1 mol/L L-メチオニン溶液、pH 6.5）又は用量 3、10 若しくは 30 mg/kg のオリプダーゼ アルファを 8.1 mL/kg の容量で単回静脈内投与した。試験デザインを表 16に示す。

毒性の評価は、生死、一般状態の変化、体重、摂餌量、ECG 検査、呼吸数、体温、パルスオキシメトリー、臨床検査、器官重量及び肉眼解剖病理学的検査に基づいて行った。体重、摂餌量、臨床検査、器官重量及び肉眼解剖病理学的検査の結果の詳細は、Module 2.6.6 [2.3.1 項]及び Module 2.6.7 [5 項]に記載する。

表 16 - [redacted]026 試験の試験デザイン

群	動物数 (雄/雌)	被験物質	用量 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与法
1	4/4	対照	0	0	8.1	単回静脈内投与
2	4/4	オリプダーゼ アルファ	3	0.37		
3	4/4		10	1.23		
4	4/4		30	3.7		

試験結果

全例が計画安楽殺時まで生存した。投与期間中に多くの一般状態の変化が認められたが、多数のオリプダーゼ アルファ投与動物とともに対照動物にも認められたことから、これらは溶媒に関連した変化と考えられた。多くの動物で、投与に関係なく以下の所見が認められた：鼻口部若しくは眼窩周囲領域又はその両方の腫脹；活動性低下、活動性亢進；側臥位又は胸骨臥位；顔面をこする動作；食物を含む吐物；流涎過多；無形便；結膜赤色化；努力性呼吸若しくは浅速呼吸又はその両方；歯肉蒼白化；耳部（表面及び内側）赤色化；体部（鼻口部若しくは歯肉又はその両方でも発現）皮膚赤色化；及び膨疹（数匹の頭部若しくは耳部又はその両方、又は全身に発現）。そのほかに以下の所見がより低い程度で認められた：肢又は足蹠の腫脹；全身の振戦；嘔気；投与後の異常発声；透明な鼻汁、黄色若しくは透明又はその両方の吐物；排便時のいきみ；透明な眼脂；速い呼吸；及び接触時温感。これらの後者の所見も溶媒に関連したものと考えられた。投与時間を延長しても、観察された一般状態の変化の発現頻度及び重症度は低下しなかった。

上記の所見に基づき、多くの動物（10 mg/kg 群の雄 1 匹を除く 10 及び 30 mg/kg 群の全例）にジフェンヒドラミン（1 mg/kg）を予防的に投与した。ジフェンヒドラミンは上記の一般状態の変化の多くで重症度を低下させたが、予防的投与を行った動物でも依然としてこれらの多数の所見が認められた。一般状態の変化の数からこれらの所見は溶媒に関連すると考えられたため、被験物質に関連した真の所見を明確に説明することはできない。オリプダーゼ アルファの投与との関連性が不明な所見は、活

動性亢進（10 及び 30 mg/kg 群のそれぞれ雌 1 匹）、顔面をこする動作（10 及び 30 mg/kg 群の雌で発現頻度が高い）及び接触時冷感であった。接触時冷感は対照群の 1 匹、3 mg/kg 群の雌 1 匹、30 mg/kg 群の雄 1 匹及び 30 mg/kg 群の雌全例に認められた。投与後 2 時間の時点にみられた詳細な一般状態の変化は、上記の所見と一致しているが、投与直後と比較して重症度がより低かった。

これらの所見は 2 日目までに回復し、その後 17 日目まで正常と判断された。

投与前値との比較では投与後 2 時間の時点において有意ではない軽度の体温低下がみられたが、対照群と投与群の間には全群を通して体温に差は認められなかった。投与後 24 時間の時点での体温は、投与前値と同程度であった。呼吸数、心拍数、ECG データ、パルスオキシメトリーデータ、体重、体重変化及び摂餌量に、オリプダーゼ アルファの明らかな影響は認められなかった。

3 及び 10 mg/kg 群の雄において、投与後 2 時間の時点で収縮期血圧の有意な低下が認められた。投与後 24 時間までには、全ての値が対照値と同程度になった。雌には同様の傾向が認められなかった。

結論

結論として、溶媒群の全例でみられた反応により、被験物質に関連した真の変化を評価することが困難であったが、投与後 24 時間までには全例がほぼ正常となった。したがって、投与後 24 時間の時点で全例が正常であったこと、体温、呼吸数、ECG 及び酸素飽和度に被験物質に関連した変化が認められなかったこと、並びに血圧の明らかな変化及び持続的な変化が認められなかったことから、ビーグル犬にオリプダーゼ アルファを緩徐なボーラス静注により単回投与したときの NOAEL は 30 mg/kg より高いと考えられた。

5　薬力学的薬物相互作用試験

[redacted]-01094 試験（Module [4.2.1.4-1]）

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グループである(4)。FIASMA のほとんどは *in silico* 解析によって同定されたもので、実質的な *in vitro* 又は *in vivo* 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 種類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* で様々なレベルの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、シタロプラムとのインキュベーションでは約 80%の ASM 活性が残存していた(5)。フルオキセチン（120～500 ng/mL）及びシタロプラム（50～110 ng/mL）の治療域を目標に、オリプダーゼ アルファの投与 3 日前に ASMKO マウスに Alzet ポンプを外科的に移植した(6)。次いで、1 mg/kg のオリプダーゼ アルファの単回 IV 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影響を、ASMKO マウスの脾臓と肝臓で評価した。

試験目的

この試験の目的は、1 mg/kg のオリプダーゼ アルファを ASMKO マウスに単回 IV 投与後の組織中スフィンゴミエリン含量に対するフルオキセチンとシタロプラムの影響を調べることである。

試験デザイン

雌雄の ASMKO マウスを 6 群（雌雄各 6 匹/群）に分け、表 17 に記載したように投与した。0 日目に、Alzet ポンプを外科的にマウスに移植して、192 µg/日のシタロプラム（第 3 群及び第 4 群）又は 300 µg/日のフルオキセチン（第 5 群及び第 6 群）を投与した。

3 日目に、シタロプラム又はフルオキセチンの測定のため、第 3 群～第 6 群から血液を採取した。また、3 日目に溶媒（第 1 群、第 3 群及び第 5 群）又は 1 mg/kg のオリプダーゼ アルファ（第 2 群、第 4 群及び第 6 群）を動物に投与した。6 日目に全動物を安楽死させ、スフィンゴミエリン、シタロプラム及びフルオキセチン濃度の測定のために肝臓及び脾臓を採取した。

