目次

2.6.6　毒性試験の概要文....6
2.6.6.1　まとめ....6
2.6.6.2　単回投与毒性試験....10
2.6.6.2.1　BMN 165 のラットにおける単回皮下又は静脈内投与毒性・TK 試験及び 2 週間回復性試験....10
2.6.6.2.2　BMN 165 のカニクイザルにおける単回皮下投与毒性・TK 試験及び 3 週間回復性試験....12
2.6.6.3　反復投与毒性試験....15
2.6.6.3.1　BMN 165 のラットにおける 4 週間皮下投与毒性･トキシコキネティクス試験及び 2 週間回復性試験....15
2.6.6.3.2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験....17
2.6.6.3.3　BMN 165 のカニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性･トキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験....26
2.6.6.3.4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験....28
2.6.6.4　反復投与毒性試験で得られた組織における PEG 空胞の検討....35
2.6.6.4.1　BMN 165 の週 2 回皮下投与によるラット及びサルの長期反復投与毒性試験で得られた脳組織における上衣細胞空胞化の検討....35
2.6.6.4.2　抗 PEG 抗体及び抗 BMN 165 抗体の結合を半定量的に評価する、ホルマリン固定パラフィン包埋ラット組織を用いた免疫組織化学染色法の開発及びバリデーション....37
2.6.6.4.3　毒性試験のラット組織における免疫組織化学（IHC）法を用いた抗 BMN 165 抗体の分析....38
2.6.6.4.3.1　4、17 又は 26 週間投与後の腎臓における抗 BMN 165 抗体染色の陽性結果....39
2.6.6.4.3.2　4、17 又は 26 週間投与後の脾臓、副腎皮質、肝臓、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節における抗 BMN 165 抗体染色の陽性結果....40
2.6.6.4.3.3　細胞質空胞化....40
2.6.6.4.4　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・TK 試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験で得られたラット組織を用いる抗 PEG 抗体の免疫組織化学的検査....42
2.6.6.5　遺伝毒性試験....46
2.6.6.6　がん原性試験....46
2.6.6.7　生殖発生毒性試験....46
2.6.6.7.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験....46
2.6.6.7.1.1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験....46
2.6.6.7.2　胚・胎児発生に関する試験....50

2.6.6.7.2.1 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験.....50
2.6.6.7.2.2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験.....53
2.6.6.7.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験.....57
2.6.6.7.3.1 BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験.....57
2.6.6.7.3.2 BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験－ F_1 世代の追加生後発生評価.....60
2.6.6.8 局所刺激性試験.....63
2.6.6.9 その他の毒性試験.....63
2.6.6.9.1 非妊娠ウサギを用いたフェニルアラニン低減飼料の 14 日間経口摂取試験.....64
2.6.6.10 考察及び結論.....66
2.6.6.11 参考文献.....66

表目次

表 2.6.6.1-1 毒性試験一覧 7
表 2.6.6.2.1-1 ラットにおける単回静脈内／皮下投与毒性試験の試験デザイン 11
表 2.6.6.2.1-2 ラットにおける単回投与時の TK パラメータ 12
表 2.6.6.2.2-1 カニクイザルにおける単回皮下投与毒性試験の試験デザイン [a] 13
表 2.6.6.3.1-1 ラットにおける 4 週間投与毒性試験の試験デザイン 16
表 2.6.6.3.2-1 ラットにおける 26 週間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン 18
表 2.6.6.3.2-2 17 週中間剖検における病理組織学的所見の発現頻度及び程度 20
表 2.6.6.3.2-3 投与期間終了時における病理組織学的所見の発現頻度及び程度 22
表 2.6.6.3.2-4 回復期間終了時における病理組織学的所見の発現頻度及び程度 24
表 2.6.6.3.3-1 カニクイザルにおける 4 週間投与毒性・TK 試験の試験デザイン 26
表 2.6.6.3.3-2 BMN 165 を週 2 回皮下投与したサルの TK パラメータ 28
表 2.6.6.3.4-1 カニクイザルにおける 39 週間反復投与毒性・TK 試験の試験デザイン 29
表 2.6.6.3.4-2 39 週目における動脈炎の発現頻度及び程度 31
表 2.6.6.3.4-3 BMN 165 を週 2 回皮下投与したサルの TK パラメータ 34
表 2.6.6.4.3-1 BMN 165 の 8 mg/kg を 4､17 又は 26 週間投与したラットの腎臓における、特異的抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）結合の陽性結果のまとめ 39
表 2.6.6.4.3-2 BMN 165 の 0 又は 8 mg/kg を 4、17 又は 26 週間投与したラットの腎臓における尿細管上皮の細胞質空胞化のまとめ 41
表 2.6.6.4.4-1 FFPE ラット組織を用いた PEG の IHC 染色法の試験デザイン* 42
表 2.6.6.4.4-2 FFPE 組織を用いた IHC 染色の染色強度、頻度及びパターンの特徴の評価基準 43
表 2.6.6.7.1-1 ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン 47
表 2.6.6.7.2-1 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン － パート A 51
表 2.6.6.7.2-2 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン － パート B 51
表 2.6.6.7.2-3 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン － パート C 51
表 2.6.6.7.2-4 ウサギの胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン 54
表 2.6.6.7.2-5 被験物質に関連する所見の概要 55
表 2.6.6.7.3-1 ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する試験の試験デザイン 58
表 2.6.6.7.3-2 BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 － F_1 世代の追加生後発生評価の試験デザイン 61
表 2.6.6.9.1-1 試験デザイン（第 1 相） 64
表 2.6.6.9.1-2 試験デザイン（第 2 相） 65

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
BLQ	below the limit of quantitation	定量下限未満
BMN	BioMarin	BioMarin 社
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
DG X	day X of presumed gestation	妊娠 X 日
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
F	bioavailability	バイオアベイラビリティ
F	female	雌
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
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
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
H&E	hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン及びエオジン
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
IV	intravenous	静脈内
kDa	kilodaltons	キロダルトン
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
M	male	雄
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAL	phenylalanine ammonia lyase	フェニルアラニンアンモニアリアーゼ
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
PKU	phenylketonuria	フェニルケトン尿症
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

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）
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
$t_{1/2}$	half-life	半減期
t-CA	*trans*-cinnamic acid	*trans*-ケイ皮酸
TK	toxicokinetic	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

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

BMN 165［JAN：ペグバリアーゼ（遺伝子組換え）］［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（PAL）］はフェニルケトン尿症（PKU）患者で血中フェニルアラニン（Phe）濃度を低下させる酵素補充療法薬である。PAL はシアノバクテリア *Anabaena variabilis* に由来し、Phe からアンモニア及び *trans*-ケイ皮酸（*t*-CA）への変換を触媒する。PAL の組換え体は大腸菌内で産生された後、広範囲に PEG 化が行われる。BMN 165 の総分子量は約 1000 kDa である。BMN 165 製剤は皮下注射用の滅菌水溶液である。

BMN 165 の非臨床安全性試験では、本薬の毒性及び過剰な薬理作用の特徴を明らかにするため、ラット及びサルを用いた単回投与及び反復投与毒性試験を実施した。生殖発生毒性試験もラット及びウサギを用いて実施した。毒性試験では毒性学的指標の他、トキシコキネティクス（TK）及び免疫原性の指標も評価した。効力を裏付ける試験の薬力学的指標として血漿中 Phe 濃度を評価した。非臨床試験で確認された BMN 165 の安全性に関連する主要な所見として、1) ラットの反復投与毒性試験で腎尿細管細胞及び組織球細胞の空胞化などの用量依存的なポリエチレングリコール（PEG）関連の所見、2) カニクイザルで小動脈・細動脈に本薬と関連する用量依存的な動脈炎、並びに 3) 正常動物で正常値以下の持続的な Phe 濃度減少と一致した用量依存的な体重増加抑制並びに母動物及び胎児毒性が認められた。これらの所見は用量依存的かつ時間依存性であり、回復期間終了後に消失又は部分的に回復が認められた。非臨床試験で確認された有害所見は BMN 165 の臨床試験における安全性モニタリングの情報提供に役立った。

