目次

2.6.4　薬物動態試験の概要文 7
2.6.4.1　まとめ 7
2.6.4.2　分析法 10
2.6.4.2.1　製剤濃度分析 13
2.6.4.2.2　第一世代の rAvPAL-PEG PK アッセイ 13
2.6.4.2.3　バリデーションした rAvPAL-PEG PK アッセイ 14
2.6.4.2.4　マウス血漿中 Phe 濃度蛍光光度法 17
2.6.4.2.5　マウス血漿中 Phe、チロシン、トリプトファン及び *t*-CA 濃度の HPLC による定量法 17
2.6.4.2.6　ラット、ウサギ及びサル血漿中 Phe 濃度の LC/MS/MS による定量法 17
2.6.4.2.7　マウス抗 PAL IgG の ELISA による定量法 18
2.6.4.2.8　マウス抗 PEG IgG 及び抗 PEG IgM の ELISA による定量法 18
2.6.4.2.9　抗 PAL IgG 及び抗 PAL IgM の ELISA 定量法のバリデーション 18
2.6.4.2.10　サル rAvPAL-PEG 活性中和抗体の定量法 19
2.6.4.2.11　マウス脳における免疫組織化学染色法 22
2.6.4.2.12　ラット組織における rAvPAL-PEG 及び PEG 検出のための免疫組織化学染色法 22
2.6.4.3　吸収 23
2.6.4.3.1　ENU2 マウスにおける単回投与による PK／PD 試験 23
2.6.4.3.2　ラットにおける単回投与による毒性及び TK 試験 25
2.6.4.3.3　サルにおける単回投与による毒性及び TK 試験 28
2.6.4.3.4　ENU2 マウスにおける反復 SC 投与による PK／PD 試験 30
2.6.4.3.5　ラットにおける 4 週間反復 SC 投与による毒性及び TK 試験 32
2.6.4.3.6　ラットにおける 26 週間 SC 投与による毒性及び TK 試験 37
2.6.4.3.7　サルにおける 4 週間反復 SC 投与による毒性及び TK 試験 39
2.6.4.3.8　サルにおける 39 週間反復 SC 投与による毒性及び TK 試験 42
2.6.4.3.9　生殖発生 TK 試験 46
2.6.4.3.9.1　ラットにおける反復投与による毒性及び TK 試験（受胎能及び胚・胎児発生に関する試験） 46
2.6.4.3.9.2　ラットにおける反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（出生前及び出生後の発生に関する試験） 48
2.6.4.3.9.3　ウサギにおける反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（胚・胎児発生に関する DRF 試験） 51
2.6.4.3.9.4　ウサギにおける反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（胚・胎児発生に関する試験、最終試験） 57
2.6.4.4　分布 60
2.6.4.5　代謝（動物種間の比較） 60
2.6.4.6　排泄 60

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用.....60
2.6.4.8 その他の薬物動態試験.....60
2.6.4.9 考察及び結論.....60
2.6.4.10 図表.....65
2.6.4.11 参考文献.....65

表目次

表 2.6.4.1-1 薬物動態試験一覧.....8
表 2.6.4.2-1 BMN 165 の非臨床試験用の生体試料中薬物濃度分析法一覧.....12
表 2.6.4.2-2 BMN 165 のバリデーションした PK アッセイ一覧.....15
表 2.6.4.2-3 BMN 165 の非臨床試験用にバリデーションした抗薬物抗体測定法一覧.....20
表 2.6.4.3-1 ラットに単回投与したときの PK パラメータ.....27
表 2.6.4.3-2 サルに単回投与したときの PK パラメータ.....30
表 2.6.4.3-3 ラットに BMN 165 を 28 日間投与したときの PK パラメータ.....36
表 2.6.4.3-4 雄ラットに BMN 165 を 28 日間投与したときの PK パラメータ.....36
表 2.6.4.3-5 雌ラットに BMN 165 を 28 日間投与したときの PK パラメータ.....37
表 2.6.4.3-6 ラットにおける 26 週間 SC 投与による毒性／TK 試験及び 12 週間回復性試験.....38
表 2.6.4.3-7 ラット血漿中における BMN 165 の蓄積率の平均値.....39
表 2.6.4.3-8 サルにおける PK パラメータ.....41
表 2.6.4.3-9 雄サルにおける PK パラメータ.....42
表 2.6.4.3-10 雌サルにおける PK パラメータ.....42
表 2.6.4.3-11 試験番号 0165-07-030 の試験において各群及び雌雄に用いた用量.....43
表 2.6.4.3-12 試験番号 0165-07-030 の試験における PK パラメータのまとめ.....44
表 2.6.4.3-13 BMN 165 を 1 日 1 回 SC 投与したときの雌雄ラット及び胎児における血漿中濃度の平均値（標準偏差）.....47
表 2.6.4.3-14 F_0 世代の雌 Sprague Dawley ラットに BMN 165 を 1 日 1 回 SC 投与したときの血漿中濃度の平均値（標準偏差）.....50
表 2.6.4.3-15 試験番号 BMN165-11-027 の試験におけるデザイン及び TK 試料採取のまとめ.....52
表 2.6.4.3-16 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの PK パラメータの平均値（標準偏差）.....55
表 2.6.4.3-17 試験番号 BMN165-12-036 の試験におけるデザイン及び TK 試料採取のまとめ.....58
表 2.6.4.3-18 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を妊娠期間中（妊娠 7～12 日、妊娠 11～16 日及び妊娠 15～20 日）に 1 日 1 回 SC 投与したときの血漿中濃度（ng/mL）の平均値（標準偏差）.....59

表 2.6.4.9-1 曝露量及び用量に基づく安全係数 62

図目次

図 2.6.4.1-1 BMN 165 の消失半減期の動物種間の予測 9
図 2.6.4.3-1 雄ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165 を 20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（±標準偏差）推移....23
図 2.6.4.3-2 ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165（第 II 相試験用のプロセス A 製剤）を 20 mg/kg の用量で SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（+標準偏差）推移....24
図 2.6.4.3-3 雌雄ラットにおける BMN 165 の血漿中濃度推移 26
図 2.6.4.3-4 ラットにおける AUC_{0-t} 及び C_{max} の用量比例性....28
図 2.6.4.3-5 サルに単回漸増投与したときの血漿中濃度推移....29
図 2.6.4.3-6 サルにおける AUC_{0-t} 及び C_{max} の用量比例性....29
図 2.6.4.3-7 雄ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165 を 1 日 1 回 36 日間 SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（+標準偏差）の推移....31
図 2.6.4.3-8 雌雄ラットに BMN 165 を週 2 回 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移（雌雄合算）....33
図 2.6.4.3-9 雄ラットに BMN 165 を週 2 回 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移....34
図 2.6.4.3-10 雌ラットに BMN 165 を週 2 回 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移....35
図 2.6.4.3-11 サルに BMN 165 を 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移....40
図 2.6.4.3-12 雄サルに BMN 165 を 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移....40
図 2.6.4.3-13 雌サルに BMN 165 を 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移....41
図 2.6.4.3-14 F_0 世代の雌 Sprague Dawley ラットに BMN 165 を 1 日 1 回 SC 投与したときの血漿中濃度の平均値（±標準偏差）推移....49
図 2.6.4.3-15 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を 2 mg/kg の用量で妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの投与前のトラフにおける血漿中濃度推移 53
図 2.6.4.3-16 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を 20 mg/kg の用量で妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの投与前のトラフにおける血漿中濃度推移 53
図 2.6.4.3-17 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を 5 mg/kg の用量で妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの投与前のトラフにおける血漿中濃度推移 54

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）
ADA	anti-drug antibodies	抗薬物抗体
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24hr}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hr	0 時間から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	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
$AUC_{0\text{-}t}$	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
BCA	bicinchoninic acid	ビシンコニン酸
BLQ	below the limit of quantitation	定量下限未満
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CTD	Common Technical Document	コモン・テクニカル・ドキュメント
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride	3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩
DRF	dose range finding	用量設定
ECLA	electrochemiluminesence assay	電気化学発光測定
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
ENU2	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
F	bioavailability	バイオアベイラビリティ
FA	formic acid	ギ酸
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	ホルマリン固定パラフィン包埋
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
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー

略語・略号一覧（続き）

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）
HRP	horseradish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
IV	intravenous	静脈内
LC/MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフタンデム質量分析
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
MRD	minimum required dilution	最小希釈倍数
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
PD	pharmacodynamics	薬力学
Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
PK	pharmacokinetics	薬物動態
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
rAvPAL-PEG	PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase	PEG 化遺伝子組換え *Anabaena variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ
SA	streptavidin	ストレプトアビジン
SC	subcutaneous	皮下
$t_{1/2}$	half-life	半減期
t-CA	*trans*-cinnamic acid	*trans*-ケイ皮酸
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン
TK	toxicokinetics	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
TU	titer unit	抗体価

略語・略号一覧（続き）

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）
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態での分布容積
V_z	volume of distribution at terminal phase	終末相での分布容積

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

ラット及びサルを用いた医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用毒性試験（4 試験）において、BMN 165［JAN：ペグバリアーゼ（遺伝子組換え）］を単回及び反復投与したときの非臨床薬物動態（PK）及びトキシコキネティクス（TK）を検討した。BMN 165 の予定臨床投与経路は皮下（SC）投与であることから、4 試験において BMN 165 を SC 投与したときの TK を解析した。バイオアベイラビリティを検討するため、ラットへの静脈内（IV）及び SC 投与の両方による単回投与試験（1 試験）を実施した。用量漸増の単回投与試験（2 試験）及び週 2 回 28 日間反復投与試験（2 試験）を実施した。また、BTBR*Pah*^{enu2}（ENU2）マウスを用いた 4 試験（単回 SC 投与による 3 試験及び 1 日 1 回 36 日間反復 SC 投与による 1 試験）を実施した。また、BMN 165 の 1 日 1 回 SC 投与による 4 つの GLP 適用生殖発生毒性試験［ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験の 1 試験、ラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験の 1 試験並びにウサギにおける胚・胎児発生に関する試験の 2 試験（用量設定試験 1 試験及び最終試験の 1 試験）］。PK パラメータはウサギにおける用量設定（DRF）試験で評価し、他の 3 試験では実測値に基づき最高血漿中濃度（C_{max}）及び最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）のみを算出した。PK／TK 解析は WinNonlin Professional Edition（version 5.2）によりノンコンパートメントモデルを用いて行った。

薬物動態試験の一覧を表 2.6.4.1-1 に示す。

表 2.6.4.1-1　薬物動態試験一覧

Type of Study	Test System	Method of Administration	Study Number	Location in CTD
Absorption: Single–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Male)	SC	0165-07-028	4.2.2.2-1
Absorption: Single–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Male)	SC	0165-09-069 and 0165-09-070	4.2.2.2-2
Absorption: Single–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Female)	SC	0165-09-069 and 0165-09-070	4.2.2.2-2
Absorption: Single–Dose	Rat	IV and SC	0165-07-003[a]	4.2.3.1-1
Absorption: Single–Dose	Monkey	SC	0165-07-007[a]	4.2.3.1-2
Absorption: Repeat–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Male)	SC	0165-08-006	4.2.2.2-3
Absorption: Repeat–Dose	Rat	SC	0165-07-009[a]	4.2.3.2-1
Absorption: Repeat–Dose	Rat	SC	0165-08-019[a]	4.2.3.2-2
Absorption: Repeat–Dose	Monkey	SC	0165-07-008[a]	4.2.3.2-3
Absorption: Repeat–Dose	Monkey	SC	0165-07-030[a]	4.2.3.2-4
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rat	SC	BMN165-12-037[a]	4.2.3.5.1-1
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rat	SC	BMN165-14-013[a]	4.2.3.5.3-1
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rabbit	SC	BMN165-11-027[a]	4.2.3.5.2-1
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rabbit	SC	BMN165-12-036[a]	4.2.3.5.2-2

IV: Intravenous; SC: Subcutaneous.

a) The study was conducted in compliance with 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; Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Principles of GLP, ENV/MC/CHEM(98)17; and any applicable amendments.

BMN 165 を SC 投与したときの血漿中濃度推移及び PK パラメータは ENU2 マウス、ラット及びサルで類似していた。

（a）血漿中濃度推移の片対数プロットから終末相は 1 相性に消失することが示された。

（b）SC 投与したとき、C_{max} に達するまでの時間（T_{max}）は長く（0.5～5 日）、半減期（$t_{1/2}$）も長かった（$t_{1/2}$ は 1.4～4 日）。

（c）ラットに単回 SC 又は IV 投与及びサルに単回 SC 投与したとき、PK に性差は認められなかったが、濃度－時間曲線下面積（AUC）及び C_{max} は雄 ENU2 マウスと比較して雌ではそれぞれ約 3.1 及び 3.5 倍高かった。

（d）ラット及びサルにおいて、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た。

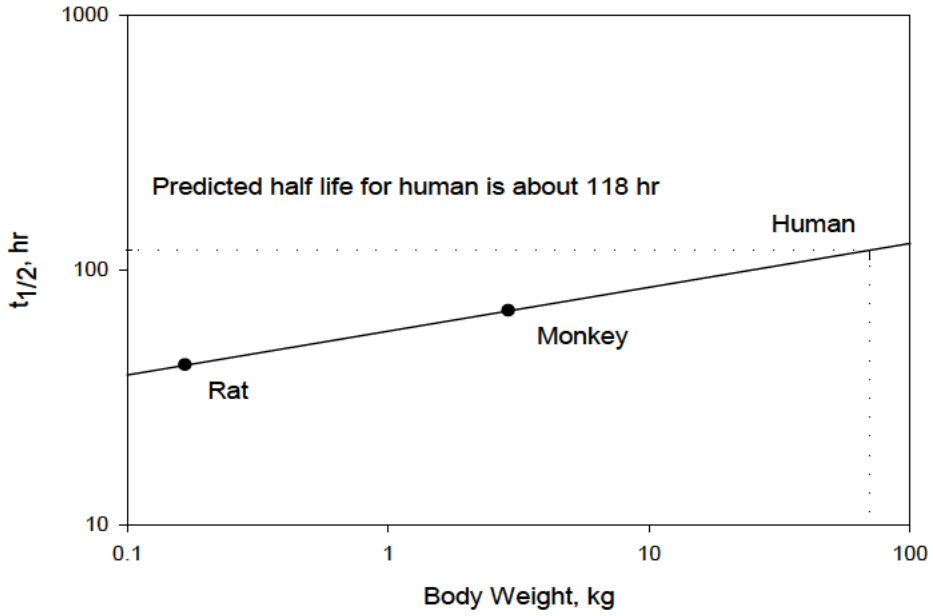
（e）サルに反復投与したとき、2 週目において蓄積が認められたが、ラットでは認められなかった。両動物種において、BMN 165 の曝露量は初回投与後に 28 日間の反復投与期間中、時々低値を示した。

（f）ENU2 マウスにおいて、BMN 165 を 2 mg/kg の用量で 14 日目まで投与し、続いて 4 mg/kg で 36 日目まで投与し、用量で補正したとき、BMN 165 の蓄積が認められた。

ラットにおいて、BMN 165 を単回 IV 又は SC 投与したとき、血漿中曝露量はいずれもおおむね用量増加に伴って増加した。IV 及び SC 投与したとき、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（AUC_{0-t}）及び C_{max} の平均値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。サルでは高用量である 60 mg/kg 群の試料が十分に採取できなかったため、AUC_{0-t} 及び C_{max} は用量線形性が明確には示されなかった。4 及び 12 mg/kg の用量で SC 投与したとき、0 を切片とした AUC_{0-t} 及び C_{max} のプロットはおおむね用量線形性を示した。60 mg/kg の用量で投与したときの利用可能なデータから、0 時間から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-24hr}）及び C_{max} の平均値は用量比を下回って増加した。

ラット及びサルに単回 SC 投与したとき、T_{max} はそれぞれ 12～120 及び 48～108 時間であり、このことは組織から血液循環への移行速度が遅いことを示唆している。また、ラット及びサルの終末相の見かけの $t_{1/2}$ はそれぞれ 33～53 及び 51～92 時間であり、消失速度は遅いことが示されている。ラットに SC 投与したとき、終末相の $t_{1/2}$ は長いことが示され、この結果は IV 投与したときの $t_{1/2}$ が 25～46 時間で長いことからも裏付けられている。ラット及びサルの平均体重及び SC 投与後の $t_{1/2}$ の log-log プロットによる動物種間の予測（アロメトリック解析）により(1)、ヒト（体重を 70 kg と仮定）での $t_{1/2}$ は 118 時間と長いことが示された（図 2.6.4.1-1）。サル及びラットに単回投与したときの用量及び濃度データのモデリングには一次吸収及びラグタイム付き 1 コンパートメントモデルを用いた。

図 2.6.4.1-1　BMN 165 の消失半減期の動物種間の予測



雌雄ラットの血漿中濃度推移を比較することで、BMN 165 を SC 投与したときに性差は認められないことが定性的に示されている。このことは 3 用量で SC 及び IV 投与したときの AUC_{0-t}、C_{max}、T_{max} 及び $t_{1/2}$ の PK パラメータを比較することにより、さらに裏付けられている。同様の結果が雌雄サルの血漿中濃度推移及び PK データを比較したときにも得られた。

雌雄ラットに 250 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの AUC_{0-t} 及び C_{max} の最大値（雌雄合算）は 34,751,389 ng·hr/mL 及び 206,380 ng/mL であった。サルについても同様に、12 mg/kg で投与したときの AUC_{0-t} 及び C_{max} の最大値はそれぞれ 20,882,173±7,690,027 ng·hr/mL 及び 147,137±65,202 ng/mL であった。

ラットに 1、8 及び 25 mg/kg の用量で週 2 回 4 週間反復投与し、試料を 1 日目（初回投与）、11 日目（4 回目投与）及び 22 日目（7 回目投与）に採取した。試料採取は、投与前から投与 72 時間後まで 2 セットのラット群間（雌雄各 n=3/セット）で割付けを交互に行い、より多くの時点で行った。1 日目における各用量の血漿中濃度推移、AUC_{0-t} 及び C_{max} の値はおおむね用量比例性を示し、11 日目では血漿中濃度は 3 用量で顕著に低下した。22 日目では血漿中濃度は低用量で低下し、中用量で増加し、高用量で初回投与（1 日目）のレベルまで増加した。全体的にこれらのデータから、ラットにおいて BMN 165 の血漿中濃度は高用量では反復投与しても 1 日目のレベルまで回復することが示された。

サルに 0.01、0.1 及び 1.0 mg/kg の用量で週 2 回 4 週間反復投与し、試料を 1 週目（初回投与）、2 週目（3 回目投与）及び 4 週目（7 回目投与）に採取した。試料の採取は投与前から投与 72 時間後まで行った。血漿中濃度推移及び PK データから、BMN 165 の曝露量は 1 週目では用量増加に伴って増加し、2 週目では 3 用量で増加し、蓄積率は約 3.7（1.1～14.4）であることが示され、4 週目では血漿中濃度は顕著に低下した。4 週目では、0.01 及び 0.1 mg/kg の 2 用量において、BMN 165 の濃度は定量下限（LLOQ、100 ng/mL）未満であった。

ラット及びサルに BMN 165 を反復投与したときに血漿中濃度が変化する理由の説明としては、BMN 165 を消失させる抗体を産生するポリエチレングリコール（PEG）化酵素への免疫反応に続いて起こる血漿クリアランス（CL）の増大と BMN 165 の曝露量の低下が関与している可能性が考えられる。これらの結果から、反復投与したときの 1 週目から最終週までの血漿中 BMN 165 濃度の変化はラット及びサルの動物種間で異なることが示されている。

雌雄ラットに 25 mg/kg の用量で反復 SC 投与したときの AUC_{0-t} 及び C_{max} の最大値（雌雄合算）はそれぞれ 2,992,269 ng·hr/mL（標準偏差は示さず）及び 72,623 ng/mL（標準偏差は示さず）であり、サルについても同様に 1.0 mg/kg の用量で投与したときの AUC_{0-t} 及び C_{max} の最大値はそれぞれ 1,238,924±397,836 ng·hr/mL 及び 27,781±12,193 ng/mL であった。

2.6.4.2 分析法

マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いた BMN 165 の薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を担保するため、生体試料中薬物濃度分析法を確立した。分析法及び関連する報告書を表 2.6.4.2-1 に示す。

製剤の投与液中の BMN 165 濃度は紫外可視分光法及びビシンコニン酸（BCA）アッセイに基づく方法により定量した。

PK 解析のため、血漿中 BMN 165 は酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を用いて定量した。マウスを用いた非 GLP 試験には初期の探索的分析法を使用した。ラット、ウサギ又はサルの血漿の分析法を GLP 及び非 GLP 試験での測定のためにバリデーションした。GLP 適用のラットにおける生殖発生毒性試験での乳汁中 BMN 165 濃度を測定するために電気化学発光測定（ECLA）法を開発し、バリデーションを行った。

マウスにおける薬力学（PD）的作用を評価するため、血漿中フェニルアラニン（Phe；酵素である BMN 165 の基質）濃度を蛍光光度法により定量した。マウス血漿中 Phe、チロシン、トリプトファン及び *trans*-ケイ皮酸（*t*-CA；BMN 165 の酵素活性により生成）は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法で定量した。ラット、ウサギ及びサルの血漿中 Phe を定量するための液体クロマトグラフタンデム質量分析（LC/MS/MS）法を開発し、バリデーションした。

PEG 又はシステイン 503 及び 565 をセリンに置換した遺伝子組換え *Anabaena variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（rAvPAL）に対する特異的抗体アイソタイプを測定するための ELISA 半定量法により、免疫原性を評価した。非 GLP 試験を担保するために、マウス血清中の抗フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）免疫グロブリン（Ig）G、抗 PEG IgG 及び抗 PEG IgM の濃度を探索的分析法で測定した。非 GLP 及び GLP 試験を担保するため、ラット、ウサギ及びサルの血清中抗薬物抗体（ADA）の抗体価を測定する抗 PAL IgG 濃度測定法を開発し、バリデーションした。GLP 試験を担保するため、サル血清中抗 PAL IgM 及び BMN 165 中和抗体の検出及び陽性／陰性の判別のための定量的 ELISA 法を開発し、バリデーションした。

BMN 165 がマウス脳に影響を及ぼす可能性を評価し、また、ラットホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片における BMN 165 又は PEG を検出するための免疫組織化学法を確立した。

非臨床安全性試験用の分析法の真度、精度、マトリックスの影響、選択性、特異性、希釈直線性、頑健性及び試料安定性を評価した。安全性試験を担保する試験前の分析法バリデーション及び試験中の分析を GLP 適用下で実施し、分析法の特性を欧州医薬品庁（EMA）、米国食品医薬品局（FDA）及び業界のガイドライン［Guideline on Bioanalytical Method Validation, EMA, 2009 draft; Bioanalytical Method Validation, FDA（CDER）Guidance for Industry, May 2001; International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use（ICH）Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2（R1, November 2005）］(2)に従って確立した。

表 2.6.4.2-1　BMN 165 の非臨床試験用の生体試料中薬物濃度分析法一覧

Study Report Number	Study Title	Location in CTD
BAS-VR-06-001	Detection of IgG antibodies to PEGylated *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in rat serum	4.2.2.1-1
BAS-VR-06-002	Detection of activity neutralizing antibodies to rAvPAL-PEG[a] in cynomolgus and human serum	4.2.2.1-2
BAS-VR-06-003	Detection of IgM antibodies to *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL) in rat, monkey and human serum	4.2.2.1-3
BAS-VR-06-005 A4	Detection of PEGylated Recombinant Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in Rat, Monkey and Human Plasma[b]	4.2.2.1-4
BAS-VR-06-005 A5	Detection of PEGylated Recombinant *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (BMN165[a]) in Rat Lithium Heparin (Li-Heparin) Plasma[b]	4.2.2.1-5
BAS-VR-06-005 A6	Detection of PEGylated Recombinant *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (BMN165[a]) in Cynomolgus Monkey Lithium Heparin (Li-Heparin) Plasma[b]	4.2.2.1-6
BAS-VR-07-001	Partial Validation Report for the Detection of IgG antibodies to PEGylated Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in monkey and human serum	4.2.2.1-7
BAS-VR-07-004	Validation of Phenylase Total Protein by UV Spectrophotometry	4.2.2.1-8
BAS-VR-07-005	Dose Concentration Analysis of PEGylated Recombinant *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in Formulation Buffer	4.2.2.1-9
BAS-VR-11-005	Quantitative Measurement of PEGylated Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a], BMN165[a]) in Rabbit Plasma by ELISA	4.2.2.1-10
BAS-VR-11-007	Detection of Anti-rAvPAL IgG in Rabbit Serum	4.2.2.1-11
BMN165-12-026	Validation of a Method for the Detection of Anti-rAvPAL IgG Antibodies In Rat Serum	4.2.2.1-12
BMN165-12-045	Detection of BMN165[a] in Rabbit Plasma using a Ligand Binding Assay	4.2.2.1-13
BMN165-12-046	Detection of BMN165[a] in Rat Plasma using a Ligand Binding Assay	4.2.2.1-14
BMN165-13-068	Development and Validation of an Immunohistochemical Method for the Semi-Quantitative Evaluation of Anti-PEG Antibody and Anti-rAvPAL-PEG Antibody Binding in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Rat Tissues	4.2.3.2-6
BMN165-14-069	Quantitation of BMN165[a] in Rat Breast Milk by Electrochemiluminescence	4.2.2.1-15

表 2.6.4.2-1　BMN 165 の非臨床試験用の生体試料中薬物濃度分析法一覧（続き）

Study Report Number	Study Title	Location in CTD
ARPHE1	Method Validation Report for the Determination of Phenylalanine in Monkey Plasma (Lithium Heparin) Using LC-API/MS/MS	4.2.2.1-16
BMN165-11-033	Method Validation Report for the Determination of Phenylalanine in Rabbit Plasma (Lithium Heparin) Using LC-API/MS/MS	4.2.2.1-17
BMN165-11-047	Method Validation Report for the Determination of Phenylalanine in Rat Plasma (Lithium Heparin) Using LC-API/MS/MS	4.2.2.1-18
16-RS-357-VAL	Validation of an Anti-Polyethylene Glycol (PEG) Immunohistochemistry Assay in Preserved Rat Tissues	4.2.2.1-19
McCaman, et al. (1962)(3)	Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum	4.3

a) rAvPAL-PEG or BMN 165: also known as pegvaliase.

b) Validation report BAS-VR-06-005, Detection of PEGylated Recombinant Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG) in Rat, Monkey and Human Plasma, was split into 3 amendments according to species.