表 17 - ■-01094 試験の試験デザイン

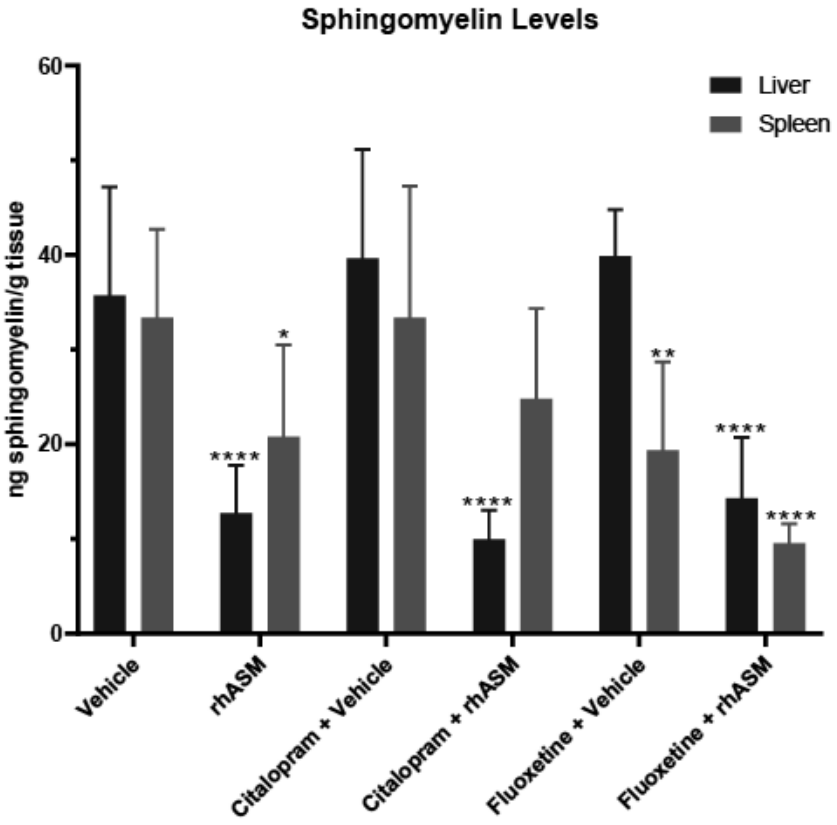
群	動物数 (雄/雌)	被験物質	オリプダーゼ アルファと溶媒投与レジメン（試験 3 日目）	阻害薬用量（試験 0 日目）	阻害薬投与レジメン	血液サンプル採取	組織サンプル採取
1	6/6	溶媒	7.7 mL/kg, IV	N/A	N/A	N/A	オリプダーゼ アルファ投与 3 日後に肝臓と脾臓 肝臓：阻害薬* 及びオリプダーゼ アルファ濃度測定、並びにスフィンゴミエリン含量測定 脾臓：阻害薬*及びスフィンゴミエリン含量測定
2	6/6	オリプダーゼ アルファ	1 mg/kg, IV	N/A	N/A	N/A	
3	6/6	シタロプラム + 溶媒	7.7 mL/kg, IV	192 µg/日	Alzet 浸透圧ポンプ Model 2001 (1 µL/hr, 200 µL reservoir) による皮下投与	阻害薬濃度測定のため試験 3 日目及び麻酔時（オリプダーゼ アルファ投与 3 日後）	
4	6/6	シタロプラム + オリプダーゼ アルファ	1 mg/kg, IV	192 µg/日			
5	6/6	フルオキセチン + 溶媒	7.7 mL/kg, IV	300 µg/日			
6	6/6	フルオキセチン + オリプダーゼ アルファ	1 mg/kg, IV	300 µg/日			

略号：IV, 静脈内投与; SC, 皮下投与; N/A, 該当せず; * 第 3 群及び第 6 群のみ

試験結果

肝臓と脾臓のスフィンゴミエリンは、ASMKO マウスに 1 mg/kg のオリプダーゼ アルファを阻害薬なしで投与した 3 日後に、有意に減少していた（図 29）。また、シタロプラムとオリプダーゼ アルファとの同時投与により、肝臓においてスフィンゴミエリンの有意な減少が認められた。脾臓スフィンゴミエリン含量はシタロプラムの同時投与後に有意に低下しなかった。これらの含量は、オリプダーゼ アルファ投与動物との間で統計学的な有意差はなかった。フルオキセチンとオリプダーゼ アルファとの同時投与は、ASMKO マウスの肝臓と脾臓の両方で有意なスフィンゴミエリン減少をもたらした。溶媒及びフルオキセチンを投与した動物でも、脾臓でスフィンゴミエリンレベルの低下が認められたが、肝臓では認められなかった。オリプダーゼ アルファ単独投与動物と、オリプダーゼ アルファといずれかの阻害薬投薬動物の間で、肝臓又は脾臓のスフィンゴミエリン含量の差は観察されなかった。オリプダーゼ アルファを投与したいずれの群でも、雌雄動物間で肝臓又は脾臓のスフィンゴミエリン含量に差はなかった。しかし、シタロプラム単独投与群では、雄よりも雌でスフィンゴミエリン含量は低かった。

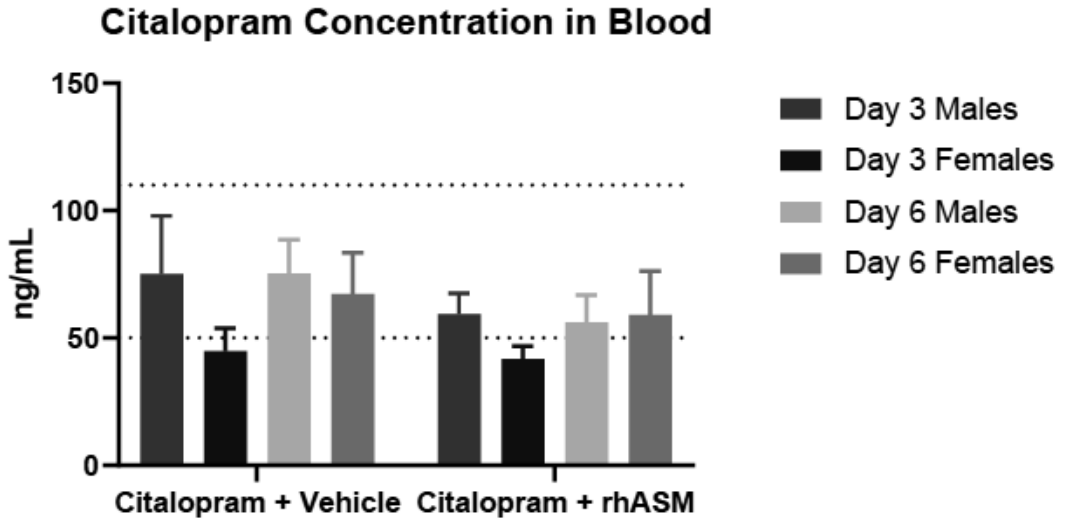
図 29 - オリプダーゼ アルファ（rhASM）投与 3 日後の肝臓及び脾臓のスフィンゴミエリン含量（平均 ± SD）（[redacted]-01094 試験）



*, p=0.0293; **, p=0.0086; ****, p<0.0001 compared to vehicle by one-way ANOVA. Olipudase alfa is denoted by rhASM.