BMN 165 の毒性試験の概略を表 2.6.6.1-1 に示す。一部の例外を除いて、全ての重要な試験は日本、米国及び経済協力開発機構（OECD）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。

表 2.6.6.1-1　毒性試験一覧

Study Description and Study Number	Species	Route	Duration and Administration Schedule	Doses (mg/kg)	GLP
SINGLE-DOSE TOXICITY					
Single-Dose Subcutaneous or Intravenous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Rats with a 2-Week Recovery Period (0165-07-003)	Rat	IV, SC	Single dose	IV: 0, 1, 5, 25 SC: 0, 10, 25, 250	Yes [a]
Single-Dose Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 3-Week Recovery Period (0165-07-007)	Monkey	SC	Single dose	0, 4, 12, 60	Yes [a]
REPEAT-DOSE TOXICITY					
4-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Rats with a 2-Week Recovery Phase (0165-07-009)	Rat	SC	4 weeks, twice per week	0, 1, 8, 25	Yes [a]
26-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with a 12-Week Recovery Period and a 17-Week Interim Euthanasia with a 4-Week Recovery Period with rAvPAL-PEG in Rats (0165-08-019)	Rat	SC	26 weeks, twice per week	0, 1, 8, 25	Yes [a]
4-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 4-Week Recovery Period (0165-07-008)	Monkey	SC	4 weeks, twice per week	0, 0.01, 0.1, 1	Yes [a]
39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Phase (0165-07-030)	Monkey	SC	39 weeks, twice per week	0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 7.0/5.0/3.0	Yes [a]
Evaluation of Ependymal Cell Vacuolation in Brains from Rats and Monkeys Treated Twice Weekly with Subcutaneous Injections of rAvPAL-PEG in Previous Chronic Toxicology Studies (BMN165-13-047)	Rat, Monkey	SC	Rat: 17 or 26 weeks, twice per week Monkey: 39 weeks, twice per week	Rat: 0, 1, 8, 25 Monkey: 0, 0.01, 0.1, 1, 3, 7/5/3	No
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 (BMN165-13-068)	Rat	SC	17 or 26 weeks, twice per week	0, 25	Yes [a]

表 2.6.6.1-1 毒性試験一覧（続き）

Study Description and Study Number	Species	Route	Duration and Administration Schedule	Doses (mg/kg)	GLP
REPEAT-DOSE TOXICITY					
Analysis of Rat Tissues from Toxicology Studies for Anti-PEG and Anti-rAvPAL-PEG using Immunohistochemistry (IHC) (BMN165-13-069)	Rat	SC	4, 17, or 26 weeks, twice per week	0, 8	Yes [a]
The Immunohistochemical Analysis in Rat Tissues in a 26-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with a 12-Week Recovery Period and a 17-Week Interim Euthanasia with a 4-Week Recovery Period with rAvPAL PEG in Rats (0165-08-019)	Rat	SC	17 or 26 weeks, twice per week	0, 8, 25	Yes [a]
REPRODUCTIVE TOXICITY					
Fertility and Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rats (BMN165-12-037)	Rat	SC	M: 6 weeks PC- euthanasia F: 4 weeks PC- G17 (Daily)	0, 2, 8, 20	Yes [a]
A Dose Range-finding Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG by Subcutaneous Injection in Rabbits (BMN165-11-027)	Rabbit	SC	G7-20, G7-14, G13-20, G11-16, G15-20 (Daily)	0, 2, 5, 20	Yes [a]
Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rabbits (BMN165-12-036)	Rabbit	SC	G7-12, G11-16, G15-20 (Daily)	0, 2, 5	Yes [a]
Developmental and Peri-/Post-natal Reproduction Study of Subcutaneous rAvPAL-PEG in Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation (BMN165-14-013)	Rat	SC	4 weeks PC- L21 (Daily)	0, 2, 8, 20	Yes [a]
A Peri-/Post-natal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rats with Additional Developmental Assessments in F1 Generation (BMN165-18-080)	Rat	SC	4 weeks PC- L21 (Daily)	0, 2, 8, 20	Yes [a]

表 2.6.6.1-1　毒性試験一覧（続き）

Study Description and Study Number	Species	Route	Duration and Administration Schedule	Doses (mg/kg)	GLP
OTHER TOXICITY STUDIES					
A 14-Day Oral Feasibility Study in Non-Pregnant Rabbits Provided Diets with Reduced Phenylalanine (BMN165-18-081)[b]	Rabbit	Oral (Dietary)	Phase 1: 17 days Phase 2: 15 days (Daily)	NA	No

SC: subcutaneous; IV: intravenous; NA: not applicable; PC: pre-cohabitation; G: gestation day; L: lactation day; M: male; F: female.

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

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

BMN 165 の非臨床毒性を正常ラット及びカニクイザルで評価した。生殖発生毒性はラット及びウサギを用いて評価した。いずれの試験も BMN 165 の臨床投与経路である皮下投与で実施した。高用量の BMN 165 投与後の毒性及び忍容性を評価するため、単回投与毒性試験を実施した。これらの試験では有害事象として、BMN 165 を 60 mg/kg 投与したカニクイザルで、本薬の薬理作用から予想された血漿中 Phe の減少に起因する病的状態（脱水、食欲不振、活動性低下を特徴とする）が認められた。これらの単回投与毒性試験の結果は反復投与毒性試験で使用する本薬の最高濃度に関する情報を得るために有用であった。PKU 患者集団における BMN 165 の長期投与を担保するため、BMN 165 を皮下注射で週 2 回投与した最長 39 週間の反復投与毒性試験を実施した。主要な所見としてサルの反復投与で動脈の炎症及びラットの反復投与で一部組織の空胞化が認められ、生殖発生毒性試験で正常動物の血漿中 Phe が検出限界以下に低下したことに起因する生殖毒性が認められた。用量依存的なカニクイザルの動脈炎は 4 週間及び 39 週間反復投与試験で観察された。4 週間投与試験では、投与期間終了後の数例に細胞残屑及びマクロファージ浸潤を特徴とする軽度の血管変性が認められた。いずれの動物でも回復期間に血管変性は認められず、この変化の回復性が示唆された。39 週間投与試験では、一部の動物で広範な器官／組織の小動脈・細動脈に様々な程度で動脈炎が観察された。動脈炎は投与期間終了時に認められたが、13 週間の休薬により回復した。これらの試験で観察された動脈の炎症は、動物に外因性酵素を長期投与したことに関連する免疫介在性反応に起因すると考えられた。

ラットの反復投与毒性試験において、一部の組織で空胞化が認められたが、機能的な影響は認められなかった。他の PEG 化した化合物では、非臨床試験に使用した動物種で機能的影響なしに空胞化を引き起こすことが知られていることから、本所見の特徴を明らかにするためにラット及びサルの両種で長期投与毒性試験の追加解析を行った。これらの追加解析では、PEG の蓄積が定常状態にある組織の空胞化について評価するため、ラット及びサルのそれぞれ 26 週間及び 39 週間投与試験における中枢神経系の詳細な病理組織学的検査並びにラットの 26 週間投与試験の組織を用いた 2 試験の免疫組織化学（IHC）検査を実施した。これらの試験の結果から、空胞化は種特異的（ラットのみ）であり、ラット及びサルでは脈絡叢を含む中枢神経系には変化が認められなかった。また、ラットの 26 週間投与試験では PEG の蓄積が定常状態に達しており、実施したいずれの試験においても機能的影響は認められなかった。BMN 165 の臨床適用を担保するために実施した非臨床毒性試験について、以下に詳細を述べる。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

ラット及びサルを用いた単回投与毒性試験において、BMN 165 の毒性及び TK を評価するとともに、反復投与毒性試験における投与濃度を検討した。

2.6.6.2.1　BMN 165 のラットにおける単回皮下又は静脈内投与毒性・TK 試験及び 2 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.1-1、0165-07-003）

<u>試験の目的：</u>

本試験は、ラットに BMN 165 を皮下又は静脈内単回投与した場合の毒性を評価し、TK を測定することを目的として実施した。動物を投与後 14 日間観察し、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.5-1 に示す。