2.6.4.2.1　製剤濃度分析

（CTD: 4.2.2.1-8、BAS-VR-07-004）
（CTD: 4.2.2.1-9、BAS-VR-07-005）

BMN 165 の非臨床試験を担保するため、BioMarin 社が分光光度法を用いてバリデーションした投与液の分析法（試験番号 BAS-VR-07-004）は、[redacted]及び[redacted]の両社へ移管した。BMN 165 のモル吸光係数を用いて、分光光度計により 280 及び 320 nm の吸光度で投与液中の BMN 165 濃度を測定した。

BMN 165 の非臨床試験を担保するため、製剤緩衝液中の BMN 165 濃度を測定するための BCA 総タンパク質アッセイキット（Pierce 社）に基づく比色分析法も BioMarin 社で開発し、バリデーションを行った（バリデーション報告書 BAS-VR-07-005）。製剤化 BMN 165 溶液を BCA 試薬と混和し、562 nm の吸光度で製剤緩衝液中の検量線に基づき BMN 165 濃度を測定した。

2.6.4.2.2　第一世代の rAvPAL-PEG PK アッセイ

（CTD: 4.2.2.1-4、BAS-VR-06-005 A4）
（CTD: 4.2.2.1-5、BAS-VR-06-005 A5）
（CTD: 4.2.2.1-6、BAS-VR-06-005 A6）

初期の非 GLP 薬理試験（試験番号 0165-07-028、0165-08-006、0165-09-069 and 0165-09-070）を担保するために、BioMarin 社にて開発した ELISA 法でマウス及びサル血漿中 BMN 165 濃度を測定した。ADA による影響の可能性を低下させる目的で BMN 165 から ADA を解離させるため、測定では測定用プレートへの添加前に実試料、検量線用標準試料及び品質管理試料を酸処理及び中和した。酸による解離及び中和の後、BMN 165 をウサギポリクローナル抗 PAL 抗

体で捕捉し、ビオチン結合モノクローナル抗 PEG 抗体で検出し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質で発色させた。標準試料による検量線を用いて、各試料中の BMN 165 濃度を定量した。試料の希釈に必要な最小希釈倍数（MRD）は 1:50～1:100 であり、アッセイの感度は無処理の血漿中 BMN 165 濃度として 25～60 ng/mL であった。

2.6.4.2.3　バリデーションした rAvPAL-PEG PK アッセイ

ラット、ウサギ及びサルの血漿中及びラット乳汁中 BMN 165 濃度はバリデーションされたリガンド結合アッセイ（詳細は表 2.6.4.2-2 参照）で測定した。アッセイにおける ADA による影響を低くするため、アッセイプレートへの添加前に実試料、検量線用標準試料及び品質管理試料を酸処理後、中和した。酸処理は乳汁マトリックスには適していないため、ラット乳汁の分析ではアッセイにおいて酸処理を行わなかった。酸による解離及び中和の後、BMN 165 をウサギポリクローナル抗 PAL 抗体で捕捉し、モノクローナル抗 PEG 抗体を用いて第一世代分析法で定量した。その後、特性を改善したウサギモノクローナル抗 PEG 抗体による捕捉及びウサギポリクローナル抗 PAL 抗体を検出する試薬を用いた第二世代の分析法を確立した。各試料中の BMN 165 濃度は標準試料による検量線を用いて定量した。カリフォルニア州サン・ラフェルにある BioMarin 社の研究所では FDA による GLP 査察が 2018 年 11 月に行われた。施設査察報告書（FDA Form 483）が発出され、示された懸念に対応し、バリデーション報告書 BAS-VR-006-005「Detection of PEGylated Recombinant Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG) in rat, monkey, and human plasma」を改訂した。求められた追加の情報を記載し、各動物種からのバリデーションデータを分けて記載した（ラット血漿は改訂第 5 版、サル血漿は改訂第 6 版）。用いた特異試薬、MRD、定量範囲及び各非臨床試験で用いられた BMN 165 の PK アッセイに関連するバリデーションの詳細を表 2.6.4.2-2 に要約する。

表 2.6.4.2-2 BMN 165 のバリデーションした PK アッセイ一覧

Species and Matrix	Study	GLP[a]/ non-GLP	Method Validation	MRD[b]	Acid Treatment	Capture Reagent	Detection Reagent	Range of Quantitation at MRD[b] (ng/mL)
Rat Plasma	0165-07-003	GLP	BAS-VR-06-005 A4	1:50	0.1 mol/L glycine pH 2.7/0.5 M Tris pH 8.5	Rabbit polyclonal anti-PAL IgG	Mouse monoclonal anti-PEG IgM-biotin/SA-HRP/TMB	250 to 17,500
	0165-07-005	GLP						
	0165-07-009	GLP						
	0165-08-019	GLP	BAS-VR-06-005 A5	1:100			Rabbit monoclonal anti-PEG IgG-biotin/SA-HRP/TMB	80 to 8,000
	BMN165-12-037	GLP	VR-BMN165-12-046	1:50	0.0625 mol/L Guanidine-HCl/ 1 mmol/L CTAB[c]	Rabbit monoclonal anti-PEG IgG	Rabbit polyclonal anti-PAL IgG-biotin+SA-HRP/TMB	78 to 2,500
	BMN165-14-013	GLP						
Rat Milk	BMN165-14-013	GLP	BMN165-14-069	1:50	0.2 mmol/L CTAB[c]	Rabbit monoclonal anti-PEG IgG	Rabbit polyclonal anti-PAL IgG-ruthenium	75 to 2,000
Rabbit Plasma	BMN165-11-027	GLP	BAS-VR-11-005	1:20	0.1 mol/L HCl/0.5 mol/L Tris-HCl pH 8.5	Rabbit polyclonal anti-PAL IgG	Rabbit monoclonal anti-PEG IgG-biotin/SA-HRP/ QuantaBlu	50 to 48,000
	BMN165-12-036	GLP	VR-BMN165-12-045	1:50	0.0625 mol/L Guanidine-HCl/ 1 mmol/L CTAB[c]	Rabbit monoclonal anti-PEG IgG	Rabbit polyclonal anti-PAL IgG-biotin+SA-HRP/TMB	78 to 2,500

表 2.6.4.2-2　BMN 165 のバリデーションした PK アッセイ一覧（続き）

Species and Matrix	Study	GLP[a]/ non-GLP	Method Validation	MRD[b]	Acid Treatment	Capture Reagent	Detection Reagent	Range of Quantitation at MRD[b] (ng/mL)
Monkey Plasma	0165-07-006	GLP	BAS-VR-06-005 A4	1:50	0.1 mol/L glycine pH 2.7/0.5 mol/L Tris pH 8.5	Rabbit polyclonal anti-PAL IgG	Mouse monoclonal anti-PEG IgM-biotin/SA-HRP/TMB	100 to 17,500
	0165-07-008	GLP						
	0165-07-030	GLP	BAS-VR-06-005 A6				Rabbit monoclonal anti-PEG IgG-biotin/SA-HRP/TMB	30 to 2,000

GLP: Good Laboratory Practices; HRP: horseradish peroxidase; Ig: Immunoglobulin; PAL: phenylalanine ammonia lyase; PEG: polyethylene glycol; SA: streptavidin; TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

a) GLP studies were compliant with FDA United States Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Study

b) MRD: Minimum required dilution

c) CTAB: Hexadecyltrimethylammonium Bromide

2.6.4.2.4　マウス血漿中 Phe 濃度蛍光光度法

少ない容量で使用できるマイクロタイタープレートフォーマット用に改変した蛍光光度法(3)を用いて、マウスでの薬効を評価するために血漿中 Phe 濃度を測定した。血漿試料及び検量線用標準試料を 0.5 mol/L トリクロロ酢酸で除タンパクさせ、96 ウェルプレート上でコハク酸塩、ニンヒドリン及び L-ロイシル-L-アラニンを含む反応混合液に添加した。サーマルサイクラーを用いて、プレートを 60°C で 2 時間インキュベートした。試料を銅試薬含有の黒色 96 ウェル蛍光分析用プレートに移し、SpectraMax M2 Microplate Reader で吸光度を測定した（励起波長 378 nm、発光波長 512 nm）。3 ウェルずつ測定し、標準曲線に対する各血漿試料における Phe 濃度の平均値を算出した。Phe 濃度アッセイの定量範囲は 117～3750 µmol/L であった。

2.6.4.2.5　マウス血漿中 Phe、チロシン、トリプトファン及び *t*-CA 濃度の HPLC による定量法

マウスを用いた試験を担保するため、アミノ酸である Phe、チロシン、トリプトファン及び *t*-CA の血漿中濃度を HPLC 法により定量した。検量線用標準試料及び血漿試料を 0.0625 mmol/L ノルロイシン（内標準物質）を含有するエタノールで除タンパクさせ、遠心分離した。真空乾燥させた試料をカップリング試薬及びフェニルイソチオシアネートと混和した。真空蒸着させた試料を pH 6.5 の 50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液で溶解し、ジクロロメタンを添加した。遠心分離した後、微量インサートを付属しているガラス製オートサンプラーバイアルに液相を移した。プログラム機能を有するダイオードアレイ紫外可視分光検出器が付属された Beckman System Gold LC を用いて Phe、チロシン及びトリプトファンを分離した。本システムは Phenomenex 社製カラム（250×4.6 mm、粒子径 5 µm、逆相、C18 分析カラム）を装着しており、254 nm で測定した。LC 分離システムは pH 6.5 の 50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（溶媒 A）及びアセトニトリル（溶媒 B）で構成されている。各分析物質の LLOQ は 8 µmol/L であった。

2.6.4.2.6　ラット、ウサギ及びサル血漿中 Phe 濃度の LC/MS/MS による定量法

（CTD: 4.2.2.1-18、BMN165-11-047）
（CTD: 4.2.2.1-17、BMN165-11-033）
（CTD: 4.2.2.1-16、ARPHE1）

非臨床試験を担保するため、ラット、ウサギ及びサルの血漿試料中 Phe を測定する LC/MS/MS による定量法をバリデーションした（ラット：バリデーション報告書 BMN165-11-047、ウサギ：バリデーション報告書 BMN165-11-033、サル：バリデーション報告書 ARPHE1）。Phe 及び内標準物質はコントロール及び血漿試料からアセトニトリル：メタノール（3:1）で除タンパクさせることにより抽出した。上清を緩衝液［2 mmol/L 酢酸アンモニウム及び 0.1%ギ酸（FA）を含有する 85:10:5 のアセトニトリル：水：メタノール溶液］で希釈し、LC-API/MS/MS で分析した。液体クロマトグラフィーには Atlantis HILIC シリカカラムを用いた。LC 溶媒送液システムは移動相 A（2 mmol/L 酢酸アンモニウム及び 0.1% FA を含有する 95:5 の水：メタノール溶液）及び移動相 B（2 mmol/L 酢酸アンモニウム及び 0.1% FA を含有する 85:10:5 のアセトニトリル:水:メタノール溶液）で構成した。HPLC システムは Turbo Ion スプレー大気圧イオン化注入口を用

いた質量分析計と連結した。高純度窒素ガスをネブライザーガス、Turbo Ion スプレー及びカーテンガスに用いた。Phe 濃度の定量範囲は 1～200 µmol/L であった。

2.6.4.2.7　マウス抗 PAL IgG の ELISA による定量法

マウスにおける免疫原性をモニターするために用いる間接 ELISA 法を開発した（試験番号 0164-06-019、0165-06-057、0165-07-001 及び 0165-07-029）。本法は非 GLP 試験における初期の探索目的のために開発した。rAvPAL をアッセイプレートに固定化し、緩衝液（MRD は 1:50）で希釈した血清試料から抗 PAL 抗体を捕捉した。インキュベートし、非特異的抗体を除去するために洗浄した後、ビオチン結合ポリクローナルヤギ抗マウス IgG 検出試薬の添加に続けてストレプトアビジン（SA）-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）を添加し、TMB 基質で発色させて ADA を検出した。スクリーニング試験での偽陽性率が約 5%となるように、各プレートに添加した正常マウス血清パネルのシグナルに基づいてダイナミックカットポイントを決定した。スクリーニングで陽性となった試料を 2%マウス血清含有アッセイ希釈液で連続的に希釈した。前述のカットポイントでの各試料の MRD を各試料の力価として報告書に記載した。

2.6.4.2.8　マウス抗 PEG IgG 及び抗 PEG IgM の ELISA による定量法

（CTD: 4.2.2.2-2、0165-09-069 and 0165-09-070）

マウス血清における抗 PEG IgG 及び抗 PEG IgM の応答の可能性を評価するために直接 ELISA 法を開発した（試験番号 0165-09-069 and 0165-09-070）。これらの方法は初期の探索目的のために開発した。血清試料を緩衝液で 1:50 に希釈した後、メトキシ PEG でコートしたアッセイプレートでインキュベートした。インキュベート及び洗浄後、ビオチン結合ポリクローナルヤギ抗マウス IgG 又はビオチン結合ポリクローナルヤギ抗マウス IgM の添加に続けて SA-HRP を添加し、TMB 基質で発色させてマウス抗 PEG 抗体を検出した。偽陽性率が約 5%となるように、正常マウス血清のパネルのシグナルに基づいて各アッセイに対して統計学的にスクリーニングカットポイントを決定した。前述のスクリーニングカットポイントでのシグナルで陽性と考えられた実試料を 2%マウス血清で連続的に希釈した。前述のカットポイントでの各試料の MRD を各試料の力価として報告書に記載した。

2.6.4.2.9　抗 PAL IgG 及び抗 PAL IgM の ELISA 定量法のバリデーション

ラット、ウサギ及びサル血清における BMN 165 に対する免疫原性を評価するために、ADA の直接 ELISA 法を開発し、バリデーションを行った。捕捉及び検出試薬、MRD、感度、薬剤に対する忍容性、関連するバリデーション及び各アッセイに対応する非臨床試験の詳細を表 2.6.4.2-3 に記載した。rAvPAL をアッセイプレート上にコートし、緩衝液（MRD は 1:20 又は 1:50）で希釈した血清試料から抗 PAL 抗体を捕捉した。インキュベートし、非特異的抗体を除去するために洗浄した後、HRP を直接的に又はビオチン - SA 結合を介して結合させた種特異的抗 IgG 又は IgM 検出試薬を添加し、TMB 基質で発色させて ADA を検出した。スクリーニング試験で偽陽性率が約 5%となるように、ラット、ウサギ又はサルから採取した正常血清試料のパネル

のシグナルに基づいて各アッセイについて統計学的にスクリーニングカットポイントを決定した。確認試験では、抗体の特異性を確認するため、溶液中での BMN 165 との競合を利用した。確認試験で偽陽性率が約 1%に達するように、遊離型 BMN 165 の存在下、正常血清試料のパネルの抑制シグナルに基づいて各方法について統計学的に確認試験でのカットポイントを決定した。スクリーニング試験及び確認試験で陽性であった実試料を 2%正常血清で連続的に希釈し、陽性が維持された各試料の最大希釈率を決定し、各試料の力価として報告書に記載した。抗 PAL IgM アッセイは定性的であるため、相対的定量又は力価測定は行わず、抗 PAL IgM の存在又は非存在を検出するようにデザインした。

2.6.4.2.10 サル rAvPAL-PEG 活性中和抗体の定量法

BMN 165 の酵素活性が検出可能な ADA を含有するサル血清により阻害されるか否かを評価するために、抗 BMN 165 活性中和抗体の定量法を開発し、バリデーションした。バリデーション、感度、薬剤に対する忍容性、MRD 及び本アッセイを使用した試験の詳細を表 2.6.4.2-3 に記載した。サル血清試料存在下での BMN 165 の変化量を *ex vivo* での *t*-CA 産生量を測定することによって評価した。本アッセイでは、血清又はコントロール抗体の存在下で既知量の BMN 165 を既知濃度の Phe とインキュベートした。BMN 165 により Phe から加水分解された遊離型 *t*-CA 量を反応混合液中で SpectraMax M2e 分光光度計により測定した（吸光度 290 nm）。BMN 165 中和抗体を含有する試料は保存していたコントロールのサル血清と比較して、290 nm の吸光度で 15%以上低下することが確認された。本アッセイでは定性的に陽性又は陰性を結果として示し、試料中の中和抗体の相対的力価は測定しなかった。本アッセイの結果は、BMN 165 中和抗体を産生した動物又はしなかった動物を特定するために有用であった。

表 2.6.4.2-3 BMN 165 の非臨床試験用にバリデーションした抗薬物抗体測定法一覧

Assay	Studies	GLP[a]/ non-GLP	Validation	Capture Reagent	Detection Reagent	MRD	Sensitivity	Drug Tolerance	Format
Rat Serum anti-PAL IgG ELISA	0165-08-019, BMN165-12-037	GLP	BMN165-12-026	rAvPAL	polyclonal goat anti-rat IgG-biotin + SA-HRP	1:20	31.3 ng/mL polyclonal rabbit anti-PAL IgG in buffer[b]	<40,000 ng/mL[c]	screen, confirm, titer
Rat Serum anti-PAL IgM ELISA	0165-07-009	GLP	BAS-VR-06-003	rAvPAL	polyclonal goat anti-rat IgM-HRP	1:50	10 ng/mL purified human IgM in buffer[b]	N.D.[d]	qualitative (positive/negative)
Rabbit Serum anti-PAL IgG ELISA	BMN165-11-027	GLP	BAS-VR-11-007	rAvPAL	polyclonal goat anti-rabbit IgG-biotin + SA-HRP	1:50	6.25 ng/mL polyclonal rabbit anti-PAL IgG in neat rabbit serum	High control detected in the presence of 100 µg/mL BMN165	screen, confirm, titer
Monkey Serum anti-PAL IgG ELISA	0165-07-006	GLP	BAS-VR-07-001	rAvPAL	polyclonal goat anti-human IgG-HRP	1:50	36.6 ng/mL polyclonal monkey anti-rAvPAL IgG in neat serum	Low positive control detected in the presence of at least 10,000 ng/mL BMN165[e]	screen, confirm, titer
	0165-07-007, 0165-07-008, 0165-07-009, 0165-07-030	GLP							

表 2.6.4.2-3　BMN 165 の非臨床試験用にバリデーションした抗薬物抗体測定法一覧（続き）

Assay	Studies	GLP[a]/ non-GLP	Validation	Capture Reagent	Detection Reagent	MRD	Sensitivity	Drug Tolerance	Format
Monkey Serum anti-PAL IgM ELISA	0165-07-006	GLP	BAS-VR-06-003	rAvPAL	polyclonal goat anti-human IgM-HRP	1:50	10 ng/mL purified human IgM in buffer	N.D.[d]	qualitative (positive/negative)
	0165-07-007	GLP							
	0165-07-008								
	0165-07-030								
Monkey Serum Neutralizing Antibody Assay	0165-07-030	GLP	BAS-VR-06-002	N/A	Light Absorbance (A290)	1:20	50 µg/mL positive control monkey anti-BMN165 IgG	Low positive control detected in the presence of 1,000 ng/mL BMN165	qualitative (positive/negative)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GLP: Good Laboratory Practices; HRP: horseradish peroxidase; Ig: Immunoglobulin; MRD: minimum required dilution; N/A: not applicable; PAL: phenylalanine ammonia lyase; rAvPAL: recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SA: streptavidin.

a) GLP studies were compliant with FDA United States Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.

b) In-assay concentration reported

c) Interference observed, not evaluated at <100 µg/mL

d) N.D.: Not done

e) Dug concentrations > 10,000 ng/mL were not evaluated.