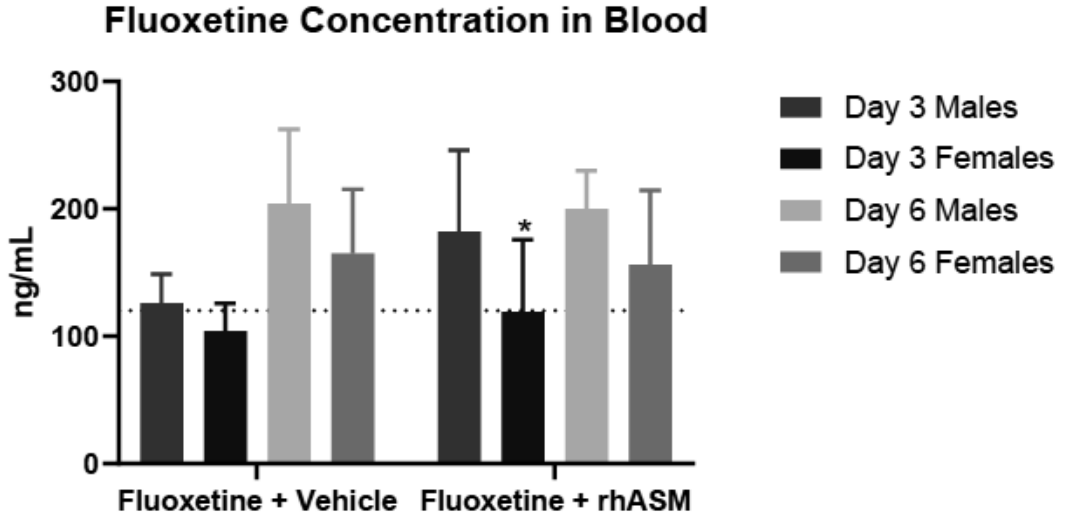
3 日目と 6 日目に、シタロプラムとフルオキセチンの血中濃度を測定した。両阻害薬の濃度は、雌では雄よりも低い傾向がみられたが、フルオキセチン及びオリプダーゼ アルファを投与した試験 3 日目の雌（第 6 群）のみが、同群の試験 3 日目の雄と比較して、統計学的に有意な濃度の差が認められた（図 30 及び図 31）。第 3 群の雌マウスのシタロプラム血中濃度は、試験 3 日目で治療域をやや下回り、オリプダーゼ アルファを同時投与した全てのマウス（第 4 群）では治療域の下のほうであった。フルオキセチン濃度は、第 5 群及び第 6 群のいずれにおいても、ほとんどが治療域の下限又はその少し上であった。これらの濃度において、シタロプラム及びフルオキセチンは、オリプダーゼアルファの投与後のスフィンゴミエリンクリアランスに負の影響を及ぼさなかった。しかし、両阻害薬の血中濃度が高い場合に、ASMKO マウスにおけるオリプダーゼ アルファの薬力学的作用が低下するかどうかは不明である。

図 30 - 試験 3 日目及び 6 日目におけるシタロプラムの血中濃度（平均 ± SD）（[redacted]-01094 試験）



Dotted line represents lower and upper limit of therapeutic range for citalopram. Olipudase alfa is denoted by rhASM.

図 31 - 試験 3 日目及び 6 日目におけるフルオキセチンの血中濃度（平均 ± SD）（[redacted]-01094 試験）



*, p=0.015 compared to day 3 males administered fluoxetine and olipudase alfa (rhASM) by two-way ANOVA.
Dotted line represents lower limit of therapeutic range for fluoxetine. Olipudase alfa is denoted by rhASM.

結論

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(5)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負の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 アルファ媒介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。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。しかしながら、この試験では阻害薬の血中濃度が低かったことを考慮すると、高濃度ではいずれかの阻害薬が ASMKO マウスにおけるオリプダーゼ アルファの薬力学的作用を低下させる可能性は否定できない。

6　考察及び結論

ASMKOマウスを用いてオリプダーゼ アルファの薬理学的特性を検討する非臨床試験を実施した。単回投与試験において、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 アルファの様々なロット、オリプダーゼ アルファのHMWS及び製造工程の同等性／同質性を評価する試験も実施した。

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み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する別の試験も実施した。また、ASMKOマウス、ビーグル犬及びカニクイザル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。

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、腎臓及び肺中のスフィンゴミエリン濃度が有意に低下した。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裏付けられた。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、肺中スフィンゴミエリン濃度は、1及び3 mg/kgの用量でそれぞれ最大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みられることが裏付けられた。

ASMKOマウスを用いてHMWS-オリプダーゼ アルファを評価する試験も実施した。これらの試験において、HMWSが検討したいずれの濃度で存在していてもオリプダーゼ アルファの有効性及び安全性に影響を及ぼさないことが示された。2つの製造工程　製法A*　及び　　製法B*　　を評価した別の同等性／同質性試験において、2つの製造プロセス間でオリプダーゼ アルファの有効性に差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10 mg/kg以上の用量で投与したとき、毒性（最も顕著なものは死亡）が認められた。この毒性の潜在的な原因を検討するため、オリプダーゼ アルファ投与後に、サイトカインのプロファイリングを実施するとともに、スフィンゴミエリンの異化代謝産物を測定した。高用量（10 mg/kg超）のオリプダーゼ アルファを投与したとき、セラミド、SPH及びS1P（蓄

＊新薬承認情報提供時に置換

積したスフィンゴミエリンの異化代謝産物）の濃度が上昇した。総セラミド及びC16-セラミドの両方の血漿中濃度の上昇と、致死率及び臨床状態不良の増加との間に相関性が認められた。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みられる基質（スフィンゴミエリン）分解による毒性を軽減又は予防する方法として、用量漸増投与法が有用であることが裏付けられた。実際にオリプダーゼ アルファを用量漸増法で投与したときの忍容性は良好であり、許容可能な安全性プロファイルが認められた。

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、用量反応的な炎症誘発性サイトカイン（IL-6、G-CSF、IL-1α、IL-1β及び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。さらに、用量漸増法を使用して、1、4、6及び8日目にオリプダーゼ アルファを低用量の3 mg/kgで投与した後、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。

ビーグル犬にオリプダーゼ アルファを30 mg/kgまでの用量で単回静脈内投与した。血圧、直腸体温及び呼吸数に影響は認められなかった。カニクイザルにオリプダーゼ アルファを30 mg/kgの用量で単回静脈内投与した。血圧、心拍数、体温、ECG間隔、呼吸数、1回換気量及び血液ガスパラメータに有害な影響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、10及び20 mg/kgの用量で単回投与し、心機能（血行動態学的反応、心拍数、血圧及び運動活動性）をテレメトリーで評価した。投与後約60分に用量依存的な心拍数の低下がみられ、これに伴って運動活動性の低下が認められた後、投与後約130～140分から血圧の緩徐な低下が認められた。また、オリプダーゼ アルファを3及び10 mg/kgの用量で2回投与し、心機能（血行動態学的反応、心拍数、血圧及び活動性）を評価したところ、オリプダーゼ アルファの2回目投与後に心拍数の軽度の低下が認められたが、心拍数が550 bpm未満に低下することはなかった。

