目次

2.4　非臨床試験の概括評価....3
2.4.1　非臨床試験計画概略....3
2.4.1.1　緒言....3
2.4.1.2　フェニルケトン尿症（PKU）....3
2.4.1.3　非臨床試験計画....3
2.4.2　薬理試験....10
2.4.2.1　効力を裏付ける試験....10
2.4.2.2　安全性薬理試験....11
2.4.3　薬物動態試験....12
2.4.4　毒性試験....14
2.4.4.1　単回投与毒性試験....14
2.4.4.2　反復投与毒性試験....14
2.4.4.3　生殖発生毒性試験....18
2.4.4.4　毒性試験の主要所見....21
2.4.5　総括及び結論....24
2.4.6　参考文献....27

表目次

表 2.4.1-1　実施した非臨床試験一覧....4
表 2.4.3-1　サルに BMN 165 を週 2 回 39 週間皮下投与したときの曝露量....13
表 2.4.4-1　非臨床試験における主な安全性所見....21
表 2.4.5-1　動物とヒト第 3 相試験の曝露量データの比較....26

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	area under the concentration-time curve from time 0 to infinity	0 時間から無限時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration	0 時間から濃度測定可能な最終時点 t までの濃度－時間曲線下面積
BLA	Biologics License Application	生物学的製剤承認申請書
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
C_{trough}	trough plasma concentration	トラフにおける血漿中濃度
ENU2 mouse	an animal model of phenylketonuria, BTBR*Pah*^{enu2} mouse developed by ethylnitrosourea mutagenesis that is deficient in phenylalanine hydroxylase activity	フェニルケトン尿症の動物モデル、エチルニトロソ尿素突然変異誘発性フェニルアラニンヒドロキシラーゼ活性を欠損した BTBR*Pah*^{enu2} マウス
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
IU	International units	国際単位
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
PAH	phenylalanine hydroxylase	フェニルアラニン水酸化酵素
PAL	phenylalanine ammonia lyase	フェニルアラニンアンモニアリアーゼ
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PFS	pre-filled syringe	プレフィルドシリンジ
Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PKU	phenylketonuria	フェニルケトン尿症
QTc	corrected QT interval	心拍数で補正した QT 間隔
rAvPAL	recombinant phenylalanine ammonia lyase derived from the cyanobacterium *Anabaena variabilis* with cysteines 503 and 565 mutated to serine	システイン 503 及び 565 をセリンに置換した遺伝子組換えシアノバクテリア *Anabaena variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ
RMP	risk management plan	医薬品リスク管理計画
t-CA	*trans*-cinnamic acid	*trans*-ケイ皮酸
TH	tyrosine hydroxylase	チロシン水酸化酵素
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

2.4.1.1　緒言

BMN 165［JAN：ペグバリアーゼ（遺伝子組換え）］はフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）遺伝子の突然変異によって引き起こされる常染色体劣性遺伝性疾患であるフェニルケトン尿症（PKU）の成人患者の治療薬として米国で承認されている。BMN 165 は遺伝子組換え酵素補充療法で、フェニルアラニン（Phe）をアンモニアと *trans*-ケイ皮酸（*t*-CA）に異化するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）を PAH の代替として使用している。*t*-CA は肝臓で尿素回路を介して可溶性代謝物である馬尿酸とアンモニアに速やかに変換され、これら両代謝物は尿中に排泄される。

BMN 165 はシアノバクテリア *Anabaena variabilis* の PAL 酵素の遺伝子組換え製剤であり、免疫原性を低下させるためにポリエチレングリコール（PEG）で修飾されている。BMN 165 の総分子量は約 1000,000 である。BMN 165 は、血中 Phe 濃度が高く既存の治療法でコントロール不十分な PKU 成人患者の治療を適応として皮下投与される。

2.4.1.2　フェニルケトン尿症（PKU）

PKU はアミノ酸 Phe をチロシンに変換するのに不可欠な PAH の欠損を特徴とする稀な常染色体劣性遺伝性疾患である(1)。高フェニルアラニン血症の臨床的帰結は重度の精神遅滞、小頭症、発作、種々の認知障害、行動障害、気分障害（例：激越、易刺激性、うつ病、統合失調症、注意力の低下及び記憶障害）、湿疹、皮膚及び毛髪の色素脱失など広範かつ重篤である(2) (3) (4)。したがって、PKU 患者の第一の治療目標は生涯にわたる治療で血中 Phe 濃度を推奨目標範囲に収めることである(5) (6)。

2.4.1.3　非臨床試験計画

非臨床試験は PKU 患者に対する BMN 165 の長期使用を裏付けることを目的としてデザインされた。広範な非臨床試験を実施し、BTBR*Pah*^{enu2}（ENU2）マウス並びに正常なラット及びサルを用いた単回及び反復投与による薬効薬理、安全性薬理、薬物動態（PK）／トキシコキネティクス（TK）及び毒性評価を行った。ラット及びウサギを用いて生殖発生毒性試験を行った。BMN 165 の薬理活性は PKU のげっ歯類モデルである ENU2 マウスを用いて評価した。ENU2 マウスは PKU 患者と同様の高フェニルアラニン血症を示し、BMN 165 の臨床試験での初回用量設定に有用であった。全ての非臨床試験は皮下投与経路を用いており、試験結果は BMN 165 の開始臨床用量を説明するために使用した。

実施した非臨床試験の概要を以下の表 2.4.1-1 に示す。モジュール 2.6 に試験の詳細を概要文及び概要表で示し、モジュール 4 に詳細な試験報告書を示した。

表 2.4.1-1 実施した非臨床試験一覧

Study Description (Study Number)	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	GLP [a]	Study Status
Pharmacology-Primary Pharmacodynamics						
Pharmacology Study Evaluating Plasma Phenylalanine Levels in ENU2 Mice Following Subcutaneous Administration of AvPAL and PEGylated AvPAL (0164-06-019)	Mouse; ENU2	SC	8 days (Day 1, 4, 8)	0, 0.2, 1 (IU/mouse)	non-GLP	Completed
Evaluation of Plasma Phenylalanine Levels Following Subcutaneous Administration of PEGylated AvPAL variant in Naïve ENU2 Mice (0165-06-057)	Mouse; ENU2	SC	8 weeks (once weekly)	0, 0.25, 1, 4 (IU/mouse)	non-GLP	Completed
Dose Range Reduction Study of rAvPAL-PEG for 16 Weeks in ENU2 Mice with a 2-Week Recovery Period (0165-07-001)	Mouse; ENU2	SC	16 weeks (once weekly)	0, 20, 40, 80 mg/kg	non-GLP	Completed
Evaluation of Changes in Neuropathology Following Subcutaneous Administration of BMN 165 to Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice for 4, 8, or 12 Weeks (BMN165-14-044)	Mouse; ENU2	SC	4, 8 or 12 weeks (three times per week)	0, 10/10/20 mg/kg	non-GLP	Completed
Assessment of rAvPAL-PEG Dose Ranging Studying Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-07-029 and 0165-08-005)	Mouse; ENU2	SC	27 weeks (once or twice weekly)	Once weekly: 80, 120 mg/kg Twice weekly: 40, 80 mg/kg	non-GLP	Completed
Assessment of Reproduction in Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice Administered rAvPAL-PEG (0165-08-027)	Mouse; ENU2	SC	50 weeks (two or three times weekly)	Twice weekly: 40 mg/kg Three times weekly: 10/10/20 mg/kg	non-GLP	Completed

表 2.4.1-1　実施した非臨床試験一覧（続き）

Study Description (Study Number)	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	GLP [a]	Study Status
Assessment of rAvPAL-PEG Dose Range Administration for Stabilization of Plasma Phenylalanine in Growing Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-09-068 and 0165-10-008)	Mouse; ENU2	SC	42 weeks (three times weekly or daily)	Three times weekly: 5, 10 mg/kg Daily: 7, 6 mg/kg	non-GLP	Completed
Safety Pharmacology						
Respiratory Safety Pharmacology Study Using the Head-Out Body Plethysmography Model of Subcutaneously Administered rAvPAL-PEG in Rats (0165-07-005)	Rat, HSD:SD	SC	Single dose	0, 10, 20, 50, 125 mg/kg	GLP	Completed
Safety Pharmacology Neurological Evaluation Study of rAvPAL-PEG in Rats with a 2-Week Recovery Period (0165-07-004)	Rat, HSD:SD	SC	Single dose	0, 10, 50, 125 mg/kg	GLP	Completed
Parallel Design Subcutaneous Injection Cardiovascular Safety Pharmacology Study of rAvPAL-PEG in Conscious Telemetry-Instrumented Male Monkeys (0165-07-006)	Monkey, Cynomolgus	SC	Single dose	0, 1, 3, 10 mg/kg	GLP	Completed
Pharmacokinetics						
Single-Dose Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of rAvPAL-PEG in Homozygote (-/-) Male BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-07-028)	Mouse; ENU2	SC	Single dose	20 mg/kg	non-GLP	Completed
Comparative Single-Dose Pharmacokinetics/Pharmacodynamics for Phase 2 Process A rAvPAL-PEG in Homozygote (-/-) Male and Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-09-069, 0165-09-070)	Mouse; ENU2	SC	Single dose	20 mg/kg	non-GLP	Completed