材料と方法:

本試験には雌雄の Crl:CD(SD)ラットを使用し、投与開始時に約 45～51 日齢で、体重は雄が 161～299 g、雌は 126～182 g の範囲にあった。毒性評価用の主試験の動物には、BMN 165 の 0（溶媒対照）、1、5 及び 25 mg/kg を単回静脈内投与（雌雄各 5 匹/群）、又は 0、10、25 及び 250 mg/kg を単回皮下投与（雌雄各 5 匹/群）し、2 週間観察した。主試験と並行して、TK 用動物として静脈内／皮下投与群（グループ 10～12 及び 14～16、各群雌雄各 6 匹）、並びに静脈内／皮下投与溶媒対照群（グループ 9 及び 13、各群雌雄各 3 匹）を設置し、主試験と同日に同様の方法で投与した。試験デザインを表 2.6.6.2.1-1 に示す。

表 2.6.6.2.1-1　ラットにおける単回静脈内／皮下投与毒性試験の試験デザイン

Groups [a]	Compound [b]	Dose (mg/kg)	Dosing Frequency	No. and Gender per Group	
				Main	TK
1, 9	Control – IV	0	once	5F, 5M	3F, 3M
2, 10	Low – IV	1	once	5F, 5M	6F, 6M
3, 11	Mid – IV	5	once	5F, 5M	6F, 6M
4, 12	High – IV	25	once	5F, 5M	6F, 6M
5, 13	Control – SC	0	once	5F, 5M	3F, 3M
6, 14	Low – SC	10	once	5F, 5M	6F, 6M
7, 15	Mid – SC	25	once	5F, 5M	6F, 6M
8, 16	High – SC	250	once	5F, 5M	6F, 6M

SC: subcutaneous; IV: intravenous; M: male; F: female.
Study design a single-dose toxicity study with BMN 165 administered SC in Crl:CD(SD) rats with a 2-week recovery.
a) Groups 1-3 and 9-11were dosed at a volume of 3 mL/kg, Groups 4 and 12 were dosed at a volume of 1.2 mL/kg, Groups 5-7 and 13-15 were dosed at a volume of 10 mL/kg, and Groups 8 and 16 were dosed at a volume of 11.9 mL/kg.
b) BMN 165 lot No. 0702010165, vehicle lot No. 070212FB.

動物の生死、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。動物の体重は投与前に 1 回、投与日の投与前に 1 回、その後は週 2 回測定した。摂餌量は週 2 回測定した。TK 測定用の血漿試料をグループ 10～12 及び 14～16（各 TK 群 6 例）の投与前、投与後 1 時間（静脈内投与群のみ）、3、6、12、24、36、48、60、72、84 時間（皮下投与群のみ）、96、120、144、168、192、216、264、312 及び 360 時間（各測定時点 3 例）に採取した。対照群（0 mg/kg、グループ 9 及び 13）は、TK 測定用の血漿試料を投与後 1 時間（グループ 9 のみ）、12、24、48 及び 96 時間（グループ 13 のみ）に採取した。血漿中の BMN 165 濃度を分析し、得られたデータを用いて最高血漿中濃度（C_{max}）、最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）及び濃度－時間曲線下面積（AUC）を算出した。

グループ 1～8 の全動物を一晩絶食し、投与後約 72 及び 360 時間に血液及び尿試料を採取して、血液学的検査、血液凝固検査、血液化学的検査及び尿検査を実施した。グループ 1～8 は投与 2 週間後に試験を終了し、全身の剖検を実施した。特定の器官（副腎、脳、精巣上体、心臓、

腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣及び胸腺）について採取時に重量を測定した。脳、心臓、腎臓、投与部位、肉眼的病変（存在する場合）、肝臓及び肺を病理組織学的検査に供した。

結果:

BMN 165 の 250 mg/kg を皮下投与した動物で、投与 3～4 日後に投与部位に腫脹が認められ、投与 2 週目には 3 例で皮膚に発赤又は鱗屑が認められた。これらの症状は皮下投与した PEG 化製剤の量に関連し、本薬の PEG 部分に水分が吸着したことによると考えられた。いずれの群でもこれ以外の症状は観察されなかった。雄でカルシウムの低値及び雌でアルカリホスファターゼ（ALP）の低値が認められた以外は、臨床病理学的変化はいずれも投与 15 日後までに回復した。

剖検では各投与群の器官重量（絶対重量及び相対重量）の平均値に変化はなく、BMN 165 に関連した肉眼的所見も認められなかった。病理組織学的検査では 250 mg/kg を皮下投与したほとんどの動物で肝臓にクッパー細胞の空胞化が観察された。皮下投与した 10 mg/kg 群の一部の動物並びに 25 及び 250 mg/kg 群の全例で、投与部位にマクロファージ浸潤が認められた。

BMN 165 を静脈内又は皮下投与したラットの TK パラメータを表 2.6.6.2.1-2 に示す。本薬を単回皮下投与した場合の血漿中プロファイルは一次吸収と一相性の消失を伴う 1 コンパートメントモデルにより説明できると考えられる。BMN 165 のバイオアベイラビリティ（F）は 7.79～16.9%の範囲にあり、AUC_{0-t} 及び C_{max} は静脈内及び皮下の両投与経路でほぼ直線的に投与量に比例したが、最高投与量では用量比を下回った。ラットにおける単回投与後の TK については、2.6.4 で包括的に詳述した。

表 2.6.6.2.1-2　ラットにおける単回投与時の TK 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)	F (%)
IV	1	606,017	12,600	4.5	28.3	NA
IV	5	3,610,522	87,667	2.0	30.9	NA
IV	25	10,856,187	202,238	9.0	41.7	NA
SC	10	1,110,433	16,674	18.0	47.3	16.9
SC	25	2,292,726	29,260	42.0	33.4	12.9
SC	250	34,751,389	206,380	96.0	44.2	7.79

IV: intravenous; NA: not applicable; SC: subcutaneous.

結論：

以上、BMN 165 をラットに単回皮下投与したときの無毒性量は 250 mg/kg であった。無毒性量における C_{max} は 206,380 ng/mL、AUC_{0-t} は 34,751,389 ng•hr/mL であった。

2.6.6.2.2　BMN 165 のカニクイザルにおける単回皮下投与毒性･TK 試験及び 3 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.1-2、0165-07-007）

試験の目的：

本試験は、カニクイザルに BMN 165 を単回皮下投与した場合の毒性を評価し、TK を測定することを目的として実施した。動物を投与後約 3 週間観察し、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.5-1 に示す。

材料と方法：

試験には未使用の雌雄カニクイザル *Macaca fascicularis* を用い、投与開始時に年齢が 3～4.5 歳齢で、体重は雄が 2.7～3.6 kg、雌は 2.0～2.4 kg であった。各群雌雄各 3 匹のサルに BMN 165 を 0、4、12 又は 60 mg/kg の用量で単回皮下投与（投与液量 2.86 mL/kg）し、3 週間観察した。試験デザインを表 2.6.6.2.2-1 に示す。

表 2.6.6.2.2-1　カニクイザルにおける単回皮下投与毒性試験の試験デザイン [a]

Group	Compound [b]	Dose (mg/kg) [c]	Dosing Frequency	No. and Gender per Group
1	Vehicle	0	once	3F, 3M
2	BMN 165	4	once	3F, 3M
3	BMN 165	12	once	3F, 3M
4	BMN 165	60	once	3F, 3M

F: female; M: male; SC: subcutaneous.
a) This study design is for an acute SC toxicity study with BMN 165 in cynomolgus monkeys with a 3-week recovery.
b) Vehicle lot No. 070212FB, BMN 165 lot No. 0702010165.
c) Animals were dosed at 2.86 mL/kg.