ASMKOマウスにおける2種類のFIASMAの潜在的阻害作用を調べるために1つの試験を実施した。試験結果から、フルオキセチン及びシタロプラムのいずれにおいても、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負の影響を与えないことが示唆された。しかし、両阻害薬の血中濃度が低かったため、結果の解釈には限界がある。

これらの試験から、ASMKOマウスにオリプダーゼ アルファを投与するとスフィンゴミエリンが用量反応的に減少し、隔週投与で効果的に組織中の基質が減少することが示された。更に、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みられた毒性のメカニズムを慎重に評価したところ、ASMD 患者を対象とした反復投与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あるものとして、サイトカイン、急性期タンパク質、セラミド及び心血管系血行動態が特定された。

参 考 文 献

1. 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.
2. Yamaji A, Sekizawa Y, Emoto K, Sakuraba H, Inoue K, Kobayashi H, et al. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. J Biol Chem. 1998:27;273:5300-6.
3. Gentry PA. Acute Phase Proteins 12b. In: Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Chapter 19. Taylor & Francis. 1999. p.336-98.
4. 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.
5. 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.
6. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. Pharmacopsychiatry. 2011;44:195-235.

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

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 30

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 8

3　　副次的薬理試験 14

4　　安全性薬理試験 22

5　　薬力学的薬物相互作用試験 30

表 目 次

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

表2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings 8

表2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings 14

表2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - noteworthy findings 22

表2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog) 27

表2.6.3.4.3 - Safety pharmacology – cardiovascular/respiratory in vivo - hemodynamic, electrocardiography (monkey) 29

表2.6.3.5.1 - Pharmacodynamic drug interactions overview - noteworthy findings 30

1　薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics					
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0428Pnp	Module [4.2.1.1-1]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1223Pnp	Module [4.2.1.1-2]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0110Pnp	Module [4.2.1.1-3]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0129Pnp	Module [4.2.1.1-4]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-06259	Module [4.2.1.1-5]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0495Pnp	Module [4.2.1.1-6]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0790Pnp	Module [4.2.1.1-7]
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-04646	Module [4.2.1.2-14]
Repeat Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1084Pnp	Module [4.2.1.1-8]
Repeat Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0813Pnp	Module [4.2.1.1-9]

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Secondary Pharmacodynamics					
Cytokine Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1008Pnp	Module [4.2.1.2-1]
Cytokine Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0127Pnp and [redacted]-0374Pnp	Module [4.2.1.2-2] and Module [4.2.1.2-3]
Ceramide and Lipid Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0129Pnp	Module [4.2.1.2-4]
Cytokine Profiling	C57BL/6 Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0436Pnp	Module [4.2.1.2-5]
Cytokine Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1009Pnp	Module [4.2.1.2-6]
Cytokine Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1010Pnp	Module [4.2.1.2-7]
Cytokine Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1240Pnp	Module [4.2.1.2-8]
Cytokine Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0437Pnp	Module [4.2.1.2-9]
Ceramide Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1346	Module [4.2.1.2-10]
Ceramide Profiling	ASMKO, ASM Heterozygous, and C57BL/6 Mice	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0778	Module [4.2.1.2-11]
Ceramide Profiling	C57BL/6 Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1511	Module [4.2.1.2-12]
Ceramide and Lipid Profiling	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-1578	Module [4.2.1.2-13]

Abbreviations: ASM: acid sphingomyelinase, ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out, PD: pharmacodynamics

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Safety Pharmacology					
Central Nervous System - Not Applicable					
Cardiovascular in vitro - Not Applicable					
Cardiovascular in vivo					
Cardiovascular Assessment	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA and [redacted] USA	[redacted]-0533Pnp	Module [4.2.1.3-1]
Cardiovascular Assessment	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0302Pnp	Module [4.2.1.3-2]
Cardiovascular Assessment	C57BL/6 Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-0292Pnp	Module [4.2.1.3-3]
Cardiovascular Assessment	Cynomolgus Monkey	Intravenous	[redacted] USA	[redacted]002	Module [4.2.1.3-4]
Cardiovascular Assessment	Beagle Dogs	Intravenous	[redacted] USA	[redacted]026*	Module [4.2.3.1-19]
Respiratory system					
Respiratory Assessment	Cynomolgus Monkey	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA and [redacted] USA	[redacted]002	Module [4.2.1.3-4]
Respiratory Assessment	Beagle Dogs	Intravenous	[redacted] USA	[redacted]026*	Module [4.2.3.1-19]
Renal system - Not Applicable					
Autonomic nervous system - Not Applicable					

Abbreviations: ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out

* Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology study conducted in beagle dogs (see 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary [Section 2.3.1])

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Safety Pharmacology					
Other					
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Genzyme, Framingham, MA, USA	[redacted]-04646	Module [4.2.1.2-14]
Gastrointestinal system - Not Applicable					
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Single Dose PD	ASMKO Mouse	Intravenous	Sanofi, Framingham, MA, USA	[redacted]-01094	Module [4.2.1.4-1]