表 2.4.1-1　実施した非臨床試験一覧（続き）

Study Description (Study Number)	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	GLP [a]	Study Status
Repeat-Dose Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of rAvPAL-PEG Administered Subcutaneously Once-Daily for 36 Days in Homozygote (-/-) Male BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-08-006)	Mouse; ENU2	SC	36 days, Once daily	2, 4 mg/kg/day	non-GLP	Completed
Single-Dose Toxicity						
Single-Dose Subcutaneous or Intravenous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Rats with a 2-Week Recovery Period (0165-07-003)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	Single dose	0, 10, 25, 250 mg/kg	GLP	Completed
		Intravenous	Single dose	0, 1, 5, 25 mg/kg		
Single-Dose Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 3-Week Recovery Period (0165-07-007)	Monkey, Cynomolgus	SC	Single dose	0, 4, 12, 60 mg/kg	GLP	Completed
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics						
4-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Rats with a 2-Week Recovery Phase (0165-07-009)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	4 weeks, 2-week recovery, Twice weekly	0, 1, 8, 25 mg/kg	GLP	Completed
26-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with a 12-Week Recovery Period and a 17-Week Interim Euthanasia with a 4-Week Recovery Period with rAvPAL-PEG in Rats (0165-08-019)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	26 weeks, 17-week interim euthanasia, 12- and 4-week recovery, Twice weekly	0, 1, 8, 25 mg/kg	GLP	Completed
4-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 4-Week Recovery Period (0165-07-008)	Monkey, Cynomolgus	SC	4 weeks, 4-week recovery, Twice weekly	0, 0.01, 0.1, 1 mg/kg	GLP	Completed

表 2.4.1-1　実施した非臨床試験一覧（続き）

Study Description (Study Number)	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	GLP [a]	Study Status
39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Phase (0165-07-030)	Monkey, Cynomolgus	SC	39 weeks, 13-week recovery, Twice weekly	0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 7.0/5.0/3.0 mg/kg	GLP	Completed
Evaluation of Ependymal Cell Vacuolation in Brains from Rats and Monkeys Treated Twice Weekly with Subcutaneous Injections of rAvPAL-PEG in Previous Chronic Toxicology Studies (BMN165-13-047)	Rat, Crl:CD(SD) Monkey, Cynomolgus	SC	Rat: 17 or 26 weeks, Twice weekly Monkey: 39 weeks, Twice weekly	Rat: 0, 1, 8, 25 mg/kg Monkey: 0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 7.0/5.0/3.0 mg/kg	non-GLP	Completed
Development and Validation of an Immunohistochemical Method for the Semiquantitative Evaluation of Anti-PEG Antibody and Anti-rAvPAL-PEG Antibody Binding in Formalin Fixed Paraffin Embedded Rat Tissue (BMN165-13-068)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	17 or 26 weeks, Twice weekly	0, 25 mg/kg	GLP	Completed
Analysis of Rat Tissues from Toxicology Studies for Anti-PEG and Anti-rAvPAL-PEG using Immunohistochemistry (IHC) (BMN165-13-069)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	4, 17, or 26 weeks, Twice weekly	0, 8 mg/kg	GLP	Completed
The Immunohistochemical Analysis in Rat Tissues in a 26-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with a 12-Week Recovery Period and a 17-Week Interim Euthanasia with a 4-Week Recovery Period with rAvPAL-PEG in Rats (0165-08-019)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	17 or 26 weeks, Twice weekly	0, 8, 25 mg/kg	GLP	Completed

表 2.4.1-1　実施した非臨床試験一覧（続き）

Study Description (Study Number)	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	GLP [a]	Study Status
Developmental and Reproductive Toxicity						
Fertility and Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rats (BMN165-12-037)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	Males: 41 days pre-cohabitation, 77 days total, Daily Females: 28 days pre-cohabitation through GD 17, 47 days total, Daily	0, 2, 8, 20 mg/kg	GLP	Completed
A Dose Range-finding Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG by Subcutaneous Injection in Rabbits (BMN165-11-027)	Rabbit, Hra:NZW	SC	GDs 7-20, 7-14, 11-16, 13 or 15-20, Daily	0, 2, 5, 20 mg/kg	GLP	Completed
Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rabbits (BMN165-12-036)	Rabbit, Hra:NZW	SC	GDs 7-12, 11-16, 15-20, Daily	0, 2, 5 mg/kg	GLP	Completed
Developmental and Peri-/Post-natal Reproduction Study of Subcutaneous rAvPAL-PEG in Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (BMN165-14-013)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	28-days pre-cohabitation through weaning, Daily	0, 2, 8, 20 mg/kg	GLP	Completed
A Peri-/Post-natal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rats with Additional Developmental Assessments in F1 Generation (BMN165-18-080)	Rat, Crl:CD(SD)	SC	28-days pre-cohabitation through weaning, Daily	0, 2, 8, 20 mg/kg	GLP	Completed

表 2.4.1 1 実施した非臨床試験一覧（続き）

Study Description (Study Number)	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	GLP [a]	Study Status
Other Toxicity Studies						
A 14-Day Oral Feasibility Study in Non-Pregnant Rabbits Provided Diets with Reduced Phenylalanine (BMN165-18-081) [b]	Rabbit, Crl:KBL (NZW)	Oral (Dietary)	Phase 1: 17 days Phase 2: 15 days (Daily)	NA	non-GLP	Completed

AvPAL: phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); BMN 165: rAvPAL-PEG; GLP: Good Laboratory Practice; HSD: Harlan Sprague Dawley; Crl: Charles River Laboratories; ENU2: an animal model of phenylketonuria, BTBR*Pah*^{enu2} mouse developed by ethylnitrosourea mutagenesis that is deficient in phenylalanine hydroxylase activity; GD: Gestation Day; IU: international units; NA: not applicable; NZW: New Zealand White; *Pah*: mouse phenylalanine hydroxylase gene; PEG: polyethylene glycol; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase, introduced two point mutations (Cys503Ser and Cys565Ser) into AvPAL enzyme sequence; PKU: phenylketonuria; SC: subcutaneous; SD: Sprague Dawley.

ENU2 mouse, PKU mouse model, also known as BTBR *Pah*^{enu2} mouse.

a) GLP studies were conducted in accordance with United States Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations, Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare Good Laboratory Practice Standards Ordinance No. 21; Organisation for Economic Cooperation and Development Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17.

b) The objectives of this study were to evaluate the tolerability and palatability of a defined artificial phenylalanine (Phe)-free diet (Phase 1) and subsequently two plant-based Phe-reduced diets (Phase 2) in an attempt to lower plasma Phe levels; BMN 165 was not administered in this study.

2.4.2　薬理試験

おおむね、BMN 165 の非臨床試験の薬効薬理及び安全性上の特徴は BMN 165 の薬理活性である血漿中 Phe 濃度の低下に関連するものであった。高フェニルアラニン血症を示す PKU のマウスモデルである ENU2 マウスは BMN 165 の投与により有意な Phe 濃度の低下を示し、同時に体重増加の改善、生存期間の延長及び生殖発生機能の改善を示した（試験番号 0165-09-068 and 0165-10-008）。Phe 濃度の低下は最長 42 週間の投与の間（試験期間）持続し、投与に関連した有害な作用は認められなかった。

正常動物では BMN 165 の投与量に依存した Phe 濃度の低下がラット、サル及びウサギの毒性試験で認められ、体重の減少、摂餌量の減少、食欲不振及び生殖発生機能の低下を伴った。これらの影響は全て BMN 165 の過剰な薬理作用に起因すると考えられた。したがって、PKU 患者への外挿性は明らかでなく、正常動物で 1 種類の必須アミノ酸を検出限界未満の血中濃度まで低下させるという状況を考慮して試験で認められた所見を考察すべきである。ENU2 マウスでは BMN 165 の投与による血漿中 Phe 濃度の低下により健康状態が改善されており(7)、ENU2 マウスが正常動物よりも PKU 患者集団をより忠実に表している可能性が高い。