2.6.4.2.11　マウス脳における免疫組織化学染色法

（CTD: 4.2.1.1-4、BMN165-14-044）

試験番号 BMN165-14-044 の試験を担保するため、固定したマウス脳組織（pH 7.4 の 4%パラホルムアルデヒド／0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液で固定、30%ショ糖含有トリス緩衝生理食塩液／0.05%アジ化ナトリウム溶液で保存）の免疫組織化学染色を行った。ドパミン神経細胞の生存並びにアストロサイト及びミクログリアの活性化の程度を評価するために、連続切片をチロシン水酸化酵素（TH）、グリア線維性酸性タンパク質（アストロサイト）又はミクログリアマーカーCD68 及び Iba-1 で免疫染色した。二次抗体検出試薬を添加後、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体（Vectastain Elite ABC）を添加し、標準的な 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩（DAB）反応で発色させて染色像を増幅させた。神経細胞の構造を可視化し、神経細胞数をカウントするため、切片を 0.05%クレシルファストバイオレット及び 0.05%酢酸で染色した。選択した脳部位の染色した切片における総神経細胞数及び TH 陽性神経細胞数を脳定位 optical fractionator 法によりカウントした。

2.6.4.2.12　ラット組織における rAvPAL-PEG 及び PEG 検出のための免疫組織化学染色法

（CTD: 4.2.2.1-19、16-RS-357-VAL）

試験番号 0165-08-019 の試験を担保するため、[redacted]において、FFPE のラット組織切片において BMN 165 を検出する免疫組織化学染色法を確立し、バリデーションを行った。FFPE のラット組織試料の切片をキシレンで脱パラフィンした後、浸水し、抗原賦活化溶液中でインキュベートした。切片をウサギポリクローナル抗 BMN 165 IgG 一次抗体又はウサギ IgG アイソタイプコントロールとインキュベートした後、EnVision+ウサギ試薬（Dako 社）を添加し、DAB 基質で可視化した。標本のスライドを評価してラベリングの強度をスコア化し、委員認定獣医病理学者により陽性細胞又は陽性組織の構成要素の分布及び頻度を評価した。

試験番号 0165-08-019 の試験を担保するため、Seventh Wave Laboratories LLC において、ラットに BMN 165 を投与したときの組織における PEG 沈着の可能性を評価する免疫組織化学染色法を確立し、バリデーションを行った（バリデーション報告書 16-RS-357-VAL）。ラット組織試料の FFPE の切片をキシレンで脱パラフィンした後、浸水し、抗原賦活化溶液中でインキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性を 3%過酸化水素水で停止させ、内因性アビジン及びビオチン活性をアビジンビオチンブロッキングキット（Vector Labs 社）でブロックした。切片をビオチン結合ウサギモノクローナル抗 PEG IgG 一次抗体又はビオチン結合ウサギ IgG アイソタイプコントロールとインキュベートした後、ABC-HRP（ホースラディッシュ結合抗体 - ビオチン複合体）を添加し、DAB 基質で可視化した。標本のスライドを評価してラベリングの強度をスコア化し、委員認定獣医病理学者により陽性細胞又は陽性組織の構成要素の分布及び頻度を評価した。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 ENU2 マウスにおける単回投与による PK／PD 試験

（CTD: 4.2.2.2-1、0165-07-028）

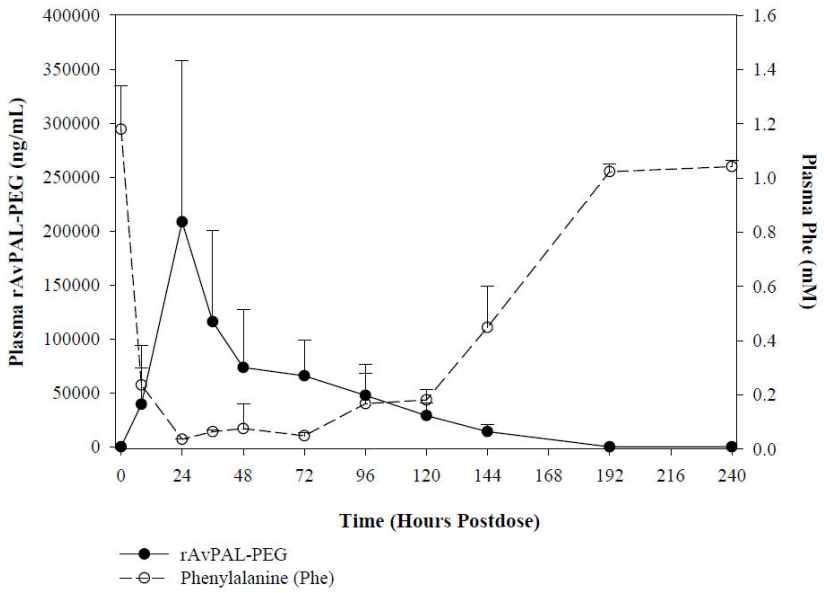
（CTD: 4.2.2.2-2、0165-09-069 and 0165-09-070）

試験番号 0165-07-028 の試験では、雄ホモ欠損 ENU2 マウスにおいて、BMN 165 の 20 mg/kg の単回 SC 投与による PK／PD 試験を実施した。本試験では、1 群 30 匹の雄ホモ欠損 ENU2 マウスを用いた。

本試験では合計 30 匹のマウスを使用し、サブグループあたり 3 匹とし、10 のサブグループの試料採取の時間の割付をずらしながら配置し、投与 240 時間後までの各時点で試料採取を行った。

試験番号 0165-07-028 の試験において、BMN 165 を 20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（±標準偏差）を図 2.6.4.3-1 に示した。

図 2.6.4.3-1 雄ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165 を 20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（±標準偏差）推移



Each point represents mean with SD. For rAvPAL-PEG, n=9 pooled (n=3 mice/pooled sample) predose samples or n=3 samples/postdose time point; for Phe, n=30 individual predose samples or n=3 samples/postdose time point.
rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

BMN 165 を 20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したとき、投与 24 時間後の血漿中 C_{max} は 209 µg/mL であった。血漿中 BMN 165 濃度は C_{max} に達した後、徐々に低下し、終末相での $t_{1/2}$ は 26.9 時間であった［見かけの分布容積（V_z/F）及び全身クリアランス（CL/F）はそれぞれ

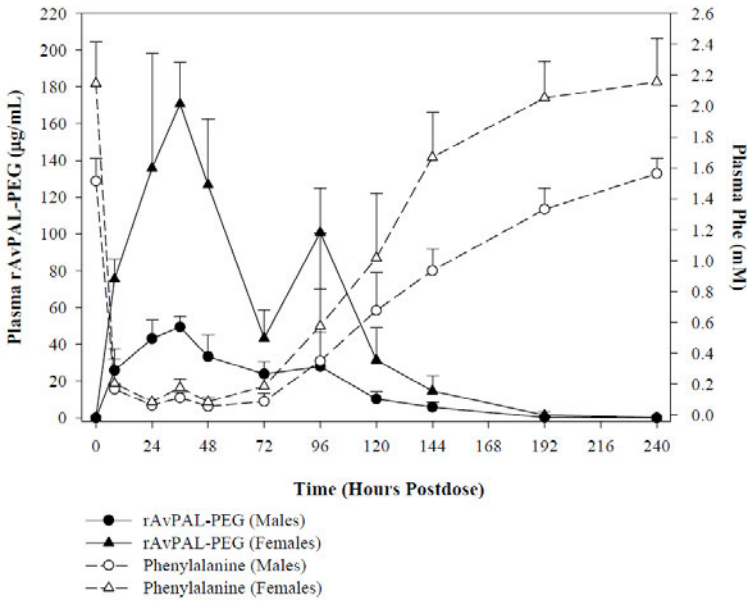
75.5 mL/kg 及び 1.95 mL/hr/kg］。血漿中 Phe 濃度に対する血漿中 BMN 165 濃度の推移から、BMN 165 濃度の増加に伴って血漿中 Phe 濃度は低下する PK-PD の関連性が示された。血漿中 Phe 濃度は血漿中 BMN 165 濃度が 50 µg/mL 以上で最低濃度に達することが示された。

雄及び雌ホモ欠損 ENU2 マウスを用いた 2 試験（それぞれ試験番号 0165-09-069 and 0165-09-070）において、BMN 165 を 20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの PK 及び PD を評価した。これらの 2 試験では BMN 165 の第 II 相試験用のプロセス A 製剤を用いて実施した。また、雄ホモ欠損 ENU2 マウスにおいて、第 I 相試験用のプロセス A 製剤を用いた類似の試験（試験番号 0165-07-028）で得られた単回投与による PK／PD パラメータを第 II 相試験用のプロセス A 製剤を用いた雄での試験結果と比較した。

雄 32 匹及び雌 28 匹のマウスに BMN 165 を投与し、最終投与後に血液採取スケジュールに基づいて 2～4 匹/群の 10 群に群分けを行った。投与前から投与後 240 時間にわたって試料を採取し、血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度を測定した。第 1～10 群のマウスは投与 8、24、36、48、72、96、120、144、192 及び 240 時間後に試験を終了した。

雌雄マウスにおける各時点での血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（+標準偏差）を図 2.6.4.3-2 に示した。

図 2.6.4.3-2　ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165（第 II 相試験用のプロセス A 製剤）を 20 mg/kg の用量で SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（+標準偏差）推移



Each point represents mean with SD. n=3-4 (rAvPAL-PEG, males), n=2-3 (rAvPAL-PEG, females); n=32 (predose Phe, males), n=3-4 (postdose Phe, males); n=28 (predose Phe, females), n=2-3 (postdose Phe, females).
rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

ホモ欠損 ENU2 マウスに第 II 相試験用の BMN 165 製剤を 20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したとき、雌での 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 C_{max} は雄と比較してそれぞれ約 3.1 及び 3.5 倍高かった。BMN 165 を SC 投与したときの V_z/F 及び CL/F は雌と比較して雄の方がそれぞれ約 2.2 及び 3.1 倍高かったが、T_{max} 及び終末相の $t_{1/2}$ に性差は特に認められなかった。曝露量及び CL に明らかな性差がみられたが、バイオマーカーである Phe 濃度に対する作用は雌雄で類似していた（図 2.6.4.3-2）。20 mg/kg の用量で単回 SC 投与したとき、投与前の血漿中 Phe 濃度は雄と比較して雌の方が約 1.4 倍高く、血漿中 BMN 165 濃度も雌の方が高かった。このように明らかな性差が認められたにも関わらず、Phe に対する薬理作用は雌雄で類似していた。血漿中 BMN 165 濃度と血漿中 Phe 濃度は逆相関を示すことが確認され、BMN 165 濃度が上昇したときに Phe 濃度は低下することが示された。Phe 濃度低下作用は通常投与 96～120 時間後に消失し始め、投与 192 時間後にはベースラインレベルまで回復し、その時点では BMN 165 濃度は定量下限未満（BLQ）となった。

1 匹の雄マウス及び 3 匹の雌マウスを除き、雌雄において全ての抗体価はアッセイのカットポイント未満（抗体価が 50 TU 未満）が維持され、検討した時点（投与 8、192 及び 240 時間後）にわたって抗体価は 50 TU と低い値を示した。免疫原性の発現が低いため、抗体の曝露の影響は評価しなかった。

第 I 相試験用のプロセス A 製剤を用いた試験番号 0165-07-028 と第 II 相試験用のプロセス A 製剤を用いた試験の比較から、雄マウスでは第 I 相試験用プロセス A 製剤の BMN 165 の曝露量（AUC、C_{max}）は第 II 相試験用プロセス A 製剤の BMN 165 の曝露量と比較して約 3～4 倍高く、雌マウスでの第 II 相試験用プロセス A 製剤の BMN 165 の曝露量は雄と比較して約 3～3.5 倍高かった。PK は被験物質及び性別に関連した明らかな差が認められたにも関わらず、Phe 濃度に対する薬理作用は各試験を通して雌雄で類似していた。

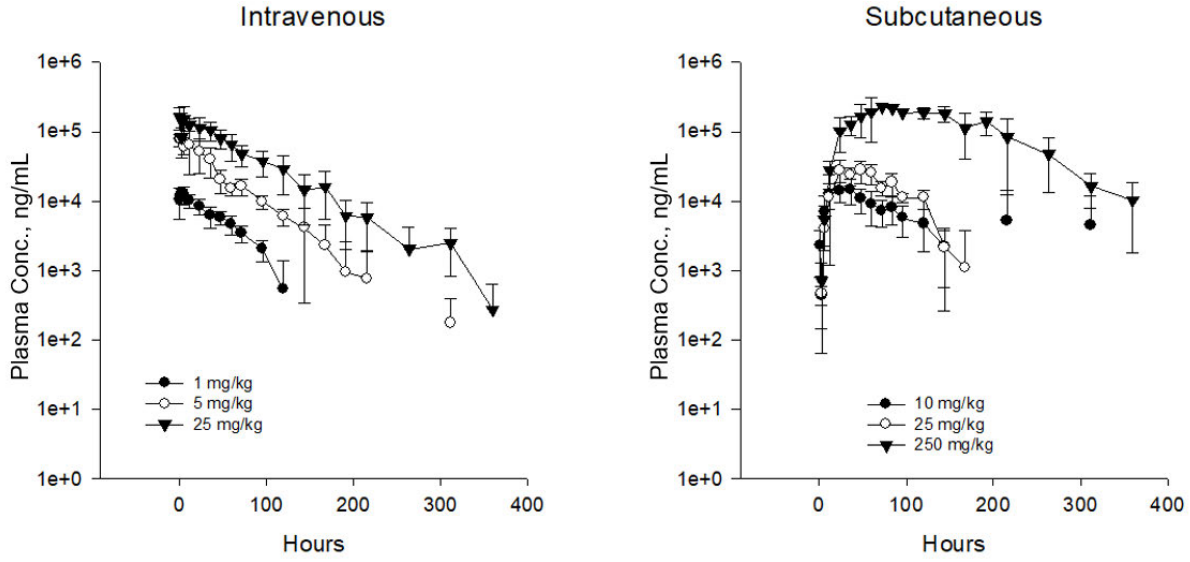
2.6.4.3.2 ラットにおける単回投与による毒性及び TK 試験

（CTD: 4.2.3.1-1、0165-07-003）

試験番号 0165-07-003 の試験では、雌雄ラットに BMN 165 を 1、5 及び 25 mg/kg の用量で単回 IV 投与し、また、10、25 及び 250 mg/kg の用量で単回 SC 投与し、漸増単回投与による PK を評価した。本試験では 2 週間の回復期間を設けた。採取する血液量に限界があるため、群分けしたラットの 2 群（各群雌雄各 n=3）の採取時間の割付をずらして血漿試料を採取した。本試験では雌雄ラット（雌雄各 n=6、各群 3 匹ずつ）で行い、血漿試料を投与前から投与 360 時間後まで採取した。

ラットに IV 投与したときに得られた血漿中濃度の片対数のグラフから、終末相では 1 次指数関数的に消失し、曝露量は用量増加に伴い増加することが示された（図 2.6.4.3-3）。グラフから、SC 投与したときの初期相における吸収と共に IV 投与したときと類似した PK 特性を有することが示された。雌雄ラットの血漿中濃度推移を比較することにより、BMN 165 を SC 投与したときに性差は認められないことが定性的に示され、このことは算出した PK パラメータにより裏付けられている。

図 2.6.4.3-3　雌雄ラットにおける BMN 165 の血漿中濃度推移



The 10 and 25 mg/kg SC plots contain some data points that are averages with SD of a single measurable concentration with zero concentrations from 5 other animals, n=6.
SC: subcutaneous; SD: standard deviation.

雌雄ラットに SC 投与したときの T_{max} は遅く、18～96 時間と範囲も広く、吸収速度は遅いことが示されている。$t_{1/2}$ も SC 投与で 33.4～47.3 時間、IV 投与で 28.3～41.7 時間と長かった。IV 及び SC 投与した時の 0 を切片とした $AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max} の値と用量のプロット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。IV 投与したときの CL、定常状態での分布容積（V_{ss}）及び終末相での分布容積（V_z）の平均値は小さく、低用量及び中用量では同程度であったが、高用量ではわずかに増加した。高用量での結果は、吸収あるいは排泄又はその両方のメカニズムが高用量では異なることを示唆している。

ラットにおける BMN 165 のバイオアベイラビリティ（F）を数式 $[AUC_{0\text{-}96hr(SC)}/AUC_{0\text{-}96hr(IV)}/Dose_{(SC)}]\times100$ を用いて算出し、1 mg/kg の用量で IV 投与したときのデータを参照とした。

10、25 及び 250 mg/kg の用量で投与したときの F 値はそれぞれ 16.9、12.9 及び 7.79%であり、用量が高いほど F 値は低くなることが示された。全体的にラットでの F 値は低かった（表 2.6.4.3-1、図 2.6.4.3-4）。

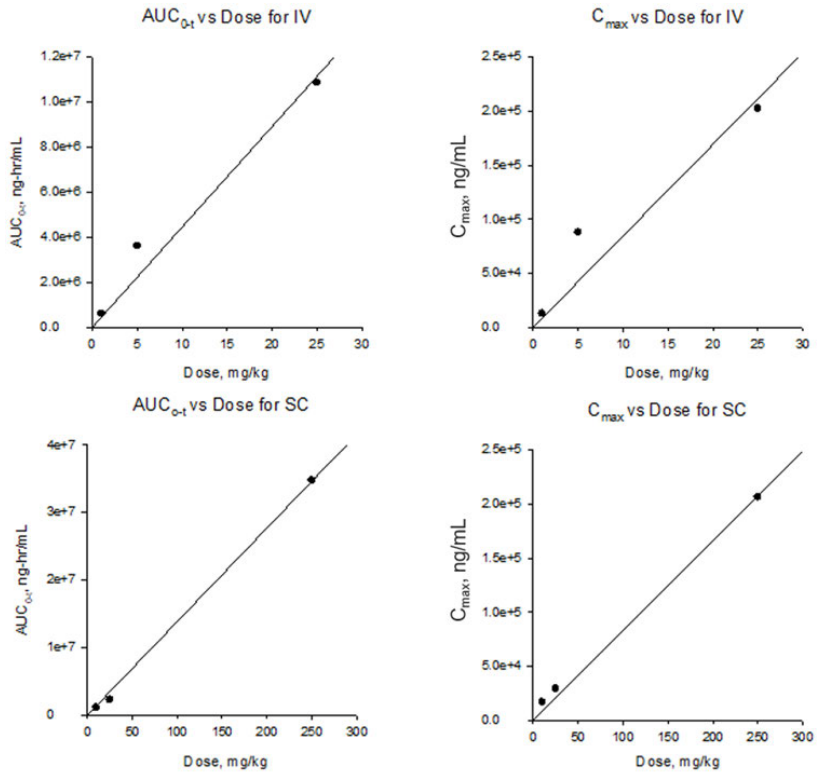
表 2.6.4.3-1 ラットに単回投与したときの PK パラメータ

Route of Administration	Dose (mg/kg)	AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	CL[a] (mL/hr/kg)	V_{ss} (mL/kg)	V_z[a] (mL/kg)	F (%)
IV	**1**	606,017	12,600	4.5	28.3	1.55	72.1	64.1	NA
	5	3,610,522	87,667	2.0	30.9	1.38	63.0	61.4	NA
	25	10,856,187	202,238	9.0	41.7	2.34	145	139	NA
SC	**10**	1,110,433	16,674	18.0	47.3	7.72	NA	532	16.9
	25	2,292,726	29,260	42.0	33.4	10.5	NA	503	12.9
	250	34,751,389	206,380	96.0	44.2	7.08	NA	449	7.79

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; F: bioavailability; IV: intravenous; NA: not applicable; SC: subcutaneous; $t_{1/2}$: terminal half-life; T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_{ss}: volume of distribution at steady state; V_z: volume of distribution at terminal phase.

a) For SC administration, clearance and volume of distribution are qualified by bioavailability, CL/F and V_z/F.

図 2.6.4.3-4 ラットにおける AUC_{0-t} 及び C_{max} の用量比例性



n=6/gender

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; IV: intravenous; SC: subcutaneous.

2.6.4.3.3 サルにおける単回投与による毒性及び TK 試験

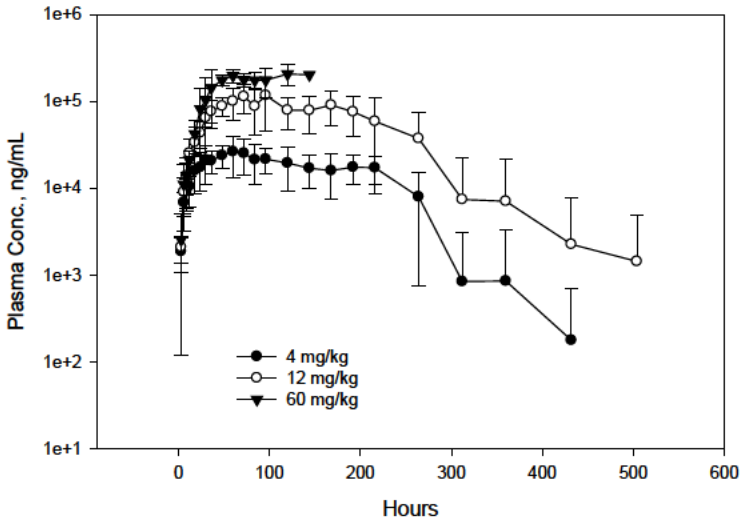
（CTD: 4.2.3.1-2、0165-07-007）

試験番号 0165-07-007 の試験では、サルに BMN 165 を 4、12 及び 60 mg/kg の 3 用量で単回 SC 投与し、単回投与による PK を評価した。IV 投与したときの PK は評価しなかった（図 2.6.4.3-5）。本試験では 3 週間の回復期間を設けた。本試験は雌雄サル（雌雄各 n=3）で行い、血漿試料を投与前から投与 504 時間後まで採取した。60 mg/kg の用量で投与した全てのサルは毒性のため試験期間中の早期（試験 6 日に雄 2 例及び雌 3 例、試験 7 日に最後の雄）に試験を終了した。

片対数のグラフから、曝露量は用量増加に伴って増加し、終末相では 1 次指数関数的に消失することが示された（図 2.6.4.3-6）。本図ではサルに SC 投与したときのデータを示している（n=6）。4 及び 12 mg/kg の用量で SC 投与したとき、0 を切片とした回帰直線において、AUC_{0-t} 及び C_{max} の平均値はおおむね用量線形性を示し、利用可能な 60 mg/kg の用量でのデータから、AUC_{0-24hr} 及び C_{max} の平均値は用量比を下回って増加することが示された。T_{max} は 52～106 時間と遅く、$t_{1/2}$ は 64.4～71.3 時間と長かった。

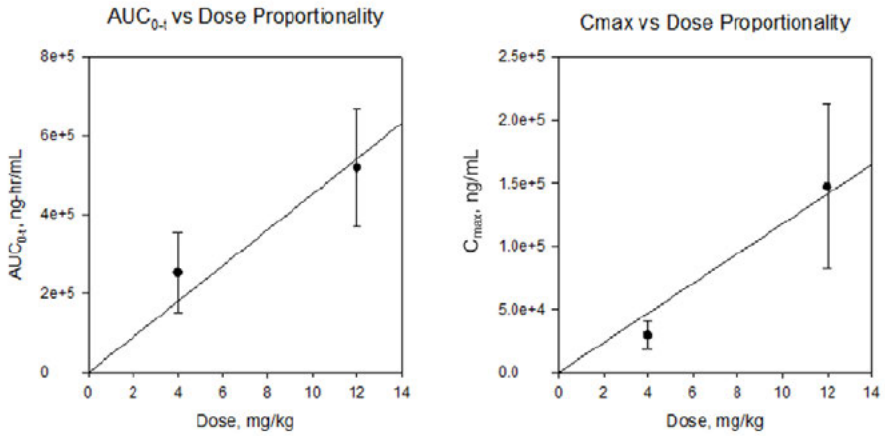
雌雄サルの血漿中濃度推移を比較することにより、BMN 165 を SC 投与したときに PK に性差は認められないことが定性的に示されている。このことは算出した PK パラメータにより裏付けられている（表 2.6.4.3-2）。

図 2.6.4.3-5 サルに単回漸増投与したときの血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. Plots contain some data points that are averages of 1 or 2 measurable concentrations with zero concentrations from remaining animals, n=6.
SD: standard deviation.

図 2.6.4.3-6 サルにおける AUC_{0-t} 及び C_{max} の用量比例性



Each point represents with SD. n=6
AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; SD: standard deviation.