Abbreviations: PD: pharmacodynamics; ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Single Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	1 mg/kg	4 per group 28 total animals	Reduction in sphingomyelin levels in all tissues: Liver = 62-75% reduction starting at Day 3 and continuing to Week 2 Spleen and lung = 46-48% at Day 7 Kidney = 23% reduction at Day 3 All tissues showed sphingomyelin reaccumulation back to predose level at Week 4.	[redacted]-0428Pnp	Module [4.2.1.1-1]
Single Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	3 mg/kg	6 per group 42 total animals	Sphingomyelin maximal depletion was observed in liver at approximately 5 days post-dose, while for the spleen this occurs at approximately 7 days post-dose following a single 3 mg/kg intravenous administration of olipudase alfa in ASMKO mice.	[redacted]-1223Pnp	Module [4.2.1.1-2]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Single Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	5 mg/kg	4 per group 24 total animals	Reduction in sphingomyelin levels from Day 1 to Day 7 postdose in all tissues: Liver = 55-95% reduction (compared to untreated animals) Spleen = 65-80% reduction Kidney = 70% reduction Lung = 26-43% reduction All tissues showed sphingomyelin reaccumulation from Weeks 2 to 4 postdose. Predose plasma sphingomyelin levels were just above the level of detection. Plasma sphingomyelin levels remained unchanged throughout the duration of the study.	[redacted]-0110Pnp	Module [4.2.1.1-3]
Single Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Rapid Bolus IV Single dose	3 mg/kg	3 per group 21 total animals	Reductions of sphingomyelin levels in liver, spleen, lung, and kidney were not significantly different across groups at 24 or 72 hours postdose. Comparison of the effects of sphingomyelin reduction with SM049, SM066, and SM078 showed no significant difference across lots.	[redacted]-0129Pnp	Module [4.2.1.1-4]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Single Dose PD	ASMKO mice 8-14 weeks	Bolus IV Single dose	0, 1, 3 mg/kg	12 per group 72 total animals	Under the conditions of the study, no statistically significant difference in ceramide or tissue sphingomyelin levels was observed following a single IV administration of olipudase alfa Process B and olipudase alfa Process C at 1 or 3 mg/kg up to 3 days post-dose in ASMKO mice.	[redacted]-06259	Module [4.2.1.1-5]
Single Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	5 mg/kg	Vehicle control (2) Olipudase alfa 24 hours (2) Olipudase alfa 72 hours (3) HWMS-olipudase alfa 24 hours (3) HWMS-olipudase alfa 72 hours (3) 13 total animals	No significant different in tissue sphingomyelin reduction was observed between olipudase alfa and HMWS-olipudase alfa following a single 5 mg/kg intravenous administration in ASMKO mice.	[redacted]-0495Pnp	Module [4.2.1.1-6]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Single Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	1 mg/kg	Vehicle control (4) Olipudase alfa 24 hours (3) Olipudase alfa 72 hours (3) HWMS-olipudase alfa 24 hours (3) HWMS-olipudase alfa 72 hours (3) 16 total animals	No significant different in tissue sphingomyelin reduction was observed between olipudase alfa and HMWS following a single 1 mg/kg intravenous administration in ASMKO mice.	[redacted]-0790Pnp	Module [4.2.1.1-7]
Single Dose PD	ASMKO Mice	Bolus IV Single Dose	0 and 3 mg/kg	12 (M/F) per group 60 total animals	No significant difference in ceramide, cytokines, tissue sphingomyelin levels, or histopathology was observed following administration of 3 mg/kg olipudase alfa and HMWS-olipudase alfa (low, mid, or high) in ASMKO mice. Based upon these data, it does not appear that HMWS-olipudase alfa (low, mid, or high) impacts efficacy or safety in the ASMKO mouse when compare to olipudase alfa under the conditions of this study.	[redacted]-04646	Module [4.2.1.2-14]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Repeat Dose PD	ASMKO mice 10 weeks	Bolus IV QOW for 12 weeks (total of 6 doses)	0, 0.1, 0.3, or 1 mg/kg	0 mg/kg (8) 0.1 mg/kg (8) 0.3 mg/kg (8) 1 mg/kg (8) 32 total animals	Biochemical analysis showed: Dose-responsive reduction of sphingomyelin in liver, spleen, and kidney at Weeks 1 and 2 post last doses Evidence of sphingomyelin reaccumulation at Week 2 postdose Histomorphometric analysis showed: Dose-responsive reduction of sphingomyelin in liver and spleen Similar trend in kidney as in liver and spleen There was no evidence of sphingomyelin reduction in lung by biochemical or histomorphometric analysis across doses. Data support QOW dosing regimen.	[redacted]-1084Pnp	Module [4.2.1.1-8]

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Repeat Dose PD	ASMKO mice 8-10 weeks	Rapid bolus IV QOW for 7 doses	0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/kg	Control vehicle (12) 0.3 mg/kg (6) 1.0 mg/kg (6) 3.0 mg/kg (12) 36 total animals	Biochemical analysis showed a dose-responsive reduction of sphingomyelin in the lung and spleen. Sphingomyelin reduction in the lung of the 1 and 3 mg/kg groups were 61% and 58%, respectively. Sphingomyelin levels were reduced to near background levels in the liver in all dose groups (0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg). Sphingomyelin reaccumulation was seen in all 3 tissues at 28 days post final dose.	[redacted]-0813Pnp	Module [4.2.1.1-9]

Abbreviations: ASM: acid sphingomyelinase, ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out, PD: pharmacodynamics; IV: intravenous, HMWS: high molecular weight species; QOW: every other week