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

BMN 165 の効力を裏付ける試験は ENU2 マウスを用いて評価した。このマウスモデルは、高フェニルアラニン血症（血漿中 Phe ベースライン濃度が 1000～2000 µmol/L）、低色素沈着など、PKU 患者と同様の特徴を示す。低色素沈着は Phe 濃度に依存したメラニン生合成の阻害によって引き起こされる表現型変化である。高フェニルアラニン血症が改善されると ENU2 マウスに進行性の毛色変化がもたらされる。血漿中 Phe 濃度の変化を主要薬理活性評価項目として使用した。

80 mg/kg（約 4 IU/マウス）の BMN 165 の週 1 回 16 週間皮下投与により、血漿中 Phe 濃度は約 2000 µmol/L から 200 µmol/L 未満に低下した（試験番号 0165-07-001）。雄性 ENU2 マウスでは、Phe 濃度低下応答の一過性の減弱が投与 3～7 週目に認められ、BMN 165 に対する抗体産生が原因である可能性が高いと考えられた。しかし、投与 7 週目以降の試験期間中血漿中 Phe 濃度は投与の継続により再び低下した。BMN 165 の反復投与によりアナフィラキシー反応及び局所注射部位反応の徴候は認められなかった。BMN 165 を投与したマウスで血漿中 Phe 濃度の低下に関連する明らかな毒性は認められなかった。血漿中 Phe 濃度の低下に加えて体重増加の促進、生存期間の延長及び被毛の色の薄茶色から暗褐色への変化から明らかなように、BMN 165 を投与したマウスの健康状態は改善した。

PKU 患者と同様に、ENU2 マウスでは血液及び脳に Phe が蓄積することにより神経伝達物質量が変化する。PKU 患者では、神経伝達物質量の変化が神経認知及び行動障害と関連していた。10～80 mg/kg の BMN 165 の単回投与は ENU2 マウスに血漿中 Phe 濃度の低下と相関する神経伝達物質の正常化を血液及び脳の両方でもたらす(8)。

雌性 ENU2 マウスはまた妊娠可能であるが重篤な生殖障害を示し、本質的に 100%の同腹児の喪失をもたらす胎児障害の転帰など母体に対して深刻な PKU 作用を示す。新生児が生まれると出生後 24 時間以内に死亡する。母性 PKU 症候群の部分的な改善は妊娠中の雌性 PKU マウス

に Phe 制限食を与えることによって可能であり、出生児は生存するが徐々に死亡し、離乳時には 1～2 例が生存するのみである。5 及び 10 mg/kg の BMN 165 を週 3 回最長 27 週間、その後 6 及び 7 mg/kg を 1 日 1 回投与した雌性 ENU2 マウスでは、血漿中 Phe 濃度がベースライン濃度約 2000 µmol/L から約 300～600 µmol/L に低下した（試験番号 0165-09-068 and 0165-10-008）。この投与レジメンは出生児が生存する妊娠数の増加及び離乳までの生存出生児数の増加など、生殖発生パラメータの改善をもたらした。試験結果は ENU2 マウスの妊娠維持及び生殖発生パラメータを改善する血漿中 Phe 濃度を明らかにする一助となった。

以上、BMN 165 の薬効薬理特性について PKU の動物モデルである ENU2 マウスで評価し、この動物モデルを用いて実施した試験で投与量及び投与レジメンに依存した血漿中 Phe 濃度の低下活性が示され、血漿中 Phe 濃度は投与頻度依存的に最適に制御された。表現型的には、BMN 165 を投与した ENU2 マウスではこれらの動物にみられる低色素沈着の改善が認められた。さらに、BMN 165 を投与した ENU2 マウスではチロシン水酸化酵素（TH）及びニッスル染色により TH 陽性神経細胞数の増加による PKU 脳病変の改善が認められた(9)（試験番号 BMN165-14-044）。異種生物由来である BMN 165 に対する初期の抗体産生により一時的に薬理活性応答が弱まったが、長期間の投与により薬理活性応答は投与開始後初期に認められた最大効果まで回復した。

2.4.2.2　安全性薬理試験

雌雄ラットを用いて、溶媒、10、50 及び 125 mg/kg の BMN 165 の単回皮下投与による中枢神経系に対する影響を投与前、投与後約 6、24、48 及び 72 時間に評価した（試験番号 0165-07-004）。各動物に一連の行動評価及び一般状態の変化など Irwin 変法による神経学的評価を実施した。高投与量（125 mg/kg）群で溶媒を投与した対照動物と比較して投与後 6 日目に体重増加に抑制が認められた。最大 125 mg/kg の BMN 165 を皮下投与したラットに、Irwin 変法によるいずれの評価でも中枢神経系パラメータの変化は認められなかった。

雄性ラットを用いて、溶媒、10、50 及び 125 mg/kg の BMN 165 の単回皮下投与による呼吸系に対する影響を評価した（試験番号 0165-07-005）。呼吸機能パラメータは一回換気量、呼吸数及び分時換気量を評価した。最大 125 mg/kg の BMN 165 を単回皮下投与した雄性ラットでは、評価した呼吸機能パラメータの変化は認められなかった。

テレメータを装着した覚醒下のサルを用いて、溶媒、1、3 及び 10 mg/kg の BMN 165 の単回皮下投与による心血管系に対する影響を評価した（試験番号 0165-07-006）。心血管系に対する影響は心電図、血行動態（収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、変力状態、心拍数及び腹部温度を評価した。最大 10 mg/kg の BMN 165 の投与量で、心拍動、QT 間隔及び心拍数で補正した QT 間隔（QTc）に対する直接的な影響は認められなかった。血行動態変化、変力状態、心拍数及び腹部温度に生理学的に重要な変化は認められなかった。

2.4.3　薬物動態試験

ラット及びサルを用いた単回及び反復投与試験並びに毒性試験及び TK 試験を組み合わせた試験において、BMN 165 の非臨床 PK の特性を評価した。これらの試験にはラットを用いた単回投与試験及び 2 つの反復投与試験（4 及び 26 週間投与試験）並びにサルを用いた単回投与試験及び 2 つの反復投与試験（4 及び 39 週間投与試験）が含まれている。一部の PK はラット及びウサギを用いた生殖発生及び毒性試験においても評価した。

ラット及びサルに単回皮下投与したとき（それぞれ試験番号 0165-07-003 及び 0165-07-007）、初期相における吸収及び 1 相性の消失が示され、性差は認められなかった。ラットに BMN 165 を皮下投与したときのバイオアベイラビリティは低く（13～17%）（試験番号 0165-07-003）、0 時間から無限時間までの濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）及び最高血漿中濃度（C_{max}）の値は雌雄いずれもおおむね用量線形性を示した。

ラットに BMN 165 を 1、8 及び 25 mg/kg/回の用量で 4 週間反復皮下投与した毒性及び TK 試験において、BMN 165 の血漿中曝露量は初回投与後に用量増加に伴って増加した。BMN 165 の曝露量は 2 週目では 3 用量全てにおいて 1 週目と比較して低下し、その後、4 週目に増加し、1 週目と同程度のレベルまで回復した。

サルに BMN 165 を 0.01、0.1 及び 1.0 mg/kg の用量で週 2 回 4 週間反復皮下投与した毒性及び TK 試験において、BMN 165 の曝露量は用量増加に伴って増加した（試験番号 0165-07-008）。血漿中 BMN 165 濃度は 3 用量で増加したが、4 週目では低下し、低下した理由として、BMN 165 を消失させる抗体が産生されたことによる可能性が考えられる。

ラット及びサルを用いたそれぞれ 26 及び 39 週間反復皮下投与毒性及び TK 試験において（それぞれ試験番号 0165-08-019 及び 0165-07-030）、BMN 165 の全身曝露量（AUC_{0-72hr} 及び C_{max}）は 1、8、16 及び 27 週目（ラット）又は 1 及び 39 週目（サル）において、おおむね用量比例性を示した。ラット及びサルにおいて、血漿中濃度は 1 週目（ラット）及び 2 週目（サル）に増加したが、その後低下し、低下した理由として、BMN 165 を消失させる抗体が産生されたことによる可能性が考えられる。血漿中 BMN 165 濃度はその後、用量依存的に増加し、増加した理由として、BMN 165 を消失させる抗体産生が早期に減少したことによる可能性が考えられ、臨床試験においても同様の結果が示されている。これらの試験で蓄積はほとんど～全く認められなかった。39 週間反復投与毒性及び TK 試験での曝露量のデータの要約を表 2.4.3-1 に示した。