動物の生死、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。動物の体重は投与前に少なくとも 1 回、投与日の前日、投与日の投与前、その後は週 2 回測定した。摂餌量は毎日の観察時に定性的に評価した。全ての生存動物から、TK 測定用の血漿試料を 1 日目の投与前、投与後 3、6、9、12、18、24、30、36、48、60、72、84、96、120、144、168、192、216、264、312、360、432 及び 504 時間に採取した。血漿中の BMN 165 濃度を分析し、得られたデータを用いて C_{max}、T_{max} 及び AUC を算出した。TK 測定の後、全投与群の残った血漿を用いて投与後 12、24、48、84、96、120、144、168、192、264、360 及び 432 時間の血漿中 Phe 濃度、並びに投与後 3 時間のプレアルブミン濃度を測定した。1 日目の投与前及び試験終了時（予定剖検及び中間剖検）に血清試料を採取し、抗体分析を行った。尿検査、血液学的検査、血液凝固検査及び血液化学的検査は、絶食条件下で投与前に 2 回（尿検査は 1 回のみ）、投与後 48 及び 240 時間（血液学的検査及び血液化学的検査のみ）、並びに全生存動物について予定剖検時に実施した。途中死亡例（非絶食）も可能な限り試料を採取した。

BMN 165 の投与後約 3 週間で動物を剖検し、病理組織学的検査のため動物の組織を採取した。なお、第 1～3 群は剖検時に腎臓を採取して電子顕微鏡検査用試料を調製した。一方、第 4 群は剖検時には電顕用の腎臓試料は採取しなかったが、電子顕微鏡検査を実施した。

結果：

BMN 165 を 60 mg/kg 投与した動物は、投与後約 1 週間で瀕死状態となったため全例を切迫屠殺（早期剖検）した。60 mg/kg 群の雄 1 例は投与後約 72 時間から脱水、活動性低下、食欲不振及び円背位が認められ、体温は 38℃であった。60 mg/kg 群の全例で投与後約 120 時間には摂餌がほとんど又は全くみられず、抑うつ、脱水、食欲不振、低体温及び下痢が認められた。このため 60 mg/kg 群は、雄 1 例を除いて全例を 6 日目に瀕死状態で切迫屠殺した。残った雄 1 例は対症療法として輸液を皮下投与したが、同様の所見が認められたため 7 日目に瀕死状態で切迫屠殺した。BMN 165 を 60 mg/kg 投与した動物（雌 3 例、雄 3 例）では、投与部位にしこりが認められ、投与した本薬（21 mg/mL）の粘性に起因すると考えられたが、本所見は投与部

位の有害反応とは判断しなかった。これ以外の溶媒、BMN 165 の 4 及び 12 mg/kg を投与した全動物が投与後 3 週間の予定剖検日まで生存した。本薬を 60 mg/kg 投与した全動物で、投与日から切迫屠殺までに雌で 13～15%、雄で 7～17%の範囲の体重減少が認められた。この変化は、これらの動物の症状観察で認められた摂餌量の減少／欠如、脱水及び下痢の所見と一致していた。4 及び 12 mg/kg 群の動物では、体重及び摂餌量に身体上重要な又は用量依存的な変化はみられなかった。

BMN 165 を 60 mg/kg 投与した動物では、6 又は 7 日目（剖検日）に網状赤血球数減少、リンパ球及び好酸球数の減少並びに軽度の ALP 減少が認められた。本薬の薬理作用から予想されたとおり、切迫屠殺時には中等度の総タンパク減少、アルブミン及びグロブリンの減少並びに尿素窒素の増加が認められた。これらの所見は本薬の薬理作用と一致しており、動物の脱水、ストレス及び健康不良により悪化する。腎病変が認められない場合、タンパク質及び尿素窒素の変化は消化管出血を示唆し、この変化は肉眼的病理所見の潰瘍で裏付けられる。血液化学的検査でタンパク質合成の低下を示す総タンパク、グロブリン及びアルブミンの減少がみられたが、肝臓の病理組織学的変化は認められなかった。

BMN 165 60 mg/kg 群の動物の早期剖検時に、消化管全体に肉眼的所見が観察された。60 mg/kg 群の全例で肉眼的な消化管病変及び／又は変色が認められた。大部分の動物で幽門部の粘膜に最大 1.0 cm^2 までの潰瘍性病変が 1 か所又は複数認められ、潰瘍病変は黄色から暗赤色を呈し、3 例中 1 例の雌で病変の周囲に輪状の黒色変化が認められた。消化管病変のみられない 1 例では幽門部粘膜に最大 0.5 cm^2 までの複数の変色領域が認められた。幽門部粘膜の潰瘍は 60 mg/kg 群の動物にのみ確認され、被験物質に関連すると考えられた。一部の動物で認められたこれ以外の消化管所見として、盲腸及び結腸近位部の漿膜表面に暗赤色の隆起領域（0.5 cm^3 まで）、結腸遠位部の粘膜表面に複数の赤色領域（0.2 cm^2 まで）、及び回盲接合部の粘膜表面に 1 か所又は複数の変色領域が認められた。

対照群、BMN 165 の 4 及び 12 mg/kg 皮下投与群の動物は投与 3 週間後に全例を剖検し、被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。対照群、4 及び 12 mg/kg 群では、剖検時の体重及び器官重量（絶対重量及び相対重量）に用量依存的な変化はみられなかった。

BMN 165 の 60 mg/kg を投与した動物の病理組織学的検査では、検査した消化管（胃、回腸及び盲腸）切片の 1 か所又は複数か所で変化が認められ、肉眼的所見と合致した。このような所見として、粘膜萎縮、うっ血及び出血、腺上皮の変性及び壊死、びらん及び／又は潰瘍（軽度から重度）並びに亜急性炎症が観察された。これらの動物における病的状態の原因は、消化管粘膜の変化に関連している可能性が高く、BMN 165 投与によるタンパク質合成阻害の二次的変化と考えられた。

これらの消化管所見は他の投与群では観察されなかった。対照群、4 及び 12 mg/kg 群では投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。腎臓の皮質・髄質の両者の電子顕微鏡検査では、いずれの投与群でも PEG に関連する腎毒性の徴候はみられなかった。

BMN 165 を単回皮下投与した場合の血漿中プロファイルは、一次吸収と一相性の消失を伴う 1 コンパートメントモデルにより説明できると考えられる。BMN 165 の平均 AUC は本薬の曝露がおおむね用量の増加に伴って増加することを示している。皮下投与後の平均 T_{max} は 52.0～

106 時間の範囲であり、血漿中では緩徐に吸収された。サルにおける単回投与後の TK パラメータについては 2.6.4 で包括的に詳述した。

BMN 165 の皮下投与では、血漿中 Phe 濃度は投与後の最初の 24 時間で検出不能レベルに減少したが、同じ期間中に BMN 165 の曝露量は増加した。消化管の肉眼的所見及び病理組織学的変化の原因として、Phe は必須アミノ酸であることから、単一のアミノ酸を制限したストレスに対する反応(1)の可能性が高いと考えられた。

全ての投与群で一部の動物にベースラインで低抗体価の抗 rAvPAL-PEG IgG 抗体が存在した。4 及び 12 mg/kg 群を通して 6 例中 5 例で投与 23 日目に低抗体価の抗 rAvPAL-PEG IgG 抗体が認められた。4 mg/kg 群の雄 1 例のみが抗 rAvPAL-PEG IgM 反応陽性であった。

結論：

以上、本薬 60 mg/kg を投与したときに毒性所見が観察されたことから、BMN 165 をカニクイザルに単回皮下投与したときの無毒性量は 12 mg/kg と判断された。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

BMN 165 の毒性及び TK を評価するために、反復投与毒性試験を 4 試験（ラット 2 試験、サル 2 試験）実施した。ラット及びサルの試験期間をそれぞれ 26 週間及び 39 週間とし、本薬の長期投与を担保した。

2.6.6.3.1　BMN 165 のラットにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 2 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-1、0165-07-009）

試験の目的：

本試験は、雌雄ラットに BMN 165 を週 2 回、28 日間反復皮下投与した場合の毒性を評価し、TK を測定することを目的として実施した。動物を投与後約 2 週間観察し、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.7-1 に示す。

