目次

2.6.1　緒言.....3
2.6.1.1　参考文献.....4

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）
BH_4	tetrahydrobiopterin	テトラヒドロビオプテリン
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
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
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
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
t-CA	*trans*-cinnamic acid	*trans*-ケイ皮酸
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス

2.6.1　緒言

フェニルケトン尿症（PKU）はフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）遺伝子の突然変異（500以上の変異体が同定されている）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(1)。PAH は肝臓に最も多く分布し、補因子であるテトラヒドロビオプテリン（BH_4）の存在下でフェニルアラニン（Phe）を水酸化し、チロシンに変換する反応を触媒する。PAH の欠如又は活性低下は高フェニルアラニン血症を引き起こす(1)。蓄積した Phe は神経毒性を示し、知的障害、行動及び神経認知の異常、うつ病、その他の精神障害などの種々の合併症を PKU 患者に引き起こす(2)(3)。

PAH 活性の欠如は PKU の原因として知られるが、血漿中の PAH は不安定であり無傷の活性型酵素を効率的に肝臓に送達することが困難なため、PAH 酵素補充療法の開発は成功していない(4)(5)。現在 PKU 患者が利用できる治療法は、(a) 合成 Phe を低含量補充した Phe 制限食又は (b) 合成 Phe を低含量補充した Phe 制限食とビオプテン顆粒 2.5%／10%（JAN：サプロプテリン塩酸塩）による治療の併用などである。現在の治療選択肢は（早期に開始された場合）PKU の多くの重度の神経病理学的症状を予防するのに有用であるが、神経認知、心理社会的、成長及び生活の質の転帰には不十分で、PKU 患者は通常、高濃度の血中 Phe 濃度に関連するこれら多くの負の転帰を有していると報告されている。

そこで PAH 補充療法の代替法として、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）を PAH の代わりに使用し、18 歳以上の PKU 患者の血中 Phe 濃度の低下活性を評価した。遺伝子組換え PAL（rAvPAL）はシアノバクテリア *Anabaena variabilis* 由来で、潜凝集性を最小限に抑えるためシステイン 503 及び 565 をセリンに置換した。PAL は Phe をアンモニアと *trans*-ケイ皮酸（*t*-CA）に異化する。rAvPAL は免疫クリアランスを低下させるために広範にポリエチレングリコール（PEG）で修飾した（rAvPAL-PEG）。総分子量は約 1000,000 である。皮下注射用の滅菌溶液製剤として BMN 165［JAN：ペグバリアーゼ（遺伝子組換え）］（rAvPAL-PEG）を開発している。

BMN 165 の非臨床試験では、BTBR*Pah*^{enu2}（ENU2）マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて単回及び反復投与による薬効薬理、安全性薬理、トキシコキネティクス（TK）及び毒性評価を行った。全ての非臨床試験では皮下投与経路を使用し、最長 39 週間の投与を評価し、臨床適用経路による長期間投与を裏付けた。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、臨床試験での初回用量設定に有用であった。呼吸系及び中枢神経系に対する安全性薬理試験はラットを用いて評価し、心血管系に対する安全性薬理試験はテレメータを装着したサルを用いて評価した。BMN 165 の薬物動態（PK）は ENU2 マウスで評価し、また、ラット及びサルにおける毒性及び TK 試験と組み合わせて評価した。ラット及びサルを用いて単回投与及び反復投与毒性試験を実施した。ラット及びウサギに BMN 165 を 1 日 1 回投与した生殖発生毒性試験を実施し、BMN 165 が受胎能、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。ENU2 マウスを用いた薬理試験では、生殖発生パラメータに対する BMN 165 の薬理活性を評価した。まとめると、実施した非臨床試験のパッケージは頑健な非臨

床評価の結果を提供するもので、PKU 患者の治療を適応とする BMN 165 の臨床開発を強く支持する。

2.6.1.1 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) Waisbren SE, Brown MJ, de Sonneville LMJ, Levy HL. Review of neuropsychological functioning in treated phenylketonuria: an information processing approach. Acta Paediatr Suppl 407, 98-103. 1994.

(3) Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, et al. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. Mol Genet Metab 92, 63-70. 2007.

(4) Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michols-Matalon K, et al. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. Mol Ther 10, 220-224. 2004.

(5) Harding CO, Neff M, Jones K, Wild K, Wolff JA. Expression of phenylalanine hydroxylase (PAH) in erythrogenic bone marrow does not correct hyperphenylalaninemia in *Pah*^{enu2} mice. J Gene Med 5, 984-993. 2003.

目次

2.6.2　薬理試験の概要文....4
2.6.2.1　まとめ....4
2.6.2.2　効力を裏付ける試験....5
2.6.2.2.1　作用機序....5
2.6.2.2.2　動物疾患モデル....5
2.6.2.2.3　野生型 *Anabaena variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（AvPAL）及びポリエチレングリコール（PEG）化 AvPAL の *in vivo* 評価....6
2.6.2.2.3.1　ENU2 マウスを用いた AvPAL 及び PEG 化 AvPAL の皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化の評価....6
2.6.2.2.4　BMN 165 の *in vivo* 評価....8
2.6.2.2.4.1　ナイーブ ENU2 マウスを用いた PEG 化遺伝子組換え AvPAL（rAvPAL-PEG）の皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化の評価....8
2.6.2.2.4.2　ENU2 マウスを用いた 2 週間の回復期間を含む rAvPAL-PEG の漸減法による 16 週間投与量範囲探索試験....10
2.6.2.2.4.3　ENU2 マウスを用いた rAvPAL-PEG の最長 12 週間投与による神経病理学的脳変化の評価....13
2.6.2.2.4.4　雌性 ENU2 マウスの生殖発生を担保する投与レジメンの検討....15
2.6.2.3　副次的薬理試験....20
2.6.2.4　安全性薬理試験....21
2.6.2.4.1　ラットを用いた rAvPAL-PEG の皮下投与によるヘッドアウトプレチスモグラフィーを使用した呼吸系に対する安全性薬理試験....21
2.6.2.4.2　ラットを用いた rAvPAL-PEG の安全性薬理神経学的評価試験....22
2.6.2.4.3　テレメータを装着した覚醒下の雄性サルを用いた rAvPAL-PEG の並行法での皮下投与による心血管系に対する安全性薬理試験....23
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験....24
2.6.2.6　考察及び結論....24
2.6.2.7　参考文献....25

表目次

表 2.6.2.1-1　薬理試験一覧....4
表 2.6.2.2.3-1　ENU2 マウスを用いた wt AvPAL 及び PEG 化 wt AvPAL（wt AvPAL-PEG）の皮下投与を評価する試験デザイン....7
表 2.6.2.2.4-1　ENU2 マウスを用いた BMN 165 及び wt AvPAL-PEG の週 1 回計 8 回皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化を評価する試験デザイン....9
表 2.6.2.2.4-2　ENU2 マウスを用いた 2 週間の回復期間を含む BMN 165 の 16 週間反復投与の試験デザイン....10

表 2.6.2.2.4-3 ホモ接合性（-/-）ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 12 週間反復投与の試験デザイン 13
表 2.6.2.2.4-4 雌性 ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 10 週間皮下投与の試験デザイン 16
表 2.6.2.2.4-5 雌性 ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 21 及び 50 週間皮下投与の試験デザイン 18
表 2.6.2.2.4-6 BMN 165 の 50 週間皮下投与による同腹児の評価....19
表 2.6.2.2.4-7 連続投与レジメンの試験デザイン 19
表 2.6.2.2.4-8 BMN 165 の週 3 回及び連日投与レジメンによる妊娠パラメータ評価....20
表 2.6.2.4.1-1 ラットを用いた BMN 165 の呼吸系に対する安全性薬理を評価する試験デザイン 21
表 2.6.2.4.2-1 ラットを用いた BMN 165 の皮下投与による神経学的評価の試験デザイン....22
表 2.6.2.4.3-1 テレメータを装着したサルを用いた BMN 165 の投与による心血管系に対する影響を評価する試験デザイン....23

図目次

図 2.6.2.2.3-1 ENU2 マウスを用いた投与 1、4 及び 8 日目の wt AvPAL 及び PEG 化 wt AvPAL（wt AvPAL-PEG）の皮下投与による血漿中 Phe 濃度の推移....7
図 2.6.2.2.4-1 ENU2 マウスを用いた週 1 回の BMN 165 の皮下投与による血漿中 Phe 濃度の推移 9
図 2.6.2.2.4-2 雌雄 ENU2 マウスを用いた BMN 165 の皮下投与による血漿中 Phe 濃度の推移（投与 71 日目で漸減） 12
図 2.6.2.2.4-3 ENU2 マウス及び野生型マウスのチロシン水酸化酵素陽性細胞数の経時的比較 15

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）
ARC	arcuate nucleus	弓状核
CFR	Code of Federal Regulations	連邦規則集
CTD	Common Technical Document	コモン・テクニカル・ドキュメント
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
DMH	dorsomedial hypothalamic nucleus	視床下部背内側核
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
GFAP	glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性タンパク質
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human *ether-à-go-go* related gene	ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IU	International units	国際単位
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
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
Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
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
SD	Sprague Dawley	ラットの系統
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
wt	wild type	野生型

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

BMN 165［JAN：ペグバリアーゼ（遺伝子組換え）］の非臨床薬理評価では、ENU2 マウス［フェニルケトン尿症（PKU）の動物モデル］を用いた効力を裏付ける試験 7 試験及び安全性薬理試験 3 試験（ラットを用いた中枢神経系に対する 1 試験、ラットを用いた呼吸系に対する 1 試験及びサルを用いた心血管系に対する 1 試験）を実施した。非臨床試験で使用した全ての試験動物種（マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザル）は、ペグバリアーゼの基質が全ての哺乳類の必須アミノ酸であるフェニルアラニン（Phe）であることに基づき、適切な動物種と考えられる。薬理試験の一覧を表 2.6.2.1-1 及び表 2.6.3.1-1 に示す。

表 2.6.2.1-1　薬理試験一覧

Study Description and Study Number	Species	Route	Duration and Administration Schedule	Doses (mg/kg)	GLP
PRIMARY PHARMACODYNAMICS					
Pharmacology Study Evaluating Plasma Phe Levels in ENU2 Mice Following Subcutaneous Administration of AvPAL and PEGylated AvPAL (0164-06-019)	Mouse	SC	8 days (Day 1, 4, 8)	0, 0.2, 1 (IU/mouse)	No
Evaluation of Plasma Phe Levels Following Subcutaneous Administration of PEGylated AvPAL variant in Naïve ENU2 Mice (0165-06-057)	Mouse	SC	8 weeks (once weekly)	0, 0.25, 1, 4 (IU/mouse)	No
Dose Range Reduction of rAvPAL-PEG for 16 Weeks with a 2 Week Recovery Period (0165-07-001)	Mouse	SC	16 weeks (once weekly)	0, 20, 40, 80	No
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	SC	4, 8 or 12 weeks (three times per week)	0, 10/10/20	No
Assessment of rAvPAL-PEG Dose Ranging Studying Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-07-029 and 0165-08-005)	Mouse	SC	27 weeks (once or twice weekly)	Once weekly: 80, 120 Twice weekly: 40, 80	No
Assessment of Reproduction in Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice Administered rAvPAL-PEG (0165-08-027)	Mouse	SC	50 weeks (two or three times weekly)	Twice weekly: 40 Three times weekly: 10/10/20	No

表 2.6.2.1-1 薬理試験一覧表（続き）

Study Description and Study Number	Species	Route	Duration and Administration Schedule	Doses (mg/kg)	GLP
Assessment of rAvPAL-PEG Dose Range Administration for Stabilization of Plasma Phe in Growing Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice (0165-09-068 and 0165-10-008)	Mouse	SC	42 weeks (three times weekly or daily)	Three times weekly: 5, 10 Daily: 7, 6	No
SAFETY PHARMACOLOGY					
Respiratory Safety Pharmacology (0165-07-005)	Rat	SC	Single dose	0, 10, 20, 50, 125	Yes [a]
CNS Safety Pharmacology (0165-07-004)	Rat	SC	Single dose	0, 10, 50, 125	Yes [a]
Cardiovascular Safety Pharmacology (0165-07-006)	Monkey	SC	Single dose	0, 1, 3, 10	Yes [a]

a) The study was conducted in compliance with the United States Food and Drug Administration (FDA) Good Laboratory Practice (GLP) Regulations, 21 CFR Part 58; the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) GLP Standards, Ordinance 21; the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Principles of GLP, ENV/MC/CHEM(98)17; and any applicable amendments.