3　副次的薬理試験

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Cytokine Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	20 mg/kg	5 per group 42 total animals	Under the conditions of this study, no elevations of pro-inflammatory cytokines was noted within 45 minutes postdose. Significant elevations of ceramide were noted from 2 minutes through 45 minutes postdose.	[redacted]-1008Pnp	Module [4.2.1.2-1]
Cytokine Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Rapid Bolus IV Single Dose	Vehicle or 20 mg/kg Vehicle or 0.3, 3, and 10 mg/kg	Vehicle Control (3); 20 mg/kg (4/time point) Total of 23 animals Untreated Control (3); 0.3, 3.0, and 10 mg/kg (3/time point) 48 total animals	No significant increase in cytokines was observed at 0.3 mg/kg. Large dose-responsive increases in interleukin- (IL) 6 and G-CSF were observed at 3 and 4 hours postdose. IL-6 and G-CSF levels were similar at 9 hours postdose at 3, 10, and 20 mg/kg doses. Smaller increases were seen in IL-1α, IL-1β, and MIP-1α compared to vehicle 3, 4, and 6 hours postdose at 3, 10, and 20 mg/kg. No notable increase in TNF-α was observed at any time point for any dose.	[redacted]-0127Pnp and [redacted]-0374Pnp	Module [4.2.1.2-2] and Module [4.2.1.2-3]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Cytokine Profiling	C57BL/6 mice 8-10 weeks	Bolus IV Single dose	Vehicle or 20 mg/kg	Vehicle (4) 20 mg/kg (4/timepoint) 36 total animals	No cytokine response was seen in C57BL/6 (wild type) mice following a single dose of 20 mg/kg olipudase alfa. Results suggest that elevations in cytokines seen in ASMKO mice at this dose (previous studies) are related to the breakdown of substrate present in ASMKO mice.	[redacted]-0436Pnp	Module [4.2.1.2-5]
Cytokine Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV	3 mg/kg on Days 1, 4, 6, and 8 followed by 20 mg/kg on Day 11	3 mg/kg Day 1 (6) 3mg/kg Days 1 and 4 (6) 3mg/kg Days 1, 4, and 6 (6) 3 mg/kg Days 1, 4, 6, and 8 (6) 3 mg/kg Days 1, 4, 6, and 8 and 20 mg/kg Day 11 (3 per time point; total 15) 39 total animals	Reduction of substrate in ASMKO mice with an initial 3 mg/kg dose prevented increases in pro-inflammatory cytokines following subsequent 3 mg/kg and 20 mg/kg doses. Mice survived administration of the known toxic dose (20 mg/kg) of olipudase alfa.	[redacted]-0437Pnp	Module [4.2.1.2-9]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Cytokine Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV	3 mg/kg on Day 1 followed by 20 mg/kg on Day 3	3 mg/kg Day 1 and 20 mg/kg Day 3 (12) 12 total animals	Administration of 3 mg/kg olipudase alfa on Day 1 and 20 mg/kg on Day 3 to ASMKO mice significantly altered circulating levels of pro-inflammatory cytokines compared to samples from untreated mice from Genzyme Study 05-0374Pnp. Compared to samples from ASMKO mice receiving a single dose of 20 mg/kg in Study 05-0127, elevations were considerably lower. No adverse clinical observation was noted in Groups 3 and 4. These data support a controlled debulking strategy to minimize the cytokine response.	[redacted]-1009Pnp	Module [4.2.1.2-6]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Cytokine Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV	3 mg/kg on Day 1 followed by 3 mg/kg on Day 6	3 mg/kg (6) 3 mg/kg Day 1 and 3 mg/kg Day 6 (6) 12 total animals	Administration of 3 mg/kg olipudase alfa on Day 1 and Day 6 to ASMKO mice resulted in an increase in pro-inflammatory cytokine levels following the first 3 mg/kg dose only. A subsequent dose of 3 mg/kg administered 6 days later did not result in cytokine release of the same magnitude, as there was a significant reduction in many cytokines by 9 hours on Day 6 versus Day 1. These results support the role of a controlled debulking of substrate as a means to reduce or eliminate the cytokine release.	[redacted]-1010Pnp	Module [4.2.1.2-7]
Cytokine Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV	3 mg/kg on Day 1 followed by 20 mg/kg dose on Day 6	3 mg/kg Day 1 and 20 mg/kg Day 6 (12) 12 total animals	Animals administered 3 mg/kg olipudase alfa on Day 1 and 20 mg/kg olipudase alfa on Day 6 demonstrated a significant reduction in circulating levels of select cytokines at 4 and 9 hours post olipudase alfa administration relative to a single 20 mg/kg olipudase alfa from Genzyme Study 05-0127Pnp.	[redacted]-1240Pnp	Module [4.2.1.2-8]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Ceramide and Lipid Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single Dose	20 mg/kg	7 per group Vehicle (n=7) 20 mg/kg (n=35) 42 total animals	Circulating ceramide, SPH, and S1P were significantly increased by olipudase alfa. Generation of ceramide appeared to be biphasic, characterized by an early, rapid rise followed by a second rise at 240 and 540 minutes postdose. Significant elevations of SPH and S1P were seen at 240 minutes postdose and remained elevated at 540 minutes postdose. Sphingosine-1-phosphate levels returned to baseline at 540 minutes postdose.	[redacted]-0129Pnp	Module [4.2.1.2-4]
Ceramide Profiling	ASMKO, ASMKO$^{+/-}$ HET, and C57BL/6 mice 8-10 weeks	Bolus IV Single Dose	1, 3, 10 or 20 mg/kg	Vehicle (9) 1 mg/kg (9) 3 mg/kg (9) 10 mg/kg (9) 20 mg/kg (9) 135 total animals (45 per phenotype; 3 per time point)	Sustained, dose-dependent increase in total and C16 circulating ceramide were seen following olipudase alfa administration in ASMKO mice. There were early, transient increases in total and C16 circulating ceramide in C57BL/6 and ASMKO+/- HET mice. There were no statistically significant differences in CRP levels between ASMKO and C57BL/6 mice receiving 20 mg/kg olipudase alfa.	[redacted]-0778	Module [4.2.1.2-11]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Ceramide Profiling	ASMKO mice 8-10 weeks	Bolus IV Single Dose	10 or 20 mg/kg	Vehicle-treated (10) 10 mg/kg (26) 20 mg/kg (26) 62 total animals	Increased levels of plasma ceramide (total) and C16-ceramide correlated with increased lethality and poor clinical outcome, mostly at the 10 mg/kg dose level. Male mice treated with 10 or 20 mg/kg olipudase alfa had statistically significant increases in total ceramide and C16-ceramide compared to female mice treated with corresponding doses. The reason for this apparent difference in ceramide levels between genders is unknown.	[redacted]-1346	Module [4.2.1.2-10]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Ceramide Profiling	C57BL/6 mice 8-10 weeks	Bolus IV Single Dose	10 mg/kg	No Treatment (6) 10 mg/kg (6 per time-point) 30 total animals	No significant change in haematology or circulating ceramide was noted in C57BL/6 mice up to 540 minutes postdose. Total circulating ceramide concentrations were significantly increased at 60 minutes postdose; however, by 540 minutes postdose, these levels were returning to untreated levels. C16, C22, and C24 were the major ceramide isoforms that were increased. The C16 isoform was transiently increased up to 120 minutes postdose, compared to untreated animals. However, by 540 minutes postdose, circulating levels were returning to untreated concentrations. No toxicity was observed at the time points evaluated (consistent with previous studies).	[redacted]-1511	Module [4.2.1.2-12]

表 2.6.3.3.1 - Secondary pharmacodynamics - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Ceramide and Lipid Profiling	ASMKO mice 8-12 weeks	Bolus IV 4 debulking doses (3 mg/kg) QOD followed by a single dose of 20 mg/kg	Groups of animals received either a single dose of 3 mg/kg olipudase alfa or 4 doses of 3 mg/kg olipudase alfa QOD followed by a toxic dose of olipudase alfa (20mg/kg).	8 per group 72 total animals	Following a debulking regimen of 4 sequential administrations of 3 mg/kg olipudase alfa QOD, all animals survived the 20 mg/kg olipudase alfa dose. The debulking regimen eliminated the toxic response to olipudase alfa and elevations of ceramide, SPH, and S1P seen with high doses of olipudase alfa. Plasma ceramide, SPH, and S1P levels were significantly lower than those seen in historical controls out to 540 minutes.	[redacted]-1578	Module [4.2.1.2-13]

Abbreviations: ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out; IV: intravenous, IL: interleukin; S1P: sphingosine-1-phosphate; ASMKO$^{+/-}$ HET: acid sphingomyelinase knock-out heterozygous; SPH: sphingosin; QOW: every other week; CRP: C reactive protein; TNF-α: tumor necrosis factor alpha; G-CSF: granulocyte colony stimulating factor.