材料と方法：

本試験には雌雄の Crl:CD(SD)ラットを使用し、TK 測定用のサテライト群 4 群を含む 8 群に割り付けた。溶媒、BMN 165 の 1、8 及び 25 mg/kg を週 2 回、4 週間皮下投与した。動物は投与開始時に約 46～52 日齢で、体重は雄が 192～267 g、雌は 147～226 g であった。試験デザインを表 2.6.6.3.1-1 に示す。

表 2.6.6.3.1-1 ラットにおける 4 週間投与毒性試験の試験デザイン

Group	No. of Animals		Dose Level, mg/kg	Dose Volume, mL/kg	Dose Concentration, mg/mL
	Male	Female			
Main Study Animals					
1 (Control) [a,b]	15	15	0	1.22	0
2 (Low)	10	10	1	1.22	0.82
3 (Mid)	10	10	8	1.22	6.56
4 (High) [b,c]	15	15	25	1.22	20.5
Toxicokinetic Animals [d]					
5 (Control) [a,b]	3	3	0	1.22	0
6 (Low)	6	6	1	1.22	0.82
7 (Mid)	6	6	8	1.22	6.56
8 (High) [b,c]	6	6	25	1.22	20.5

SC: subcutaneous.
Study design for 28-day toxicity study with BMN 165, SC in rats with a 2-week recovery.
a) Groups 1 and 5 will received control article only.
b) Animals designated for recovery sacrifice (5 animals/sex in Groups 1 and 4) underwent at least 2 weeks of recovery following dose administration.
c) Nominal concentration, provided by sponsor.
d) Toxicokinetic animals included solely for the purpose of blood sample collections.

全ての動物について、生死、異常行動又は臨床症状を 1 日 2 回観察した。動物の体重は投与前に少なくとも 1 回、投与期間中週 1 回、回復期間は週 1 回測定した。摂餌量は週 1 回測定した。眼科学的検査を投与開始前に全動物で実施し、投与 4 週目に主試験の動物について実施した。全動物について予定剖検時に絶食条件下で尿検査、血液学的検査、血液凝固検査及び血液化学的検査を実施した。サテライト群の動物から非絶食条件下で TK 測定用の血漿試料を採取した。溶媒投与群は 1 回目（1 日目）、4 回目（11 日目）及び 7 回目（22 日目）の投与前、投与後 24 及び 72 時間に血漿試料を採取し、BMN 165 投与群は同じ投与日の投与前、投与後 3、6、9、12、24、36、48、60 及び 72 時間に 1 例当たり 5 時点で試料を採取した。各時点の血漿中濃度データを合成して TK パラメータを算出した。サテライト群の全例から投与開始前、投与期間の 10、14、22 及び 28 日目、回復期間の 1、2 週目に 1 回並びに剖検時に採血し、抗体検査を行った。試験終了時に動物の全身を剖検し、毒性試験の標準的な組織標本を採取して病理組織学的検査に供した。組織採取時に以下の器官重量を測定した（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、脾臓、精巣及び胸腺）。保存した全ての組織について病理組織学的検査を実施し、腎臓の糸球体と近位尿細管曲部の電子顕微鏡検査も行った。

<u>結果：</u>

全例が予定剖検日まで生存した。本試験では、投与期間及び回復期間に被験物質に関連した臨床症状、体重、体重増加量及び摂餌量の変化は認められなかった。少数の動物で投与部位（背部／頸部）に痂皮又は損傷が認められたが、これは被験物質の投与によるものではなく、投与手法に起因すると考えられた。試験期間中に実施した眼科学的検査では、可視的病変は認められなかった。

BMN 165 の投与は臨床病理パラメータに明らかな影響を及ぼさなかった。投与終了時又は回復期間終了時の剖検では、器官重量（絶対／相対重量）に被験物質に関連した変化や肉眼的所

見は認められなかった。投与期間終了時剖検では、対照群の雄 1 例及び雌 2 例並びに 25 mg/kg 群の雄 5 例及び雌 3 例で肝臓のクッパー細胞に単一の透明な空胞からなる軽微な空胞化が認められた。回復期間終了時の剖検では、対照群の雄 2 例で肝臓に軽微な空胞化が認められた。

BMN 165 を 8 mg/kg（雄のみ）又は 25 mg/kg（雌雄）皮下投与した動物で、脾臓の細網内皮細胞に単一の透明な空胞を特徴とする軽微な空胞化が観察された。回復期間後の剖検では、25 mg/kg 群の一部の動物で脾臓に軽微な空胞化が観察された。観察された空胞化について検討するため、本試験の組織を用いて詳細な解析を実施した（試験番号 BMN165-13-069）。当該試験の概要を 2.6.6.4.3 項に示した。

皮下投与を実施した 2 か所の部位では、被験物質に関連する病理組織学的所見として、軽微～重度の線維化及び軽微～軽度のリンパ球／マクロファージ浸潤が認められた。リンパ球／マクロファージ浸潤は被験物質を投与した全ての投与群で一部の動物に認められた。8 及び 25 mg/kg 群の動物で線維化が一層高頻度で観察された。投与部位の所見は 2 週間の回復期間後の剖検で回復が認められた。

ラット血漿中の BMN 165 曝露量は 1 回目の投与後には用量と共に増加した。2 週目（4 回目）の血漿中濃度は 3 用量とも 1 週目を下回った。高用量群では 4 週目（7 回目）の血漿中濃度が 2 週目と比較して増加した。ラットに反復皮下投与した場合の TK については、2.6.4 に詳述した。

投与開始前のベースラインで抗 BMN 165 IgG の抗体価を示した動物はなかった。BMN 165 投与後の抗 AvPAL IgG 抗体価及び抗体発現頻度は、用量依存的ではなく、全例で抗体が認められたわけではなかった。抗体価はおおむね BMN 165 の血漿クリアランスに対応しており、ラットでみられた経時的な曝露量の低下と反復投与後に予想された血漿中蓄積の欠如が説明可能である。

結論：

以上、ラットに BMN 165 を 0、1、8 又は 25 mg/kg の用量で週 2 回 4 週間皮下投与したときの忍容性は良好であった。病理組織学的検査では、脾臓の細網内皮細胞に軽微な空胞化及び投与部位に線維化が認められた。これらの所見はいずれも有害所見とは考えられなかった。したがって、BMN 165 をラットに週 2 回 4 週間皮下投与したときの無毒性量は本試験で評価した最高用量の 25 mg/kg であった。

2.6.6.3.2 BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-2、0165-08-019）

試験の目的：

本 GLP 試験は、ラットに BMN 165 を週 2 回 26 週間皮下投与した場合の毒性を評価し、TK パラメータを決定することを目的として実施した。本試験では 26 週間投与後 12 週間又は 17 週間投与後 4 週間の回復期間を設け、影響の可逆性、持続性及び遅発性の影響を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.7-2 に示す。

材料と方法：

本試験には、雌雄の Crl:CD(SD)ラットを使用し、TK 測定用のサテライト群 4 群を含む 8 群に割り付けた。動物は投与開始時に 49～55 日齢で、体重は雄が 227～298 g、雌は 162～214 g であった。溶媒、BMN 165 の 1、8 及び 25 mg/kg を週 2 回、17 又は 26 週間皮下投与した。投与開始から 33 又は 53 回は肩甲骨間（投与部位 A）に投与し、最終投与は腰部（投与部位 B）に行った。試験デザインを表 2.6.6.3.2-1 に示す。

表 2.6.6.3.2-1　ラットにおける 26 週間投与毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

Main Group	Compound [a]	Dose (mg/kg)	Dosing Frequency	Main Group No. and Gender per Group [b, c]	TK Group	TK Group No. and Gender per Group
1	Vehicle	0	Twice Weekly	35F, 35M	5	9F, 9M
2	BMN 165	1	Twice Weekly	25F, 25M	6	9F, 9M
3	BMN 165	8	Twice Weekly	25F, 25M	7	9F, 9M
4	BMN 165	25	Twice Weekly	35F, 35M	8	9F, 9M

F: female; M: male.
a) Vehicle consists of 10 mmol/L tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS), 135 mmol/L sodium chloride (NaCl), 1 mmol/L trans-Cinnamic Acid (*t*-CA), and 1 mmol/L ammonia.
b) 10 animals/sex/group were designated as interim dosing phase animals and were euthanized after 17 weeks of dose administration. 5 animals/sex in Groups 1 and 4 were designated as interim recovery phase animals and underwent a 4-week recovery period after 17 weeks of dose administration.
c) 15 animals/sex/group were designated as final dosing phase animals and were euthanized after 27 weeks of dose administration. 5 animals/sex in Groups 1 and 4 were designated as final recovery phase animals and underwent a 12-week recovery period after 27 weeks of dose administration.