AvPAL: phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); BMN 165: rAvPAL-PEG; CNS: central nervous system; ENU2: an animal model of phenylketonuria, BTBR*Pah*^{enu2} mouse developed by ethylnitrosourea mutagenesis that is deficient in phenylalanine hydroxylase activity; IU: international units; PEG: polyethylene glycol; *Pah*: mouse phenylalanine hydroxylase gene; Phe: phenylalanine; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase, introduced two point mutations (Cys503Ser and Cys565Ser) into AvPAL enzyme sequence; SC: subcutaneous.

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験では、ENU2 マウスを用いた短期間及び長期間反復投与による投与量範囲探索薬理試験 4 試験、さらに母性 PKU 症候群を評価する投与量範囲探索薬理試験 3 試験を実施した。全ての薬理試験では臨床適用経路すなわち皮下投与を用いた。さらに非臨床毒性試験で血漿中 Phe 濃度を評価し、BMN 165 の薬理活性を確認した。

2.6.2.2.1 作用機序

BMN 165 は Phe をアンモニアと *trans*-ケイ皮酸（*t*-CA）に異化し、*t*-CA は速やかに馬尿酸に変換され尿中に排泄される。BMN 165 は高フェニルアラニン血症に特化した PKU の治療を適応とする酵素補充療法として開発している。

2.6.2.2.2 動物疾患モデル

PKU の薬理評価モデルである BTBR*Pah*^{enu2}（ENU2）［(-/-) ENU2 とも記載している］マウスは、生殖細胞系列のエチルニトロソ尿素突然変異誘発によって作出され、Phe クリアランスのスクリーニングによりフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）活性を欠損した突然変異マウス系統（PAH -/-）を分離した(1)。このマウスではオーソロガス PAH 遺伝子のエクソン 7 に T835C ミスセンス突然変異が誘発され、その結果、PAH タンパク質のアミノ酸 263 の Phe がセリンに置換（F263S）されており、これは標準的な PKU 患者に認められている突然変異に類似している(2) (3)。このマウスモデルは高フェニルアラニン血症（血漿中 Phe のベースライン濃度が 1000

～2000 µmol/L）、低色素沈着、認知障害など、PKU 患者で認められる臨床所見と類似した特徴を示す。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 マウスの被毛に進行性の黒ずみがもたらされる。PAH 欠損により Phe 濃度が制御されない雌性 ENU2 マウスは受胎可能であるが、妊娠中に多数の胚吸収、流産、死産を経験し、新生児が生まれるとほとんどは出生後 24 時間以内に死亡する。子宮内での胚・胎児死亡は、母動物の血漿中 Phe 濃度が高いことにより着床後の発育中の胎児への曝露量が多くなったことによると予想される。母体の状態が悪いことも、子宮内での胚・胎児死亡の主要要因の一つであると考えられる。出生後の死亡は、胎児発育中の Phe への高曝露により催奇形性が認められると報告されているため、この子宮内の悪条件に起因する可能性が高い(1)。また、一部は Phe 濃度が高いことによりドーパミン濃度が低下したことによる母動物の母性行動の欠如に起因すると考えられ、乳汁中の高濃度の Phe の影響も考えられる。

ENU2 モデルを用いて、種々のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）変異体をスクリーニングし、BMN 165 の薬理活性を評価し、BMN 165 の投与による PKU 脳病変及び母性 PKU 症候群の改善を評価した。薬理活性の 3 評価候補項目（血漿中 Phe 濃度、低色素沈着及び認知障害）のうち低色素沈着及び認知機能変化の原因である血漿中 Phe 濃度変化を主要薬理活性評価項目として使用した。

2.6.2.2.3　野生型 *Anabaena variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（AvPAL）及びポリエチレングリコール（PEG）化 AvPAL の *in vivo* 評価

最初の試験では、大腸菌（*E.coli*）に発現させた *Anabaena variabilis* PAL（AvPAL）及びポリエチレングリコール（PEG）化 AvPAL（AvPAL-PEG）の（-/-）ENU2 マウスモデルでの血漿中 Phe 濃度低下活性について、野生型 PAL 分子［野生型（wt）AvPAL］及び PEG 化 wt AvPAL（wt AvPAL-PEG）を用いて評価した。

2.6.2.2.3.1　ENU2 マウスを用いた AvPAL 及び PEG 化 AvPAL の皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化の評価

（CTD: 4.2.1.1-1、0164-06-019）

大腸菌に発現させた *Anabaena variabilis* 由来の wt AvPAL 及び wt AvPAL-PEG の 3 回皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化を評価した。試験は[redacted]（[redacted]、[redacted]、Canada）で実施し、連邦規則集第 21 巻 58 条（21 CFR Part 58）に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practice に準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。

被験物質は雌雄（-/-）ENU2 マウスの後四半部に、投与 1、4 及び 8 日目に皮下投与した。投与開始 3 日前（投与-3 日目）、投与 4 及び 8 日目の投与前並びに投与 2、5、9 及び 12 日目に Phe 濃度測定用の血漿を採取した。投与開始 3 日前（投与-3 日目）、投与 8 及び 22 日目に抗 AvPAL IgG 抗体価測定用の血清を採取した。体重は週 1 回測定した。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.3-1 に示す。

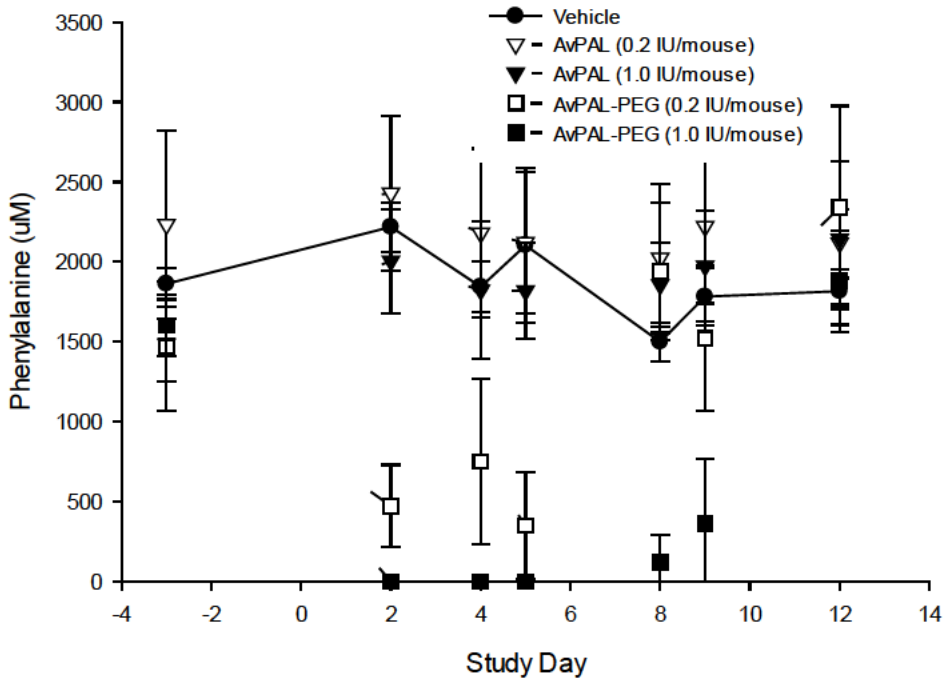
表 2.6.2.2.3-1 ENU2 マウスを用いた wt AvPAL 及び PEG 化 wt AvPAL（wt AvPAL-PEG）の皮下投与を評価する試験デザイン

Group	Compound	Dose Level (IU/mouse)	Dose [c] (mg/ mouse)	Dose Regimen	No. and Gender per Group	
					Males	Females
1	Vehicle	0	0	Days 1, 4, 8	3	0
2	wt AvPAL [a]	0.2	0.11	Days 1, 4, 8	1	4
3	wt AvPAL [a]	1.0	0.53	Days 1, 4, 8	5	0
4	wt AvPAL-PEG [b]	0.2	0.13	Days 1, 4, 8	3	2
5	wt AvPAL-PEG [b]	1.0	0.66	Days 1, 4, 8	2	4

a) lot # 0164-03262006-00Av
b) lot # 0164-03262006-00Av-X2
c) Groups 1-5 were dosed at a volume of 0.33 mL/mouse.
AvPAL: phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); IU: international units; No.: number; PEG: polyethylene glycol; wt: wild type.

動物の体重、瀕死状態及び死亡に対する被験物質の投与による影響は認められなかった。Wt AvPAL の反復皮下投与では、12 日間の測定期間中 ENU2 マウスの血漿中 Phe 濃度に有意な変化は認められなかった。一方、wt AvPAL-PEG の皮下投与では、第 1 及び 2 回目の投与である投与 1 及び 4 日目の投与により ENU2 マウスの血漿中 Phe 濃度は低下した。第 3 回目の投与後、Phe 濃度の低下に対する Wt AvPAL-PEG の薬理効果の減弱が認められた（図 2.6.2.2.3-1）。

図 2.6.2.2.3-1 ENU2 マウスを用いた投与 1、4 及び 8 日目の wt AvPAL 及び PEG 化 wt AvPAL（wt AvPAL-PEG）の皮下投与による血漿中 Phe 濃度の推移



Error bars represent standard deviation (SD); n=3 samples/time point for vehicle, n=5 samples/time point for AvPAL (both dose groups) and AvPAL-PEG (0.2 IU/mouse), and n=6 samples/time point for AvPAL-PEG (1.0 IU/mouse).
AvPAL: phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); PEG: polyethylene glycol; IU: international units.