4　安全性薬理試験

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - noteworthy findings

Test Article: Olipudase Alfa

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Toal	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Acute Toxicity/ Cardiovascular Assessment	ASMKO mice 8-10 weeks	Rapid Bolus IV	Vehicle, 3, 10 or 20 mg/kg Session 1 – Single dose of vehicle, 10 or 20 mg/kg Session 2 – Single dose of 3 mg/kg Session 3 – Single repeated dose of 3 or 10 mg/kg	Vehicle (4) 3 mg/kg (4; same animals that received vehicle) 10 mg/kg (4) 20 mg/kg (4) 12 total animals	Single IV doses of 20 mg/kg olipudase alfa resulted in decreased heart rate, blood pressure, and activity leading to death or the need for moribund euthanasia in all animals within 43 hours of dosing. Single intravenous dosing of 10 mg/kg olipudase alfa resulted in decreased heart rate, blood pressure, and activity resulting in death or moribund euthanasia in 3 of 4 animals within 75 hours of dosing. Following the 10 and 20 mg/kg doses of olipudase alfa, significant dose-dependent effects were first observed in heart rate, followed closely by activity, and eventually by blood pressure. The 3 mg/kg olipudase alfa dose elicited mild decreases in heart rate and activity; however, both single and repeat dosing with 3 mg/kg was well tolerated.	No	[redacted]-0533Pnp	Module [4.2.1.3-1]

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Cardiovascular Assessment	ASMKO mice 8-10 weeks	No dose or Rapid Bolus IV	Part 1: N/A Part 2: 20 mg/kg olipudase alfa Single dose	Part 1: No dose (n=20) Part 2: 20 mg/kg olipudase alfa (n=12) Vehicle (n=8) 20 total animals	Part 1: Baseline data gathered from these twenty ASMKO mice indicated a normal resting heart rate of 755 +/- 41 beats per minute on average, and there was no statistical difference between the male and female ASMKO mice. Additionally, no arrhythmias were observed in the resting baseline heart rate. Part 2: Administration of olipudase alfa caused a significant bradycardia in the ASMKO mice ($p<0.01$). This was composed of an initial drop in heart rate approximately 50 min post dose, compensation, and then a further drop developing around 3 hours post dose. Administration of vehicle to the ASMKO mice did not affect the heart rate. The results generated from the ECGenie nearly mirrored the results from the telemetry studies.	No	[redacted]-0302Pnp	Module [4.2.1.3-2]

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Cardiovascular Assessment	C57Bl/6 mice 8-10 weeks	No dose or Rapid Bolus IV	Part 1: N/A Part 2: 20 mg/kg olipudase alfa Single dose	Part 1: No dose (n=20) Part 2: 20 mg/kg olipudase alfa (n=10) 20 total animals	Part 1: Baseline data gathered from the C57BL/6 mice indicated an average normal resting heart rate of 759 +/-33 beats per minute, and there was no statistical difference between the male and female mice using a t-test. Additionally, no arrhythmias were observed in the baseline data of the C57BL/6 mice. There was no statistical difference ($p>0.05$) in the baseline heart rate of the C57BL/6 mice and the baseline ASMKO mouse. This indicates that both strains have a normal resting heart rate of approximately 750-760 beats per minute. Part 2: Data gathered from these mice suggested there was no significant ($p>0.05$) drop in heart rate throughout the 6 hours of monitored electrocardiograms. This suggests that 20 mg/kg dose of rhASM to C57BL/6 mice is non-toxic. It is presumed that because the C57BL/6 strain has acid sphingomyelinase enzyme activity, there is a little buildup of sphingomyelin substrate and further supports that ASMKO toxicity is substrate dependent	No	[redacted]-0292Pnp	Module [4.2.1.3-3]

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Multiple	ASMKO mice 8-14 weeks	Bolus IV Single dose	0 and 3 mg/kg	12 per group 60 total animals	No significant difference in ceramide, cytokines, tissue sphingomyelin levels, or histopathology was observed following administration of 3 mg/kg olipudase alfa and HMWS-olipudase alfa (low, mid, or high) in ASMKO mice. Based upon these data, it does not appear that HMWS-olipudase alfa (low, mid, or high) impacts efficacy or safety in the ASMKO mouse when compare to olipudase alfa under the conditions of this study.	No	[redacted]-04646	Module [4.2.1.2-14]
Multiple TK*	Cynomolgus monkey Young adult/adult	Two infusions IV/animal	0 and 30 mg/kg Vehicle on Day 1 followed 4-5 days later by 30 mg/kg olipudase	Positive control group, morphine (2 males/2 females) Vehicle (3 males/3 females) 30 mg/kg olipudase alfa (3 males/3 females) 10 total animals	IV administration of olipudase alfa at 30 mg/kg was well tolerated in all study animals. No dose-related, biologically significant, or adverse effects were observed on blood pressure, heart rate, body temperature, ECG intervals, respiratory rate, tidal volume, or blood gas parameters. NOAEL was considered to be 30 mg/kg olipudase alfa.	Yes	[redacted]002	Module [4.2.1.3-4]

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology - noteworthy findings（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
Multiple Toxicity and TK *	Beagle dogs 7 to 8 months	Slow Bolus IV Single dose	0, 3, 10, and 30 mg/kg	Control Vehicle (8) 3 mg/kg (8) 10 mg/kg (8) 30 mg/kg (8) 32 total animals	No significant pathological findings were noted. Hypersensitivity reactions observed in control animals immediately after dosing include the following: Hypoactivity and recumbent posture Muzzles swollen Eyes developed red conjunctivae Animals with hypersensitivity reactions, as well as all remaining test article animals, were treated with diphenhydramine. All animals recovered over the 2-week recovery period. After Day 1, no effects on blood pressure, rectal body temperature, or respiration rate were observed. NOAEL was >30 mg/kg.	Yes	[redacted]026	Module [4.2.3.1-19]

Abbreviations: GLP: Good Laboratory Practices: ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out; IV: intravenous, N/A: not applicable; HMWS: high molecular weight species; TK: toxicokinetic; NOAEL: no observable adverse effect level.

* Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology study conducted in beagle dogs and cynomolgus monkeys (see 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary [Section 2.3.1])

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog)

Test Article: Olipudase Alfa

Title: Single-Dose Intravenous Injection Toxicity Study with Olipudase Alfa in Dogs with a 2-Week Recovery Period		
Species/Strain: Beagle Dog	**Test Article (Batch):** [redacted]	**Study No.:** [redacted]026 (Module [4.2.3.1-19])
No. per Group/Gender: 4 males/4 females	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L sodium phosphate, 5% sucrose (w/v), 0.06% Polysorbate 80, 0.1 mmol/L EDTA and 0.1 mol/L L-Methionine at a pH of 6.5	**Location:** 4.2.3.1
Age: 7 to 8 months	**Method of Admin:** Intravenous Injection, slow push	**Start Date:** 02 Dec [redacted]
	Anesthesia: Pentobarbital (35 mg/kg, IV)	**GLP Compliance:** Yes

Measured or Calculated Parameters: Mean Arterial Blood Pressures (MBP), Heart Rate (HR), Body Temperature, Respiration rate, Pulse Oximetry Data