動物の生死、異常行動、疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察し、詳細な症状観察を週 1 回実施した。動物の体重は投与開始前に 1 回、1 日目の投与前及びその後週 1 回測定した。摂餌量は主試験の動物で毎週測定した。眼科学的検査を、全ての動物について投与開始前、主試験の動物について投与期間 17 週目、17 週間投与動物の回復期間 4 週目、投与期間 26 週目及び 26 週間投与動物の回復期間 12 週目に実施した。血液学的検査、血液凝固検査及び血液化学的検査は、全例について投与開始前の期間に 1 回、投与期間中の 89 及び 117 日目、17 週間投与動物の回復期間 148 日目（剖検時）、投与期間終了時の 187 日目並びに回復期間の 211、246 及び 272 日目に絶食下で実施した。尿検査は、全動物について投与開始前に 1 回、投与期間中の 22、50、89 及び 117 日目、17 週間投与動物の回復期間 148 日目（剖検時）、投与期間終了時の 187 日目（剖検時）並びに回復期間の 211、246 及び 272 日目に絶食下で実施した。

サテライト群の全ての TK 用動物から、非絶食条件下で TK 測定用血漿試料を採取した。BMN 165 投与群では、TK 用試料を 1、50、109 及び 183 日目の投与前並びに投与後約 8、24、48 及び 72 時間（次の投与前）に採取した。また、BMN 165 投与群では 22、78 及び 141 日目の投与前並びに投与後約 8、24 及び 72 時間（次の投与前）にも TK 用試料を採取した。投与終了後の回復期間には、186 日目の最終投与の 24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 及び 264 時間後に一致するように TK 測定用試料を採取した。抗体分析のため、全動物について投与開始前の期間、主試験の動物について投与期間中の 15、29、56、92 及び 120 日目の投与前、17 週間投与動物の回復期間 134 及び 148 日目、最終投与終了日 186 日目の投与前並びに回復期間の 200、211、246 及び 272 日目に、臨床病理学的検査のために絶食する場合を除いて非絶食状態で血清を採取した。

中間剖検の動物は 17 週間投与後の 120 日目に剖検した。17 週間投与後の回復期間の動物は 4 週間の休薬後の 148 日目に剖検した。26 週間投与終了後の動物は 187 日目に回復期間の動物は 12 週間休薬後の 272 日目にそれぞれ剖検した。全動物について予定日に全身の剖検を行い、病理組織学的検査用の組織を採取した。以下の器官（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺、下顎腺、卵巣、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、上皮小体を含む甲状腺、下垂体、前立腺及び子宮）は、採取時に重量を測定した。全ての保存組織の病理組織学的検査を実施した。

結果：

4 例を除き全例が予定剖検日まで生存した。これらの死亡例は BMN 165 投与との関連はないと判断された。

BMN 165 を 25 mg/kg 投与した雌の約半数で、中間剖検及び投与終了後剖検時に投与部位又は腹部背面に被毛の菲薄化が認められた。低用量群では認められなかったが、25 mg/kg 群の雌では 81 日目に早くも薄毛が観察され、しばしばその後の投与期間を通して認められた。この症状は本薬に関連すると考えられたが、薄毛は他の一層重篤な臨床症状との合併がみられず投与中止に至らなかったことから、有害所見とは判断しなかった。25 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 7 例で粗毛が観察された。粗毛が認められた雌の一部では薄毛も観察されたが、粗毛は一過性で少数の動物で発現したことから、本薬に関連するとは考えられなかった。また、17 週間投与後の回復期間及び投与終了後の回復期間には、本薬投与に関連した臨床症状は認められなかった。

中間剖検を実施した 25 mg/kg 群の雄では、溶媒投与群の雄と比較して体重増加量（91.1%）及び摂餌量の減少が認められた。17 週間投与後の回復期間には、25 mg/kg 群の雄の平均体重は溶媒投与群の雄とほぼ同程度であった。投与期間終了時に 25 mg/kg 群の雌雄で、溶媒対照群と比較して体重増加量（雌雄それぞれ 82.9%及び 65.7%）並びに摂餌量の減少が認められたが、投与終了後の回復期間にはこれらの差は認められなかった。25 mg/kg 投与群で認められた低体重及び体重増加抑制は、BMN 165 に関連すると考えられたが、観察されたほとんどの変化は軽度であり、低体重と関連する臨床症状がみられないことから、有害所見とは判断しなかった。

中間剖検の動物では、溶媒投与群と BMN 165 投与群との間で臨床病理学的検査値に統計学的に有意な又は特記すべき差異はほとんど認められなかった。本薬に関連すると考えられる変化として、25 mg/kg 群の雌雄で軽微なトリグリセリドの減少、25 mg/kg 群の雄、8 及び 25 mg/kg 群の雌で軽微なアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の減少、25 mg/kg 群の雄で軽微な ALP の減少、並びに 25 mg/kg 群の雄で軽微な尿 pH の低下が認められたのみであった。これらの軽微な変化は摂餌量及び体重増加量の減少と関連している可能性が高く、毒性学的意義は乏しいと考えられた。

投与期間終了時の動物でも、溶媒投与群と BMN 165 投与群との間で、臨床病理学的検査値に統計学的に有意な又は特記すべき差異はほとんど認められなかった。本薬に関連すると考えられる変化として、25 mg/kg 群の雌雄で軽微なトリグリセリドの減少、25 mg/kg 群の雄、8 及び 25 mg/kg 群の雌で軽微な ALT の減少（雌で一過性の低値）並びに 25 mg/kg 群の雄、8 及び 25 mg/kg 群の雌で軽微な尿 pH の低下が認められたのみであった。これらの軽微な影響の具体的な機序は明らかではないが、毒性学的に重要な変化ではないと考えられ、いずれも回復期間終了までに回復性を示した。

25 mg/kg 群の雄 1 例は、投与期間終了時の 187 日目に顕著な腎機能障害のエビデンスを示した（例：尿素窒素 121 mg/dL、クレアチニン 3.4 mg/dL、無機リン 16.1 mg/dL）。この動物の血清中 AST 濃度（154 U/L）は対照群と差がなかったが、腎機能障害を示す尿細管変性／壊死及び顆粒円柱の病理組織学的所見が認められた。25 mg/kg 群の他の動物で類似した病理組織学的又は臨床病理学的変化が認められなかったことから、これらの変化は偶発的な所見と考えられた。

17 週間投与後の中間剖検では、25 mg/kg 群の雄で心臓、肝臓及び甲状腺の平均絶対重量及び脳相対重量に統計学的に有意な減少が認められた。これらの器官では器官重量の減少と相関する肉眼的又は病理組織学的変化が認められないこと、並びに肝臓及び甲状腺の脳相対重量の比較は体重相対重量と比べて信頼性が低いことから、これら器官重量の減少は BMN 165 投与の直接的影響ではなく、25 mg/kg 群における体重減少と関連する可能性が考えられる。なお、17 週間投与後の回復期間の剖検時に認められた肉眼的所見については病理組織学的検査を実施しなかったが、観察された少数の肉眼的所見で BMN 165 と関連する重要な所見と判断される変化はなかった。

17 週間投与後の中間剖検では、本薬投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。17 週間投与後の回復期間の剖検でも、BMN 165 と関連する肉眼的所見は認められなかった。