抗 AvPAL IgG 抗体価は投与 8～22 日目に増加した。Wt AvPAL-PEG を投与した ENU2 マウスでは、PEG 化していない wt AvPAL を投与したマウスよりも抗 AvPAL IgG 抗体価は低かった。3 回の投与後の薬理活性応答の低下は PAL-PEG に対する抗体産生が原因である可能性がある。免疫に関連した毒性所見は認められなかった。

以上、wt AvPAL の PEG 化は投与開始後 8 日間の血漿中 Phe 濃度を抑制するために必要だが、抗 AvPAL IgG 産生は認められ、投与量が少ないほど有効性に影響が認められた。

2.6.2.2.4　BMN 165 の *in vivo* 評価

AvPAL 酵素の遺伝子配列に 2 つの点突然変異（C503S 及び C565S の置換）を導入し、凝集性を低下させ、酵素活性を安定化した［以下、「遺伝子組換え AvPAL（rAvPAL）」と表記する］。次に、このタンパク質を PEG 化して BMN 165 を生成した。BMN 165 は、本 CTD では「PEG 化 rAvPAL（rAvPAL-PEG）」とも表記している。ENU2 マウスモデルを用いて、BMN 165 の血漿中 Phe 濃度低下活性に対する至適投与量、投与レジメン及び長期間反復投与の効果について評価した。さらに ENU2 マウスを用いて神経病理学的解析を行い、中枢神経系に対する効果を評価した。

2.6.2.2.4.1　ナイーブ ENU2 マウスを用いた PEG 化遺伝子組換え AvPAL（rAvPAL-PEG）の皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化の評価

（CTD: 4.2.1.1-2、0165-06-057）

ENU2 マウスに種々の投与量の BMN 165（点突然変異による C503S 及び C565S の置換を有し、「rAvPAL-PEG」とも表記している）及び wt AvPAL-PEG の反復皮下投与を行い、血漿中 Phe 濃度を測定した。試験は[redacted]（[redacted]、[redacted]、Canada）で実施し、21 CFR Part58 に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practice に準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。

BMN 165 を 0.33 mL の投与容量で雌雄 ENU2 マウス（2～4 ヵ月齢）に週 1 回皮下投与した。比較対照として wt AvPAL-PEG も投与した。投与開始 3 日前（投与-3 日目）、投与 3、8、10、15、17、22、24、29、31、36、38、43、45、50、52 及び 57 日目に 1 回（投与日は投与前に）血漿中 Phe 濃度測定用の血液試料を採取した。投与開始 3 日前（投与-3 日目）、投与 8、15、22、29、36、43、50 及び 57 日目に抗 AvPAL IgG 抗体測定用の血清を採取した。体重は投与開始前及びその後週 1 回測定した。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.4-1 に示す。

表 2.6.2.2.4-1　ENU2 マウスを用いた BMN 165 及び wt AvPAL-PEG の週 1 回計 8 回皮下投与による血漿中 Phe 濃度変化を評価する試験デザイン

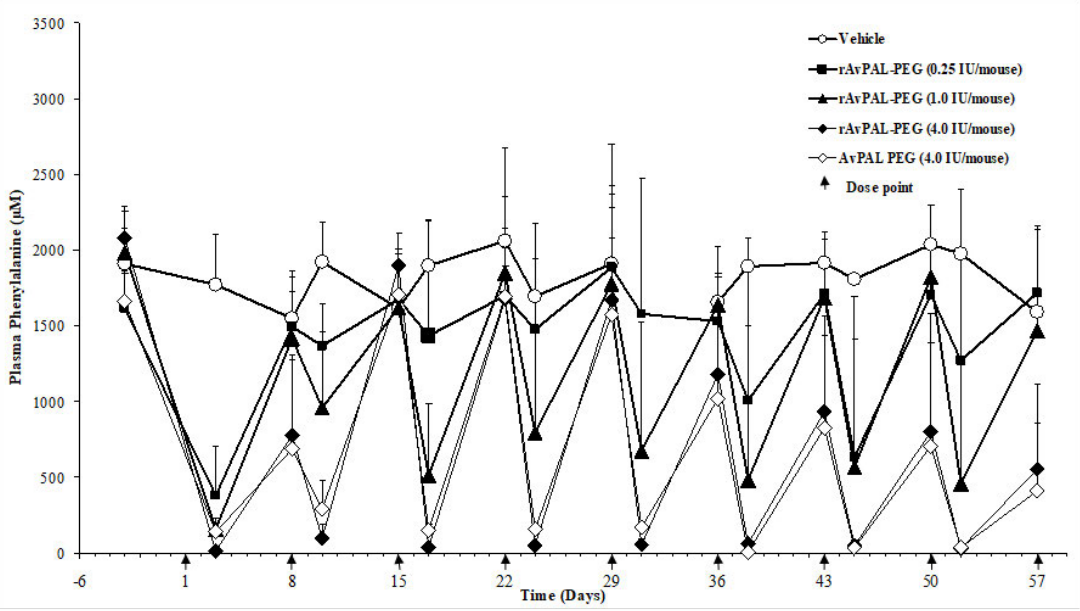
Group	Compound	Dose (IU/mouse)	Nominal Dose (mg/mouse)	Dosing Frequency / number [c]	No. and Gender per Group	
					Male	Female
1	Vehicle	0	0	weekly / 8	1	1
2	BMN 165 [a]	0.25	0.23	weekly / 8	2	2
3	BMN 165 [a]	1.0	0.92	weekly / 8	2	2
4	BMN 165 [a]	4.0	3.67	weekly / 8	2	2
5	wt AvPAL-PEG [b]	4.0	3.81	weekly / 8	2	2

a) lot # 0164-10122006-02Av-X2
b) lot # 0164-10122006-00Av-X2
c) Groups 1-5 were dosed once per week at a volume of 0.33 mL/mouse.
wt AvPAL-PEG: PEGylated wild type phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); IU: international units; No.: number; PEG: polyethylene glycol.

ENU2 マウスでは最大 4 国際単位（IU）/マウスの BMN 165 及び wt AvPAL-PEG の 57 日間皮下投与の忍容性は高く、全ての投与動物は試験期間中体重が全般的に増加し、溶媒投与動物と比較して投与量に依存した一般状態の変化は認められなかった。試験期間中に 2 例の死亡が確認されたが、いずれの死亡例も BMN 165 の投与に関連した死亡とは判断されなかった。

BMN 165 の週 1 回計 8 回の皮下投与により ENU2 マウスの血漿中 Phe 濃度は投与量に依存して低下した。投与 3～7 週目に血漿中 Phe 濃度の低下活性の減弱が認められた。Phe 濃度の低下活性は、BMN 165 と wt AvPAL-PEG でほぼ同程度であった（図 2.6.2.2.4-1）。

図 2.6.2.2.4-1　ENU2 マウスを用いた週 1 回の BMN 165 の皮下投与による血漿中 Phe 濃度の推移



Error bars represent standard deviation (SD); n=2 samples/time point for vehicle but one animal was terminated during the study on day 25, and n=4 samples/time point for each AvPAL-PEG and rAvPAL-PEG dose group.
AvPAL-PEG: wt AvPAL-PEG; rAvPAL-PEG: BMN 165.
AvPAL-PEG: PEGylated wild type phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); IU: international units; PEG: polyethylene glycol; wt: wild type.

試験期間中予想された免疫原性が認められたが、抗体価は低かった。BMN 165 を投与した動物（投与 29 日目）では wt AvPAL-PEG を投与した動物（投与 15 日目）よりも後に抗 AvPAL IgG 産生が出現した。抗 AvPAL 抗体産生の出現にもかかわらず特異的免疫に関連したアナフィラキシー様反応及び注射部位反応の徴候は認められなかった。

以上、ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 8 週間反復投与により血漿中 Phe 濃度が低下し、低抗体価の抗 AvPAL IgG 産生が投与 64 日まで認められた。

2.6.2.2.4.2　ENU2 マウスを用いた 2 週間の回復期間を含む rAvPAL-PEG の漸減法による 16 週間投与量範囲探索試験

（CTD: 4.2.1.1-3、0165-07-001）

ナイーブ ENU2 マウスに漸減法で BMN 165 の反復皮下投与を行い、血漿中 Phe 濃度の測定により至適維持投与量を検討した。試験は[redacted]（[redacted]、[redacted]、Canada）で実施し、21 CFR Part58 に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practice に準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。

雌雄 ENU2 マウスに週 1 回 16 週間皮下投与した。投与開始 1 日前、投与 5、8、12、15、19、22、26、29、33、36、40、43、47、50、54、57、61、64、68、71、75、78、82、85、89、92、96、99、103、106、110、113、117 及び 120 日目（投与日は投与前）に血漿中 Phe 濃度測定用の血液を尾静脈出血により採取した。投与開始 1 日前、投与 12、19、26、33、40、61、75、89、103、113 及び 124 日目に抗 rAvPAL IgG 抗体価測定用の血清試料を採取した。体重は週 1 回測定した。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.4-2 に示す。

表 2.6.2.2.4-2　ENU2 マウスを用いた 2 週間の回復期間を含む BMN 165 の 16 週間反復投与の試験デザイン

Group #	Compound	Weeks	Dose (mg/kg)	Dosing Frequency [b]	No. and Gender per Group	
					Female	Male
1	Vehicle	1-10	0	weekly	8	8
		11-16	0	weekly	8	8
2	BMN 165 [a]	1-10	80	weekly	8	8
		11-16	40	weekly	8	8
3	BMN 165 [a]	1-10	80	weekly	8	8
		11-16	20	weekly	8	8
4	BMN 165 [a]	1-10	40	weekly	8	8
		11-16	20	weekly	8	8