表 2.6.4.3-2　サルに単回投与したときの PK パラメータ

Dose (mg/kg)	AUC_{0-t} (ng·hr/mL) (SD)	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL) (SD)	C_{max} (ng/mL) (SD)	T_{max} (hr) (SD)	$t_{1/2}$ (hr)	CL/F (mL/min/kg)	V_z/F (mL/kg)
4	4,625,836 (1,810,469)	252,874 (100,086)	29,337 (11,017)	52.0 (20.7)	64.5[a]	0.820[a]	76.3[a]
12	20,882,173 (7,690,027)	518008 (149,703)	147,137 (65,202)	106 (40)	71.3[b]	0.462[b]	45.6[b]
60	9,319,360 (6,815,626)	672,490 (300,228)	218,387 (39,058)	66.0 (36.2)	c	c	c

AUC_{0-24hr}: area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hr; AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; F: bioavailability; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: terminal half-life; T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z: volume of distribution at terminal phase.

a) n=1

b) n=2

c) Animals terminated early in the study

2.6.4.3.4　ENU2 マウスにおける反復 SC 投与による PK／PD 試験

（CTD: 4.2.2.2-3、0165-08-006）

試験番号 0165-08-006 の試験では、雄ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165 を 1 日 1 回 36 日間反復 SC 投与し、14 日間の回復期間を設けたときの PK／PD を評価した。

本試験では 1 群 18 匹の雄ホモ欠損 ENU2 マウスを用いた。マウスに BMN 165 を 2 mg/kg/日の用量で試験 1 日目から 14 日目まで、4 mg/kg/日の用量で試験 15 日から試験 36 日まで 1 日 1 回 SC 投与し、その後試験 37 から 50 日まで休薬し、14 日間の回復期間を設けた。1 群 3 匹の 6 つのサブグループから各時点で血液試料を採取し、血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度並びに血清中抗 rAvPAL IgG 抗体価を測定した。

試料採取はサブグループあたり 3 匹で 6 つのサブグループ間で下記のとおり採血時間の割付をずらしながら行った：

・サブグループ A は試験前（試験 14 日前）、試験 1、8、15、22、29 及び 36 日目の投与前並びに試験 36 日目の最終投与 72（試験 39 日目）、264（試験 47 日目）及び 312（試験 49 日目）時間後に採血を行った。

・サブグループ B は試験前（試験 14 日前）、試験 1 日目の投与 4 時間後、試験 8、16、22 及び 29 日目の投与前、試験 36 日目の投与 4 時間後並びに試験 36 日目の最終投与 96（試験 40 日目）及び 312（試験 49 日目）時間後に採血を行った。

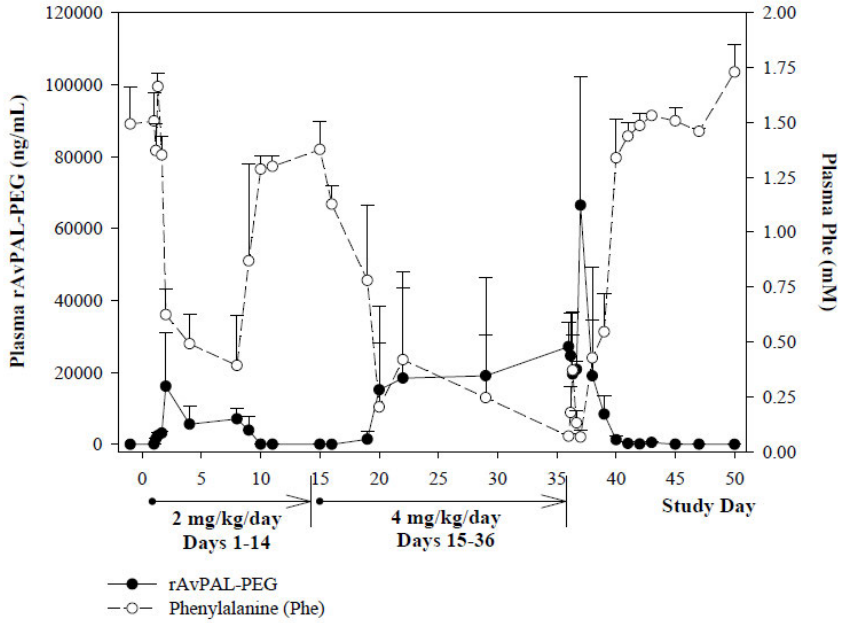
・サブグループ C は試験前（試験 14 日前）、試験 1 日目の投与 8 間後、試験 9、19、22 及び 29 日目の投与前、試験 36 日目の投与 8 時間後並びに試験 36 日目の最終投与 120（試験 41 日目）及び 336（試験 50 日目）時間後に採血を行った。

・サブグループ D は試験前（試験 14 日前）、試験 1 日目の投与 16 間後、試験 9、20、22 及び 29 日目の投与前、試験 36 日目の投与 16 時間後並びに試験 36 日目の最終投与 144（試験 42 日目）及び 336（試験 50 日目）時間後に採血を行った。

・サブグループ E は試験前（試験 14 日前）、試験 2、10 及び 29 日目の投与前並びに試験 36 日目の最終投与 24（試験 37 日目）、168（試験 43 日目）及び 360（試験 51 日目）時間後に採血を行った。
・サブグループ F は試験前（試験 14 日前）、試験 4、11 及び 29 日目の投与前並びに試験 36 日目の最終投与 48（試験 38 日目）、216（試験 45 日目）及び 360（試験 51 日目）時間後に採血を行った。

試験番号 0165-08-006 の試験での各時点の経時的な血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（+標準偏差）を図 2.6.4.3-7 に示した。

図 2.6.4.3-7　雄ホモ欠損 ENU2 マウスに BMN 165 を 1 日 1 回 36 日間 SC 投与したときの血漿中 BMN 165 及び Phe 濃度の平均値（+標準偏差）の推移



Note: Pre-study sampling occurred on Day -14; for simplicity, predose data was presented as Day -1.

Each point represents mean with SD. n=3 for rAvPAL-PEG and Phe at each time point with the following exceptions: n=11 or 18 (pre-study), n=6 (Days 8 and 9), n=12 (Day 22), n=12 or 18 (Day 29), n=1 (Day 43, Phe only), and n=17 (Day 50).
rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

BMN 165 を試験 1 日目に初回投与したとき、BMN 165 の C_{max}（16,133±15,000 ng/mL）は投与 24 時間後（試験 2 日目の投与前）であった。血漿中 BMN 165 濃度の個別値は試験 10～16 日目まで 100 ng/mL 未満であった。試験 17～18 日はマウスから試料を採取しなかった。BMN 165 の用量を増加させて 4 mg/kg の用量で 1 日 1 回投与したとき、血漿中 BMN 165 濃度は試験 19 日目で 1,450±2,290 ng/mL であった。血漿中 BMN 165 濃度は試験 37 日目に 66,527±35,855 ng/mL に増加し（C_{max} は試験 36 日目の投与 24 時間後であった）、その後、試験 40 日目に血漿中 BMN 165

濃度は 1303±1101 ng/mL に低下した。試験 45 日目では、血漿中 BMN 165 濃度の個別値は 100 ng/mL 未満であった。BMN 165 を 4 mg/kg の用量で試験 36 日目に最終投与したときの $AUC_{0\text{-}24hr}$ の値を 2 mg/kg の用量で試験 1 日目に初回投与したときの値と用量で補正して比較したとき、蓄積率は 3.2 であった。血漿中 Phe 濃度は試験期間にわたり、血漿中 BMN 165 濃度とおおむね逆相関を示し、用量増加に伴って Phe 濃度低下の程度は大きくなった。試験期間にわたり、ほとんどの抗体価は最小検出レベル付近（抗体価は 50 TU 以下）であった。

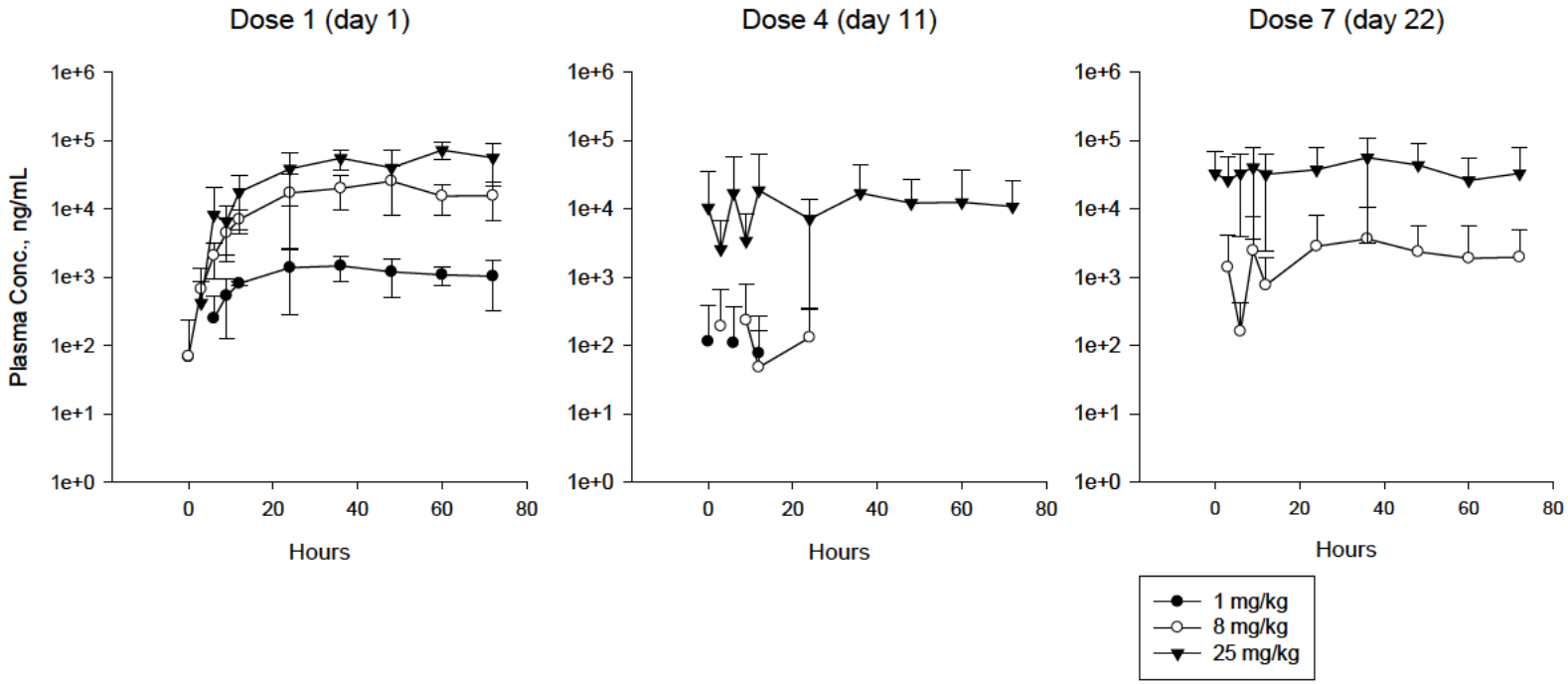
2.6.4.3.5 ラットにおける 4 週間反復 SC 投与による毒性及び TK 試験

（CTD: 4.2.3.2-1、0165-07-009）

試験番号 0165-07-009 の試験では、4 群のラットに BMN 165 を週 2 回（火及び金曜日）4 週間 SC 投与した。グループ 5（溶媒群）は雌雄各 3 匹ずつとし、グループ 6～8 は雌雄各 6 匹/群とした。グループ 5 では投与前並びに投与 24 及び 72 時間後に採血した。グループ 6～8 はラットを 2 群に分け、群間で血液試料採取時期をずらした。すなわち、第 1 群の 3 匹は投与 3、9、24、48 及び 72 時間後に採血し、第 2 群の 3 匹は投与前並びに投与 6、12、36 及び 60 時間後に採血した。本試験においてラットに BMN 165 を 4 週間投与し、2 週間の回復期間を設けた（図 2.6.4.3-8、図 2.6.4.3-9 及び図 2.6.4.3-10）。

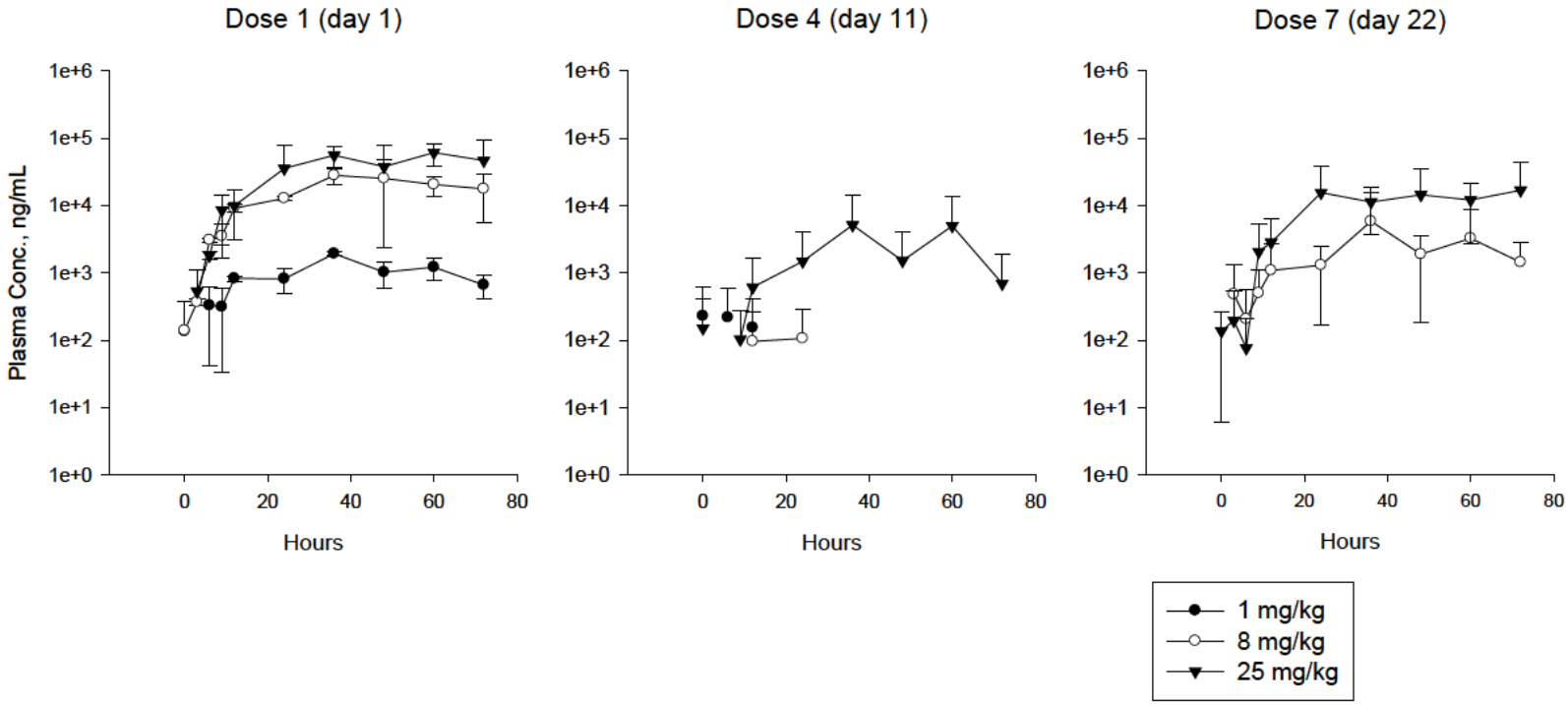
ラットに初回投与したときの BMN 165 の曝露量は用量増加に伴って増加した。試験 2 週目（4 回目投与）では 3 用量全てにおいて血漿中濃度は試験 1 週目よりも低値であった。試験 4 週目（7 回目投与）では試験 2 週目と比較して血漿中濃度は増加し、高用量では試験 1 週目の初期の濃度付近まで回復した。試験 4 週目における血漿中 BMN 165 濃度の変化は雄よりも雌ラットの方がより顕著であった（表 2.6.4.3-3、表 2.6.4.3-4 及び表 2.6.4.3-5）。

図 2.6.4.3-8 雌雄ラットに BMN 165 を週 2 回 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移（雌雄合算）



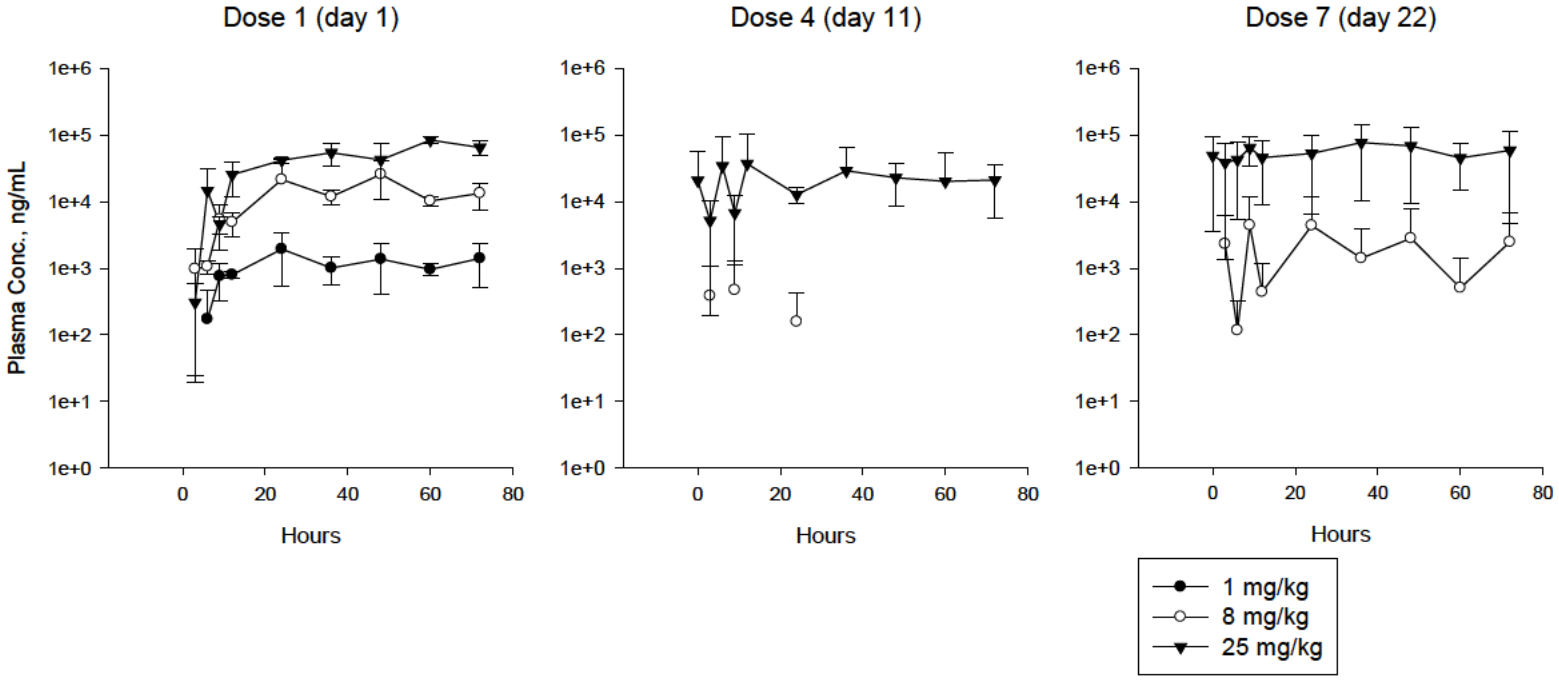
Each point represents mean with SD. n=6 (1, 8 and 25 mg/kg/day)

図 2.6.4.3-9　雄ラットに BMN 165 を週 2 回 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. n=3 (1, 8 and 25 mg/kg/day)

図 2.6.4.3-10 雌ラットに BMN 165 を週 2 回 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. n=3 (1, 8 and 25 mg/kg/day)

表 2.6.4.3-3 ラットに BMN 165 を 28 日間投与したときの PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Dose (Day)	AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)
1	1 (1)	76,388	1,935	30.0
	4 (11)	NA	NA	NA
	7 (22)	NA	NA	NA
8	1 (1)	1,104,773	26,933	42.0
	4 (11)	4,591	288	16.5
	7 (22)	158,404	5,143	22.5
25	1 (1)	2,992,269	72,623	60.0
	4 (11)	878,249	21,064	24.0
	7 (22)	2,755,085	56,430	36.0

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; LLOQ: lower limit of quantitation; NA: not applicable, concentration levels <LLOQ; PK: pharmacokinetics; SC: subcutaneous; T_{max}: time to maximum plasma concentration.
PK parameters from male and female rats (combined) receiving BMN 165 SC injections twice weekly over 28 days.

表 2.6.4.3-4 雄ラットに BMN 165 を 28 日間投与したときの PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Dose (Day)	AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)
1	1 (1)	72,350	1,932	36.0
	4 (11)	2,465	230	0
	7 (22)	NA	NA	NA
8	1 (1)	1,241,165	28,213	36.0
	4 (11)	1,365	107	24.0
	7 (22)	169,018	5,882	36.0
25	1 (1)	2,680,523	61,353	60.0
	4 (11)	168,338	5,168	36.0
	7 (22)	1,386,565	35,773	36.0

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; LLOQ: lower limit of quantitation; NA: not applicable, concentration levels <LLOQ; PK: pharmacokinetics; SC: subcutaneous; T_{max}: time to maximum plasma concentration.
PK parameters from male rats receiving BMN 165 SC injections twice weekly over 28 days.

表 2.6.4.3-5 雌ラットに BMN 165 を 28 日間投与したときの PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Dose (Day)	AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)
1	1 (1)	80,425	1,938	24.0
	4 (11)	NA	NA	NA
	7 (22)	NA	NA	NA
8	1 (1)	968,380	25,652	48.0
	4 (11)	7,818	468	9.0
	7 (22)	147,790	4,403	9.0
25	1 (1)	3,304,015	83,893	60.0
	4 (11)	1,588,160	36,960	12.0
	7 (22)	4,123,605	77,087	36.0

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; LLOQ: lower limit of quantitation; NA: not applicable, concentration levels <LLOQ; PK: pharmacokinetics; SC: subcutaneous; T_{max}: time to maximum plasma concentration.
PK parameters from female rats receiving BMN 165 SC injections twice weekly over 28 days.

2.6.4.3.6 ラットにおける 26 週間 SC 投与による毒性及び TK 試験

（CTD: 4.2.3.2-2、0165-08-019）

試験番号 0165-08-019 の試験では、ラットにおける 26 週間 SC 投与毒性及び TK 試験を実施し、12 週間の回復期間を設け、4 週間の回復期間と共に 17 週目での試験期間中の安楽死も行った。

240 匹の雌雄ラットを 8 群に分け、0、1、8 又は 25 mg/kg の用量で週に 2 回投与し、各用量をそれぞれ雌雄各 9 匹に投与し、計 72 匹のラットで TK を評価した。

投与前並びに投与期間中の 1、50、109 及び 183 日目の投与約 8、24、48 及び 72 時間後に血液試料を採取した。また、投与前並びに投与期間中の 22、78 及び 141 日目の投与約 8、24 及び 72 時間後に試料を採取した。投与 72 時間後の試料は次の投与前に試料を採取した。試料は投与期間中の 186 日目の最終投与 24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 及び 264 時間後にも採取した。

表 2.6.4.3-6 に 1、8 及び 25 mg/kg の用量で 1、8、16 及び 27 週目に投与したときの PK パラメータの平均値を示した。BMN 165 の血漿中における蓄積率の平均値を表 2.6.4.3-7 に示した。

表 2.6.4.3-6 ラットにおける 26 週間 SC 投与による毒性／TK 試験及び 12 週間回復性試験

		Pre-dose/Dosing Phase[a]			Recovery Phase[b]		
Dose (mg/kg)	**Study Week**	**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)**
1	**1**	1,325	36	68,029	NA	NA	NA
	8	276	0	4,094	NA	NA	NA
	16	3,085	36	65,516	NA	NA	NA
	27	1,994	48	67,470	2,008	24	147,570
8	**1**	38,129	48	1,443,872	NA	NA	NA
	8	44,342	16	1,617,226	NA	NA	NA
	16	22,446	60	1,098,690	NA	NA	NA
	27	18,500	8	1,036,762	17,099	72	2,771,088
25	**1**	128,675	60	5,552,860	NA	NA	NA
	8	205,500	4	9,859,624	NA	NA	NA
	16	106,983	12	4,781,972	NA	NA	NA
	27	152,944	36	6,283,204	139,167	132	18,637,860
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; NA: not applicable; PK: pharmacokinetics; T_{max}: time to maximum plasma concentration.

a) Collection times for Weeks 1,8,16 and 27 were pre-dose (0), 8, 24, 48 and 72 hr.

b) Collection times for Week 27 were pre-dose (0), 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, and 264 hr.