表 2.4.3-1 サルに BMN 165 を週 2 回 39 週間皮下投与したときの曝露量

Dose Group	Dose Level (mg/kg)		PK Parameters					
			First Week			Last Week (Week 39)		
			C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{0-72hr} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{0-72hr} (ng·hr/mL)
2	**0.01**	Mean	51	43.2	2,776	0.0	NA	0.0
		SD	29	20.1	1,818	0.0	NA	0.0
		N	6	5	6	6	0	6
3	**0.1**	Mean	908	57.6	45,053	81	12.8	996
		SD	761	21.5	39,358	132	7.5	1,895
		N	6	5	6	6	4	6
4	**1.0**	Mean	23,427	72.0	928,020	637	18.0	28,431
		SD	11,523	0.0	237,747	476	15.9	24,209
		N	6	6	6	6	6	6
5	**3.0**	Mean	47,654	49.7	2,334,176	21,831	18.6	1,205,170
		SD	23,286	14.8	916,955	50,391	12.0	2,854,258
		N	14	14	14	14	14	14
6	**7.0/5.0/3.0 [a]**	Mean	144,598	53.1	6,122,640	3,644	23.1	144,935
		SD	41,582	13.9	1,814,405	4,367	13.0	177,175
		N	14	14	14	13	13	13
Additional Information:		PK parameters reported are gender combined.						

AUC_{0-72hr}: area under the concentration-time curve from time 0 to 72 hr; C_{max}: maximum plasma concentration; N: number; NA: not applicable; PK: pharmacokinetics; SD: standard deviation; T_{max}: time to maximum plasma concentration.

a) Dose for this group was reduced due to toxicity from 7.0 to 5.0 to 3.0 mg/kg.

2.4.4　毒性試験

ラット及びサルを用いて、BMN 165 の皮下投与による単回及び反復投与毒性試験を実施した。単回投与毒性試験はラットで 2 週間及びサルで 3 週間の観察期間を設けた。反復投与毒性試験はラット及びサルの 28 日間投与試験、ラットの 26 週間投与試験及びサルの 39 週間投与試験を実施し、一部の動物で回復期間を設定した。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

ラットに BMN 165 を 0、10、25 又は 250 mg/kg の用量で単回皮下投与して、毒性及び TK を評価した（試験番号 0165-07-003）。250 mg/kg を単回投与したラットでは投与 3～4 日後に投与部位の腫脹が認められ、さらに投与 2 週目には皮膚の発赤又は鱗屑が認められ、これらの変化は PEG 化製剤の総投与量に起因すると考えられた。250 mg/kg 群で体重増加抑制が認められたが、摂餌量には変化は認められなかった。各投与群で器官重量の変化はなく、BMN 165 に関連する肉眼的所見も認められなかった。250 mg/kg を投与したほとんどの動物で肝臓にクッパー細胞の空胞化が観察された。ラットに BMN 165 を単回皮下投与したときの無毒性量は 250 mg/kg であった。

カニクイザルに BMN 165 を 0、4、12 及び 60 mg/kg の用量で単回皮下投与し、毒性及び TK を評価した（試験番号 0165-07-007）。本薬を 4 又は 12 mg/kg 投与した動物では、試験期間中に毒性を示す臨床症状は観察されなかった。4 mg/kg 以上を投与した動物では、薬理作用から予想されたように血漿中 Phe 濃度が減少し検出限界未満であった。60 mg/kg 群の動物は投与後 3～5 日で抑うつ、脱水、食欲不振、冷触感／低体温、下痢、円背位、活動性低下、食物嘔吐及び体重減少などの病的状態を示した。これらの症状は血漿中 Phe 濃度を検出限界未満に低下させる本薬の過剰な薬理作用に伴う二次的な所見と考えられ、投与後 1 週間以内に全例を早期剖検した。6 又は 7 日目の臨床病理学的検査では、アルブミン濃度の低下による血清総タンパクの低値が認められた。この血漿中 Phe 濃度を低下する過剰な薬理作用とそれに続くタンパク質合成の低下により、動物は摂餌量減少、脱水、体重減少及び低体温により嗜眠状態となった。剖検では消化管全体にわたって肉眼的にびらん及び変色が認められた。ほとんどの動物で幽門部の粘膜に 1 ヵ所又は複数の潰瘍が認められ、一部の動物では回盲部又は結腸遠位部に変色が認められた。60 mg/kg 群で認められたこれらの消化管病変、特に幽門部の粘膜潰瘍はタンパク質合成の低下による二次的なストレス反応の可能性が高く、BMN 165 投与に関連する変化と考えられた。4 又は 12 mg/kg を投与した動物では、本薬投与に関連した病理組織学的所見は認められなかった。サルに BMN 165 を単回皮下投与したときの無毒性量は 12 mg/kg であった。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

ラットの 4 週間反復投与毒性試験では、BMN 165 を 0、1、8 及び 25 mg/kg/dose の用量で週 2 回 28 日間反復皮下投与し、その後 2 週間の休薬期間を設けて毒性及び TK を評価した（試験番号 0165-07-009）。本薬を週 2 回 28 日間投与後に死亡例、臨床症状、体重及び摂餌量の変化はみられなかった。全投与群で少数のラットに投与部位の線維化が認められたが、2 週間の回復期間後にはみられなかった。8 mg/kg 群の 20 例中 4 例及び 25 mg/kg 群の 20 例中 8 例で、脾臓の細網内皮細胞に軽微な空胞化（単一の透明な空胞）が認められた。2 週間の回復期間後、25 mg/kg

群の 10 例中 7 例で脾臓に同様の空胞化が認められた。これらの所見は関係する組織／器官の機能に変化がなく、空胞化が細網内皮細胞による PEG のクリアランスと合致するため、有害所見とは判断しなかった。したがって、ラットに BMN 165 を週 2 回 4 週間皮下投与したときの無毒性量は 25 mg/kg/dose であった。ラットの 22 日目の平均 $AUC_{0\text{-}t}$ は 2,755,085 ng•hr/mL であり、1 週当たりの曝露量が 5,510,170 ng•hr/mL に相当する。プレフィルドシリンジ（PFS）でヒトに 40 mg/日を投与したとき、定常状態の平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 246,782.5 ng•hr/mL であった。これは 1 週当たり 1,727,477.5 ng•hr/mL の曝露量に相当し、ラットの無毒性量における曝露量に対して約 3.7 倍の安全域が存在する。ヒトの 60 mg/日投与における $AUC_{0\text{-}24hr}$ は明らかではないため、この用量での安全域は推定できなかった。しかし、十分な Phe 濃度の低下を達成するために 60 mg/日の投与を必要とした被験者では、おそらく免疫介在性のクリアランスが増加したため、観察された平均 C_{trough} 値は 40 mg/日よりも低かった。このためヒトの 60 mg/日の安全域は 40 mg/日よりも大きいことが予想される。ヒトの投与量 40 及び 60 mg/日における安全域は、本試験の無毒性量 25 mg/kg と比較してそれぞれ 10.7 及び 7.1 倍であった（2.6.4、表 2.6.4.9-1）。

ラットの 26 週間反復投与毒性試験では、BMN 165 を 0、1、8 及び 25 mg/kg/dose の用量で週 2 回 26 週間反復皮下投与し、その後 12 週間の休薬期間を設けて毒性及び TK を評価した（試験番号 0165-08-019）。1 mg/kg 群の 4 例を除き全ての動物が 26 週間生存した。これらの死亡例は BMN 165 投与とは関連がないと考えられた。25 mg/kg 群の約半数の雌で、26 週間の投与期間中に投与部位又は腹部背面に被毛の菲薄化が認められた。薄毛は他の一層重篤な臨床症状との合併がみられず投与中止に至らなかったことから、有害所見とは判断しなかった。25 mg/kg 群の動物では、投与期間中の体重増加量及び摂餌量が減少したが回復期間中に回復した。
25 mg/kg 群の低体重及び体重増加抑制は本薬投与に関連すると考えられたが、観察された変化が軽度（投与期間終了時に対照群の 87.7～94.3%）であることから有害所見とは判断しなかった。25 mg/kg 群の雄 1 例は 187 日目に顕著な腎機能障害のエビデンス（例:尿素窒素 121 mg/dL、クレアチニン 3.4 mg/dL、無機リン 16.1 mg/dL）を示し、尿細管変性／壊死及び顆粒円柱の病理組織学的所見と一致した。この所見は腎尿細管細胞の空胞化が報告された PEG の毒性と関連する可能性がある(10)。25 mg/kg 群の他の動物では同様の異常は認められず、26 週間投与後又は 12 週間の回復期間後の剖検では BMN 165 に関連する器官重量の変化は認められなかった。典型的な単一の透明な細胞質空胞を特徴とする空胞化組織球細胞が、25 mg/kg 群の雌雄及び 8 mg/kg 群の雌で肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節及び副腎皮質に認められた。
25 mg/kg 群の雄では精巣間質に微小空胞を有する小型の組織球細胞も認められた。12 週間の回復期間終了時にはこれらの器官／組織で組織球細胞の軽微な空胞化が持続したが、発現頻度及び程度の低下が認められたことから回復傾向が示唆された。本試験ではこれらの器官／組織に機能的な影響がみられず、組織球細胞の空胞化は細胞内での PEG の緩徐な異化と関係する(10)ことから、BMN 165 投与と関連する組織球細胞の空胞化は毒性学的に重要ではないと考えられた。投与期間終了時（26 週目）に 8 mg/kg 群の 30 例中 9 例及び 25 mg/kg 群の 30 例中 18 例で、腎尿細管細胞が軽微～軽度に空胞化／肥大した領域が限局性又は多巣性に認められた。12 週間の回復期間終了時に 25 mg/kg 群の 10 例中 8 例で腎尿細管細胞の空胞化／肥大が持続しており、回復性のエビデンスはみられなかった。腎臓は PEG の主要な排出機構であるため、空胞化の持