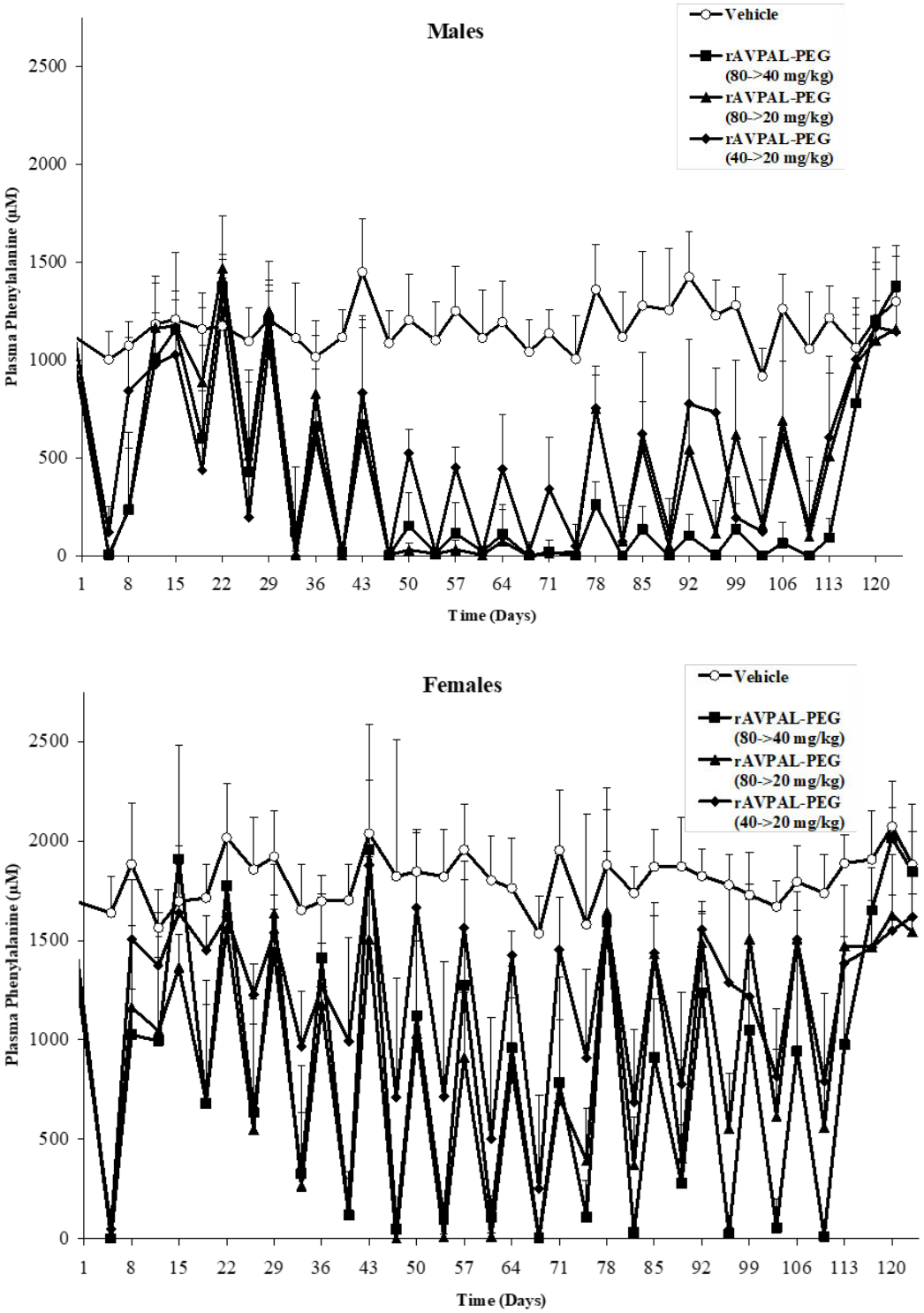
a) lot # 0702010165
b) Groups 1-4 were dosed at a volume of 10 mL/kg.
No.: number; PEG: polyethylene glycol.

4 例の死亡が認められたが、死亡は最高投与量群（第 2 群に 2 例）、最低投与量群（第 4 群に 1 例）及び対照群（第 1 群に 1 例）に認められたため、BMN 165 の投与に関連した死亡とは判断されなかった。残りの動物は試験期間中体重が増加したが、投与量依存的ではなかった。80 mg/kg を週 1 回投与した動物（第 2 群及び 3 群）の被毛は投与 11 日目までに黒ずみ始め、

投与 32 日目までに全ての投与動物で被毛の黒ずみが認められた。40 mg/kg の BMN 165 を投与した動物の被毛の黒ずみは遅れ、投与 12～49 日目に認められた。

血漿中 Phe 濃度は、40 及び 80 mg/kg を投与した動物で投与開始後 4 日目までに低下した（図 2.6.2.2.4-2）。その後、雌雄マウスでそれぞれ投与 3～16 週目及び投与 3～7 週目に、全ての投与動物で血漿中 Phe 濃度の低下活性の減弱が認められた。80 mg/kg の BMN 165 を投与した雄性 ENU2 マウスでは、週 1 回計 8 回投与後 200 µmol/L 未満の安定した血漿中 Phe 濃度が達成された。40 mg/kg を週 1 回皮下投与した雄性マウスでは、週 1 回計 8 回投与後約 500 µmol/L 以下の血漿中 Phe 濃度がその後 1 週間の間維持された。試験期間中全般的に雌の血漿中 Phe のベースライン濃度は雄よりも高かった。雌性 ENU2 マウスでは、40 及び 80 mg/kg の BMN 165 の週 1 回皮下投与により血漿中 Phe 濃度は低下したが血漿中 Phe 濃度の低下作用を 1 週間維持できず、雄性 ENU2 マウスでは認められなかった血漿中 Phe 濃度の大きな変動を引き起こした（図 2.6.2.2.4-2）。

図 2.6.2.2.4-2　雌雄 ENU2 マウスを用いた BMN 165 の皮下投与による血漿中 Phe 濃度の推移（投与 71 日目で漸減）



Error bars represent standard deviation (SD); n=8 samples/gender/time point for each group.
rAvPAL-PEG: BMN 165.

BMN 165 を 80 mg/kg で週 1 回 10 週間、その後、40 mg/kg で週 1 回 6 週間皮下投与する投与レジメンは、雄性 ENU2 マウスで投与後 1 週間の間完全に安定した血漿中 Phe 濃度の低下を維

持する最も効果的な投与レジメンであった。週1回投与で試験最後の6週間の投与量を20 mg/kgに漸減する投与レジメンは、雌雄 ENU2 マウス両方で安定した血中 Phe 濃度の低下を維持する有効な投与レジメンではないようであった。

3 投与群全てに投与 26～33 日目から一貫した抗 rAvPAL IgG 抗体産生が認められ、12150 以下の抗体価が試験終了時点まで認められた。第 4 群（40 mg/kg→20 mg/kg）の動物の抗体価は他の 2 投与群よりもわずかに低く、投与量が低い群では抗体産生量が低いことが示唆されたが、3 投与群の抗体価に有意差はなかった。第 3 群（80 mg/kg→20 mg/kg）の雌は雄と比較して抗体価がわずかに高かったが、有意ではなかった。抗 rAvPAL IgG 産生の出現にもかかわらず免疫に関連したアナフィラキシー様反応及び注射部位反応の徴候は認められなかった。

以上、ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 16 週間皮下投与により雄性マウスでは血漿中 Phe 濃度の安定した低下が認められたが、雌性マウスでは安定した低下は認められなかった。抗 rAvPAL IgG 抗体産生は全ての投与レジメンで認められたが、アナフィラキシー様反応及び注射部位反応の徴候は認められなかった。BMN 165 の皮下投与量の 80 mg/kg から 40 mg/kg への漸減で、雄性マウスの血漿中 Phe 濃度の低下効果は維持された。

2.6.2.2.4.3　ENU2 マウスを用いた rAvPAL-PEG の最長 12 週間投与による神経病理学的脳変化の評価

（CTD: 4.2.1.1-4、BMN165-14-044）

雌性（-/-）ENU2 マウスを用いて、BMN 165 の週 3 回 4、8 及び 12 週間連続皮下投与による神経病理学的基本パラメータに対する効果について、野生型（+/+）BTBR マウス及び（-/-）ENU2 マウスの両方と比較して評価した。主要神経学的評価項目は、視床下部及び中脳神経核神経細胞のチロシン水酸化酵素（TH）及びニッスル染色の 2 項目を評価した。試験は[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）及び[redacted]（[redacted]、UK）で実施し、21 CFR Part58 に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practice に準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.4-3 に示す。

表 2.6.2.2.4-3　ホモ接合性（-/-）ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 12 週間反復投与の試験デザイン

Groups	Number of Female	Genotype	Material	Duration (week)	Dose (mg/kg/day, M,W,F) [a]
1, 4, 7	5, 5, 5	wt	Vehicle	8, 12, 5 [b]	0
2, 5, 8	4, 5, 5	(-/-) ENU2	Vehicle	8, 12, 5 [b]	0
3, 6, 9	5, 5, 5	(-/-) ENU2	BMN 165	8, 12, 5 [b]	10, 10, 20

a) BMN 165 Lot # P1626-13107, 2 mg/mL on Mondays (M) and Wednesdays (W) and 4 mg/mL on Fridays (F), given SC at 5 mL/kg/dose.
b) In the protocol this duration was 4 weeks, but mice were treated for 5 weeks.
wt: wild type.

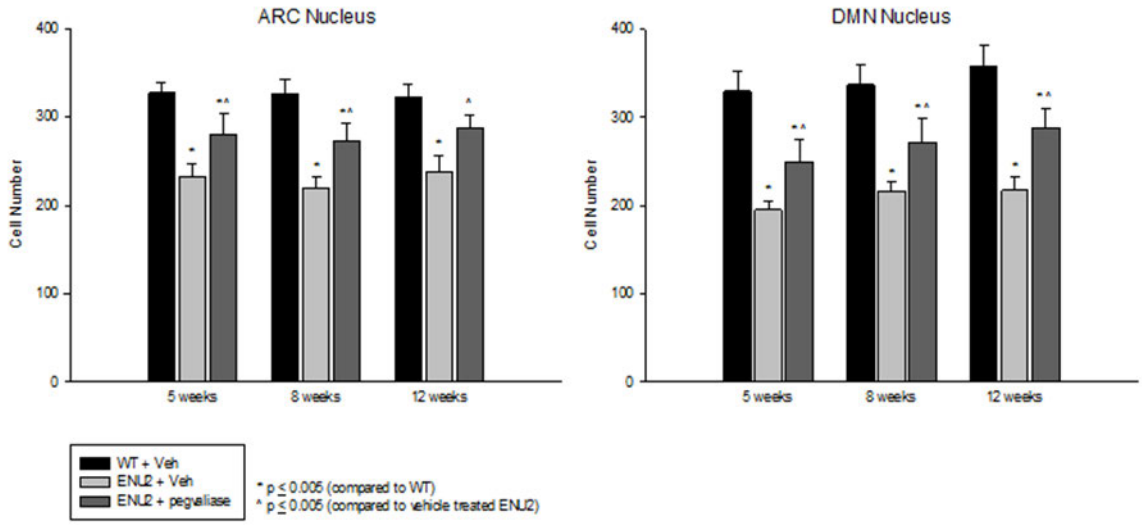
44 匹の約 5～8 週齢の雌性マウス［29 匹のホモ接合性（-/-）ENU2 及び 15 匹の野生型（+/+）BTBR マウス］を 9 群（n = 4～5/群、3 群/終了時点）に割り当てた。溶媒（ENU2 及び野生型

マウス）及び BMN 165（ENU2 マウス）を週 3 回（月曜日、水曜日及び金曜日）皮下投与した。動物は瀕死状態、生死及び一般状態の変化を毎日評価した。体重は週 1 回測定した。試験期間中週 1 回及び試験終了時に血漿中 Phe 濃度測定用の血液試料を採取した。Phe 濃度は少容量及びマイクロタイタープレート用に改変した蛍光測定法で評価した。動物は投与 5、8 及び 12 週目の各最終投与の約 24 時間後に安楽死させた。TH、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP、星状膠細胞マーカー）並びに CD68 及び Iba-1（小膠細胞マーカー）の免疫組織染色によって、星状膠細胞及び小膠細胞の活性化並びにドーパミン作動性神経細胞の生存について脳を評価した(4)。神経細胞の細胞構築を視覚化し神経細胞数の立体的解析を可能にするために脳冠状切片をニッスル染色し、光学選別装置を使用して染色細胞数をカウントした。解析は脳の視床下部、中脳及び橋領域で実施した。