Parameter (Unit)				GZ402665 (mg/kg)					
	Pretreatment Values	Control (Vehicle)		3		10		30	
		2 hr	24 hr	2 hr	24 hr	2 hr	24 hr	2 hr	24 hr
Respiration Rate (breaths/minute) Male	44±5.7 to 46±6.6	44±11.3	42±6.9	33±6.8	32±9.4	43±7.5	38±2.1	34±4.3	37±12.2
Respiration Rate (breaths/minute) Male	37±10.2 to 45±7.4	39±8.9	34±7.4	50±19.2	43±12.8	40±6.6	35±6.4	43±8.7	38±8.6
Body Temp (°C) Male	39.3±0.36 to 39.6±0.36	38.6±0.33	39.4±0.17	38.2±0.29	39.0±0.51	38.6±0.59	39.3±0.26	38.6±.041	38.9±0.15
Body Temp (°C) Female	39.1±0.39 to 39.4±0.14	38.4±0.05	39.1±0.17	38.5±0.44	39.3±0.60	38.8±0.22	39.2±0.14	38.9±0.26	38.9±0.10
HR (beats/minute)	103±23.6 to 143±43.5	143±17.1	115±17.3	128±29.9	93±12.6	120±18.3	115±19.1	133±35.0	110±31.6
HR (beats/minute)	105±19.1 to 138±25.0	113±18.9	98±12.6	125±5.8	130±21.6	115±19.1	123±17.1	115±25.2	93±45.7

Additional Information: Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology study conducted in beagle dogs (see 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary [Section 2.3.1])

Abbreviations: IV: intravenous; MBP: mean arterial blood pressures; HR: heart rate; GLP: Good laboratory Practices

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog)（続き）

Test Article: Olipudase Alfa

Title: Single-Dose Intravenous Injection Toxicity Study with Olipudase Alfa in Dogs with a 2-Week Recovery Period

Parameter (Unit)	Pretreatment Values	Control (Vehicle)		GZ402665 (mg/kg)					
				3		Control (Vehicle)		3	
		2 hr	24 hr	2 hr	24 hr	2 hr	24 hr	2 hr	24 hr
Pulse Oximetry Data (%) Male	84±13.0 to 94±6.06	90±6.7	95±1.5	89±15.5	92±8.3	91±5.1	89±6.3	91±5.7	90±8.5
Pulse Oximetry Data (%) Female	75±8.8 to 89±5.6	92±4.4	94±2.5	90±10.2	91±6.6	86±3.8	92±4.2	91±6.4	94±3.9
MBP (mm Hg) Male	116±25.6 to 150±30.5	127±42.7	140±22.0	101±14.9	128±42.5	95±12.8	130±34.7	102±9.8	143±34.4
MBP (mm Hg) Female	112±16.0 to 154±41.4	95±15.1	138±38.0	119±11.9	120±23.5	93±6.5	131±16.7	99±21.6	103±13.5

Additional Information: Safety pharmacology endpoints were integrated into the GLP-compliant toxicology study conducted in beagle dogs (see 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary [Section 2.3.1])

Conclusions: Under the conditions of this study, IV administration of olipudase alfa at 30 mg/kg was well tolerated in all of the study animals. No dose-related, biologically significant, or adverse effects were observed on blood pressure, heart rate, body temperature, ECG intervals, respiratory rate, tidal volume, or blood gas parameters. The no observable adverse effect level (NOAEL) was considered to be 30 mg/kg olipudase alfa. There were no quantitative clinical effects observed after the 30 mg/kg dose of olipudase alfa; therefore, the 10 and 3 mg/kg doses of olipudase alfa were not administered.

Abbreviations: IV: intravenous; ECG: electrocardiogram; NOAEL: no observable adverse effect level; MBP: mean arterial blood pressures; HR: heart rate

表 2.6.3.4.3 - Safety pharmacology – cardiovascular/respiratory in vivo - hemodynamic, electrocardiography (monkey)

Test Article: Olipudase Alfa

Title: Olipudase Alfa: A Cardiovascular and Respiratiry Assessment in Cynomolgus Monkeys		
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Test Article (Batch):** [redacted]	**Study No.:** [redacted]002 (Module [4.2.1.3-4])
No. per Group/Gender: Group 1 - 2 males/2 females Group 2 – 3 males/3 females	**Vehicle/Formulation:** 20 mmol/L $NaPO_4$, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L L-Methionine, 5% Sucrose, pH 6.5	**Location:** 4.2.1.3
Age: Young adult/adult, 3-7 kgs	**Method of Admin:** Group 1: Subcutaneous Injection, Group 2: 30 minute IV infusion	**Start Date:** 20 Oct [redacted]
	Anesthesia: NA	**GLP Compliance:** Yes

Measured or Calculated Parameters: Mean arterial Blood Pressures (MBP), Heart Rate (HR), Body Temperature, Respiration rate, Pulse Oximetry Data, Tidal Volume, QT Interval

Parameter[a] (Unit)	Pretreatment Values	Group 1		Group 2				
		Control (morphine)		Pretreatment Values (Test 1 to test 2)	Control (Vehicle) Test 1		GZ402665 30 mg/kg Test 2	
		3 hr	24 hr		3 hr	24 hr	3 hr	24 hr
Respiration Rate (breaths/minute)	37 - 48	49	38	55±10.6 to 56±11.1	56±17.0	51±8.6	57±9.1	49±15.1
Tidal Volume (mL)	23.6 – 32.5	27.3	23.4	35±14.5 to 32±17.8	39.8±17.8	36±10.2	35.1±13.2	31±12.7
Body Temp (°C)	38.2	38.0	38.3	38±0.5 to 38±0.2	38±0.4	38±0.6	38±0.4	38±0.1
HR (beats/minute)	NA	NA	NA	203±20.9 to 233±15.1	195±7.0	199±17.1	219±17.5	219±10.3
Pulse Oximetry Data (%)	98	98	99	98±2.3 to 97±1.4	97±0.6	97±1.7	97±0.8	95±6.5
MBP (mm Hg)	NA	NA	NA	115±7.9 to 122±8.1	111±9.1	115±7.1	118±8.5	115±7.7
QT (minutes)	NA	NA	NA	0.18±0.016 to 0.16±0.008	0.17±0.009	0.17±0.008	0.16±0.010	0.16±0.010

Additional Information: Measurements for respiration rate and tidal volume taken at 20 hour

Abbreviations: NA: not applicable; MBP: mean arterial blood pressures; HR: heart rate; GLP: Good laboratory Practices; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

5　薬力学的薬物相互作用試験

表 2.6.3.5.1 - Pharmacodynamic drug interactions overview - noteworthy findings

Test Article: Olipudase Alfa

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Total	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Single Dose PD	ASMKO mice 12-14 weeks	Bolus IV (Single dose olipudase alfa) Fluoxetine and citalopram administered continuously via Alzet pumps	1 mg/kg (olipudase alfa) 192 µg/day (citalopram) 300 µg/day (fluoxetine)	12 per group 70 total	Sphingomyelin was significantly reduced in liver and spleen 3 days post administration of 1 mg/kg olipudase alfa to ASMKO mice. Coadministration of fluoxetine did not alter olipudase alfa-mediated sphingomyelin reduction in liver or spleen. Co-administration of citalopram did not alter olipudase alfa-mediated sphingomyelin reduction in liver but an effect on the spleen could not be excluded.	[redacted]-01094	Module [4.2.1.4-1]

Abbreviations: ASMKO: acid sphingomyelinase knock-out, PD: pharmacodynamics; IV: intravenous.