続は回復性又は部分的な回復が観察された他の器官での PEG の緩徐な減少に起因する可能性がある。本試験では病理組織学的検査及び臨床病理学的検査（血液学的検査、血液化学的検査及び尿検査）のいずれにおいても、主に組織マクロファージ及び腎臓（尿細管上皮）で観察される細胞質空胞化に関連した細胞／組織の機能障害は認められなかった。いずれの所見も変化の程度が軽微であり、尿細管細胞の空胞化／肥大以外は回復期間後に変化が回復したことから本薬投与に関連する有害所見は認められなかった。腎臓で持続的に認められた尿細管細胞の空胞化／肥大は回復性のエビデンスが見られず、この所見の毒性学的意義は不明であった。したがって、ラットに BMN 165 を週 2 回 26 週間皮下投与したときの無毒性量は 1 mg/kg/dose であった。ラットの 27 週目の平均 $AUC_{0\text{-}72hr}$ は 67,470 ng•hr/mL であり、1 週当たりの曝露量が 134,940 ng•hr/mL に相当する。PFS を用いてヒトに 40 mg/日を投与したとき、定常状態の平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 246,782.5 ng•hr/mL であった。これは 1 週当たり 1,727,477.5 ng•hr/mL の曝露量に相当し、本試験の無毒性量における曝露量をはるかに上回った。ヒトの 60 mg/日投与における $AUC_{0\text{-}24hr}$ は明らかではないため、この用量での安全域は推定できなかった。しかし、十分な Phe 濃度の低下を達成するために 60 mg/日の投与を必要とした被験者では、おそらく免疫介在性のクリアランスが増加したため、観察された平均 C_{trough} 値は 40 mg/日よりも低かった。このためヒトの 60 mg/日の安全域は 40 mg/日よりも大きいことが予想される。ヒトの投与量 40 及び 60 mg/日における安全域は本試験の無毒性量 1 mg/kg/dose と比較して 1 倍未満であった（2.6.4、表 2.6.4.9-1）。

カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験では、BMN 165 を 0、0.01、0.1 及び 1 mg/kg/dose の用量で週 2 回 28 日間反復皮下投与し、その後一部の動物で 4 週間の休薬期間を設けて毒性及び TK を評価した（試験番号 0165-07-008）。試験期間を通して被験物質に関連した臨床症状や体重、体重増加量及び摂餌量の変化はみられなかった。眼科学的検査及び心電図検査で被験物質に関連する所見は認められなかった。本試験では、BMN 165 の薬力学的エンドポイントとして血漿中 Phe 濃度を測定した。血漿中 Phe 濃度は初回投与後に用量依存的に減少した。その後、投与 22 日目には投与前値まで上昇し、試験期間中は影響を受けなかった。全動物が予定剖検日まで生存した。剖検時の体重及び絶対／相対器官重量に本薬投与に関連した影響はみられなかった。投与期間終了時及び回復期間後の剖検では、被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。投与部位で観察された変化は皮下投与に関連すると考えられ、対照群を含む各用量群の少数の動物で認められた。病理組織学的検査では、皮下組織で血管周囲にリンパ球及びマクロファージの浸潤並びに皮下組織で軽微～軽度の肉芽腫性炎症が認められた。尿細管細胞の色素沈着は投与期間終了時及び回復期間後の両剖検で観察された。0.1 mg/kg 群の 6 例中 1 例及び 1 mg/kg 群の 10 例中 2 例で主に中型の筋性動脈に軽度の血管変性が認められた。この変化は有害所見と考えられ、BMN 165 投与との関連が考えられた。以上の所見より、サルに BMN 165 を週 2 回 4 週間反復皮下投与したときの無毒性量は 0.01 mg/kg/dose であった。本試験では、無毒性量 0.01 mg/kg/dose における $AUC_{0\text{-}72hr}$ が 1 例のみ 3 回目投与後に 7890 ng•hr/mL と算出されており、これに基づく 1 週当たりの曝露量は約 15,780 ng•hr/mL である。PFS を用いてヒトに 40 mg/日を投与したとき、定常状態の平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 246,782.5 ng•hr/mL であった。これは 1 週当たり 1,727,477.5 ng•hr/mL の曝露量に相当し、本試験の無毒性量における曝露量をはるかに

上回った。ヒトの 60 mg/日投与における $AUC_{0\text{-}24hr}$ は明らかではないため、この用量での安全域は推定できなかった。しかし、十分な Phe 濃度の低下を達成するために 60 mg/日の投与を必要とした被験者では、おそらく免疫介在性のクリアランスが増加したため、観察された平均 C_{trough} 値は 40 mg/日よりも低かった。このためヒトの 60 mg/日の安全域は 40 mg/日よりも大きいことが予想される。ヒトの投与量 40 及び 60 mg/日における安全域は、本試験の無毒性量 0.01 mg/kg/dose と比較して 1 倍未満であった（2.6.4、表 2.6.4.9-1）。

カニクイザルの 39 週間皮下投与毒性試験では、BMN 165 を 0、0.01、0.1、1.0、3.0 及び 7.0 mg/kg/dose の用量で投与を開始した。最高用量を 7.0 mg/kg から 5.0 mg/kg、さらに 3.0 mg/kg に減量し、週 2 回 39 週間反復皮下投与して毒性及び TK を評価した。一部の動物について 13 週間の回復期間を設けた（試験番号 0165-07-030）。1、4 及び 8 日目に本薬を 7.0 mg/kg 投与した雌は 1 週目に摂餌量の低下又は無摂餌が続き、有意な体重減少及び／又は活動性低下を示した。このため、7.0 mg/kg 群の全例で 11 及び 15 日目の投与を中止し、摂餌量が正常化して体重増加が認められた 18 日目に 5.0 mg/kg で投与を再開した。臨床症状が再発したため 22 日目に再度投与を中止し、46 日目に 3.0 mg/kg で投与を再開したが、その後は症状の発現はなかった。7.0 mg/kg 群の雌 1 例は食欲不振と全身状態の悪化のため 12 日目に切迫屠殺した。この動物では切迫屠殺時に臨床病理学的所見として赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、網状赤血球数及び総タンパクの中等度減少が認められ、他の 7.0 mg/kg 群の雌で 15 日目に認められた臨床病理学的所見と一致していた。剖検時の肉眼的観察では、皮膚の脱毛、胃の変色及び甲状腺の腫大が認められた。この動物では病理組織学的検査で胃、子宮及び膣にリンパ球／マクロファージの軽微な血管／血管周囲性浸潤並びに中等度の胸腺萎縮が認められた。他の動物は全て投与期間又は回復期間終了時の予定剖検日まで生存した。7.0/5.0 mg/kg 群の雌で 1 及び 3 週目に認められた変化を除いて、一般状態、摂餌量、体重及び体重増加量に変化はみられなかった。眼科学的検査及び剖検時の肉眼的観察では、本薬投与に関連した変化は認められなかった。7.0/5.0 mg/kg 群の雌で 15 及び 25 日目にのみ臨床病理学的変化が認められた。このような変化として、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、網状赤血球数、尿素窒素、総タンパク（アルブミン及びグロブリンの減少による）、並びにコレステロールの軽度～中等度減少が認められた。これらの所見は少なくとも部分的には摂餌量の減少に起因しており、投与量を 3.0 mg/kg に減量することで回復した。その後の投与期間には、全動物でこれ以外の臨床病理学的変化は認められなかった。本試験では、BMN 165 の薬力学的エンドポイントとして血漿中 Phe 濃度を測定した。血漿中 Phe 濃度は初回投与後に用量依存的に減少した。その後の 39 週目までの測定時点で Phe 濃度の減少は様々であり、3.0 mg/kg 以上を投与した少数例のみで Phe 濃度の減少が認められた。投与期間終了時の剖検では雄の前立腺、精嚢、精巣上体及び精巣並びに雌雄の脾臓で器官重量の増加が観察されたが、相関する肉眼的又は病理組織学的変化は認められなかった。BMN 165 投与に関連する病理組織学的所見として、動脈炎、投与部位の血管周囲性細胞浸潤、胸腺萎縮及び胸骨骨髄のリンパ性結節の増加が認められ、このうち動脈炎のみが有害所見と考えられた。3.0 mg/kg 群の 8 例中 5 例及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の 9 例中 6 例で、広範囲の器官（腎臓、膀胱、膵臓、胆嚢、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肺、心臓、坐骨神経、涙腺、下顎リンパ節、精巣上体、精嚢、卵巣、子宮、子宮頸、膣及び投与部位）に、