17 週間投与後の中間剖検における病理組織学的検査の成績を表 2.6.6.3.2-2 に示す。

表 2.6.6.3.2-2　17 週中間剖検における病理組織学的所見の発現頻度及び程度

Sex	Males				Females			
Dose Level BMN 165 (mg/kg/dose)	**0**	**1**	**8**	**25**	**0**	**1**	**8**	**25**
No. Examined	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Kidney								
Vacuolation/ Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal								
Minimal	0	0	0	3	0	0	1	2
Liver								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	5	0	0	1	6
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Spleen								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	5	0	0	1	4
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	5	0	0	2	7
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3
Lymph Node, Mandibular								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	4	0	0	5	4
Slight	0	0	0	3	0	0	0	5

表 2.6.6.3.2-2　17 週中間剖検における病理組織学的所見の発現頻度及び程度（続き）

Sex	Males				Females			
Dose Level BMN 165 (mg/kg/dose)	**0**	**1**	**8**	**25**	**0**	**1**	**8**	**25**
No. Examined	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Adrenal, Cortex								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	3
Testes								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	10	NA	NA	NA	NA
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	4	0	0	0	3	4	0
Slight	0	1	7	0	0	0	5	0
Moderate	0	0	3	8	0	0	0	6
Marked	0	0	0	2	0	0	0	4
Fibrosis								
Minimal	0	0	3	1	0	0	2	1
Slight	0	0	2	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	1	9	0	0	0	9
Infiltrate, Lymphocytes								
Minimal	0	2	1	3	0	2	2	4
Slight	0	1	0	0	0	0	1	0
Degeneration, Skeletal Muscle/Adipocytes, Dermis								
Minimal	0	0	0	2	0	0	0	0
Subcutaneous Injection Site B								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	0	8	4	0	0	4	2
Slight	0	0	0	2	0	0	0	4
Moderate	0	0	0	2	0	0	0	2

これら一部の動物で認められた所見として、25 mg/kg の雄 3 例及び 8 mg/kg 以上の雌 3 例で、腎臓に軽微な限局性又は多巣性の尿細管細胞空胞化及び肥大が認められた。典型的には単一の透明な細胞質空胞を特徴とする空胞の増加が、25 mg/kg 群の雄及び 8 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節の組織球細胞並びに 25 mg/kg 群の雌 3 例の副腎皮質で観察された。25 mg/kg 群の雄 10 例では、精巣間質に微小空胞を有する小型の組織球細胞が認められた。これらの空胞は一般に組織球細胞内での遅い PEG の異化と関連する(2) (3)。

投与部位 A では、BMN 165 に関連する病理組織学的変化として 1 mg/kg 以上の群で軽微～顕著な空胞化組織球の浸潤、8 mg/kg 以上で軽微～中等度の線維化、及び 1 mg/kg 以上で軽微～軽度のリンパ球浸潤が認められた。投与部位 B では、本薬投与に関連する病理組織学的所見として 8 mg/kg 以上の投与群で軽微～中等度の空胞化組織球の浸潤が認められた。17 週間投与後の中間剖検で認められたその他の病理組織学的所見は自然発生又は偶発的な所見と考えられた。

投与期間終了後及び回復期間終了後の剖検では本薬投与に関連する器官重量の変化は認められなかった。投与期間終了後の剖検では 8 mg/kg 群の雄で下垂体の脳相対重量、1 及び 25 mg/kg 群の雄で腎臓の体重相対重量並びに 1 及び 8 mg/kg 群の雄で腎臓の脳相対重量の増加が認められた。下垂体及び腎臓における器官重量の変化は、明瞭な用量反応性や雌雄の一貫性がみられず相関する病理組織学的変化が認められないことから、正常範囲内の生物学的変動である可能性が高く、BMN 165 の直接作用とは判断しなかった。

投与期間終了後及び回復期間終了後の剖検では本薬投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。投与期間終了時の剖検では投与部位 A にのみ BMN 165 に関連した肉眼的所見が認められた。8 mg/kg 以上の群で皮下投与部位の肥厚が観察され、病理組織学的所見との関連が認められた。投与期間終了時又は回復期間終了時に認められたこれ以外の全ての肉眼的所見は自然発生又は偶発的所見であり、BMN 165 投与とは関連がないと考えられた。

投与期間終了時（26 週目）に認められた病理組織学的所見の概略を表 2.6.6.3.2-3 に示す。回復期間終了時（39 週目）の剖検で認められた病理組織学的所見は表 2.6.6.3.2-4 に示す。

表 2.6.6.3.2-3　投与期間終了時における病理組織学的所見の発現頻度及び程度

Sex	**Males**				**Females**			
Dose Level BMN 165 (mg/kg/dose)	0	1	8	25	0	1	8	25
No. Examined	15	12	15	15	15	15	15	15
Kidney								
Vacuolation/Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal								
Not Present	15	12	7	4	15	15	14	8
Minimal	0	0	8	10	0	0	1	7
Slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Liver								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Not Present	15	12	15	7	15	15	14	6
Minimal	0	0	0	8	0	0	1	7
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Spleen								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Not Present	15	12	15	5	15	15	14	0
Minimal	0	0	0	7	0	0	1	9
Slight	0	0	0	3	0	0	0	5
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Not Present	15	12	15	8	15	15	11	4
Minimal	0	0	0	7	0	0	4	11

表 2.6.6.3.2-3 投与期間終了時における病理組織学的所見の発現頻度及び程度（続き）

Sex	Males				Females			
Dose Level BMN 165 (mg/kg/dose)	0	1	8	25	0	1	8	25
No. Examined	15	12	15	15	15	15	15	15
Lymph Node, Mandibular								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Not Present	15	12	15	1	15	15	10	1
Minimal	0	0	0	10	0	0	5	11
Slight	0	0	0	3	0	0	0	3
Adrenal, Cortex								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Not Present	15	12	15	14	15	15	15	11
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	4
Testes								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Not Present	15	12	15	2	NA	NA	NA	NA
Minimal	0	0	0	13	NA	NA	NA	NA
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Not Present	15	4	0	0	15	7	2	0
Minimal	0	6	1	0	0	8	1	0
Slight	0	2	3	1	0	0	6	2
Moderate	0	0	11	8	0	0	6	9
Marked	0	0	0	6	0	0	0	4
Fibrosis								
Not Present	15	7	1	1	15	15	2	0
Minimal	0	5	0	0	0	0	3	1
Slight	0	0	1	1	0	0	7	2
Moderate	0	0	13	13	0	0	3	12
Degeneration, Skeletal Muscle/Adipocytes, Dermis								
Not Present	15	12	13	2	15	15	13	1
Minimal	0	0	2	6	0	0	2	4
Slight	0	0	0	5	0	0	0	7
Moderate	0	0	0	2	0	0	0	3
Subcutaneous Injection Site B								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Not Present	15	11	3	6	15	14	10	4
Minimal	0	1	12	8	0	1	5	10
Slight	0	0	0	1	0	0	0	1
Degeneration, Skeletal Muscle/Adipocytes, Dermis								
Not Present	15	12	13	13	15	15	13	9
Minimal	0	0	2	2	0	0	2	6

表 2.6.6.3.2-4 回復期間終了時における病理組織学的所見の発現頻度及び程度

Sex	Males		Females	
Dose Level BMN 165 (mg/kg/dose)	**0**	**25**	**0**	**25**
No. Examined	**5**	**5**	**5**	**5**
Kidney				
Vacuolation/Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal				
Not Present	5	0	5	2
Minimal	0	4	0	3
Slight	0	1	0	0
Liver				
Vacuolation, Histiocytic Cells				
Not Present	5	5	5	4
Minimal	0	0	0	1
Spleen				
Vacuolation, Histiocytic Cells				
Not Present	5	2	5	0
Minimal	0	3	0	4
Slight	0	0	0	1
Lymph Node, Mesenteric				
Vacuolation, Histiocytic Cells				
Not Present	5	4	5	0
Minimal	0	1	0	5
Lymph Node, Mandibular				
Vacuolation, Histiocytic Cells				
Not Present	5	0	5	0
Minimal	0	5	0	5
Adrenal, Cortex				
Vacuolation, Histiocytic Cells				
Not Present	5	5	5	4
Minimal	0	0	0	1
Testes				
Vacuolation, Histiocytic Cells				
Not Present	5	1	NA	NA
Minimal	0	4	NA	NA
Subcutaneous Injection Site A				
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated				
Not Present	5	1	5	3
Minimal	0	4	0	2
Fibrosis				
Not Present	5	1	5	2
Minimal	0	0	0	1
Slight	0	4	0	2