全ての動物は予定した試験終了日まで生存した。有害な一般状態の変化は認められず、全ての野生型マウス及び BMN 165 を投与した（-/-）ENU2 マウスで体重が増加した。溶媒を投与した ENU2 マウスでは、この系統のマウスで予測された体重増加の抑制が認められた。第 3、6 及び 9 群では、投与開始後の 7 日間に生理学的に正常な野生型マウスと同程度の血漿中 Phe 濃度への低下が認められたが、その後、血漿中 Phe 濃度の低下応答は再び野生型マウスと同程度の濃度への低下が認められた投与約 28 日目まで減弱した。溶媒を投与した（-/-）ENU2 マウスの Phe の平均ベースライン濃度は 2000 µmol/L 超であった。

溶媒を投与した（-/-）ENU2 マウスでは、野生型マウスと比較して非常にわずかではあるが小膠細胞の活性化が 13 ヵ月齢で認められたが、脳の初期病変とは判断されなかった。溶媒を投与した（-/-）ENU2 マウスの脳切片の解析では、野生型マウスと比較して TH の早発型発現抑制が複数の脳領域で認められた。ニッスル染色による神経細胞数の解析では、これらの神経細胞は脱落しておらず、治療療法に適している可能性が示された。ホモ接合性（-/-）ENU2 マウスの視床下部背内側核（DMH）及び弓状核（ARC）の TH 陽性神経細胞数は、野生型対照マウスと比較して両核で一貫した減少が全ての時点で認められ、TH 発現が抑制された神経細胞の治療の可能性が裏付けられた。BMN 165 の 12 週間の投与によりこれら TH 陽性神経細胞の欠損は両核で部分的に改善した（図 2.6.2.2.4-3）。

図 2.6.2.2.4-3　ENU2 マウス及び野生型マウスのチロシン水酸化酵素陽性細胞数の経時的比較



Error bars represent standard deviation (SD); n=5 samples/time point for each group, except for ENU2+vehicle at 8 weeks where n=4 samples.
Optical fractionator counts of tyrosine hydroxylase (TH) stained neurons in the arcuate nucleus (ARC) and dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) of ENU2 mice and age-matched wt controls, either treated with BMN 165 or vehicle. A consistent and significant reduction in the number TH positive neurons was evidence in both nuclei at three time points up to 12 weeks. This was partly reversed by BMN 165 treatment, which significantly increased the number of neurons in both nuclei, albeit not to wt levels.
Veh: vehicle; WT: wild type.
Source: This figure was modified Figure 4 of Appendix 3 in BMN165-14-044.

以上、溶媒を投与した ENU2 マウスの自然経過評価では、ENU2 マウスの複数の脳領域でわずかな小膠細胞の活性化を伴う劇的かつ早発型の TH 発現抑制が認められた。この所見は、モノアミン神経伝達物質の欠乏が PKU で一般的に認められる神経認知症に部分的に関与しているという報告と一致している。BMN 165 の最長 12 週間の投与により溶媒を投与した ENU2 マウスと比較して複数の脳領域で免疫組織化学的に検出可能な TH 陽性神経細胞数が有意に増加し、BMN 165 の投与により雌性（-/-）ENU2 マウスの TH 量の不足を改善できることが示された。

2.6.2.2.4.4　雌性 ENU2 マウスの生殖発生を担保する投与レジメンの検討

薬理活性及び生殖発生を評価する 3 試験を実施し、BMN 165 を用いた酵素補充療法の使用により ENU2 マウスで認められる母性 PKU 症候群の改善を評価し、妊娠を維持し正常な同腹児数を生み出すのに十分な濃度で血漿中 Phe 濃度を安定化する反復投与レジメンを検討した。

2.6.2.2.4.4.1　雌性 ENU2 マウスの繁殖を担保する rAvPAL-PEG の投与量範囲探索試験：試験 1

（CTD: 4.2.1.1-5、0165-07-029 and 0165-08-005）

雌性（-/-）ENU2 マウスを用いて、血漿中 Phe 濃度を低下させ生殖及び妊娠を担保する維持投与レジメンについて検討した。試験では、BMN 165 を週 1 回及び週 2 回皮下投与する投与レジメンを用いて生殖発生を評価した。試験は[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）で

実施し、21 CFR Part58 に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practice に準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。

18 匹の雌性ホモ接合性（-/-）ENU2 マウス（[redacted]、[redacted]）（約 6～8 週齢、19.3～36.7 g）を 4 投与群に割り当て、80 及び 120 mg/kg を週 1 回並びに 40 及び 80 mg/kg を週 2 回 10 週間皮下投与した。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.4-4 に示す。

表 2.6.2.2.4-4　雌性 ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 10 週間皮下投与の試験デザイン

Group	Test Article [a]	Dose (mg/kg)	Dose Regimen	No. of Animals
1	BMN 165	80	Twice weekly	5
2	BMN 165	120	Weekly	4
3	BMN 165	80	Weekly	3
4	BMN 165	40	Twice weekly	6

a) Lot # AP160703; up to 10 mL/kg
No.: number.

試験の最初の部分（0165-07-029 試験）では、雌性 ENU2 マウスに 80 及び 120 mg/kg の BMN 165 を週 1 回並びに 40 及び 80 mg/kg の BMN 165 を週 2 回 10 週間反復皮下投与により薬理活性である血漿中 Phe 濃度変化及び抗 rAvPAL IgG 抗体産生への影響を比較し、雌性 ENU2 マウスの維持投与レジメンについて検討した。

投与 71 日目（投与 11 週目）から、第 3 及び 4 群の動物は生殖発生段階について継続して評価した（0165-08-005 試験）。第 1 及び 2 群の動物は投与 75 日目の試料採取後に試験を中止した。投与レジメンを変更し、第 3 及び 4 群の全ての動物に 40 mg/kg の BMN 165 を週 2 回皮下投与した。妊娠を最も担保できる血漿中 Phe 濃度の安定化及び一貫した体重増加に基づいて投与レジメンを選択した。雌は単独で飼育され、（+/-）及び（-/-）の雄性 ENU2 マウスと交配した。生殖発生パラメータは妊娠数、出生児が生存する妊娠数及び 1 腹の出生児数を評価した。

体重は少なくとも週 1 回投与前に測定した。投与開始前、投与 4、8、11、12、15、18、19、22、25、29、32、36、39、40、44、47、51、54、58、61、65、69、72、75 及び 79 日目に週 2 回（投与日は投与前に）血漿中 Phe 濃度測定用の血液を採取した。採取した試料は少容量及びマイクロタイタープレート用に改変した蛍光測定法で評価した。投与開始前、投与 18/19、47、72 及び 75 日目に抗 rAvPAL IgG 抗体測定用の血清を採取し、抗体価は ELISA 法で測定した。

投与 29 日目に 1 例の予定外の死亡（第 4 群）が皮下投与中に発生したが、BMN 165 の投与に関連した死亡ではないと判断された。残りの全ての動物は試験終了まで生存した。試験期間中体重は全般的に全ての投与群で増加した。第 1 群（80 mg/kg を週 2 回投与）の動物の体重は投与開始前から約 20%増加した後安定化した。第 2 群（120 mg/kg を週 1 回投与）の動物の体重増加はわずかで、投与開始前から投与 11 週間までの増加率は 5～15%であった。これらの動物は第 3 及び 4 群の動物よりも有意に高齢であったため、試験期間中の体重増加はそれほど顕著ではなかった。第 3 及び 4 群の動物は試験期間中に最大 40%の体重増加を示した。

血漿中 Phe 濃度は BMN 165 の投与開始時に全ての投与群で有意に低下したが、持続した低下の維持は投与量及び投与レジメンに依存した。週 1 回の投与レジメンでは大幅な経時変動を生じ、安定した血漿中 Phe 濃度をもたらさなかった。週 2 回の投与レジメンでは、第 1 及び 4 群（それぞれ 80 mg/kg 及び 40 mg/kg を週 2 回投与）のそれぞれ投与 20 及び 38 日目以降の血

漿中 Phe 濃度はおおむね 150 µmol/L 以下で維持された。第 3 及び 4 群の動物は生殖発生段階に移行すると血漿中 Phe 濃度は動物の生殖過程に依存して 100 µmol/L から 1000 µmol/L まで変動した。第 1 及び 4 群の 2 例を除くほとんど全ての動物は投与 71 日目までに高抗体価の抗 rAvPAL IgG 産生を示した。

第 3 及び 4 群の雌 8 例は試験を継続し、40 mg/kg の BMN 165 を週 2 回投与した。この 16 週間の継続試験の間に 5 例が妊娠し、母動物 2 例の出生児が離乳時生存することに成功した。この 2 例の同腹児あたりの生存動物数は少なく、それぞれ出生児数は 3 及び 5 例であった。母動物 3 例で 6 回妊娠の不成功が認められ、新生児は死亡した。生存出生児がいない又は新生児の死亡が確認された全ての母動物では体重減少に基づく流産、吸収胚、ネグレクト又は出産後の食殺による出生児の死亡があったと推測された。

以上、試験の最初の部分では、生殖及び妊娠維持に必要な健康状態の指標である血漿中 Phe 濃度の安定化及び適切な体重増加について、週 1 回及び週 2 回の異なる投与量の投与による 4 種類の異なる投与レジメンを検討した。11 週間後、40 mg/kg の BMN 165 を週 2 回皮下投与した雌性 ENU2 マウスでは妊娠を維持するために必要な最適な体重増加を示し、安定した血漿中 Phe 濃度推移を維持した血漿中 Phe 濃度の低下が達成された。しかし、交配後これらの雌性 ENU2 マウスでは、40 mg/kg を週 2 回 16 週間皮下投与により 2 例の雌性マウスで同腹児数の少ない計 2 回の出生児が生存する妊娠が認められたのみであった。3 例のマウスでは、新生児が死亡し妊娠の不成功が認められた。試験で評価した妊娠転帰は限定的だが、妊娠を維持し出産を成功させ離乳までの正常な出生児の発達を担保するためには、血漿中 Phe 濃度を狭い範囲内で維持する必要があることが示された。マウスの年齢及び妊娠中の血漿中 Phe 濃度の変動が原因である可能性が高いが、BMN 165 を投与した ENU2 マウスで母性 PKU 症候群を完全には改善することはできなかった。しかし、試験結果は未処理のホモ接合性 ENU2 マウスの繁殖で通常みられるほぼ完全な同腹子の喪失に比較して大幅な改善を示した。

2.6.2.2.4.4.2　rAvPAL-PEG の投与による雌性 ENU2 マウスの生殖発生の評価：試験 2

（CTD: 4.2.1.1-6、0165-08-027）

雌性（-/-）ENU2 マウスを用いて、生殖及び妊娠を担保する 200 µmol/L の目標血漿中 Phe 濃度を達成する投与レジメンについて検討した。試験では BMN 165 を週 3 回皮下投与する投与レジメンで生殖発生を評価した。試験は[redacted]、[redacted]、USA）で実施し、21 CFR Part58 に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practice に準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。

19 匹の雌性ホモ接合性（-/-）ENU2 マウス（[redacted]、[redacted]）（5～25 週齢）（13.1～27.3 g）を用い、第 1 群の動物には BMN 165 を週 2 回（月曜日及び木曜日）21 週間皮下投与し、第 2 群の動物には BMN 165 を 2 段階の投与レジメンで週 2 回（月曜日及び木曜日）17 週間、その後、週 3 回（月曜日、水曜日及び金曜日）33 週間皮下投与した。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.4-5 に示す。