表 2.6.4.3-7 ラット血漿中における BMN 165 の蓄積率の平均値

Dose (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 8/ $AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 1	$AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 16/ $AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 1	$AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 27/ $AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 1	C_{max}, Week 8/ C_{max}, Week 1	C_{max}, Week 16/ C_{max}, Week 1	C_{max}, Week 27/ C_{max}, Week 1
1	0.0602	0.963	0.992	0.208	2.33	1.50
8	1.12	0.761	0.718	1.16	0.589	0.485
25	1.78	0.861	1.13	1.60	0.830	1.19

$AUC_{0\text{-}72hr}$: area under the concentration-time curve from time 0 to 72 hr; C_{max}: maximum plasma concentration.

投与期間中の 1、8、16 及び 27 週目において、BMN 165 の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}72hr}$ 及び C_{max}）はおおむね用量に比例して増加することが示された。BMN 165 の曝露量は投与期間中の 4 週目に低下し、試験 8 週に増加した。4 週目に低下した理由は rAvPAL に対する抗体産生による可能性が考えられる。投与期間中の 8、16 及び 27 週目に蓄積はほとんど又は全く認められなかった。1 mg/kg の用量で反復投与した雌雄ラットにおいて、8、16 及び 27 週目の $AUC_{0\text{-}72hr}$ の蓄積率（$AUC_{0\text{-}72hr,\ Week\ 8,\ 16\ or\ 27}/AUC_{0\text{-}72hr,\ Week\ 1}$）は 0.0～1.7 であった。蓄積率は 8 mg/kg の用量では 0.44～1.4 であり、25 mg/kg の用量では 0.69～2.1 であった。同様の比を C_{max}（$C_{max,\ Week\ 8,\ 16\ or\ 27}/C_{max,\ Week\ 1}$）についても算出したとき、全般的に蓄積はほとんど又は全く認められなかった。

全てのラットから採取した全ての試料は 1 mg/kg/回の用量で投与した雌雄各 1 匹ずつを除き（動物番号 B77797 及び B77958）、投与期間中の 272 日目までを通してラット血清中 rAvPAL に対する中和抗体は陰性であった。雌雄各 1 匹のラットで中和抗体が投与期間中の 120 日目のみに認められた。

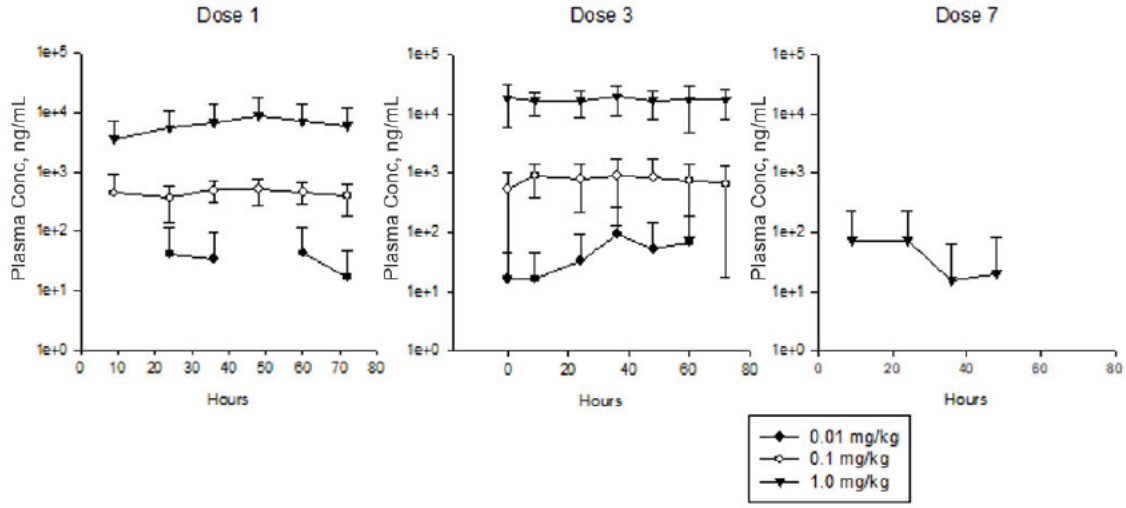
2.6.4.3.7 サルにおける 4 週間反復 SC 投与による毒性及び TK 試験

（CTD: 4.2.3.2-3、0165-07-008）

試験番号 0165-07-008 の試験では、グループ 1 には溶媒（雌雄各 5 匹/群）、グループ 2 及び 3（雌雄各 3 匹/群）にはそれぞれ 0.01 及び 0.1 mg/kg 並びにグループ 4（雌雄各 5 匹/群）には 1.0 mg/kg の用量で投与した。血漿試料を 1 日目（投与 1 回目）、8 日目（投与 3 回目）及び 22 日目（投与 7 回目）の投与前並びに投与 9、24、36、48、60 及び 72 時間後に採取した。7 及び 8 回投与後において、LLOQ（100 ng/mL）を上回る血漿中 BMN 165 濃度データは限られていた（100 ng/mL を上回ったのはそれぞれ 6 及び 2 匹）。そのため、利用可能な濃度データでも 7 及び 8 回投与から得られたデータは TK 解析から除外した。本試験において、サルに BMN 165 を 4 週間投与し、4 週間の回復期間を設けた。

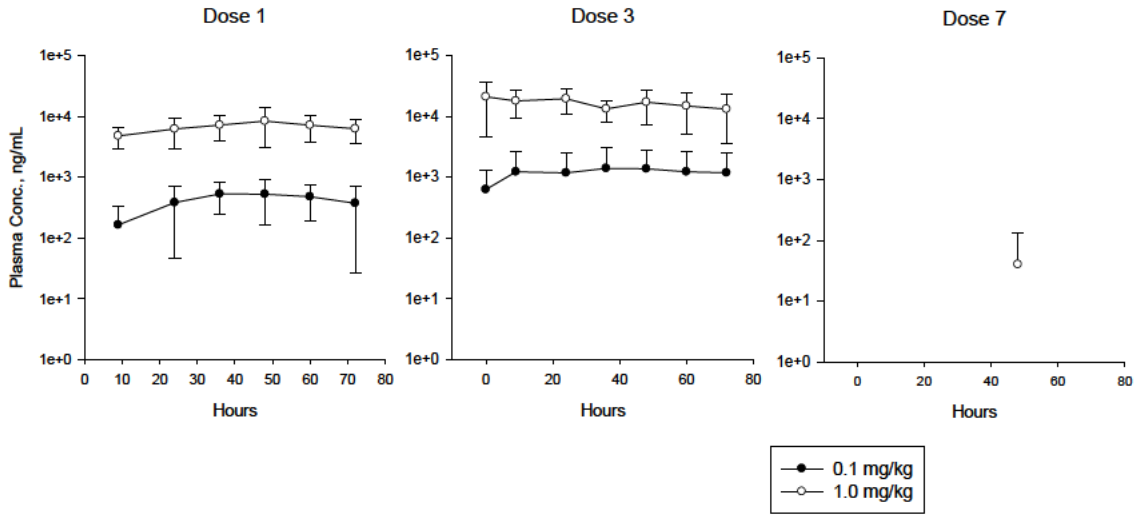
単回 SC 投与したときに得られた結果と同様に、1 週目（初回投与）において BMN 165 の曝露量は用量増加に伴って増加した。2 週目では血漿中濃度は更に増加し、蓄積率は約 3.7（1.1～14.4）であり、定常状態に達するまでの時間は利用可能なデータからは算出できなかった。4 週目では、3 用量全てにおいて血漿中濃度は 1 及び 2 週目と比較して顕著に低下し、低用量及び中用量では LLOQ（100 ng/mL）を下回って低下した（図 2.6.4.3-11、図 2.6.4.3-12 及び図 2.6.4.3-13）。これらの結果は PK パラメータにより裏付けられており（表 2.6.4.3-8、表 2.6.4.3-9 及び表 2.6.4.3-10）、これらの傾向は雌雄のサルで類似していた。

図 2.6.4.3-11 サルに BMN 165 を 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移



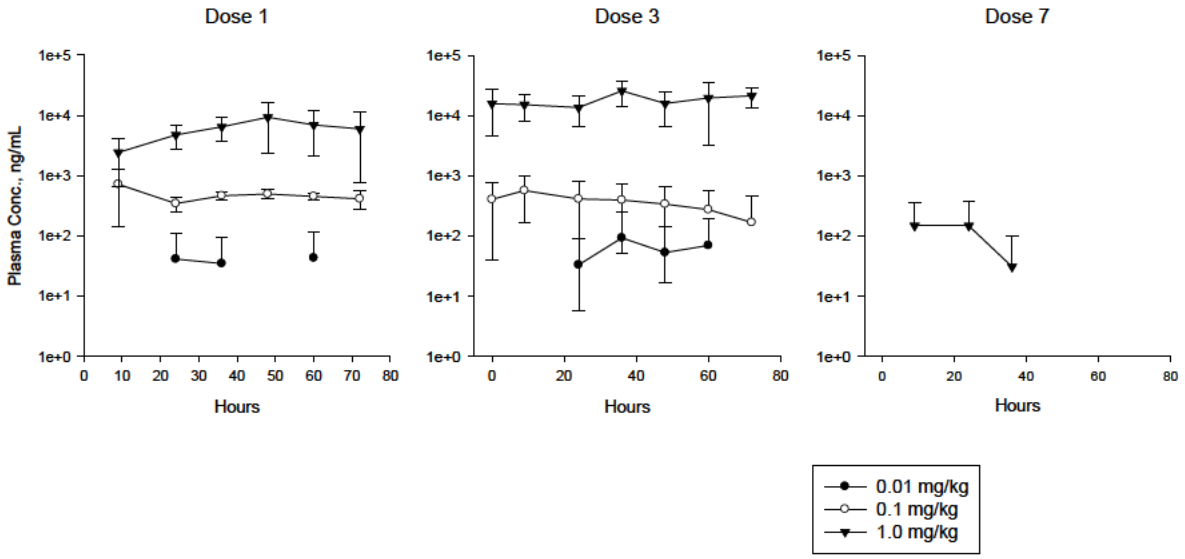
Each point represents mean with SD. n=6 (0.01 and 0.1 mg/kg/day) or n=10 (1.0 mg/kg/day)

図 2.6.4.3-12 雄サルに BMN 165 を 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. n=3 (0.1 mg/kg/day) or n=5 (1.0 mg/kg/day)

図 2.6.4.3-13 雌サルに BMN 165 を 28 日間 SC 投与したときの血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. n=3 (0.01 and 0.1 mg/kg/day) or n=5 (1.0 mg/kg/day)

表 2.6.4.3-8 サルにおける PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Dose	AUC_{0-t} (ng·hr/mL) (SD)	C_{max} (ng/mL) (SD)	T_{max} (hr) (SD)	Accumulation Index, Dose 3/Dose 1 (SD)
0.01	1	2318[a]	128[b]	42.0[b]	NA
	3	7890[a]	280[a]	36.0[a]	NA
0.1	1	30,066 (14,465)	689 (384)	33.0 (20.6)	NA
	3	70,062 (40,973)	1,079 (787)	26.5 (19.7)	3.59 (6.07)
1.0	1	425,366 (178,337)	9,873 (5372)	41.7 (13.7)	NA
	3	1,238,924 (397,836)	27,781 (12,193)	39.3 (29.2)	3.32 (1.67)

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; LLOQ: lower limit of quantitation; NA: not applicable, concentration levels <LLOQ; PK: pharmacokinetics; SD: standard deviation; T_{max}: time to maximum plasma concentration.

PK parameters from male and female monkeys (combined) receiving BMN 165 SC injections twice weekly over 28 days.

a) n=1

b) n=2

表 2.6.4.3-9 雄サルにおける PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Dose	AUC_{0-t} (ng·hr/mL) (SD)	C_{max} (ng/mL) (SD)	T_{max} (hr) (SD)	Accumulation Index, Dose 3/Dose 1 (SD)
0.01	1	NA	NA	NA	NA
	3	NA	NA	NA	NA
0.1	1	27,283 (19,308)	573 (331)	40.0 (6.9)	NA
	3	90,318 (42,579)	1,588 (778)	44.0 (6.9)	4.96 (8.15)
1.0	1	447,867 (200,984)	9,168 (4,664)	37.8 (16.9)	NA
	3	1,185,270 (409,625)	23,947 (13,931)	30.6 (28.2)	2.82 (0.69)

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; LLOQ: lower limit of quantitation; NA: not applicable, concentration levels <LLOQ; PK: pharmacokinetics; SD: standard deviation; T_{max}: time to maximum plasma concentration.
PK parameters from male monkeys receiving BMN 165 SC injections twice weekly over 28 days.

表 2.6.4.3-10 雌サルにおける PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Dose	AUC_{0-t} (ng·hr/mL) (SD)	C_{max} (ng/mL) (SD)	T_{max} (hr) (SD)	Accumulation Index, Dose 3/Dose 1 (SD)
0.01	1	2,318[a]	128[b]	42.0[b]	NA
	3	7,890[b]	280[b]	36.0[b]	NA
0.1	1	32,850 (11,270)	805 (469)	26.0 (29.4)	NA
	3	39,679[b]	570 (406)	9.0 (0)	1.54[b]
1.0	1	402,864 (172,912)	10,578 (6,476)	45.6 (10.0)	NA
	3	1,292,579 (425,589)	31,615 (10,181)	48.0 (30.6)	3.82 (2.27)

AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum plasma concentration; LLOQ: lower limit of quantitation; NA: not applicable, concentration levels <LLOQ; PK: pharmacokinetics; SD: standard deviation; T_{max}: time to maximum plasma concentration.
PK parameters from female monkeys receiving BMN 165 SC injections twice weekly over 28 days.
a) n=1
b) n=2

2.6.4.3.8 サルにおける 39 週間反復 SC 投与による毒性及び TK 試験

（CTD: 4.2.3.2-4、0165-07-030）

試験番号 0165-07-030 の試験では、カニクイザルにおける反復投与毒性試験及び TK 試験を実施した。合計 64 例のサルに 0、0.01、0.1、1.0、3.0 及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg/回の用量で週 2 回 39 週間 SC 投与し、コントロール群及び高用量の 2 群（3.0 及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg/回）のサブグル

ープには 13 週間の回復期間を設けた（表 2.6.4.3-11）。BMN 165 を投与したサルの血漿試料を 39 週間にわたり採取し、1 日目の初回投与（1 週目）及び 267 日目の最終投与（39 週目）の投与前～投与 72 時間後に PK 用の試料を採取した。

表 2.6.4.3-11 試験番号 0165-07-030 の試験において各群及び雌雄に用いた用量

Group[a]	Number of Animals[b]		Dose Level
	Male	Female	(mg/kg/dose)
1	8	8	0
2	3	3	0.01
3	3	3	0.1
4	3	3	1.0
5	7	7	3.0
6	8	8	7.0/5.0/3.0[c]

a) Group 1 received control article only.
b) Animals designated for recovery phase sacrifice (three animals/sex in Groups 1, 5, and 6) underwent 13 weeks of recovery following dose administration.
c) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/day on Days 1, 4, and 8; were not dosed on Days 11 and 15; were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18; were not dosed on Days 22 through 43; and resumed twice weekly dosing on Day 46 at 3.0 mg/kg/dose.

BMN 165 の初回投与及び最終週の投与後の試料から得られた PK パラメータのまとめを表 2.6.4.3-12 に示した。

表 2.6.4.3-12 試験番号 0165-07-030 の試験における PK パラメータのまとめ

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	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.						

表 2.6.4.3-12　試験番号 0165-07-030 の試験における PK パラメータのまとめ（続き）

$AUC_{0\text{-}72hr}$: area under the concentration-time curve from time 0 to 72 hr; C_{max}: maximum plasma concentration; N: number; NA: not applicabele; 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.

BMN 165 を 0.01～3.0 mg/kg の用量で単回投与したとき、血漿中 $AUC_{0\text{-}72hr}$ は用量比を上回って増加した。0.01 mg/kg の用量で最終投与したときの $AUC_{0\text{-}72hr}$ の平均値は BLQ であり、用量比例性は 0.1～3.0 mg/kg の用量の範囲でのみ評価可能であった。0.1 mg/kg から 1.0 及び 3.0 mg/kg に用量を 10 及び 30 倍増加させたとき、$AUC_{0\text{-}72hr}$ はそれぞれ 28.5 及び 1210 倍増加した。全般的に投与期間中の 39 週目の $AUC_{0\text{-}72hr}$ 及び C_{max} の値を 1 週目の値と比較したとき、BMN 165 の蓄積は認められなかった。蓄積率（$AUC_{0\text{-}72hr,\ Week\ 39}/AUC_{0\text{-}72hr,\ Week\ 1}$ 及び $C_{max,\ Week\ 39}/C_{max,\ Week\ 1}$）は 3.0 mg/kg/回の用量で投与した 2 例の雌サルでそれぞれ 2.54 及び 3.38 であったが、その 2 例を除くとおおむね 1.0 未満であった。

コントロール群の全てのサル及び 0.01 mg/kg/回の用量で投与したサルは中和抗体の検査結果は陰性のままであった。他の全てのサルは 0.1 mg/kg/回の用量で投与した 1 例の雌及び 7.0 mg/kg/回の用量で投与した 1 例の雌（予定外の早期の屠殺）を除き、中和抗体の検査結果は陽性であった。一方、抗 BMN 165 IgG 抗体と BMN 165 に対する中和抗体との間の相関性は中和抗体陽性のサルが少数であったため明確ではなかった。

BMN 165 を 1.0 mg/kg/回以上の用量で投与したサルの初回投与後の血漿中 Phe 濃度は投与後 9 時間以内に中程度から顕著に低下し、投与期間中の 11 又は 15 日目を通してこれらのサルのほとんどで顕著に低下したままであった。0.1 mg/kg 投与群では、Phe 濃度は投与期間中の試験 1 週目に数例のサルで軽度に低下した。Phe 濃度は投与期間中の試験 22 日目までにコントロール群のサルの濃度まで回復し、1.0 mg/kg/回以上の用量で投与したサルのほとんどで投与期間中の終了時付近までその状態が維持されていた。

2.6.4.3.9 生殖発生 TK 試験

2.6.4.3.9.1 ラットにおける反復投与による毒性及び TK 試験（受胎能及び胚・胎児発生に関する試験）

（CTD: 4.2.3.5.1-1、BMN165-12-037）

試験番号 BMN165-12-037 の試験では、ラットにおける BMN 165 の SC 投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する試験を実施した。検討した用量はグループ 1～4 でそれぞれ 0、2、8 又は 20 mg/kg/日とした。雄に馴化前に投与を開始して、雌との馴化期間中に 41 日間（約 6 週間）投与し、安楽死前日までの継続期間中に少なくとも合計 77 回投与した。雌には雄との馴化前に投与を開始して、馴化期間中に 28 日間（約 4 週間）投与し、妊娠 17 日までの継続期間中に少なくとも合計 47 回投与した。

BMN 165 のトラフにおける血漿中濃度を測定するための血液試料を 12 匹の雄ラットでは試験 1、8、15、22、29、43、64 日及び剖検前に 12 匹の雌ラットでは試験 1、8、15、22、29 日／妊娠 0、12 及び 21 日に採取した。妊娠 21 日に TK 用ラットの 4 胎児／同腹児から血液試料を採取した。

用量及び雌雄で層別した各時点の BMN 165 濃度の平均値（標準偏差）を表 2.6.4.3-13 に示した。

表 2.6.4.3-13 BMN 165 を 1 日 1 回 SC 投与したときの雌雄ラット及び胎児における血漿中濃度の平均値（標準偏差）

Gender	Dose (mg/kg)	Mean (SD) Plasma BMN 165 Concentration (ng/mL)[a]							
		DS 1	**DS 8**	**DS 15**	**DS 22**	**DS 29**	**DS 43**	**DS 64**	**DS 79**
Male	**2**	0.00	1,480 (2,563)	0.00	0.00	0.00	0.00	153 (266)	3,162 (3,362)
	8	0.00	1,260 (2,182)	0.00	1,008 (1,673)	2,533 (2,989)	29,833 (13,973)	27,067 (3,721)	20,400 (7,006)
	20	0.00	40,967 (47,945)	43,200 (36,715)	122,467 (53,772)	100,700 (63,200)	179,000 (44,034)	217,667 (65,010)	266,667 (58,432)
Female	**Dose (mg/kg)**	**DS 1**	**DS 8**	**DS 15**	**DS 22**	**DS 29/ DG 0[b]**	**DG 12**	**DG 21**	**DG 21 (Fetal)**
	2	0.00	6,267 (10,854)	6,967 (12,067)	7,367 (12,759)	5,961 (9,570)	9,280 (8,262)	7,397 (4,683)	0.00
	8	0.00	44,967 (23,247)	6,455 (5,585)	53,100 (43,422)	83,533 (35,570)	69,567 (25,353)	57,800 (33,700)	0.00
	20	0.00	135,633 (89,092)	156,500 (111,365)	302,667 (62,517)	322,667 (56,871)	349,333 (73,528)	395,667 (11,060)	202 (286)
Additional Information:	Note: Male animals were administered once-daily for 78 days, then euthanized and necropsied on DS 79. Female animals were administered once-daily doses from DS 1 through DG 17; terminal C-sections occurred on DG 21. Cohabitation of male and female animals began on DS 42 (male) and DS 29 (female).								

DS: day of study; DG: day of presumed gestation; SD: standard deviation.

a) All samples taken before dosing (pre-dose)

b) F_0 generation female rats were bled on 17 December 2012 (which was equivalent to DS 29 or DG 0). The intent was to collect a sample before the 29th dose of the test or control article. Because cohabitation began on 16 December 2012, some rats mated and therefore their study day was DG 0 on 17 December 2012.