様々な程度で小動脈・細動脈の炎症が観察された。動脈炎が認められた動物では、通常 1 つ又は複数の器官で所見が観察された。また、全ての動脈で炎症の徴候が見られたのではなく、動脈炎は 13 週間の回復期間終了時までに消失した。胸腺萎縮と胸骨骨髄のリンパ性結節の増加は 13 週間の回復期間終了後も回復がみられなかったが、これらの変化は有害所見とは判断しなかった。サルに BMN 165 を週 2 回 39 週間皮下投与したとき、小動脈・細動脈に動脈炎の所見が認められたことから、本試験の無毒性量は 1.0 mg/kg/dose と考えられた。サルの 39 週間投与試験の無毒性量 1.0 mg/kg/dose における平均 $AUC_{0\text{-}72hr}$ は 928,020 ng•hr/mL であり、これは 1 週当たりの曝露量が 2,165,380 ng•hr/mL に相当する。PFS を用いてヒトに 40 mg/日を投与したとき、定常状態の平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 246,782.5 ng•hr/mL であった。これは 1 週当たり 1,727,477.5 ng•hr/mL の曝露量に相当し、本試験の無毒性量における曝露量と比較して約 1.3 倍である。ヒトの 60 mg/日投与における $AUC_{0\text{-}24hr}$ は明らかではないため、この用量での安全域は推定できなかった。しかし、十分な Phe 濃度の低下を達成するために 60 mg/日の投与を必要とした被験者では、おそらく免疫介在性のクリアランスが増加したため、観察された平均 C_{trough} 値は 40 mg/日よりも低かった。このためヒトの 60 mg/日の安全域は 40 mg/日よりも大きいことが予想される。ヒトの投与量 40 及び 60 mg/日における安全域は、本試験の無毒性量 1 mg/kg/dose と比較して 1 倍未満であった（2.6.4、表 2.6.4.9-1）。

2.4.4.3　生殖発生毒性試験

ラット及びウサギを用いて BMN 165 の生殖発生毒性試験を実施し、受胎能、胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に及ぼす影響を評価した。

雌雄ラットに BMN 165 を 2、8 及び 20 mg/kg/日の用量で交配前から交配、着床及び硬口蓋閉鎖まで連日皮下投与し、受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響を評価した（試験番号 BMN165-12-037）。20 mg/kg 群の 2 例は妊娠 21 日に分娩した。これ以外の全ての動物は妊娠 21 日の予定剖検日まで生存した。20 mg/kg 群の雌雄では、投与期間を通して摂餌量の減少がみられ、それに応じた体重増加抑制も認められた。雌は卵巣重量も対照群と比べて減少した。高用量の 20 mg/kg/日で、雌雄の交配及び受胎能に関するいずれの指標にも本薬投与に関連する影響は観察されなかった。本試験で認められた生殖毒性として 8 mg/kg/日以上を投与した動物で対照動物と比べて着床数が減少した。20 mg/kg/日では同腹児数及び胎児体重も減少した。8 mg/kg/日以上で一腹当たりの異常を有する胎児の割合が増加した。血漿中 Phe 濃度は用量依存的に減少し、20 mg/kg 群では僅かに検出可能又は検出不能［定量下限（LLOQ）未満、1.0 µmol/L 未満］であった。本試験の結果から、雌雄の交配及び受胎能に関する無毒性量は 20 mg/kg/日であった。雌雄の一般毒性に関する無毒性量は 8 mg/kg/日、胎児の発生毒性に関する無毒性量は 2 mg/kg/日であった。親動物の無毒性量 8 mg/kg/日における妊娠 12 日の $C_{trough,ss}$ 値と比較した安全域は、ヒトの 20、40 及び 60 mg/日投与でそれぞれ 10.3、9.8 及び 26 倍であった。投与量に基づく安全域は、親動物の無毒性量 8 mg/kg/日に対してヒトの 20、40 及び 60 mg/日投与でそれぞれ 24、12 及び 8 倍であった（2.6.4、表 2.6.4.9-1）。

血漿中 Phe 濃度を低下させるために、非妊娠の雌ウサギに Phe 非含有飼料、次いで植物性の 2 種の Phe 低減飼料を給与し、忍容性及び嗜好性の評価を目的とする経口摂取試験を実施した。ウサギは非植物性人工飼料の摂取を拒絶したため、血漿中 Phe 濃度を低下させる手段として Phe

含量を低減した人工飼料を使用することはできなかった。ウサギは 2 種の植物性 Phe 低減飼料を良好に摂取したが、この飼料を 2 週間給与しても血漿中 Phe 濃度は低下しなかった。ウサギに Phe 低減飼料を 2 週間給与して体重減少を引き起こすほど摂餌量が減少した場合でも、血漿中 Phe 濃度は低下しなかったことから、飼料操作による血漿中 Phe 濃度の低下は不可能であることが明らかとなった。本試験の結果から、BMN 165 を雌に着床から硬口蓋閉鎖まで曝露して胚・胎児発生に及ぼす影響を評価する試験では、これらの飼料は使用できないことが明らかとなった。

ウサギを用いた GLP 適合の胚・胎児発生に関する用量設定試験を実施し、重要な胚・胎児発生に関する試験の投与量を設定した（試験番号 BMN165-11-027）。妊娠雌ウサギに BMN 165 を 2、5 又は 20 mg/kg/日の用量で皮下投与した。妊娠 7～20 日における曝露を確実にするために投与期間を分割した 10 グループを設定した。20 mg/kg/日を投与した動物は 1 種類の必須アミノ酸の欠乏により体重減少、食欲不振、運動失調及び活動性低下を示し、瀕死状態に陥ったため切迫屠殺した。このため、この用量では十分な発生毒性評価はできなかった。2 又は 5 mg/kg/日を投与した動物で、流産、早期分娩又は死亡例はなかった。5 mg/kg/日を投与したウサギでは吸収胚・胎児の増加がみられ、その結果、胎児体重の減少及び異常を有する胎児の増加が認められた。BMN 165 の曝露量は投与後最初の 24 時間に増加し、1 日 1 回投与で少なくとも 5 日間はおおむね蓄積が続いた。2 mg/kg/日以上を投与した動物で血漿中 Phe 濃度が定量下限以下に減少した。本試験は重要な胚・胎児発生に関する試験の用量設定を目的として実施したため、無毒性量は算定しなかった。

GLP 適合の重要な胚・胎児発生に関する試験として、妊娠雌ウサギに BMN 165 を 2 又は 5 mg/kg/日の用量で皮下投与した（試験番号 BMN165-12-036）。妊娠 7～20 日における曝露を確実にするために投与期間を分割した 7 グループを設定した。先に実施した用量設定試験で投与期間が 7 日間を超えると曝露量の減少が観察されたことから、投与期間を分割することにより投与期間を通じて薬物への曝露を確実にした。5 mg/kg/日を投与したウサギで、摂餌量の減少に応じた用量依存的な体重増加抑制が認められ、流産が増加した。2 mg/kg/日以上で胎児体重の低値、5 mg/kg/日で胚・胎児死亡の増加及び胎児の奇形・変異が認められた。2 及び 5 mg/kg/日で、本薬の過剰な薬理作用による血漿中 Phe 濃度の顕著な減少が認められた。本試験の結果に基づき、母動物の毒性及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は、器官形成期のいずれの投与期間においても 2 mg/kg/日未満であった。