表 2.6.2.2.4-5　雌性 ENU2 マウスを用いた BMN 165 の 21 及び 50 週間皮下投与の試験デザイン

Group	Test Article	Dosing Phase	Dose (mg/kg)	Dose Regimen	Treatment Duration	Number of Animals
1	BMN 165 [a]	1	40	Twice weekly	21 weeks	11
2	BMN 165 [a]	1	40	Twice weekly	17 weeks	8
		2	10, 10 and 20	Three times per week	33 weeks	

a) Lot # NP160706, NP160801, AP160802, 10 mL/kg

動物は瀕死状態、生死及び一般状態の変化を毎日評価した。Phe 濃度測定用の血漿試料は BMN 165 の各投与前に採取し、少容量及びマイクロタイタープレート用に改変した蛍光測定法で評価した。さらにプール血漿試料でチロシン及びトリプトファン濃度を測定した。第 2 群の雌は血漿中 Phe 濃度が 200 µmol/L を超えた時点（投与 147 日目前後）で交配を開始した。妊娠パラメータは出産日、出生児の生死数及び肉眼的身体異常を評価した。

投与 232 及び 284 日目に、BMN 165 の投与に関連しない 2 例の予定外の死亡が認められた。試験期間中体重は全般的に増加したが、妊娠に関連した体重の増減によって変動が認められた。

血漿中 Phe 濃度は投与開始時に低下し、一過性の減弱（投与 8～43 日目）後安定化した。第 2 段階の投与レジメン（週 3 回投与）が開始されると、妊娠及び摂餌量の増加による可能性が最も高いが、17 週目まで血漿中 Phe 濃度の動物間のばらつきが認められた。その後、平均して血漿中 Phe 濃度は目標濃度の 200 µmol/L で安定化した。トリプトファン濃度は BMN 165 投与及び未処理 ENU2 マウスの両方で、野生型マウスと比較して違いは認められなかった。チロシン濃度は BMN 165 投与及び未処理 ENU2 マウスの両方で、野生型マウスと比較して 40～50% 低かった。

第 2 群（8 匹）の動物の合計 6 腹で生存出生児が認められ、出生児は 34 例及び新生児死亡は 13 例であった。4 同腹児は 1 例の雌性マウス（動物番号 14）由来であった。2 例のマウス（動物番号 13 及び 16）がそれぞれ 1 同腹児をもった。生存出生児が認められた 6 腹のうち 4 同腹児は投与 36 週目以前に生じ、それぞれ 4～10 例の出生児をもった。一方、試験後半（投与 41 及び 44 週目）に、2 同腹児がそれぞれ 2 及び 3 例の出生児をもった。生存出生児は全て、第 2 段階の投与期間（週 3 回投与、それぞれ 10、10 及び 20 mg/kg）に認められた。新生児死亡は流産（体重測定に基づく）、おそらく母動物のネグレクト及び食殺による出生直後の死亡などであった（表 2.6.2.2.4-6）。

表 2.6.2.2.4-6 BMN 165 の 50 週間皮下投与による同腹児の評価

Animal Number	Number of Litters	Number of Live Pups	Neonatal Mortalities	Possible Aborted Litters
12	0	-	0	1
13	1 [a]	4	1	1
14	4 [b]	10, 10, 2, 3	1	1
15	0	-	4	2
16	1 [c]	5	5	1
17	0	-	1	0
18 *	0	-	0	0
19 *	0	-	1	0
Total	**6**	**34**	**13**	**6**

a) Day 232
b) Days 169, 218, 284 and 307
c) Day 169
* Animal Numbers 18 and 19 were found dead on Days 232 and 284.

以上、本試験の週 3 回の投与レジメンでは出生児が生存する妊娠は担保されなかった。同腹児数は母動物の年齢と共に 200 µmol/L の目標血漿中 Phe 濃度でも減少した。血漿中チロシン濃度が改善されない血漿中 Phe 濃度の改善が、この試験での同腹児数及び同腹児死亡に影響した可能性がある。チロシン濃度はマウスの食欲、母動物の習性及び授乳行動に影響を与えるドーパミン量に直接影響し(5) (6) (7)、ENU2 マウスで母性 PKU 症候群に影響する可能性もある。

2.6.2.2.4.4.3 雌性 ENU2 マウスの血漿中 Phe 濃度を安定化し成長を担保する rAvPAL-PEG の投与量範囲探索試験：試験 3

（CTD: 4.2.1.1-7、0165-09-068 and 0165-10-008）

雌性（-/-）ENU2 マウスを用いて、成長及び生殖発生機能を維持し、血漿中 Phe 濃度（300～600 µmol/L）を安定化する BMN 165 の維持投与レジメンについて検討し、この疾患モデルの母性 PKU 症候群について評価した。2 種類の投与レジメン（週 3 回及び 1 日 1 回投与）及び 4 種類の異なる投与量を用い、体重を維持し、生殖発生パラメータを評価する最長 42 週間の連続投与試験を実施した。試験は[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）で実施し、21 CFR Part58に記載されている GLP には準拠していないが、一般的に認められている Good scientific practiceに準拠した。表 2.6.3.2-1 に要約を示す。

12 匹の雌性ホモ接合性（-/-）ENU2 マウス（[redacted]、[redacted]）（4～12 週齢、13.1～21.3 g）を用いた。試験デザインを以下の表 2.6.2.2.4-7 に示す。

表 2.6.2.2.4-7 連続投与レジメンの試験デザイン

Group	Number of Animals	Treatment	Dose (mg/kg)	Duration (weeks)	Treatment Regimen
1	12	BMN 165 [a]	5, 10	3-8, 19	3x weekly (M, W, F)
			7	3	Daily
			6	12	Daily

a) Lot # NP160706; 10 mL/kg
M: Mondays; W: Wednesdays; F: Fridays.

体重は各投与前に測定した。血漿中 Phe 濃度測定用の血液試料は、投与開始前及びその後は毎週採取し、少容量及びマイクロタイタープレート用に改変したニンヒドリンを用いた蛍光測定法で評価した。5 mg/kg の BMN 165 を週 3 回 3～8 週間投与後、投与 52 日目に 12 匹全ての投与動物を同時に 10 mg/kg の BMN 165 の週 3 回投与に切り替えた。試験の最初の段階（0165-09-068 試験）で週 3 回 22～27 週間の投与により、安定した Phe 濃度が達成され、成長を維持し、生殖発生機能を最適化した。その後全ての動物は、試験の生殖発生段階（0165-10-008 試験）について継続して検討され、7 mg/kg を 1 日 1 回 3 週間投与に切り替え、さらに投与量を 6 mg/kg に漸減し、1 日 1 回 12 週間投与した。交配及び生殖発生評価は、投与 93 日目に開始し、連日投与レジメン期間の間行った。妊娠は外観検査及び体重増加に基づき確認した。出生児が生存する全ての妊娠例の同腹児数及び体重を測定した。妊娠不成功を示す同腹児パラメータとして、同腹児数、新生児の死亡率及び分娩日を評価した。

投与 253 日目に、12 匹中 8 例が BMN 165 の最終投与を受け、4 例が試験を終了し、残りの 4 例は、さらにその後約 12 週間で試験を終了した。12 匹のうちの残りの 4 例は、投与 290 日まで 1 日 1 回 BMN 165 の投与を継続し、その後約 5 週間で試験を終了した。Phe 及び抗 rAvPAL 抗体価測定用にそれぞれ血漿及び血清を採取し、脳切片も採取した。

試験中に予定外の死亡は認められなかった。全ての動物は経時的に体重が増加した。交配は 10 mg/kg を週 3 回投与する期間及び連日投与レジメン期間の間、血漿中 Phe 濃度が平均 2000 µmol/L 超のベースライン値から平均約 300～600 µmol/L に低下した時点で行った。妊娠に伴う体重及び摂餌量の増加によって、妊娠中の雌の血漿中 Phe 濃度は 24 時間にわたって変動した。母動物の年齢は、週 3 回の投与期間は 19～24 週齢、連日投与期間は 29～41 週齢であった。総妊娠数、出生児が生存する妊娠数及び出生児が生存する妊娠成功率の要約を表 2.6.2.2.4-8 に示す。

表 2.6.2.2.4-8　BMN 165 の週 3 回及び連日投与レジメンによる妊娠パラメータ評価

Dosing Regimen	Number of Total Pregnancies	Number of Successful Pregnancies	% Success Rate	Average Number of Pups/Litter
3X Weekly, 10 mg/kg	38	20	53%	5.7
Daily, 7/6 mg/kg/day	14	6	43%	4.3

以上、妊娠 ENU2 マウスでは、300～600 µmol/L の目標血漿中 Phe 濃度で生殖発生能及び出生児の生存率が向上した。マウスの年齢及び妊娠中の血漿中 Phe 濃度の変動が原因である可能性が高いが、BMN 165 を投与した ENU2 マウスで、母性 PKU 症候群を完全には改善することはできなかった。しかし、試験結果は未処理のホモ接合性 ENU2 マウスの繁殖で通常みられるほぼ完全な同腹子の喪失に比較して大幅な改善を示した。

2.6.2.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4　安全性薬理試験

安全性薬理試験は、ラット（呼吸系及び中枢神経系）及びテレメータを装着したサル（心血管系）を用いて臨床適用経路である皮下投与により評価した。BMN 165 のような大きな分子がカリウムチャネルに侵入して阻害を引き起こすことは不可能と考えられ、QT 延長の可能性を予測する標準的な *in vitro* ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（hERG）チャネルアッセイは実施しなかった。したがって、hERG アッセイで 50%阻害濃度（IC_{50}）値は測定していない。

2.6.2.4.1　ラットを用いた rAvPAL-PEG の皮下投与によるヘッドアウトプレチスモグラフィーを使用した呼吸系に対する安全性薬理試験

（CTD: 4.2.1.3-1、0165-07-005）

ヘッドアウトプレチスモグラフィーチャンバーを使用して、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。試験は米国、日本及び経済協力開発機構（OECD）の GLP 規制に準拠して[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）で実施した。表 2.6.3.4-1 に要約を示す。

雄性 Sprague Dawley（SD）ラット（Hsd:SD;[redacted]、[redacted]、[redacted]）（約 12 週齢 339～384 g）を用いた。試験デザインを以下の表 2.6.2.4.1-1 に示す。

表 2.6.2.4.1-1　ラットを用いた BMN 165 の呼吸系に対する安全性薬理を評価する試験デザイン

Group	Compound [a]	Dose [b] (mg/kg)	Total Dose for Study (mg/kg)	Dosing Frequency	No. and Gender per Group	
					Main	TK
1	Vehicle	0	0	Once	6 M	0 M
2, 5	BMN 165	10	10	Once	6 M	3 M
3, 6	BMN 165	50	50	Once	6 M	3 M
4, 7	BMN 165	125	125	Once	6 M	3 M

a) BMN 165 lot # 0703070165, vehicle lot # 070307FB
b) Groups 1-7 were dosed at a volume of 5.95 mL/kg.
M: male; No.: number; TK: toxicokinetic.