雌雄ラットのトラフにおける血漿中 BMN 165 濃度はおおむね用量比例性を上回って増加した。血漿中 BMN 165 濃度は 8 mg/kg/日投与群では低下傾向又は比較的一定のままであったのに対し、20 mg/kg/日群では試験期間を通して増加傾向を示した。8 mg/kg/日群の雌ラットにおける 29 日目でのトラフにおける血漿中 BMN 165 濃度は雄と比較して 33 倍高かったが、雄ラットの 64 日目での値と雌ラットの妊娠 21 日での値はおおむね同程度であった。雌ラットの 20 mg/kg/日群の妊娠 12 日でのトラフにおける血漿中 BMN 165 濃度は雄ラットの 20 mg/kg/日群の 43 日目での値よりも約 2 倍高かった。雌雄ラットにおいて、2 mg/kg/日群ではおおむね曝露量は低く、性差はないと考えられた（表 2.6.4.3-13）。胎児への BMN 165 の曝露は 20 mg/kg/日群の 2 匹の同腹児のうち 1 匹のみで認められ、値は 404 ng/mL であり、他の全ての群の曝露量は BLQ であった。

雄ラットの 2、8 及び 20 mg/kg/日群でそれぞれ 52%（13/25 匹）、20%（5/25 匹）及び 16%（4/25 匹）に投与期間中の試験期間を通して血清中抗 PAL IgG 抗体の産生が認められた。雌ラットの 2 mg/kg/日群では、36%（10/28 匹）に血清中抗 PAL IgG 抗体の産生が認められたが、雌ラットの 8 及び 20 mg/kg/日群では血清中抗 PAL IgG 抗体の産生は試験期間を通して認められなかった。最低用量でトラフにおける血漿中 BMN 165 濃度がより低下したことには、抗 PAL IgG 抗体の産生がより高まることが関連している可能性が考えられる。

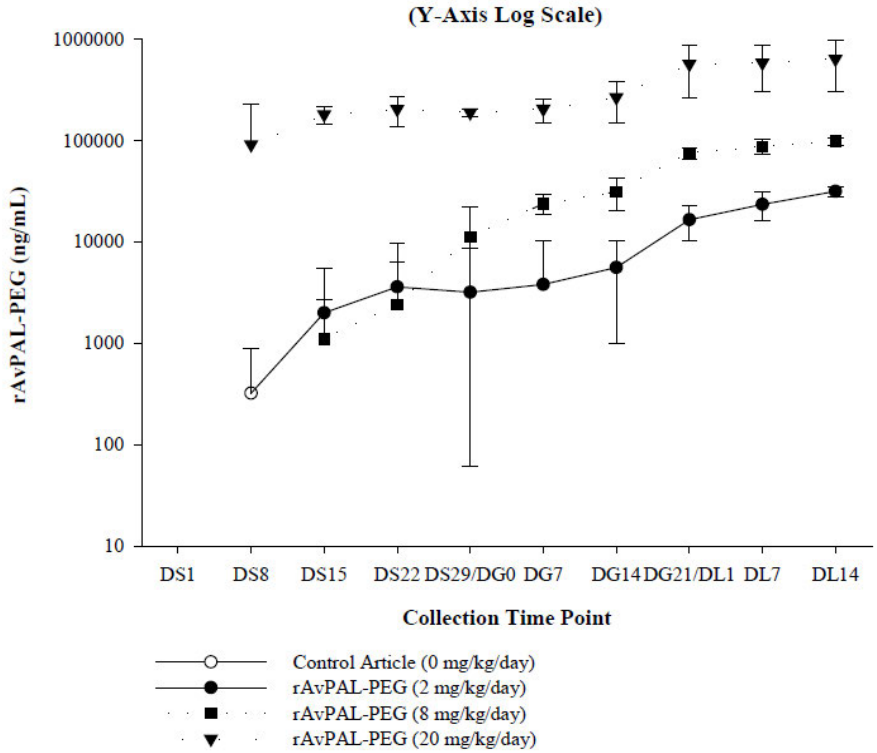
2.6.4.3.9.2 ラットにおける反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（出生前及び出生後の発生に関する試験）

（CTD: 4.2.3.5.3-1、BMN165-14-013）

試験番号 BMN165-14-013 の試験では、ラットにおける BMN 165 の SC 投与による出生後の行動／機能の評価を含む出生前／出生後の生殖発生毒性試験を実施した。1 群 25 匹、4 群で合計 100 匹のラットに BMN 165 を 0、2、8 又は 20 mg/kg/日の用量で投与した。F_0 世代の雌ラットに雄との馴化 28 日前に BMN 165 及び／又はコントロール製剤の 1 日 1 回 SC 投与を開始し、馴化期間中及び安楽死（授乳 14 日）前日まで投与を継続した。母ラットの血液試料を 1、8、15、22、29 日目／妊娠 0、7、14、21 日／授乳 1、7 及び 14 日の投与前に採取した。出生児の血液試料を分娩 14 日後に 4 出生児／同腹児から採取した。

各時点での BMN 165 濃度の平均値（±標準偏差）を図 2.6.4.3-14 に示した。授乳 14 日での F_0 母ラットの血漿中及び乳汁中 BMN 165 濃度の平均値（標準偏差）を表 2.6.4.3-14 に示した。

図 2.6.4.3-14　F_0 世代の雌 Sprague Dawley ラットに BMN 165 を 1 日 1 回 SC 投与したときの血漿中濃度の平均値（±標準偏差）推移



Each point represents with SD. n=3 (control article), n=3 (rAvPAL-PEG, 2 mg/kg/day), n=3 (rAvPAL-PEG, 8 mg/kg/day), n=2-3 (rAvPAL-PEG, 20 mg/kg/day)
DS: day of study; DG: day of presumed gestation; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

表 2.6.4.3-14 F_0 世代の雌 Sprague Dawley ラットに BMN 165 を 1 日 1 回 SC 投与したときの血漿中濃度の平均値（標準偏差）

Matrix			Plasma Concentration (ng/mL)			Breast Milk Concentration (ng/mL)		
Assay			ELISA			ECLA		
Group	Dose (mg/kg/day)	Lactation Day	n	Mean	SD	n	Mean	SD
2	2	14	3	31,533	3,669	5	153[a]	NA
3	8	14	3	98,633	8,792	5	612	399
4	20	14	3	553,000	278,124	5	1,490	405
Additional Information:			Female F_0 rats were administered once-daily SC injections starting on DS 1; each animal received a minimum of 70 doses.					

DS: day of study; ECLA: electrochemiluminesence assay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; NA: not applicable; SC: subcutaneous; SD: standard deviation.

a) Single sample resulted in quantifiable levels of BMN 165, 4 sample results were below the quantifiable limits of the method (n=5 samples/group).

投与前の血漿中 BMN 165 濃度の平均値は試験期間を通して用量に伴って増加した。BMN 165 を 8 mg/kg/日の用量で投与したとき、TK 試験に用いた 3 匹のラットの全てにおいて血漿中 BMN 165 濃度は授乳 14 日の時点で測定可能であり、平均値は 98,633 ng/mL（標準偏差=8,792）であった。また、BMN 165 を 20 mg/kg/日の用量で投与したとき、TK 試験に用いた 3 匹のラットの全てにおいて血漿中 BMN 165 濃度は授乳 14 日の時点で測定可能であり、平均値は 553,000 ng/mL（標準偏差=278,124）であった。BMN 165 は全ての用量で妊娠及び授乳期間中、用量依存的に Phe 濃度を低下させた。

BMN 165 を 2 mg/kg/日の用量で投与した 5 匹の母ラットのうち 1 匹で乳汁中 BMN 165 濃度は測定可能であり、平均値は 153 ng/mL であった。BMN 165 を 8 mg/kg/日の用量で投与した母ラットの乳汁中 BMN 165 濃度は測定可能であり、平均値は 612 ng/mL（標準偏差=399）であった。BMN 165 を 20 mg/kg/日の用量で投与した母ラットの乳汁中 BMN 165 濃度は測定可能であり、平均値は 1,490 ng/mL（標準偏差=405）であった。TK 試験で BMN 165 を 2 mg/kg/日の用量で投与した 3 匹のラットの全てにおいて、血漿中 BMN 165 濃度は授乳 14 日の時点で測定可能であり、平均値は 31,533 ng/mL（標準偏差=3669）であった。

出生児（F_1 世代）の分娩 14 日後の血漿中 BMN 165 濃度は測定不能であった。

2.6.4.3.9.3　ウサギにおける反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（胚・胎児発生に関する DRF 試験）

（CTD: 4.2.3.5.2-1、BMN165-11-027）

試験番号 BMN165-11-027 の試験では、雌ウサギにおいて BMN 165 を SC 投与したときの DRF を検討する胚・胎児発生に関する毒性試験を実施した。BMN 165 を 2、5 及び 20 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 SC 投与したときの単回及び反復投与による PK を評価した。

30 匹のウサギを 10 群に分け（n=3/群）、溶媒（グループ 1）又は BMN 165（グループ 2～10）を 1 日 1 回 SC 投与した。グループ 2～4、5～7 及び 8～10 にはそれぞれ 2、20 及び 5 mg/kg の用量で投与した。グループ 1、2、5 及び 8 には妊娠 7～20 日から胚・胎児期全体の期間、溶媒又は BMN 165 を 1 日 1 回投与した。グループ 3 及び 4 にはそれぞれ妊娠 7～14 日及び妊娠 13～20 日に投与した。グループ 6 及び 9 には妊娠 11～16 日、グループ 7 及び 10 には妊娠 15～20 日に投与した。投与及び TK 試料採取の詳細を表 2.6.4.3-15 に示した。

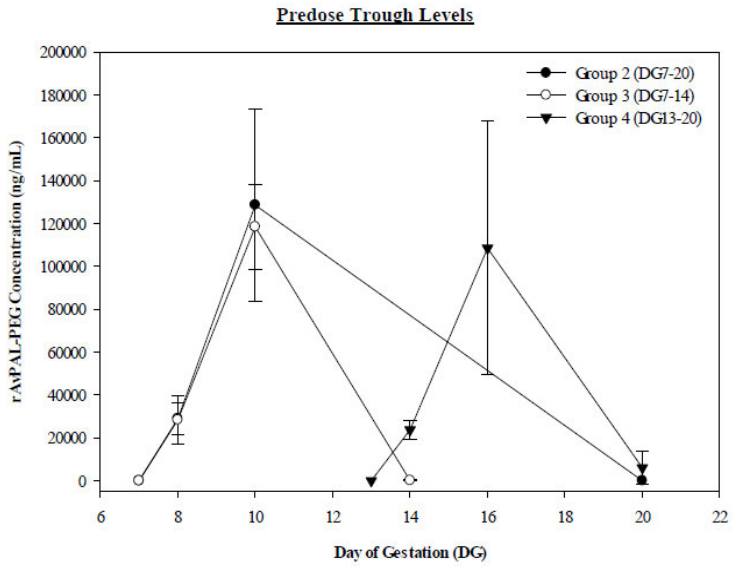
表 2.6.4.3-15 試験番号 BMN165-11-027 の試験におけるデザイン及び TK 試料採取のまとめ

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg)	Days of Dose Administration (DG)	Intensive PK[a] (DG)	Trough PK[b] (DG)	No. of Study Animals	No. of TK Animals
1	Control Article	0	7-20	7, 20	10	10	3
2	BMN 165	2	7-20	7, 20	10	10	3
3	BMN 165	2	7-14	7, 14	10	10	3
4	BMN 165	2	13-20	13, 20	16	10	3
5	BMN 165	20	7-20[c]	7, 20[c]	10, 11, 12, 14, 16, 18	10	3[c]
6	BMN 165	20	11-16	11, 16	14, 15	10	3
7	BMN 165	20	15-20	15, 20	18, 19	10	3
8	BMN 165	5	7-20	7, 20	10, 11, 12, 14, 16, 18	10	3
9	BMN 165	5	11-16	11, 16	14, 15	10	3
10	BMN 165	5	15-20	15, 20	18, 19	10	3

DG: day of presumed gestation; PK: pharmacokinetics; TK: toxicokinetics.
a) Intensive PK samples were collected at pre-dose, 4 hr, 8 hr, 12 hr, 18 hr, 24 hr, 48 hr (DG 20 only), 72 hr (DG 20 only), 96 hr (DG 20 only), 120 hr (DG 20 only), and 168 hr (DG 20 only) time points.
b) Trough PK samples were collected pre-dose on DG 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18 and 19.
c) Due to unscheduled terminal procedures occurring on DG 18 for all animals in Group 5, dosing and sample collection past DG 18 were not possible.

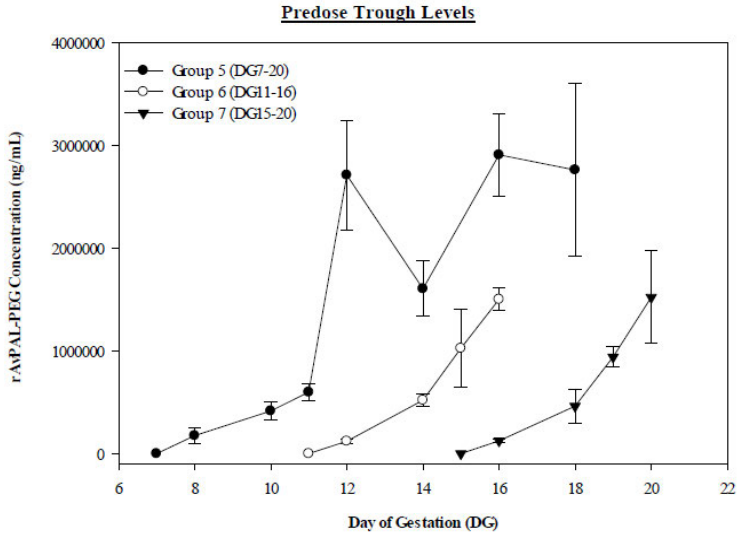
BMN 165 を 2、20 及び 5 mg/kg の用量で投与したときの各妊娠日齢でのトラフにおける血漿中濃度をそれぞれ図 2.6.4.3-15、図 2.6.4.3-16 及び図 2.6.4.3-17 に示した。BMN 165 の PK パラメータの平均値（標準偏差）を表 2.6.4.3-16 に示した。

図 2.6.4.3-15　雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を 2 mg/kg の用量で妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの投与前のトラフにおける血漿中濃度推移



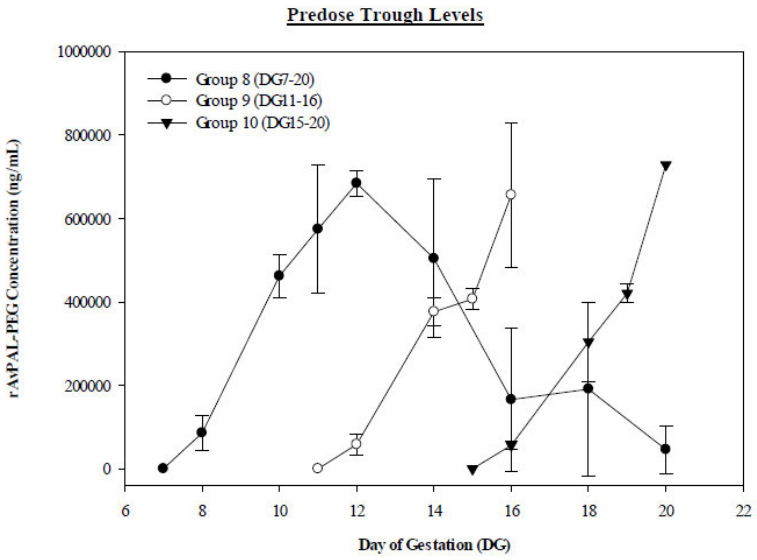
Each point represents mean with SD. n=3/group/time point
DG: day of presumed gestation; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

図 2.6.4.3-16　雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を 20 mg/kg の用量で妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの投与前のトラフにおける血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. n=3/group/time point
DG: day of presumed gestation; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

図 2.6.4.3-17　雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を 5 mg/kg の用量で妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの投与前のトラフにおける血漿中濃度推移



Each point represents mean with SD. n=3/group/time point
DG: day of presumed gestation; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase, BMN 165; SD: standard deviation.

表 2.6.4.3-16 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの PK パラメータの平均値（標準偏差）

PK Parameter			C_{max} (ng/mL)[a]		T_{max} (hr)[a]		AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)		AR	
Group	Dose (mg/kg)	Day of Gestation	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
2	2	7	28,933	7,557	24	0	246,499	60,972	–	–
		20[b]	–	–	–	–	–	–	–	–
3		7	28,333	11,140	24.0	0.0	255,153	53,523	–	–
		14	287	206	8.0	4.0	2,497	2,689	0.012	0.015
4		13	23,767	4,277	24.0	0.0	236,841	78,413	–	–
		20	6,447	7,322	4.0	6.9	31,333	15,127	0.160	0.134
5	20	7	175,333	74,501	24.0	0.0	1,540,675	835,831	–	–
		20[c]	–	–	–	–	–	–	–	–
6		11	121,700	23,381	24.0	0.0	902,140	171,863	–	–
		16	2,270,000	357,631	18.67	9.24	42,746,667	5,205,856	47.8	3.68
7		15	125,000	16,371	24.0	0.0	821,924	135,163	–	–
		20	1,800,000	376,431	2.67	2.31	32,163,333	6,820,076	39.6	9.56

表 2.6.4.3-16 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を妊娠期間中に 1 日 1 回 SC 投与したときの PK パラメータの平均値（標準偏差）（続き）

PK Parameter			C_{max} (ng/mL)[a]		T_{max} (hr)[a]		AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)		AR	
Group	Dose (mg/kg)	Day of Gestation	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
8	5	7	77,667	33,307	22.0	3.5	667,767	233,542	–	–
		20	64,660	51,990	2.7	4.6	872,383	715,862	1.30	1.23
9		11	59,633	22,107	22.0	3.5	635,113	148,866	–	–
		16	767,667	86,234	10.7	12.2	13,367,667	1,790,769	21.7	4.83
10		15	59,000	11,004	22.0	3.5	583,740	215,940	–	–
		20	744,000	247,586	10.0	7.2	12,697,333	4,265,097	22.1	3.92

AR: accumulation ratio; AUC_{0-24hr}: area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hr; BLQ: below the limit of quantitation; C_{max}: maximum plasma concentration; DG: day of presumed gestation; PK: pharmacokinetics; SD: standard deviation; T_{max}: time to maximum plasma concentration.

a) C_{max} and T_{max} were based on sample collections that occurred pre-dose through 24 hours post-dose.

b) Plasma concentrations of BMN 165 were all BLQ (<50 ng/mL) for the last dose on DG 20 for Group 2.

c) Due to unscheduled terminal procedures occurring on DG 18 for all animals in Group 5, dosing and collecting samples after DG 18 were not possible.

BMN 165 を 5 及び 20 mg/kg/日の用量で投与したとき、曝露量は投与後 24 時間増加し、トラフにおける血漿中濃度は少なくとも 5 日間おおむね増加が持続した。2 mg/kg/日投与群では、トラフにおける血漿中濃度は妊娠 10 日（グループ 2 及び 3）及び妊娠 16 日（グループ 4）まで増加した。妊娠 14 日（グループ 3）及び妊娠 20 日（グループ 2 及び 4）の最終投与後では、C_{24hr} と比較してトラフにおける血漿中濃度は顕著に低下した。いずれの用量（グループ 2～10 の 2、5 又は 20 mg/kg/日）においても定常状態には達しなかった。

2 mg/kg/日の用量では、反復投与したときに蓄積は認められず、蓄積率の平均値はグループ 3 では妊娠 14 日で 0.012 であり、グループ 4 では妊娠 20 日で 0.160 であった。グループ 2 では妊娠 20 日で最終投与後の血漿中濃度が全て BLQ（50 ng/mL 未満）であったため、蓄積率は算出できなかった。

5 mg/kg/日の用量では、蓄積率の平均値はグループ 8 では妊娠 20 日で 1.30、グループ 9 及び 10 では妊娠 16 及び 20 日でそれぞれ約 22 であった。20 mg/kg/日の用量では、蓄積率の平均値はグループ 6 では妊娠 16 日で 47.8 であり、グループ 7 では妊娠 20 日で 39.6 であった。グループ 5 の全てのラットについて、妊娠 18 日に予定外に試験を終了したため、妊娠 20 日での計画していた最終投与時の PK 試料採取は行わなかった。高用量の 2 用量では、抗体産生による CL 作用を乗り越えるかのように BMN 165 のトラフにおける血漿中濃度の平均値は LLOQ を上回り、妊娠 20 日で明らかな蓄積が認められた。

2 mg/kg/日群の妊娠 15 日に採取した試料でのみ胎児の血漿中 BMN 165 濃度は測定可能であった。他の全ての胎児の血漿試料は妊娠 27 日に採取したが、恐らく抗体による CL 作用のため BMN 165 濃度は測定できなかった。

2.6.4.3.9.4 ウサギにおける反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（胚・胎児発生に関する試験、最終試験）

（CTD: 4.2.3.5.2-2、BMN165-12-036）

試験番号 BMN165-12-036 の試験では、雌ウサギにおける BMN 165 の SC 投与による胚・胎児発生に関する試験を実施した。BMN 165 を 2 及び 5 mg/kg の用量で 1 日 1 回 SC 投与した後、BMN 165 のトラフにおける血漿中濃度を測定した。

21 匹のウサギを 7 群に分け（n=3/群）、溶媒（グループ 1）又は BMN 165（グループ 2～7）を 1 日 1 回 SC 投与した。胚・胎児発生の全期間を通して確実に曝露させるため、BMN 165 を 2 又は 5 mg/kg/日の用量で妊娠 7～12 日（グループ 2 及び 5）、妊娠 11～16 日（グループ 3 及び 6）又は妊娠 15～20 日（グループ 4 及び 7）に投与した。以前に実施した DRF 試験で投与 7 日後に曝露は低下することが確認されたことから、投与期間を分割することにより、投与期間を通して確実に曝露させた。

投与及び TK 試料採取のスケジュールの詳細を表 2.6.4.3-17 に示した。ウサギ血漿中における各グループ及び用量でのトラフにおける血漿中 BMN 165 濃度の平均値（標準偏差）を表 2.6.4.3-18 に示した。

表 2.6.4.3-17 試験番号 BMN165-12-036 の試験におけるデザイン及び TK 試料採取のまとめ

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Days of Dose Administration (DG)	Trough PK[d] (DG)	No. of Study Animals	No. of TK Animals
1	Control Article	0	7-20	8, 14, 16	20	3
2	BMN 165	2	7-12	8, 10, 13	20	3
	Control Article[a]	0	13-20[a]	19[a]	20	3
3	Control Article[b]	0	7-10, 17-20[b]	19[b]	20	3
	BMN 165	2	11-16	12, 14, 17	20	3
4	Control Article	0	7-14	-	20	3
	BMN 165	2	15-20	16, 18, 21[c]	20	3
5	BMN 165	5	7-12	8, 10, 13	20	3
	Control Article[a]	0	13-20[a]	19[a]	20	3
6	Control Article[b]	0	7-10, 17-20[b]	19[b]	20	3
	BMN 165	5	11-16	12, 14, 17	20	3
7	Control Article	0	7-14	-	20	3
	BMN 165	5	15-20	16, 18, 21[c]	20	3

DG: day of presumed gestation; PK: pharmacokinetics; TK: toxicokinetics; -: not applicable.

a) TK rabbits in Groups 2 and 5 were not administered the control article on Days 19 or 20 of presumed gestation (DGs 19 or 20) as these rabbits were euthanized on DG 19 at which time a fetal sample was obtained for analysis.

b) TK rabbits in Groups 3 and 6 were not administered the control article on DGs 19 or 20 as these rabbits were euthanized on DG 19 at which time a fetal sample was obtained for analysis.

c) Maternal rabbits were euthanized on DG21, at which time maternal and fetal samples were obtained for analysis.

d) PK samples were collected pre-dose on DGs 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 24 hours, and post-dose on DGs 13, 17 and 21.