出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する試験では、BMN 165 を雌ラットに交配前から授乳及び離乳まで 2、8 又は 20 mg/kg/日の用量で皮下投与した（試験番号 BMN165-14-013）。いずれの用量でも死亡例や臨床症状はみられなかった。20 mg/kg/日を投与した雌で体重増加量及び摂餌量の減少がみられ、これに関連して分娩後 1～4 日に全出生児が死亡した母動物数及び生後 7 日までに死亡した出生児数が増加した。20 mg/kg/日で出生児の生存率、哺育率、各観察日の生存児数及び平均体重が有意に減少した。20 mg/kg/日では出生児の体重増加抑制が認められた。この群では離乳後の生後 43 日まで体重増加抑制が認められ、その後は体重及び体重増加量が対照群を含む他の全ての群と同程度であった。母動物に最高 20 mg/kg/日までの用量で BMN 165 を投与した結果、出生児の学習及び記憶、交配及び受胎能並びに帝

王切開で評価したいずれの指標にも影響は認められなかった。本試験の結果から、一般毒性及び生殖毒性に関する無毒性量はいずれも 8 mg/kg/日と考えられた。なお、本試験の無毒性量 8 mg/kg/日における授乳 14 日の $C_{trough,ss}$ 値と比較した安全域はヒトの 20、40 及び 60 mg/日投与でそれぞれ約 14.5、13.7 及び 36.4 倍であった。投与量に基づく安全域は、本試験の無毒性量 8 mg/kg/日に対してヒトの 20、40 及び 60 mg/日投与でそれぞれ 24、12 及び 8 倍であった（2.6.4、表 2.6.4.9-1）。

BMN 165 を投与した母動物の出生児で身体及び行動発達についてさらに検討するため、ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する追加試験を実施した（試験番号 BMN165-18-080）。試験デザインは先に実施した試験番号 BMN165-14-013 と同様であり、本薬を雌ラットに交配前から授乳及び離乳まで 2、8 及び 20 mg/kg/日の用量で皮下投与した。本試験では、F_1 世代の追加の神経行動学的及び発達に関する指標として、自発運動量、瞳孔対光反射、ロータロッド又は握力、耳介展開、眼瞼開裂及び歯牙萌出を評価した。20 mg/kg 群で交配前の期間に平均体重増加量が減少した。2 及び 8 mg/kg 群では、BMN 165 投与に関連した死亡例はなかった。20 mg/kg 群の 3 例は、本薬投与との関連が考えられる重篤な臨床症状が発現したため、授乳 2～7 日の間に安楽死させた。これ以外の全ての母動物は授乳 21 日の予定剖検日まで生存した。離乳後には、F_1 世代の雌雄共に母動物への BMN 165 投与に関連する有害な臨床症状は観察されなかった。母動物に本薬を 2、8 又は 20 mg/kg/日の用量で投与した結果、F_1 世代の平均体重及び体重増加量、並びに本試験で出生児に実施した追加の神経行動学的又は発達評価指標である機能観察バッテリー、受動的回避試験、自発運動量、反射反応及び身体的発達に影響を及ぼさなかった。本試験の結果から、母動物の一般毒性及び生殖毒性に関する無毒性量はいずれも 8 mg/kg/日と考えられた。

これらの試験で観察された母動物及び胎児への影響は、BMN 165 の過剰な薬理作用により正常動物の血漿中 Phe 濃度が低下したことに起因すると考えられた。正常マウス、ラット及びサルを用いた試験で出生時体重の減少や胎児死亡の増加を避けるためには、Phe 濃度の狭い範囲内での維持が重要であることが示されている(11) (12) (13)。必須アミノ酸である Phe を除去した正常動物で生殖過程の他の時点でも同様の生殖に対する影響が観察されている(14) (15)。2.4.2.1 項に要約したように、高フェニルアラニン血症 ENU2 マウスモデルに BMN 165 を投与し血中 Phe 濃度を低下させると生殖に関する指標が改善した。

2.4.4.4　毒性試験の主要所見

非臨床毒性試験における主要な所見を表 2.4.4-1 に示す。

表 2.4.4-1　非臨床試験における主な安全性所見

Study No.	Species	Duration	Doses [a] (mg/kg)	Key Findings	NOAEL (mg/kg)
0165-07-009	Rat	4 weeks	1, **8, 25**	Minimal vacuolation of reticuloendothelial cells of the spleen in a subset of animals	25
0165-08-019	Rat	26 weeks	1, **8, 25**	Vacuolation/hypertrophy of renal tubule epithelial cells; vacuolation of histiocytic cells in liver, spleen, testes, adrenal cortex, mesenteric lymph node and mandibular lymph node	1
0165-07-008	Cynomolgus monkey	4 weeks	0.01, **0.1, 1**	Slight vascular degeneration of medium, muscular arteries in a subset of animals	0.01
0165-07-030	Cynomolgus monkey	39 weeks	0.01, 0.1, 1.0, **3.0, 7.0/5.0/3.0** [b]	Varying degrees of arterial inflammation of small arteries and arterioles in a wide range of organs in a subset of animals	1
BMN165-12-037	Rat	Before cohabitation, through mating to GD 17	2, **8, 20**	Reduced body weight gain (males and females); decreased implantations, litter size and fetal weights; increased fetuses with alterations	20 (mating and fertility), 2 (fetal toxicity)
BMN165-11-027	Rabbit	GD 7 to 20	2, 5, 20	Weight loss, anorexia and hypoactivity. Increased fetal resorptions, reduced fetal body weights and increased fetal alterations.	2
BMN165-12-036	Rabbit	GD 7 to 20	**2, 5**	Reduced body weight gain. Increased abortions, reduced fetal body weights, increased embryo/fetal lethality and fetal malformations	< 2
BMN165-14-013	Rat	Before cohabitation, through lactation and weaning	2, **8, 20**	Reduced body weight gain. Decreased litter size, increased pup deaths, reduced pup viability and decreased pup weights.	8
BMN165-18-080	Rat	Before cohabitation, through lactation and weaning	2, **8, 20**	Early euthanasia in 3/22 dams in the 20 mg/kg group due to decreased body weight and clinical observations. Reduced body weight gain. Decreased litter size, increased pup deaths, reduced pup viability and decreased pup weights.	8

表 2.4.4-1　非臨床試験における主な安全性所見（続き）

a) Bolded dose levels are those at which key findings were observed.
b) Animals received 7.0 mg/kg for 1 week. Dose reduced to adverse events to 5.0 mg/kg. Dose further reduced due to adverse events to 3.0 mg/kg.
GD = gestation day; NOAEL = no observed adverse effect level.

上記の試験に加えて、BMN 165 投与による組織への PEG 蓄積に関連する有害作用の追加検討のため、ラット及びサルの長期投与毒性試験で得られた組織を用いて広範な分析を行った。これらの追加試験として、ラットの 26 週間及びサルの 39 週間投与毒性試験における中枢神経系の詳細な病理組織学的検査を実施した。また、空胞化が観察された組織における定常状態の PEG 蓄積を検討するために、ラット 26 週間投与毒性試験の組織を用いた免疫組織化学的検査を 2 試験実施した。これらの追加試験では、空胞化は種特異的（ラットのみ）であり、ラット及びサルのいずれにおいても脈絡叢を含む中枢神経系の空胞化は観察されなかった。ラットの 26 週間投与試験では PEG の蓄積が定常状態に達しており、いずれの試験でも機能的影響は認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

BMN 165 の薬理活性、薬物動態及び毒性について正常動物及び疾患の動物モデルを用いて広範に評価し、PKU 成人患者に対する BMN 165 の長期投与を支持した。ENU2 マウス（PKU のマウスモデル）を用いた広範な薬理試験、PK 試験（独立した PK 試験及び毒性試験評価の両方）並びにラット及びサルを用いた単回及び反復投与毒性試験を実施し、生殖発生毒性試験もラット及びウサギを用いて実施した。

ENU2 マウスを用いた薬理試験では、BMN 165 が長期間持続して Phe 濃度を正常濃度に低下させることを示した。BMN 165 の投与によりこの動物モデルを用いて実施した試験で、投与量及び投与レジメンに依存した血漿中 Phe 濃度の低下活性が示され、血漿中 Phe 濃度は投与頻度依存的に最適に制御された。さらに、BMN 165 は ENU2 マウスの PKU 脳病変を軽減する改善効果を示した(9)。BMN 165 の投与は雌性 ENU2 マウスにおいて出生児が生存する妊娠成功率、離乳までの生存出生児数の増加など生殖発生パラメータの改善ももたらした。