動物は生死、異常並びに疼痛及び苦痛の徴候を 1 日 2 回評価した。主試験群である第 1～4 群の動物のみ投与前段階（2 回）、投与日の投与前及び予定された試験終了日に体重を測定した。

ヘッドアウトプレチスモグラフィーを使用した呼吸機能の連続測定は、第 1～4 群の全ての投与動物について、溶媒、10、50 及び 125 mg/kg の BMN 165 の皮下投与前、投与後約 6、24、48 及び 72 時間に約 90 分間行った。呼吸機能は一回換気量、呼吸数及び分時換気量を測定して評価した。第 5～7 群（サテライト群、それぞれ 10、50 及び 125 mg/kg を皮下投与）は、トキシコキネティクス（TK）測定用で、プレチスモグラフィーを使用した測定はこれらの動物では行わなかった。TK 測定用血漿試料は、投与後 6、24、48 及び 72 時間に採取した。

全ての動物は予定された試験終了まで生存し、BMN 165 の投与に関連した一般状態の変化及び体重に対する影響は認められなかった。50 及び 125 mg/kg の BMN 165 を投与した動物は、投与後 6～72 時間の間、溶媒を投与した動物と比較して呼吸数が軽度に減少（12%以下）し、

一回換気量の変化を伴わない分時換気量の減少（11%以下）を引き起こした。125 mg/kg の BMN 165 を皮下投与した動物は、投与後 72 時間に一過性の有意な呼吸数の減少（28%）も示した。全ての TK 動物は 72 時間の試験期間中 BMN 165 の血漿中濃度の上昇を示し、BMN 165 に適切に曝露されたことを示した。

以上、最大 125 mg/kg の BMN 165 を単回皮下投与した雄性ラットに、一回換気量、呼吸数及び分時換気量の測定による評価に基づく呼吸機能の変化は認められなかった。

2.6.2.4.2　ラットを用いた rAvPAL-PEG の安全性薬理神経学的評価試験

（CTD: 4.2.1.3-2、0165-07-004）

ラットを用いて BMN 165 の単回皮下投与による神経学的影響を評価した。動物は神経学的作用の可逆性、持続性及び発生の遅延を評価するために、投与後 5 日間評価した。試験は米国、日本及び OECD の GLP 規制に準拠して[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）で実施した。表 2.6.3.4-1 に要約を示す。

雌雄 SD ラット（[redacted]、[redacted]、[redacted]）（約 6～7 週齢、雄では 197～219 g 及び雌では 139～161 g）を用いた。動物を 4 群に割り当て、BMN 165 を単回皮下投与した。試験デザインを以下の表 2.6.2.4.2-1 に示す。

表 2.6.2.4.2-1　ラットを用いた BMN 165 の皮下投与による神経学的評価の試験デザイン

Group	Compound [a]	Dose [b] (mg/kg)	Total Dose for Study (mg/kg)	Dosing Frequency	No. and Gender per Group
1	Vehicle	0	0	Once	5F, 5M
2	BMN 165	10	10	Once	5F, 5M
3	BMN 165	50	50	Once	5F, 5M
4	BMN 165	125	125	Once	5F, 5M

a) Pegvaliase lot # 0703070165, vehicle lot # 070307FB
b) Groups 1-4 were dosed at a volume of 5.95 mL/kg.
F: female; M: male; No.: number.

投与前、投与後約 6、24、48 及び 72 時間に各動物の Irwin 変法による神経学的評価を実施した。ホームケージ評価（呼吸数及び活動性）、ハンドリング観察（皮膚色、皮膚の血流、体調、被毛状態、立毛、過剰流涙、過剰流涎、ハンドリングに対する反応性及び啼鳴）、オープンフィールド観察（糞便量、尿量、自発運動、姿勢、歩行異常、その他の異常な行動、糞便の状態及び挙尾）及び行動観察（アプローチ検査、触診、聴覚性驚愕反応、視覚感覚、耳介応答、角膜応答、瞳孔の状態、瞳孔応答、カタレプシー、正向反射、瀕死状態、死亡、握力、侵害受容性、体温など）を行った。

全ての動物は予定された試験終了まで生存し、BMN 165 の投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。対照動物と比較して、125 mg/kg を投与した動物で投与から試験終了（投与 6 日目）までの間の体重増加に有意な抑制が認められた。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異常又は投与群間に統計学的有意差は認められなかった。

以上、BMN 165 を最大 125 mg/kg まで単回皮下投与したラットに、溶媒を投与した動物と比較して中枢神経系への影響に変化は認められなかった。第 4 群（125 mg/kg）の動物に体重増加の抑制が認められたが、有害とは判断されなかった。この試験での BMN 165 の無影響量は 125 mg/kg と判断された。

2.6.2.4.3　テレメータを装着した覚醒下の雄性サルを用いた rAvPAL-PEG の並行法での皮下投与による心血管系に対する安全性薬理試験

（CTD: 4.2.1.3-3、0165-07-006）

テレメータを装着した覚醒下のカニクイザルを用いて、BMN 165 の皮下投与による心血管系に対する影響を評価した。試験は米国、日本及び OECD の GLP 規制に準拠して[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）で実施した。表 2.6.3.4-1 に要約を示す。

16 匹の雄性カニクイザル（Covance stock colony of surgically instrumented animals）（2.6～4.8 歳、3.4～5.2 kg）を 4 群に割り当てた。各群に、溶媒対照、1、3 及び 10 mg/kg の BMN 165 を 0.5 mL/kg の投与容量で単回投与した。試験デザインを以下の表 2.6.2.4.3-1 に示す。

表 2.6.2.4.3-1　テレメータを装着したサルを用いた BMN 165 の投与による心血管系に対する影響を評価する試験デザイン

Group	Compound	No. of Animals	Dosage (mg/kg)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)
1	Vehicle control [a]	4 Males	0	0	0.5
2	BMN 165 [b]	4 Males	1	2	0.5
3	BMN 165 [b]	4 Males	3	6	0.5
4	BMN 165 [b]	4 Males	10	20	0.5

a) Vehicle control animals received Tris NaCl (0.5 mL/kg) on Day 1 of the dosing phase. Vehicle lot # 070307FB
b) Lot # 0703070165
No.: number.

一般毒性評価は生死及び一般状態の変化の評価並びに体重及び腹部温度の測定に基づいて行った。心血管系に対する影響の評価は心電図解析、血行動態の変化（収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、変力状態（dP/dt_{max}）及び心拍数の測定に基づいて行った。測定は投与前、投与後 3、6、9 及び 12 時間、その後は約 12 時間ごとに投与 15 日目まで行った。

死亡例、有害な一般状態の変化及び有意な体重変化は認められなかった。腹部温度の測定値、血行動態の変化（収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、変力状態（dP/dt_{max}）及び心拍数に BMN 165 の投与に関連した変化及び生理学的に重要な変化は認められなかった。1、3 及び 10 mg/kg の BMN 165 を投与した動物の PR 間隔は溶媒対照を投与した動物と比較して有意に短かった。しかし、これらの動物の PR 間隔はベースライン値より短縮が認められなかったため、生理学的に重要な変化とは判断されなかった。BMN 165 の投与に直接的に関連した心拍動、QT 間隔及び心拍数で補正した QT 間隔（QTc）に対する影響は、15 日間の吸収～消失相（T_{max} の範囲は 52～106 時間）で BMN 165 のいずれの投与量でも認められなかった。

1、3 及び 10 mg/kg の BMN 165 を投与した動物の投与 24 時間後の曝露量は、それぞれ 7949±1490、11320±3117 及び 24200±9400 µg/mL（血漿中濃度）であった。最高投与量群の 1 例を除いた全ての動物の血漿中 Phe 濃度は、BMN 165 の 3 投与量全てで、投与後 24 時間でほぼ

検出限界未満の濃度まで低下した。溶媒対照を投与した動物では、投与 24 時間後の Phe 濃度にほとんど変化は認められなかった。

1、3 及び 10 mg/kg 投与群のそれぞれ 4 匹中 2 例、3 例及び 4 例の動物に、投与 15 日目に低抗体価の抗 rAvPAL IgG 産生が認められた。1 及び 10 mg/kg 投与群のそれぞれ 1 例及び 3 例の動物は、投与 15 日目に抗 rAvPAL IgM 抗体が陽性であった。

以上、1、3 及び 10 mg/kg の BMN 165 を投与した雄性サルに、心血管系（心電図及び血行動態）パラメータ、体温、死亡率及び体重に対して BMN 165 の投与に関連した変化は認められなかった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6　考察及び結論

BMN 165 の薬理活性を ENU2 マウスモデルで評価し、80 mg/kg（約 4 IU/マウス）の BMN 165 の週 1 回 3 ヵ月以上の皮下投与により、血中 Phe 濃度は約 2000 µmol/L から 200 µmol/L 未満に低下することを示した。雄性（-/-）ENU2 マウスにおいて、血漿中 Phe 濃度は、通常投与 3～7 週間目に一過性に減弱を示し、その後 200 µmol/L 未満の濃度で完全に 1 週間安定化した。比較的低い抗体価の抗 BMN 165 抗体の増加が反復投与試験期間中認められた。PEG 化した rAvPAL 酵素は抗 rAvPAL IgG 抗体産生を示したが、rAvPAL 酵素の PEG 化は *in vivo* での血漿中 Phe 濃度の低下を維持するために必要であった。類似したパターンの血漿中 Phe 濃度の低下活性が Wt AvPAL-PEG を投与した雄性（-/-）ENU2 マウスでも示された。PEG 化は抗 AvPAL IgG 抗体価を低下させたが、抗体産生は排除されなかった。

BMN 165 を週 3 回投与した雌性（-/-）ENU2 マウスの脳病変を評価する 12 週間の試験では、溶媒を投与した（-/-）ENU2 マウスの脳と比較して複数の脳領域で TH 陽性神経細胞数の有意な増加が認められ、BMN 165 の投与により雌性（-/-）ENU2 マウスの TH 量の不足が改善されることが裏付けられた。投与量範囲探索薬理試験 3 試験で、雌性（-/-）ENU2 マウスを用いて母性 PKU 症候群に対する BMN 165 の投与の効果を評価した。1 日 1 回及び週 3 回の投与レジメンにより 300～600 µmol/L の目標血漿中 Phe 濃度を達成し、生殖発生能及び出生児の生存率の向上が認められた。マウスの年齢及び妊娠中の血漿中 Phe 濃度の変動が原因である可能性が高いが、BMN 165 を投与した ENU2 マウスで母性 PKU 症候群を完全には改善することはできなかった。しかし、試験結果は未処理の（-/-）ENU2 マウスの繁殖で通常みられるほぼ完全な同腹子の喪失に比較して大幅な改善を示した。まとめると、BMN 165 の投与量及び投与レジメンを注意深く調整することによって、ENU2 マウスで母性 PKU 症候群の経過を劇的に改善し、出生児の発達はほぼ正常となり、生存率を 0%から 40～50%以上に改善することができた(8)。

安全性薬理コアバッテリー試験はラット（呼吸系及び中枢神経系）及びテレメータを装着したサル（心血管系）を用いて臨床適用経路である皮下投与により評価した。BMN 165 を皮下投与したラットで実施した安全性薬理試験で、中枢神経系及び呼吸機能パラメータに変化は認められなかった。同様に、BMN 165 を皮下投与したテレメータを装着したカニクイザルで実施し

た安全性薬理試験で、心電図波形、心拍動、QT 間隔、QTc などの心血管系パラメータに変化は認められなかった。

以上、BMN 165 の薬効薬理特性を PKU の動物モデルである（-/-）ENU2 マウスを用いて評価し、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中 Phe 濃度の低下が示され、血中 Phe 濃度は連日投与により最もよく制御された。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、PKU 脳病変の改善が認められた。異種生物由来である BMN 165 に対する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 Phe 濃度低下の最大効果まで回復した。要約すると、BMN 165 は、PKU の動物モデルである（-/-）ENU2 マウスの血中 Phe 濃度を低下させ、PKU 脳病変を軽減し、生殖発生パラメータを改善する劇的な薬理活性応答を示した。

2.6.2.7　参考文献

(1) Shedlovsky A, McDonald JD, Symula D, Dove WF. Mouse models of human phenylketonuria. Genetics 134, 1205-1210. 1993.