表 2.6.4.3-18 雌 New Zealand White ウサギに BMN 165 を妊娠期間中（妊娠 7～12 日、妊娠 11～16 日及び妊娠 15～20 日）に 1 日 1 回 SC 投与したときの血漿中濃度（ng/mL）の平均値（標準偏差）

Group	Dose (mg/kg/day)	Dose Period (DG)	DG Sampling Time Points			
			8 (0 hr)	10 (0 hr)	13 (24 hr)	19 (Fetal)
2	2	7-12	23,567 (379)	NA	94,100 (94,611)	279 (123)
5	5	7-12	60,350 (19,021)	99,050 (138,522)	438,667 (127,222)	1,160 (570)
Group	**Dose (mg/kg/day)**	**Dose Period (DG)**	**DG Sampling Time Points**			
			12 (0 hr)	**14 (0 hr)**	**17 (24 hr)**	**19 (Fetal)**
3	2	11-16	8,060 (10,949)	117,767 (26,404)	51,067 (32,853)	317 (28)
6	5	11-16	1,450 (257)	200,667 (46,458)	300,333 (84,311)	1,240 (190)
Group	**Dose (mg/kg/day)**	**Dose Period (DG)**	**DG Sampling Time Points**			
			16 (0 hr)	**18 (0 hr)**	**21 (24 hr)**	**21 (Fetal)**
4	2	15-20	20,267 (1,701)	96,267 (30,027)	98,033 (68,877)	576 (51)
7	5	15-20	53,767 (3,456)	239,000 (36,000)	403,667 (41,789)	567 (369)

DG: day of presumed gestation; PK: pharmacokinetics; TK: toxicokinetics; NA: not applicable.

投与期間を分割することにより、妊娠期間を通して BMN 165 を確実に曝露させた。2 及び 4 回目投与並びに最終投与の投与前の BMN 165 濃度の平均値は 2 又は 5 mg/kg/日の用量間でおおむね同程度であった。2 mg/kg/日では投与前の BMN 165 濃度の平均値は 2 回目投与前から 4 回目投与前に増加し、最終投与前では同程度であった。対照的に 5 mg/kg/日では投与前の濃度は最終投与まで増加が持続し、定常状態には達しなかった。最終投与の投与前の BMN 165 濃度は用量を 2 mg/kg/日から 5 mg/kg/日に 2.5 倍に増加させたとき、4.1～5.9 倍に増加した（表 2.6.4.3-18）。グループ 2 及び 5 では、2 及び 5 mg/kg/日投与群の両方において、血漿中 Phe 濃度の平均値は妊娠 8、10 及び 13 日で顕著に低下したか又は BLQ（1.00 µmol/L 未満）であった。グループ 3 及び 6 では、2 及び 5 mg/kg/日投与群の両方において、Phe 濃度は妊娠 12、14 及び 17 日に顕著に低下したか又は BLQ であった。グループ 4 及び 7 では、2 及び 5 mg/kg/日投与群の両方において、Phe 濃度は妊娠 16、18 及び 21 日に顕著に低下するか又は BLQ であった。

グループ 2、3、5 及び 6 では妊娠 19 日に、グループ 4 及び 7 では妊娠 21 日に胎児の血漿中 BMN 165 濃度を測定した。胎児における BMN 165 濃度の平均値は 2 mg/kg の用量（グループ 2、3 及び 4）で 279～576 ng/mL であり、5 mg/kg の用量（グループ 5、6 及び 7）で 567～1,240 ng/mL であった。

2.6.4.4　分布

BMN 165 は高分子のタンパク質製剤であることから、臓器内及び組織内濃度に関する試験並びに血漿中のタンパク結合及び血球への分配に関する試験は実施しなかった。

胎盤・胎児移行性に関して、ラット及びウサギにおける生殖発生 TK 試験において、BMN 165 の胎児への曝露が認められ（詳細は 2.6.4.3.9.1 及び 2.6.4.3.9.4 参照）、BMN 165 は胎盤を移行することが示された。

2.6.4.5　代謝（動物種間の比較）

BMN 165 は高分子のタンパク質製剤であり、ペプチド及びアミノ酸に代謝されると考えられることから、代謝に関する試験は実施しなかった。

2.6.4.6　排泄

BMN 165 は高分子のタンパク質製剤であり、ペプチド及びアミノ酸に異化されることにより排泄されると考えられることから、排泄の経路及び程度に関する試験は実施しなかった。

ラットでの反復投与による生殖発生毒性及び TK 試験（出生前及び出生後の発生に関する試験）において、母ラット乳汁中に BMN 165 が定量され（詳細は 2.6.4.3.9.2 参照）、BMN 165 は乳汁中に移行することが示された。

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

薬物動態学的相互作用に関する試験は実施しなかった。BMN 165 の代謝から、他の薬剤と相互作用する可能性は低いと考えられる。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施しなかった。

2.6.4.9　考察及び結論

ENU2 マウス、ラット及びサルにおいて、BMN 165 を SC 投与したとき、血漿中濃度推移及び PK パラメータは類似していた。

（a）血漿中濃度推移の片対数プロットから終末相では 1 相性に消失することが示された。

（b）SC 投与したとき、C_{max} に達するまでの時間（T_{max}）は長く、$t_{1/2}$ も長いことが示された。

（c）ENU2 マウスにおいて、AUC 及び C_{max} は雄と比較して雌でそれぞれ約 3.1 及び 3.5 倍高かったが、ラットに単回 SC 又は IV 投与及びサルに単回 SC 投与したとき、PK パラメータに性差は認められなかった。

（d）ラット及びサルにおいて、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た。

（e）サルに BMN 165 を反復投与したとき、2 週目において BMN 165 の蓄積が認められたが、ラットでは認められなかった。両動物種において、BMN 165 の曝露量は反復投与により、初回投与後に 28 日間の投与期間中、時々低値を示した。

（f）ENU2 マウスにおいて、BMN 165 を 2 mg/kg の用量で 14 日目まで投与し、続いて 4 mg/kg の用量で 36 日目まで投与し、用量で補正したとき、BMN 165 の蓄積が認められた。

ラット及びサルの両方において、初回投与後、反復投与により血漿中 BMN 165 濃度の低下が認められ、低下した理由の仮説として、BMN 165 に対する免疫反応による可能性が高いと考えられた。免疫反応はサルよりもラットにおいてより早期に発現し、持続は短かった。

ラット、ウサギ、サル及びヒトにおける曝露量及び用量に基づく安全係数を表 2.6.4.9-1 に示した。

表 2.6.4.9-1 曝露量及び用量に基づく安全係数

Species Study Number	Dose level and Duration	Clinical dose (mg/day)	Mean AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	Mean C_{trough} (ng/mL)	Exposure-based safety factor[a]			Dose-based safety factor[a]		
					Human 20 mg/day	Human 40 mg/day	Human 60 mg/day	Human 20 mg/day	Human 40 mg/day	Human 60 mg/day
Rat 0165-07-009	8 mg/kg twice weekly for 4 weeks[f]	n/a	158,404	n/a	0.2	0.2	n/a	6.9	3.4	2.3
Rat 0165-07-009	25 mg/kg twice weekly for 4 weeks[g]	n/a	2,755,085	n/a	3.5	3.7	n/a	21.4	10.7	7.1
Rat 0165-08-019	1 mg/kg twice weekly for 26 weeks[g]	n/a	67,470	n/a	0.1	0.1	n/a	0.9	0.4	0.3
Rat 0165-08-019	8 mg/kg twice weekly for 26 weeks[f]	n/a	1,036,762	n/a	1.3	1.4	n/a	6.9	3.4	2.3
Monkey 0165-07-008	0.01 mg/kg twice weekly for 4 weeks[g]	n/a	7,890	n/a	0.01	0.01	n/a	0.009	0.004	0.003
Monkey 0165-07-030	1 mg/kg twice weekly for 39 weeks[g]	n/a	928,020	n/a	1.2	1.3	n/a	0.9	0.4	0.3
Monkey 0165-07-030	3 mg/kg twice weekly for 39 weeks[f]	n/a	2,334,176	n/a	3.0	3.2	n/a	2.6	1.3	0.9
Rat BMN165-12-037	8 mg/kg/day; Males-41 days precohabitation, 77 days total. Females-28 days precohabitation through GD 17[f]	n/a	n/a	70,300[b]	10.3	9.8	14.8	24	12	8

表 2.6.4.9-1 曝露量及び用量に基づく安全係数（続き）

Species Study Number	Dose level and Duration	Clinical dose (mg/day)	Mean AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	Mean C_{trough} (ng/mL)	Exposure-based safety factor[a]			Dose-based safety factor[a]		
					Human 20 mg/day	Human 40 mg/day	Human 60 mg/day	Human 20 mg/day	Human 40 mg/day	Human 60 mg/day
Rat BMN165-12-037	20 mg/kg/day Males-41 days precohabitation, 77 days total. Females-28 days precohabitation through GD 17[g]	n/a	n/a	355,889[b]	52.3	49.4	74.7	60	30	20
Rat BMN165-14-013	2 mg/kg/day for 28 days precohabitation through weaning[g]	n/a	n/a	31,533	4.6	4.4	6.6	6	3	2
Rat BMN165-14-013	8 mg/kg/day for 28 days precohabitation through weaning[g]	n/a	n/a	98,633	14.5	13.7	20.7	24	12	8
Rat BMN165-14-013	20 mg/kg/day for 28 days precohabitation through weaning[f]	n/a	n/a	553,000	81.2	76.8	116.1	60	30	20
Rabbit BMN165-12-036	2 mg/kg/day GDs 7-12, 11-16, 15-20[i]	n/a	n/a	63,641[c]	9.3	8.8	13.4	6	3	2
Rabbit BMN165-12-036	5 mg/kg/day GDs 7-12, 11-16, 15-20	n/a	n/a	199,661[c]	29.3	27.7	41.9	15	7.5	5
Human	n/a	20	262,182	6,810.7[d]	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Human	n/a	40	246,783	7,199.6[d]	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Human	n/a	60	n/a	4,762.2[e]	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

AUC_{0-24hr}: area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hr; AUC_{0-72hr}: area under the concentration-time curve from time 0 to 72 hr; AUC_{0-t}: area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{trough}: trough plasma concentration; $C_{trough, ss}$: trough plasma concentration at steady state; GD: day of presumed gestation; n/a: not applicable or not available; NOAEL: no observed adverse effect level.

表 2.6.4.9-1 曝露量及び用量に基づく安全係数（続き）

a) For developmental toxicity studies, safety factors were calculated using formulas: exposure-based safety factor = $C_{trough,\ animal}/C_{trough,\ human}$ and dose-based safety factor = $Dose_{animal}/Dose_{human}$; For repeat-dose toxicity studies, safety factors were calculated using formulas: exposure-based safety factor = $AUC_{0\text{-}72hr,\ animal}/(AUC_{0\text{-}24hr,\ human}*3)$ and dose-based safety factor = $(2*Dose_{animal})/(7*Dose_{human})$. In calculating dose-based safety factors, human body weight was assumed to be 60 kg.

b) C_{trough} values at 8 and 20 mg/kg/day in rats are the average of mean $C_{trough,ss}$ from all observations during the gestation period (DG 0, DG 12 and DG 21).

c) C_{trough} values at 2 and 5 mg/kg/day in rabbits are the average of mean $C_{trough,ss}$ from all observations during the gestation period.

d) C_{trough} values at 20 mg/day and 40 mg/day in humans are from Study 165-302 Part 3 Week 5/6.

e) C_{trough} value at 60 mg/day in humans is from Study 165-302 Part 4 Week 41.

f) The dose level where findings were observed.

g) Dose level based on NOAEL

i) Dose level based on lowest dose evaluated in study (NOAEL for maternal and developmental toxicity was not determined.)

2.6.4.10　図表

図表は本文中に示した。

2.6.4.11　参考文献

(1) Mordenti J, Osaka G, Garcia K, Thomsen K, Licko V, Meng G. Pharmacokinetics and interspecies scaling of recombinant human factor VIII. Toxicol Appl Pharmacol 136, 75-78, 1996.

(2) ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 2005.

(3) McCaman MW, Robins E. Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. J Lab Clin Med 59, 885-890, 1962.

目次

2.6.5　薬物動態試験概要表....3
2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表....3
2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験....5
2.6.5.3　薬物動態試験：吸収：単回投与....7
2.6.5.4　薬物動態試験：吸収：反復投与....13
2.6.5.5　薬物動態試験：分布....21
2.6.5.6　薬物動態試験：タンパク結合....21
2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験....22
2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験....29
2.6.5.9　薬物動態試験：代謝：*In vivo*....29
2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：*In vitro*....29
2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路....29
2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害....29
2.6.5.13　薬物動態試験：排泄....29
2.6.5.14　薬物動態試験：排泄：胆汁中....29
2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用....29
2.6.5.16　薬物動態試験：その他....30
2.6.5.17　参考文献....30

表目次

表 2.6.5.1-1　薬物動態試験一覧....3
表 2.6.5.2-1　分析方法一覧....5
表 2.6.5.3-1　ホモ接合型（-/-）雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回投与による薬物動態／薬力学的作用....7
表 2.6.5.3-2　ホモ接合型（-/-）雌雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける第 II 相試験用プロセス A 製剤の BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回投与による薬物動態／薬力学的作用の比較....8
表 2.6.5.3-3　ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回皮下又は静脈内投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 2 週間回復性試験....10
表 2.6.5.3-4　カニクイザルにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 3 週間回復性試験....11
表 2.6.5.4-1　ホモ接合型（-/-）雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 1 日 1 回 36 日間反復皮下投与による薬力学的作用及び薬物動態....13
表 2.6.5.4-2　ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 4 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 2 週間回復性試験....14

表 2.6.5.4-3 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 26 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験、及び 17 週間投与後の安楽死による中間解析並びに 4 週間回復性試験.....15
表 2.6.5.4-4 カニクイザルにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 4 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 4 週間回復性試験.....17
表 2.6.5.4-5 カニクイザルにおける 39 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 13 週間回復性試験.....19
表 2.6.5.7-1 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する試験.....22
表 2.6.5.7-2 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の発生並びに出生後の行動／機能評価を含む出生前及び出生後の発生に関する試験.....24
表 2.6.5.7-3 ウサギにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験.....25
表 2.6.5.7-4 ウサギにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による胚・胎児発生に関する試験.....27

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

Test Article: BMN 165

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Absorption: Single–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Male)	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-028	4.2.2.2-1
Absorption: Single–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Male)	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-09-069 and 0165-09-070	4.2.2.2-2
Absorption: Single–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Female)	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-09-069 and 0165-09-070	4.2.2.2-2
Absorption: Single–Dose	Rat	IV and SC	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-003[a]	4.2.3.1-1
Absorption: Single–Dose	Monkey	SC	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-007[a]	4.2.3.1-2
Absorption: Repeat–Dose	BTBR*Pah*^{enu2} Mouse (Male)	SC	[redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-08-006	4.2.2.2-3
Absorption: Repeat–Dose	Rat	SC	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-009[a]	4.2.3.2-1
Absorption: Repeat–Dose	Rat	SC	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-08-019[a]	4.2.3.2-2
Absorption: Repeat–Dose	Monkey	SC	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-008[a]	4.2.3.2-3
Absorption: Repeat–Dose	Monkey	SC	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA	0165-07-030[a]	4.2.3.2-4

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rat	SC	[redacted], USA	BMN165-12-037[a]	4.2.3.5.1-1
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rat	SC	[redacted], USA	BMN165-14-013[a]	4.2.3.5.3-1
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rabbit	SC	[redacted], USA	BMN165-11-027[a]	4.2.3.5.2-1
Absorption: Repeat–Dose in Pregnant or Nursing Animals	Rabbit	SC	[redacted], USA	BMN165-12-036[a]	4.2.3.5.2-2

IV: intravenous; SC: subcutaneous.

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.

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

Test Article: BMN 165

表 2.6.5.2-1 分析方法一覧

Study Report Number	Study Title
BAS-VR-06-001	Detection of IgG antibodies to PEGylated *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in rat serum
BAS-VR-06-002	Detection of activity neutralizing antibodies to rAvPAL-PEG[a] in cynomolgus and human serum
BAS-VR-06-003	Detection of IgM antibodies to *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL) in rat, monkey and human serum
BAS-VR-06-005 A4	Detection of PEGylated Recombinant Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in Rat, Monkey and Human Plasma[b]
BAS-VR-06-005 A5	Detection of PEGylated Recombinant *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (BMN 165[a]) in Rat Lithium Heparin (Li-Heparin) Plasma[b]
BAS-VR-06-005 A6	Detection of PEGylated Recombinant *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (BMN 165[a]) in Cynomolgus Monkey Lithium Heparin (Li-Heparin) Plasma[b]
BAS-VR-07-001	Partial Validation Report for the Detection of IgG antibodies to PEGylated Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in monkey and human serum
BAS-VR-07-004	Validation of Phenylase Total Protein by UV Spectrophotometry
BAS-VR-07-005	Dose Concentration Analysis of PEGylated Recombinant *Anabaena variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a]) in Formulation Buffer
BAS-VR-11-005	Quantitative Measurement of PEGylated Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG[a], BMN 165[a]) in Rabbit Plasma by ELISA
BAS-VR-11-007	Detection of Anti-rAvPAL IgG in Rabbit Serum

表 2.6.5.2-1 分析方法一覧（続き）

Study Report Number	Study Title
BMN165-12-026	Validation of a Method for the Detection of Anti-rAvPAL IgG Antibodies In Rat Serum
BAN165-12-045	Detection of BMN165[a] in Rabbit Plasma using a Ligand Binding Assay
BMN165-12-046	Detection of BMN165[a] in Rat Plasma using a Ligand Binding Assay
BMN165-13-068	Development and Validation of an Immunohistochemical Method for the Semi-Quantitative Evaluation of Anti-PEG Antibody and Anti-rAvPAL-PEG Antibody Binding in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Rat Tissues
BMN165-14-069	Quantitation of BMN165[a] in Rat Breast Milk by Electrochemiluminescence
ARPHE1	Method Validation Report for the Determination of Phenylalanine in Monkey Plasma (Lithium Heparin) Using LC-API/MS/MS
BMN165-11-033	Method Validation Report for the Determination of Phenylalanine in Rabbit Plasma (Lithium Heparin) Using LC-API/MS/MS
BMN165-11-047	Method Validation Report for the Determination of Phenylalanine in Rat Plasma (Lithium Heparin) Using LC-API/MS/MS
16-RS-357-VAL	Validation of an Anti-Polyethylene Glycol (PEG) Immunohistochemistry Assay in Preserved Rat Tissues
McCaman, et al. (1962)(1)	Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum

a) rAvPAL-PEG or BMN165: also known as pegvaliase.

b) Validation report BAS-VR-06-005, Detection of PEGylated Recombinant Anabaena variabilis Phenylalanine Ammonia Lyase (rAvPAL-PEG) in Rat, Monkey and Human Plasma, was split into 3 amendments according to species.

2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与

Test Article	**BMN 165**
Study No.	**0165-07-028**
GLP Compliance	**Non-GLP**

表 2.6.5.3-1 ホモ接合型（-/-）雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回投与による薬物動態／薬力学的作用

Species/Strain		Mouse/BTBR*Pah*^{enu2}									
Gender (M/F)/Number of Animals		3 M/Group									
Feeding Condition		Fed									
Sample		Plasma									
Analyte		BMN 165									
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L phenylalanine (pH 7.3)									
Assay		ELISA									
Method of Administration		SC Bolus Injection									
Dose		20 mg/kg									
PK Parameters		**C_{max} (µg/mL)**		**T_{max} (hr)**		**AUC_{0-t} (µg·hr/mL)**		**$t_{½}$ (hr)**		**V_z/F (mL/kg)**	**CL/F (mL/hr/kg)**
		208.613		24		9,722		26.9		75.5	1.95
		Group									
		1-10[a]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Time point		Pre-dose	8 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	144 hr	192 hr	240 hr
Plasma BMN 165 Concentration (ng/mL)	**Mean (SD)**	0	39,455 (33,709)	208,613 (149,111)	115,851 (84,508)	73,493 (53,591)	65,803 (33,498)	47,727 (20,129)	28,969 (11,617)	14,159 (6,588)	0	0

AUC_{0-t}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; CL/F: apparent subcutaneous systemic clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; PK: pharmacokinetic(s); rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: elimination half-life; T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z/F: apparent subcutaneous volume of distribution.

a) Individual blood samples were collected for centrifugation to obtain plasma; individual plasma samples were then pooled on a per-group basis (n=3 animals/group) for analysis. Pre-dose value for group 1 was considered anomalous; not included in calculations.

Test Article	BMN 165
Study Nos.	0165-09-069 and 0165-09-070
GLP Compliance	Non-GLP

表 2.6.5.3-2　ホモ接合型（-/-）雌雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける第 II 相試験用プロセス A 製剤の BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回投与による薬物動態／薬力学的作用の比較

Species/Strain		Mouse/BTBR*Pah*^{enu2}								
Gender (M/F)/Number of Animals		32 M/28 F with 2-4 animals per Group								
Feeding Condition		Fed								
Sample		Plasma								
Analyte		BMN 165								
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia (pH 7.3)								
Assay		ELISA								
Method of Administration		SC Bolus Injection								
Dose		20 mg/kg								
		PK Parameters								
Material	**Gender**	**C_{max} (µg/mL)**		**T_{max} (hr)**		**AUC_{0-t} (µg·hr/mL)**		**$t_{1/2}$ (hr)**	**V_z/F (mL/kg)**	**CL/F (mL/hr/kg)**
Phase 1	**Male**	209		24.0		9,722		26.9	75.5	1.95
Phase 2	**Male[a]**	49.4		36.0		3,848		11.6	86.7	5.19
Phase 2	**Female[a]**	171		36.0		11,905		16.0	38.6	1.68
		Plasma BMN 165 Concentration (µg/mL)								
	Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gender	**Nominal Time**	8 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	144 hr	192 hr	240 hr
Male[a]	**Mean**	25.77	43.02	49.35	33.27	23.78	27.87	10.20	5.80	0.19	0
	SD	11.77	10.26	5.77	11.82	6.67	18.69	3.93	2.45	0.38	0
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4

表 2.6.5.3-2　ホモ接合型（-/-）雌雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける第 II 相試験用プロセス A 製剤の BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回投与による薬物動態／薬力学的作用の比較（続き）

		Plasma BMN 165 Concentration (µg/mL)									
	Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gender	**Nominal Time**	8 hr	24 hr	36 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	144 hr	192 hr	240 hr
Female[a]	**Mean**	75.50	135.82	170.75	126.72	43.23	100.87	31.43	14.60	1.48	0
	SD	10.82	62.72	22.73	36.02	15.27	24.18	17.93	8.27	2.09	0
	N	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2
Additional Information:	Clinical Phase 1 material (Lot No. AP160703, 7.6 monomers PEG/PAL monomer) was previously investigated in males in BioMarin 0165-07-028; a Phase 2 material lot designated for nonclinical use (Lot No. NP160706, 8 monomers PEG/PAL monomer) was investigated in BioMarin 0165-09-069 (males) and 0165-09-070 (females). Both lots of rAvPAL-PEG were manufactured via PEGylation Process A.										

AUC_{0-t}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; CL/F: apparent subcutaneous systemic clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; N: number; PAL: phenylalanine ammonia lyase; PEG: polyethylene glycol; PK: pharmacokinetic(s); rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: elimination half-life; T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z/F: apparent subcutaneous volume of distribution.

a) Male mice were from Study 0165-09-069 while female mice were from Study 0165-09-070.