ENU2 マウス、ラット及びサルにおける PK の解析から、BMN 165 を皮下投与したときの血漿中濃度推移及び PK パラメータはこれらの動物種で類似しており、皮下投与での最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）及び半減期は長いことが示された。ENU2 マウスにおいて、雄と比較して雌では AUC 及び C_{max} はそれぞれ約 3.1 及び 3.5 倍高かったが、ラット及びサルでは単回皮下投与したとき、PK に性差は認められなかった。ラット及びサルでは、AUC 及び C_{max} はおおむね用量線形性を示し、高用量では用量比を下回って増加した。BMN 165 を反復投与したとき、サルでは蓄積が認められたが、ラットでは認められなかった。ラット及びサルにおいて、BMN 165 の曝露量は初回投与後に 28 日間の反復投与期間中、時々低値を示した。血漿中 BMN 165 濃度が初回投与後、反復投与により低下した理由は BMN 165 に対する免疫反応によると考えられ、臨床試験においても同様の結果が示されている。

毒性試験で確認された安全性に関する所見として、用量依存的かつ種特異的なラットの尿細管上皮／組織球の細胞質空胞化及びサルの動脈炎が認められ、正常動物における血漿中 Phe 濃度の有意な低下と相関がみられた。

ラットの毒性試験のみで観察された細胞質の空胞化は、血液化学的検査及び尿検査で評価した機能的変化とは関連がなかった。ラットの毒性試験で観察された空胞化は安全性に係わる所見であることから、第 3 相試験で腎機能（血清クレアチニン、尿アルブミン／クレアチニン比、尿顕微鏡検査）、肝機能（血清 ALP、AST、ALT 及び γ-GT）、血液学的パラメータ（総血球数）並びに副腎機能（血清コルチゾール）の検査を頻繁に実施してモニターした。さらに、臨床モニタリングには来院時の身体診察及び有害事象のパターンの定期的な評価が含まれる。

サルで観察された動脈炎は動物に外因性タンパク質を長期投与したことに関連する免疫介在性反応に起因し、投与中止により回復した。サルで認められた動脈炎はヒトとの関連が不明であったため、臨床試験で慎重にモニターした。器官の障害（腎臓障害及び肝臓障害など）を誘発する免疫複合体の蓄積に伴う合併症は Palynziq のリスク管理計画（RMP）に含まれる重要な潜在的リスクである。このリスクは計画している 165-501 試験及び 165-503 試験の観察でモニターする予定である。現在のところ、BMN 165 を投与した患者で免疫介在性の器官障害のエビデンスは確認されていない。米国における Palynziq の承認申請の審査において、BioMarin 社は

BMN 165 による腎障害の懸念に関して米国食品医薬品局（FDA）との協議を継続して実施した。FDA は Summary Basis of Approval で、BMN 165 の前臨床試験で腎臓に PEG 空胞が認められたが、動物試験で腎毒性を示唆する腎臓の病理所見や臨床検査値の変化は認められなかったと結論した。さらに、FDA は最初の生物学的製剤承認申請書（BLA）の臨床データに基づき腎機能の変化、進行性若しくは持続性のタンパク尿の発現又は免疫介在性糸球体腎炎などの重篤な免疫複合体関連性疾患のエビデンスはなく、BMN 165 による急性又は慢性腎毒性のシグナルもないと結論した。用量依存的な体重増加量の減少及び生殖毒性は、BMN 165 の過剰な薬理作用により正常動物における血漿中 Phe 濃度が低下したことに起因すると考えられた。

非臨床試験の結果から、臨床試験を開始するために十分な安全域が確保された。臨床における安全性は、BMN 165 の患者への導入、増量及び維持用量の投与パラダイムに基づいて確保されている。臨床試験の結果蓄積したデータにより、動物の無毒性量での曝露量を上回るヒトの投与量の安全性が担保される。非臨床試験における BMN 165 の曝露量を以下の表 2.4.5-1 に示し、現在の臨床試験におけるヒトの曝露量と比較した。

表 2.4.5-1 動物とヒト第 3 相試験の曝露量データの比較

Species	Study No.	Dose	Week	$AUC_{0\text{-}24hr}$ [a] (ng•hr/mL)	$AUC_{0\text{-}72hr}$ [a] (ng•hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	C_{trough} (ng/mL)
Rat	0165-08-019	1 mg/kg [b] (twice weekly)	Week 1	NA	68,029	1325	NA
			Week 8	NA	4094	276	NA
			Week 16	NA	65,516	3085	NA
			Week 27	NA	67,470	1994	NA
Monkey	0165-07-030	1 mg/kg [b] (twice weekly)	Week 1	NA	928,020 (237,747)	23,427 (11,523)	NA
			Week 39	NA	28,431 (24,209)	637 (476)	NA
Human	165-302	20 mg/day	Part 3 Week 1	143,039.7 (174,109.69)	NA	7098.4 (7971.62)	6464.8 (6841.81)
		40 mg/day	Part 3 Week 1	206,572.3 (212,342.03)	NA	10,653.4 (13,438.66)	9727.3 (10,438.97)
		20 mg/day	Part 3 Week 5/6	262,181.5 (280,378.19)	NA	14,042.6 (16,254.69)	11,177.3 (8974.65)
		40 mg/day	Part 3 Week 5/6	246,782.5 (338,587.54)	NA	16,687.3 (19,457.12)	10,446.0 (12,723.89)
		60 mg/day	Part 4 Week 41	NA	NA	NA	4762.2 [c] (20720.21)

a) Mean (SD).
b) Previously determined no observed adverse effect level.
c) Source: Module 5.3.5.1.1, 165-302 CSR, Table 14.2.7.4.

AUC: area under the curve; C_{max}: maximum plasma concentration; C_{trough}: trough plasma concentration; NA: Not available; No.: number; SD: standard deviation.

2.4.6　参考文献

(1) Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver, CR, Beaudet, A, Sly, WS et al., editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: McGraw Hill, 1667-1724. 2001.

(2) Pitt DB, Danks DM. The natural history of untreated phenylketonuria over 20 years. J Paediatr Child Health 27, 189-190. 1991.

(3) Pietz J, Fätkenheuer B, Burgard P, Armbruster M, Esser G, Schmidt H. Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. Pediatrics 99, 345-350. 1997.

(4) Huttenlocher PR. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. Eur J Pediatr 159 Suppl 2, S102-S106. 2000.

(5) Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. Genet Med 16, 188-200. 2014.

(6) van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. Orphanet J Rare Dis. 2017 12, 162. 2017.

(7) Zeile WL, McCune HC, Musson DG, O'Donnell B, O'Neil CA, Tsuruda LS, et al. Maternal phenylketonuria syndrome: studies in mice suggest a potential approach to a continuing problem. Pediatr Res 83, 889-896. 2018.

(8) Berguig GY, Martin NT, Creer AY, Xie L, Zhang L, Murphy R, et al. Of mice and men: Plasma phenylalanine reduction in PKU corrects neurotransmitter pathways in the brain. Mol Genet Metab 128, 422-430. 2019.

(9) Goldfinger M, Zeile WL, Corado CR, O'Neill CA, Tsuruda LS, Laipis PJ, et al. Partial rescue of neuropathology in the murine model of PKU following administration of recombinant phenylalanine ammonia lyase (pegvaliase). Mol Genet Metab 122, 33-35. 2017.

(10) Bendele A, Seely J, Richey C, Sennello G, Shopp G. Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. Toxicol Sci 42, 152-157. 1998.

(11) Kerr GR, Chamove AS, Harlow HF, Waisman HA. "Fetal PKU:" the effect of maternal hyper-phenylalaninemia during pregnancy in the rhesus monkey (Macaca mulatta). Pediatrics 42, 27-36. 1968.

(12) Brass CA, Isaacs CE, McChesney R, Greengard O. The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria. Pediatr Res 16, 388-394. 1982.

(13) Cho S, McDonald JD. Effect of maternal blood phenylalanine level on mouse maternal phenylketonuria offspring. Mol Genet Metab 74, 420-425. 2001.

(14) Bessman SP, Wapnir RA, Pankratz HS, Plantholt BA. Maternal phenylalanine deprivation in the rat. Enzymatic and cellular liver changes in the offspring. Biol Neonat 14, 107-116. 1969.

(15) Dluzniewski A, Gastol-Lewińska L, Gródecka A. Phenylalanine deficiency in the food of rat. Part II.

Decrease in fertility by phenylalanine deficiency in pregnancy. Pol J Pharmacol Pharm 33, 91-98. 1981.