(2) Mouse Genome Informatics [homepage on the Internet]. The Jackson Laboratory. Available from: http://www.informatics.jax.org/.

(3) McDonald JD, Charlton CK. Characterization of mutations at the mouse phenylalanine hydroxylase locus. Genomics 39, 402-405. 1997.

(4) 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.

(5) Zhou QY, Palmiteyr RD. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. Cell 83, 1197-1209. 1995.

(6) Yang S, Lee YJ, Kim JM, Park S, Peris J, Laipis P, et al. A murine model for human sepiapterin-reductase deficiency. Am J Hum Genet 78, 575-587. 2006.

(7) Miller SM, Lonstein JS. Dopaminergic projections to the medial preoptic area of postpartum rats. Neuroscience 159, 1384-1396. 2009.

(8) 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.

目次

2.6.3　薬理試験概要表.....2
2.6.3.1　薬理試験：一覧表.....2
2.6.3.2　効力を裏付ける試験.....4
2.6.3.3　副次的薬理試験.....7
2.6.3.4　安全性薬理試験.....8
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験.....10

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: BMN 165

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number(s)	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Repeat Dose – Efficacy	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], Canada	0164-06-019	4.2.1.1-1
Repeat Dose – Efficacy	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], Canada	0165-06-057	4.2.1.1-2
Repeat Dose – Dose Range Reduction Efficacy	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], Canada	0165-07-001	4.2.1.1-3
Repeat Dose – Efficacy	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN165-14-044	4.2.1.1-4
Repeat Dose – Dose Ranging Efficacy & Reproduction	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-029 and 0165-08-005	4.2.1.1-5
Repeat Dose – Reproduction	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-08-027	4.2.1.1-6
Repeat Dose – Reproduction	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-09-068 and 0165-10-008	4.2.1.1-7
Safety Pharmacology					
Single-Dose Safety Pharmacology - Respiratory	Rat (Hsd:Sprague Dawley)	SC	[redacted]., [redacted], [redacted], USA	0165-07-005 [a]	4.2.1.3-1

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number(s)	Location in CTD
Single-Dose Safety Pharmacology – Central Nervous System	Rat (Hsd:Sprague Dawley)	SC	[redacted]., [redacted], [redacted], USA	0165-07-004 [a]	4.2.1.3-2
Single-Dose Safety Pharmacology – Cardiovascular	Monkey (Cynomolgus)	SC	[redacted]., [redacted], [redacted], USA	0165-07-006 [a]	4.2.1.3-3

a) The study was conducted in compliance with the United States Food and Drug Administration (FDA) Good Laboratory Practice (GLP) Regulations, 21 CFR Part 58; the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) GLP Standards Ordinance No. 21; the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Principles of GLP, ENV/MC/CHEM(98)17; and any applicable amendments.

BTBR*Pah*^{enu2}: an animal model of phenylketonuria, mouse developed by ethylnitrosourea mutagenesis that is deficient in phenylalanine hydroxylase activity; CTD: Common Technical Document; *Pah*: mouse phenylalanine hydroxylase gene; SC: Subcutaneous.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

Test Article: BMN 165

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験

Study Description	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Plasma Phe Levels Following Administration of wt AvPAL and PEGylated wt AvPAL	Mouse; ENU2	SC	8 days (Days 1, 4, 8)	0, 0.2, 1 IU/mouse	Administration of SC wt AvPAL PEG reduced plasma Phe concentrations in ENU2 mice after the first and second injections on Study Days 1 and 4. Attenuation of the PD effect of wt AvPAL PEG on Phe concentration reduction was observed after the third injection.	0164-06-019
Plasma Phe Levels Following Administration of PEGylated AvPAL variant	Mouse; ENU2	SC	8 weeks (once weekly)	0, 0.25, 1, 4 IU/mouse	Eight weekly SC administrations of BMN 165 dose dependently reduced plasma Phe in ENU2 mice. An attenuated response in the ability to reduce plasma Phe concentrations was noted between Weeks 3 through 7. The ability to reduce Phe concentrations appears to be approximately equivalent between BMN 165 and the wt AvPAL PEG.	0165-06-057
Dose Range Reduction of rAvPAL-PEG	Mouse; ENU2	SC	16 weeks (once weekly)	0, 20, 40, 80 mg/kg	Treatment with BMN 165, SC in ENU2 mice over 16 weeks, resulted in reduced and stable plasma Phe concentrations in male but not female mice. The dose regimen of weekly SC administrations of 80 mg/kg BMN 165 for 10 weeks and then 40 mg/kg for 6 weeks was the most effective regimen in achieving stable plasma Phe concentrations over the entire week in male ENU2 mice. Formation of anti-rAvPAL IgG titers was seen after all dose regimens without the appearance of anaphylactoid responses or injection site reactions.	0165-07-001

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続き）

Study Description	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Changes in Neuropathology Following Administration of BMN 165 to Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice	Mouse; ENU2	SC	4, 8 or 12 weeks (three times per week)	0, 10/10/20 mg/kg	BMN 165 reversed the deficit in TH levels in female (-/-) ENU2 mice after 13 weeks of treatment by significantly increasing the number of immunohistochemically detectable TH expressing neurons in multiple brain regions compared to untreated ENU2 mice.	BMN165-14-044
rAvPAL-PEG Dose Ranging Studying Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice	Mouse; ENU2	SC	27 weeks (once or twice weekly)	40, 80, 120 mg/kg	While a total rescue of the maternal PKU syndrome was not possible in ENU2 mice given BMN 165, likely due to mouse age and varying plasma Phe levels during pregnancy, the results represent a significant improvement over the near complete litter loss normally associated with breeding of untreated homozygote ENU2 mice.	0165-07-029 and 0165-08-005
Assessment of Reproduction in Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice Administered rAvPAL-PEG	Mouse; ENU2	SC	50 weeks (two or three times weekly)	Twice weekly: 40 mg/kg Three times weekly: 10/10/20 mg/kg	A successful pregnancy rate was not supported by the three times per week dose regimen. Litter size decreased with animal age and/or at the target 200 µmol/L plasma Phe concentrations.	0165-08-027

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続き）

Study Description	Species	Route of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Assessment of rAvPAL-PEG Dose Range Administration for Stabilization of Plasma Phe in Growing Female BTBR*Pah*^{enu2} Mice	Mouse; ENU2	SC	42 weeks (three times weekly or daily)	Three times weekly: 5, 10 mg/kg Daily: 7, 6 mg/kg	Having target plasma Phe concentrations of 300 to 600 µmol/L in pregnant ENU2 mice resulted in increased reproductive capacity and pup survival. While a total rescue of the maternal PKU syndrome was not possible in ENU2 mice given BMN 165, likely due to mouse age and varying plasma Phe levels during pregnancy, the results represent a significant improvement over the near complete litter loss normally associated with breeding of untreated homozygote ENU2 mice.	0165-09-068 and 0165-10-008

AvPAL: phenylalanine ammonia lyase which is derived from *Anabaena variabilis*, expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*); BMN 165: rAvPAL-PEG; ENU2: an animal model of phenylketonuria, BTBR*Pah*^{enu2} mouse developed by ethylnitrosourea mutagenesis that is deficient in phenylalanine hydroxylase activity; *Pah*: mouse phenylalanine hydroxylase gene; IU: international units; PD: pharmacodynamics; PEG: polyethylene glycol; Phe: phenylalanine; PKU: phenylketonuria; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase, introduced two point mutations (Cys503Ser and Cys565Ser) into AvPAL enzyme sequence; SC: subcutaneous; TH: tyrosine hydroxylase; wt: wild type.

2.6.3.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: BMN 165

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance [a]	Study Number
Respiratory	Rat / Hsd:Sprague Dawley	SC bolus injection	0 10 50 125	Male n=6/group (Satellite toxicokinetics n=3/group)	• No adverse changes in respiratory function were observed in animals treated with BMN 165 over an observation period of 72 hours. • Peak plasma concentrations of BMN 165: 10 mg/kg - 12.34 ± 1.30 µg/mL at 48 hours postdose; 50 mg/kg - 68.83 ± 16.92 µg/mL at 72 hours postdose; 125 mg/kg - 183.61 ± 35.23 µg/mL at 72 hours post-dose.	GLP	0165-07-005
Central Nervous System	Rat / Hsd:Sprague Dawley	SC bolus injection	0 10 50 125	Male and Female n=5/gender/group	• No central nervous system effects were observed in animals treated with BMN 165. • A non-adverse reduction in weight gain was observed in the 125 mg/kg group 5 days after dosing.	GLP	0165-07-004

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験（続き）

<table>
<tr><th>Organ Systems Evaluated</th><th>Species/ Strain</th><th>Method of Administration</th><th>Doses (mg/kg)</th><th>Gender and No. per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>GLP Compliance [a]</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>Cardiovascular</td><td>Monkey / Cynomolgus</td><td>SC bolus injection</td><td>0
1
3
10</td><td>Male
n=4/group</td><td>• No test-article related effects on cardiovascular (electrocardiographic or hemodynamic) parameters, body temperature, mortality, or body weight were observed in animals given up to 10 mg/kg BMN 165 and followed up to 14 days post-dose.
• Plasma phenylalanine was reduced to nearly undetectable levels following all dosages of BMN 165 within 24 hours post-dose. A single animal given 10 mg/kg had measurable phenylalanine at 24 hours post-dose.
• Plasma IgM responses
<table>
<tr><th colspan="3">Incidence of IgM Reponses (positive animals/treated animals)</th></tr>
<tr><td></td><td>Pre-dose</td><td>Day 15</td></tr>
<tr><td>Control</td><td>0/4</td><td>0/4</td></tr>
<tr><td>1 mg/kg</td><td>0/4</td><td>1/4</td></tr>
<tr><td>3 mg/kg</td><td>1/4</td><td>0/4</td></tr>
<tr><td>10 mg/kg</td><td>0/4</td><td>3/4</td></tr>
</table></td><td>GLP</td><td>0165-07-006</td></tr>
</table>

a) The study was conducted in compliance with the United States Food and Drug Administration (FDA) Good Laboratory Practice (GLP) Regulations, 21 CFR Part 58; the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) GLP Standards, Ordinance 21; the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Principles of GLP, ENV/MC/CHEM(98)17; and any applicable amendments.

SC: subcutaneous.

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。