Test Article	BMN 165
Study No.	0165-07-003
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.3-3 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回皮下又は静脈内投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 2 週間回復性試験

Species/Strain		Rat/Crl:CD (Sprague Dawley)					
Gender (M/F)/Number of Animals		6 M+6 F/Dose Group					
Feeding Condition		Fed					
Sample		Plasma					
Analyte		BMN 165					
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 140 mmol/L NaCl, pH 7.5±0.1					
Assay		ELISA					
Method of Administration	**Dose (mg/kg)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**AUC_{0-t} (ng·hr/mL)**	**$t_{½}$ (hr)**	**CL/F[a] (mL/hr/kg)**	**V_z[b] (mL/kg)**
IV Bolus	**1**	12,600	4.50	606,017	28.3	1.55	64.1
	5	87,667	2.00	3,610,522	30.9	1.38	61.4
	25	202,238	9.00	10,856,187	41.7	2.34	139
SC Bolus	**10**	16,674	18.0	1,110,433	47.3	NA	532
	25	29,260	42.0	2,292,726	33.4[c]	NA	503[c]
	250	206,380	96.0	34,751,389	44.2	NA	449
Additional Information:		Note: The first three animals/sex/group were bled at pre-dose, and approximately 1 (IV only), 6, 24, 48, 60, 84 (SC only), 120 168, 216, and 312 hours post-dose. The last three animals/sex/group were bled at approximately 3, 12, 36, 72, 96, 144, 192, 264, and 360 hours post-dose. PK parameters reported are gender combined.					

AUC_{0-t}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; CL/F: apparent subcutaneous systemic clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; IV: intravenous, M: male; NA: not available; PK: pharmacokinetic(s); SC: subcutaneous; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; $t_{1/2}$: elimination half-life; T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z/F: apparent subcutaneous volume of distribution.

a) CL/F reported for SC administration.

b) V_z/F reported for SC administration.

c) $t_{1/2}$ and V_z/F parameters based off female rats only.

Test Article	BMN 165
Study No.	0165-07-007
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.3-4　カニクイザルにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 3 週間回復性試験

Species/Strain		Monkey/Cynomolgus						
Gender (M/F)/Number of Animals		3 M+3 F/Dose Group						
Feeding Condition		Fed						
Sample		Plasma						
Analyte		BMN 165						
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 140 mmol/L NaCl, pH 7.5±0.1						
Assay		ELISA						
Method of Administration		SC Bolus Injection						
		TK Parameters						
Dose (mg/kg)	**Statistic**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**AUC_{0-t} (ng·hr/mL)**	**AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)**	**$t_{½}$ (hr)**	**CL/F (mL/hr/kg)**	**V_z/F (mL/kg)**
4	**Mean**	29,337	52.0	4,625,836	252,874	64.5	0.820	76.3
	(SD)	(11,017)	(20.7)	(1,810,469)	(100,086)	(NA)	(NA)	(NA)
	N	6	6	6	6	1	1	1
12	**Mean**	147,137	106	20,882,173	518,008	71.3	0.462	45.6
	(SD)	(65,202)	(40)	(7,690,027)	(149,703)	(NA)	(NA)	(NA)
	N	6	6	6	6	2	2	2
60	**Mean**	218,387	66.0	9,319,360	672,490	NA	NA	NA
	(SD)	(39,058)	(36.2)	(6,815,626)	(300,228)	(NA)	(NA)	(NA)
	N	6	6	6	6	0	0	0
Additional Information:		Samples were collected from all surviving animals on Day 1 pre-dose and at approximately 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 264, 312, 360, 432, and 504 hours post-dose.						

表 2.6.5.3-4　カニクイザルにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の単回皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 3 週間回復性試験（続き）

AUC_{0-t}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; AUC_{0-24hr}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hr, estimated by linear trapezoidal rule; CL/F: apparent subcutaneous systemic clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; N: number; NA: not applicable; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: elimination half-life; TK: toxicokinetic(s); T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z/F: apparent subcutaneous volume of distribution.

2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与

Test Article	**BMN 165**
Study No.	**0165-08-006**
GLP Compliance	**Non-GLP**

表 2.6.5.4-1 ホモ接合型（-/-）雄 BTBR*Pah*^{enu2} マウスにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 1 日 1 回 36 日間反復皮下投与による薬力学的作用及び薬物動態

Species/Strain	Mouse/BTBR*Pah*^{enu2}						
Gender (M/F)/Number of Animals	18 M, ≥3 M/Time Point						
Feeding Condition	Fed						
Sample	Plasma						
Analyte	BMN 165						
Vehicle Formulation	10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia						
Assay	ELISA						
Method of Administration	SC Bolus Injection						
Dose	2 mg/kg on Days 1-14 and 4 mg/kg on Days 15-36						
	PK Parameters						
Day	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng·hr/mL)**	**AI (fold)**	**$t_{1/2}$ (hrs)**	**V_z/F (mL/kg)**	**CL/F (mL/hr/kg)**
1	16,133	24	110,366	–	–	–	–
36	66,527	24	702,860	3.2	12.1	100	5.69

AI: accumulation indices; $AUC_{0\text{-}24hr}$: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hr, estimated by linear trapezoidal rule; CL/F: apparent subcutaneous systemic clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; PK: pharmacokinetic(s); rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; $t_{1/2}$: elimination half-life; T_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z/F: apparent subcutaneous volume of distribution; −: not calculated.

Test Article	BMN 165
Study No.	0165-07-009
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.4-2　ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 4 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 2 週間回復性試験

Species/Strain	Rat/Crl:CD (Sprague Dawley)								
Gender (M/F)/Number of Animals	6 F+6 M (3 per gender per Time Point)								
Feeding Condition	Fed								
Sample	Plasma								
Analyte	BMN 165								
Vehicle Formulation	10 mmol/L TRIS, 140 mmol/L NaCl, pH 7.5±0.1								
Assay	ELISA								
Method of Administration	SC Bolus Injection								
Group	6			7			8		
Dose (mg/kg)	1			8			25		
TK Parameters	Dose 1	Dose 4	Dose 7	Dose 1	Dose 4	Dose 7	Dose 1	Dose 4	Dose 7
C_{max} (ng/mL)	1,935	−	−	26,933	288	5,143	72,623	21,064	56,430
T_{max} (hr)	30.0	−	−	42.0	16.5	22.5	60.0	24.0	36.0
AUC_{0-t} (ng·hr/mL)	76,388	−	−	1,104,773	4,591	158,404	2,992,269	878,249	2,755,085
Additional Information:	TK parameters reported are gender combined. Data by gender is provided in 表 2.6.7.3-1. The first three animals/sex in Groups 6 through 8 were bled approximately 3, 9, 24, 48, and 72 hours post-dose. The last three animal/sex in Groups 6 through 8 were bled pre-dose and approximately 6, 12, 36, and 60 hours post-dose.								

AUC_{0-t}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; TK: toxicokinetic(s); T_{max}: time to maximum plasma concentration; −: not quantifiable.

Test Article	BMN 165
Study No.	0165-08-019
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.4-3 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 26 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験、及び 17 週間投与後の安楽死による中間解析並びに 4 週間回復性試験

Species/Strain		Rat/Crl: CD (Sprague Dawley)					
Gender (M/F)/Number of Animals		9 M +9 F/Dose Group, 3 M+3 F per Time Point					
Feeding Condition		Fed					
Sample		Plasma					
Analyte		BMN 165					
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia					
Assay		ELISA					
Method of Administration		SC Bolus Injection					
		Pre-dose/Dosing Phase[a]			Recovery Phase[b]		
Dose (mg/kg)	**Study Week**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng·hr/mL)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng·hr/mL)**
1	**1**	1,325	36	68,029	NA	NA	NA
	8	276	0	4,094	NA	NA	NA
	16	3,085	36	65,516	NA	NA	NA
	27	1,994	48	67,470	2,008	24	147,570
8	**1**	38,129	48	1,443,872	NA	NA	NA
	8	44,342	16	1,617,226	NA	NA	NA
	16	22,446	60	1,098,690	NA	NA	NA
	27	18,500	8	1,036,762	17,099	72	2,771,088
25	**1**	128,675	60	5,552,860	NA	NA	NA
	8	205,500	4	9,859,624	NA	NA	NA
	16	106,983	12	4,781,972	NA	NA	NA
	27	152,944	36	6,283,204	139,167	132	18,637,860

表 2.6.5.4-3 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 26 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 12 週間回復性試験、及び 17 週間投与後の安楽死による中間解析並びに 4 週間回復性試験（続き）

	Mean Plasma Accumulation Indices					
Dose (mg/kg)	**$AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 8/ $AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 1**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 16/ $AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 1**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 27/ $AUC_{0\text{-}72hr}$, Week 1**	**C_{max}, Week 8/ C_{max}, Week 1**	**C_{max}, Week 16/ C_{max}, Week 1**	**C_{max}, Week 27/ C_{max}, Week 1**
1	0.0602	0.963	0.992	0.208	2.33	1.50
8	1.12	0.761	0.718	1.16	0.589	0.485
25	1.78	0.861	1.13	1.60	0.830	1.19
Additional Information:		TK parameters reported are gender combined.				

AI: accumulation indices; $AUC_{0\text{-}72hr}$: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 72 hr, estimated by linear trapezoidal rule; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; NA: not applicable; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; TK: toxicokinetic(s); T_{max}: time to maximum plasma concentration.

a) Collection times for Weeks 1,8,16 and 27 were pre-dose (0), 8, 24, 48 and 72 hr.

b) Collection times for Week 27 were pre-dose (0), 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, and 264 hr.

Test Article	BMN 165
Study No.	0165-07-008
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.4-4 カニクイザルにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 4 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 4 週間回復性試験

Species/Strain	Monkey/Cynomolgus					
Gender (M/F)/Number of Animals	3 F/Dose Group (5 F at 1.0 mg/kg)/3 M/Dose Group (5 M at 1.0 mg/kg)					
Feeding Condition	Fed					
Sample	Plasma					
Analyte	BMN 165					
Vehicle Formulation	10 mmol/L TRIS, 140 mmol/L NaCl, pH 7.5±0.1					
Assay	ELISA					
Method of Administration	SC Bolus Injection					
Dose (mg/kg)	0.01		0.1		1.0	
TK parameters	Dose 1[a]	Dose 3[b]	Dose 1	Dose 3	Dose 1	Dose 3
C_{max} (ng/mL) (SD)	128	280	689	1,079	9,873	2,7781
	(NA)	(NA)	(384)	(787)	(5,372)	(12,193)
T_{max} (hr) (SD)	42.0	36.0	33.0	26.5	41.7	39.3
	(NA)	(NA)	(20.6)	(19.7)	(13.7)	(29.2)
AUC_{0-t} (ng·hr/mL) (SD)	2,318	7,890	30,066	70,062	425,366	1,238,924
	(NA)	(NA)	(14,465)	(40,973)	(178,337)	(397,836)
AUC_{0-t} (ng·hr/mL) Accumulation Ratio (SD) (Dose 3/Dose 1)	NA (NA)		3.59 (6.07)		3.32 (1.67)	
Additional Information:	Administered by subcutaneous injection twice weekly for 4 weeks (dosing phase) at a dose volume of 0.5 mL/kg. The first 7 injections were dosed in the same site, while the eighth dose was injected on the contralateral side. Doses were based on the most recently recorded body weight. TK samples were taken at pre-dose and approximately 9, 24, 36, 48, 60, and 72 hours post-dose (prior to the next dose administration; for Days 1, 8, and 22 only).					

AUC_{0-t}: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; NA: not available; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; TK: toxicokinetic(s); T_{max}: time to maximum plasma concentration.

表 2.6.5.4-4　カニクイザルにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の 4 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 4 週間回復性試験（続き）

a) Only female animals reported, all male animals were below the lower limit of quantitation after Dose 1. n=2 for C_{max} and T_{max}, while n=1 for AUC_{0-t}.
b) Only one animal (female) reported, n=1 for all PK parameters.

Test Article	**BMN 165**
Study No.	**0165-07-030**
GLP Compliance	**GLP**

表 2.6.5.4-5 カニクイザルにおける 39 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 13 週間回復性試験

Species/Strain		Monkey/Cynomolgus						
Gender (M/F)/Number of Animals		3-8 per gender/Group						
Feeding Condition		Fed						
Sample		Plasma						
Analyte		BMN 165						
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia						
Assay		ELISA						
Method of Administration		SC Bolus Injection						
		TK Parameters						
		First Week				**Last Week (Week 39)**		
Dose Group	**Dose Level (mg/kg)**	**Statistic**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng·hr/mL)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$ (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

表 2.6.5.4-5 カニクイザルにおける 39 週間皮下投与による毒性及びトキシコキネティクス試験並びに 13 週間回復性試験（続き）

		First Week				Last Week (Week 39)		
Dose Group	**Dose Level (mg/kg)**	**Statistic**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng·hr/mL)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (hr)**	**$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng·hr/mL)**
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:		TK parameters reported are gender combined. Blood samples were collected at pre-dose, 9, 24, 48 and 72 hour post-dose in the first week of dosing and the last week (39th week). Pre-dose, 9, 48 and/or 72 hour post-dose samples were collected periodically throughout the study of 39 weeks.						

$AUC_{0\text{-}72hr}$: area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 72 hr, estimated by linear trapezoidal rule; C_{max}: maximum plasma concentration; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; N: number; NA: not applicable; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; TK: toxicokinetic(s); 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.

2.6.5.5　薬物動態試験：分布

試験は実施しなかった。

2.6.5.6　薬物動態試験：タンパク結合

試験は実施しなかった。

2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Test Article	**BMN 165**
Study No.	**BMN165-12-037**
GLP Compliance	**GLP**

表 2.6.5.7-1 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

Species/Strain		Rat/Crl:CD (Sprague Dawley)								
Gender (M/F)/Number of animals		Main study: 25 M+25 F/Group; TK Study: 3 M+3 F/Group								
Feeding condition		Fed								
Method of Administration		SC Bolus Injection								
Sample		Plasma								
Analyte		BMN 165								
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia, pH 7.0±0.5								
Assay		ELISA								
		Plasma BMN 165 Concentration (ng/mL)[a]								
Gender	**Dose (mg/kg)**	**Statistic**	**DS 1**	**DS 8**	**DS 15**	**DS 22**	**DS 29**	**DS 43**	**DS 64**	**DS 79**
Male	**2**	Mean (SD)	0.00	1,480 (2,563)	0.00	0.00	0.00	0.00	153 (266)	3,162 (3,362)
	8	Mean (SD)	0.00	1,260 (2,182)	0.00	1,008 (1,673)	2,533 (2,989)	29,833 (13,973)	27,067 (3,721)	20,400 (7,006)
	20	Mean (SD)	0.00	40,967 (47,945)	43,200 (36,715)	122,467 (53,772)	100,700 (63,200)	179,000 (44,034)	217,667 (65,010)	266,667 (58,432)

表 2.6.5.7-1 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（続き）

Gender	Dose (mg/kg)	Statistic	DS 1	DS 8	DS 15	DS 22	DS 29/DG 0[b]	DG 12	DG 21	DG 21 (Fetal)
Female	**2**	Mean (SD)	0.00	6,267 (10,854)	6,967 (12,067)	7,367 (12,759)	5,961 (9,570)	9,280 (8,262)	7,397 (4,683)	0.00
	8	Mean (SD)	0.00	44,967 (23,247)	6,455 (5,585)	53,100 (43,422)	83,533 (35,570)	69,567 (25,353)	57,800 (33,700)	0.00
	20	Mean (SD)	0.00	135,633 (89,092)	156,500 (111,365)	302,667 (62,517)	322,667 (56,871)	349,333 (73,528)	395,667 (11,060)	202 (286)
Additional Information:		Note: Male animals were administered once-daily for 78 days then euthanized and necropsied on DS 79. Female animals were administered once-daily doses from DS 1 through DG 17; terminal C-sections occurred on DG 21. Cohabitation of male and female animals began on DS 42 (male) and DS 29 (female).								

DG: day of presumed gestation; DS: day of study; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; TK: toxicokinetic(s).

a) All samples taken before dosing (pre-dose)

b) F_0 generation female rats were bled on 17 December 2012 (which was equivalent to DS 29 or DG 0). The intent was to collect a sample before the 29th dose of the test or control article. Because cohabitation began on 16 December 2012, some rats mated and therefore their study day was DG 0 on 17 December 2012.

Test Article	**BMN 165**
Study No.	**BMN165-14-013**
GLP Compliance	**GLP**

表 2.6.5.7-2 ラットにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の発生並びに出生後の行動／機能評価を含む出生前及び出生後の発生に関する試験

Species/Strain			Rat/Crl:CD (Sprague Dawley)					
Gender (M/F)/Number of Animals			Main Study 25 F/per Group; TK study 3 F/per Group					
Feeding Condition			Fed					
Analyte			BMN 165					
Vehicle Formulation			10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia, pH 7.0±0.5					
Method of Administration			SC Bolus Injection					
Sample			Plasma			Breast Milk		
Assay			ELISA			ECLA		
			Plasma Concentration (ng/mL)			Breast Milk Concentration (ng/mL)		
Group	**Dose (mg/kg/ day)**	**Lactation Day**	**N**	**Mean**	**SD**	**N**	**Mean**	**SD**
2	**2**	14	3	31,533	3,669	5	153[a]	NA
3	**8**	14	3	98,633	8,792	5	612	399
4	**20**	14	3	553,000	278,124	5	1,490	405
Additional Information:			Female F_0 rats were administered once-daily SC injections starting on DS 1; each animal received a minimum of 70 doses.					

DS: day of study; ECLA: electrochemiluminesence assay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; SC: subcutaneous; M: male; NA: not applicable; N: number; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; TK: toxicokinetic(s).

a) Single sample resulted in quantifiable levels of BMN 165, 4 sample results were below the quantifiable limits of the method (n=5 samples/group).

Test Article	BMN 165
Study No.	BMN165-11-027
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.7-3　ウサギにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験

Species/Strain		Rabbits/New Zealand White							
Gender (M/F)/Number of Animals		3 F/Group							
Feeding condition		Fed							
Method of Administration		SC Bolus Injection							
Sample		Plasma							
Analyte		BMN 165							
Vehicle Formulation		10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia, pH 7.1±0.1							
Assay		ELISA							
PK Parameter			C_{max} (ng/mL)[a]		T_{max} (hr)[a]		AUC_{0-t} (ng·hr/mL)		AR	
Dose (mg/kg)	Group	Day of Gestation	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
2	2	7	28,933	7,557	24.0	0	246,499	60,972	–	–
		20[b]	–	–	–	–	–	–	–	–
	3	7	28,333	11,140	24.0	0.0	255,153	53,523	–	–
		14	287	206	8.0	4.0	2,497	2,689	0.012	0.015
	4	13	23,767	4,277	24.0	0.0	236,841	78,413	–	–
		20	6,447	7,322	4.0	6.9	39,087	14,558	0.160	0.134
20	5	7	175,333	74,501	24.0	0.0	1,540,675	835,831	–	–
		20[c]	–	–	–	–	–	–	–	–
	6	11	121,700	23,381	24.0	0.0	902,140	171,863	–	–
		16	2,270,000	357,631	18.67	9.24	524,800,000	71,079,460	47.8	3.68
	7	15	125,000	16,371	24.0	0.0	821,924	135,163	–	–
		20	1,800,000	376,431	2.67	2.31	149,335,333	22,955,192	39.6	9.56

表 2.6.5.7-3 ウサギにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による胚・胎児発生に関する用量設定試験（続き）

PK Parameter			C_{max} (ng/mL)[a]		T_{max} (hr)[a]		AUC_{0-t} (ng·hr/mL)		AR	
Dose (mg/kg)	Group	Day of Gestation	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
5	8	7	77,667	33,307	22.0	3.5	667,767	233,542	–	–
		20	64,660	51,990	2.7	4.6	894,271	727,892	1.30	1.23
	9	11	59,633	22,107	22.0	3.5	635,113	148,866	–	–
		16	767,667	86,234	10.7	12.2	13,367,667	1,790,769	21.7	4.83
	10	15	59,000	11,004	22.0	3.5	635,113	148,866	–	–
		20	744,000	247,586	10.0	7.2	61,481,104	60,820,245	22.1	3.92

AR: accumulation ratio; AUC_{0-t}: are under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration, estimated by linear trapezoidal rule; C_{max}: maximum plasma concentration; DG: day of presumed gestation; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; M: male; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; T_{max}: time to maximum plasma concentration; −: not available.

a) C_{max} and T_{max} were based on sample collections that occurred pre-dose through 24 hours post-dose.

b) Plasma concentrations of BMN 165 were all below the limit of quantitation (<50 ng/mL) for the last dose on DG 20 for Group 2.

c) Due to unscheduled terminal procedures occurring on DG 18 for all animals in Group 5, dosing and collecting samples after DG 18 were not possible.

Test Article	BMN 165
Study No.	BMN165-12-036
GLP Compliance	GLP

表 2.6.5.7-4 ウサギにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による胚・胎児発生に関する試験

Species/Strain			Rabbit/New Zealand White	
Gender (M/F)/Number of animals			Main Study: 20 F/Group; TK Study: 3 F/Group	
Feeding Condition			Fed	
Sample			Plasma	
Analyte			BMN 165	
Vehicle Formulation			10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L ammonia, pH 7.0±0.5	
Assay			ELISA	
Method of Administration			SC Bolus Injection	
Dose (mg/kg)			2	5
Group[c]	**Dose Period**	**DG Sampling Time Points**	**Mean (SD) Plasma BMN 165 Concentration (ng/mL)**	
2[a], 5[a]	**DG 7-12**	**8 (0 hr)**	23,567 (379)	60,350 (19,021)
		10 (0 hr)	NA	99,050 (138,522)
		13 (24 hr)	94,100 (94,611)	438,667 (127,222)
		19 (Fetal)	279 (123)	1,160 (570)
3[a], 6[a]	**DG 11-16**	**12 (0 hr)**	8,060 (10,949)	1,450 (257)
		14 (0 hr)	117,767 (26,404)	200,667 (46,458)
		17(24 hr)	51,067 (32,853)	300,333 (84,311)
		19 (Fetal)	317 (28)	1,240 (190)
4[b], 7[b]	**DG 15-20**	**16 (0 hr)**	20,267 (1,701)	53,767 (3,456)
		18 (0 hr)	96,267 (30,027)	239,000 (36,000)
		21 (24 hr)	98,033 (68,877)	403,667 (41,789)
		21 (Fetal)	576 (51)	567 (369)

表 2.6.5.7-4　ウサギにおける BMN 165（rAvPAL-PEG）の皮下投与による胚・胎児発生に関する試験（続き）

DG: day of presumed gestation; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; F: female; hr: hours post-dose; “24 hr” collections occurred approximately 24 hours after the last dose of BMN 165 was administered, and “0 hr” samples were collected pre-dose; rAvPAL-PEG: PEGylated recombinant *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase; SC: subcutaneous; SD: standard deviation; M: male; TK: tokicokinetic(s); NA: not available.

a) Maternal TK rabbits were euthanized on DG 19, at which time a fetal sample was obtained for analysis.

b) Maternal TK rabbits were euthanized on DG 21, at which time a fetal sample was obtained for analysis.

c) Groups 2 and 5 were given control article on DG 13-18; Groups 3 and 6 were given control article on DG 7-10 and DG 17-18; Groups 4 and 7 were given control article on DG 7-14.

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

試験は実施しなかった。

2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：*In vivo*

試験は実施しなかった。

2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：*In vitro*

試験は実施しなかった。

2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

試験は実施しなかった。

2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

試験は実施しなかった。

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄

試験は実施しなかった。

2.6.5.14 薬物動態試験：排泄：胆汁中

試験は実施しなかった。

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

試験は実施しなかった。

2.6.5.16　薬物動態試験：その他

試験は実施しなかった。

2.6.5.17　参考文献

(1)　McCaman MW, Robins E. Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. J Lab Clin Med 59, 885-890. 1962.