投与期間終了時に観察された本薬投与に関連する病理組織学的所見は 17 週間投与後の所見と類似しており、腎臓及び精巣については回復期間に認められた所見と類似していた。一部の動物で観察された所見として、8 mg/kg 群の雄 8 例及び雌 1 例並びに 25 mg/kg 群の雄 11 例及び

雌 7 例で腎尿細管細胞が軽微～軽度に空胞化／肥大した領域が限局性又は多巣性に認められた。12 週間の回復期間終了後には、25 mg/kg 群の動物で腎尿細管細胞の空胞化／肥大が持続しており、回復性のエビデンス（発現頻度又は程度）は認められず、本所見の毒性学的意義は不明であった。本所見は PEG 化したタンパク質の投与に関連する可能性がある(2)。投与期間終了時に 25 mg/kg 群の雄 1 例で腎臓に軽度の尿細管細胞の変性／壊死及び顆粒円柱が認められた。BMN 165 を投与した他の動物で同様の所見は認められず、これらの所見は偶発的変化であり本薬投与との関連はないと考えられた。

典型的には単一の透明な細胞質空胞を特徴とする空胞化組織球細胞が 25 mg/kg 群の雄及び 8 mg/kg 以上の雌の肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節並びに 25 mg/kg 群の雌雄の副腎皮質で観察された。25 mg/kg 群の雄 13 例でも精巣間質に微小空胞を有する小型の組織球細胞が認められた。12 週間の回復期間終了時には雌の肝臓及び副腎皮質、雄の精巣、並びに雌雄の脾臓、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節で組織球細胞の軽微な空胞化が持続して認められた。回復期間終了時には、影響がみられた多くの組織で空胞化組織球の発現頻度／程度はおおむね低下が認められ、回復傾向が示唆された。本試験の範囲では、これらの組織における BMN 165 投与と関連した組織球細胞の空胞化は毒性学的に重要ではないと考えられた。これらの観察された空胞化について更に検討するため、引き続いてこれらの試験で得られた組織の分析を実施し、その結果を 2.6.6.4.1 項、2.6.6.4.2 項、2.6.6.4.3 項及び 2.6.6.4.4 項に示す（試験番号 BMN165-13-047、BMN165-13-068、BMN165-13-069 及び 0165-08-019）。

投与期間終了時に BMN 165 投与に関連する所見として、投与部位 A では 1 mg/kg 以上の群で軽微～顕著な空胞化組織球浸潤、1 mg/kg 以上の雄及び 8 mg/kg 以上の雌で軽微～中等度の線維化、並びに 8 mg/kg 以上の群で皮膚深部の骨格筋及び／又は脂肪細胞に軽微～中等度の変性が認められた。投与部位 B では本薬投与に関連する所見として、1 mg/kg 以上の群で軽微～軽度の空胞化組織球浸潤、並びに 8 mg/kg 以上の動物で皮膚深部の骨格筋及び／又は脂肪細胞に軽微な変性が認められた。

回復期間終了時には投与部位 A で軽微な空胞化組織球浸潤及び軽微～軽度の線維化が認められたのみであり、明確な回復性のエビデンスが示された。投与部位 B の所見は回復期間終了時までに完全な回復性が認められた。投与部位の所見は局所的であり、回復期間中に一部又は完全に回復したことから本試験ではこれらの変化は有害所見とは判断しなかった。投与期間終了時及び回復期間終了時の動物で認められた他の病理組織学的所見は、自然発生又は偶発的な所見と考えられた。

BMN 165 の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}72hr}$ 及び C_{max}）は 1、8、16 及び 27 週目に 1～25 mg/kg で用量に比例するとみられる。

血漿中の BMN 165 濃度は全群で投与 1 週目に増加し、4 週目に減少した。8 及び 25 mg/kg 群では 8 週目に血漿中の BMN 165 濃度が増加した。4 週目の減少は抗 BMN 165 抗体の産生による可能性が考えられる。

8、16 及び 27 週目の測定では反復投与による BMN 165 の蓄積はほとんど又は全く認められなかった。1 mg/kg から 8 mg/kg 及び 25 mg/kg への用量の増加に伴い、一般に蓄積係数が 1.0

以上に増加するようにみられた。高用量（8 及び 25 mg/kg）における 8 週目の蓄積係数は 16 及び 27 週目よりも大きいと考えられる。

本薬を投与したほとんどの動物で 15 又は 29 日目までに抗 BMN 165 IgG の抗体価が測定可能であったが、溶媒を投与した雄 1 例では例外的に投与開始前及び 15 日目の時点のみ抗 BMN 165 抗体が陽性であった。全体的な抗体価は BMN 165 の 1 mg/kg 群で最も高く、25 mg/kg 群で最も低かった。本薬 1 mg/kg を投与した投与期間中の雄 1 例及び投与期間終了時の雌 1 例では、120 日目に抗 BMN 165 中和抗体が陽性であった。試験期間中、他の全ての動物は抗 BMN 165 中和抗体が陰性であった。

結論：

以上、ラットに BMN 165 を週 2 回 26 週間反復皮下投与したときの無毒性量は、本試験で認められた毒性所見から 1 mg/kg と判断された。投与 27 週目の雄及び雌ラットの C_{max} はそれぞれ 315 及び 3673 ng/mL、$AUC_{0\text{-}72hr}$ はそれぞれ 10,064 及び 124,876 ng•hr/mL であった。

2.6.6.3.3　BMN 165 のカニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-3、0165-07-008）

試験の目的：

本試験は、カニクイザルに BMN 165 を週 2 回 28 日間反復皮下投与した場合の毒性を評価し、TK パラメータを決定することを目的として実施した。回復性試験の動物は投与終了後約 4 週間観察し、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.7-3 に示す。

材料と方法：

本試験には、未使用の雌雄カニクイザルを使用し、投与開始時に 2～3 歳齢で、体重は雄が 2.5～3.0 kg、雌は 2.2～2.4 kg であった。動物を 4 群に割り付け、各週の 1 日目と 4 日目に週 2 回 4 週間、0.5 mL/kg の投与液量で皮下投与した。初回投与から 7 回は同一部位に投与し、8 回目は反対側に投与した。試験デザインを表 2.6.6.3.3-1 に示す。

表 2.6.6.3.3-1　カニクイザルにおける 4 週間投与毒性・TK 試験の試験デザイン

Group	Compound [a]	Dose (mg/kg) [b]	Dosing Frequency	Total Dose (mg/kg)	Number and Gender	
					Main	Recovery
1	Vehicle	0	Twice weekly	0	3M, 3F	2M, 2F
2	BMN 165	0.01	Twice weekly	0.08	3M, 3F	NA
3	BMN 165	0.1	Twice weekly	0.8	3M, 3F	NA
4	BMN 165	1.0	Twice weekly	8.0	3M, 3F	2M, 2F

F: female; M: male; NA: Not applicable; SC: subcutaneous.
Study design for a 28-day SC toxicity study with BMN 165 in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery.
a) Vehicle lot # NB1614-07001, BMN 165 lot # NP160701.
b) Group 1, 4 dose was dose volume normalized to 0.5 mL/kg.

動物の生死、異常行動及び臨床症状を 1 日 2 回観察した。体重は、投与開始前の期間に 4 回、投与日、その後は週 2 回測定した。摂餌量は毎日の観察時に定性的に評価した。眼科学的検査を投与開始前及び 4 週目に実施した。10 誘導心電図システムを用いて、投与開始前及び 4 週目

に心電図を記録した。尿検査、血液学的検査、血液凝固検査及び血液化学的検査は、絶食した動物を用いて投与開始前の期間に 2 回、投与期間の 3 及び 23 日目並びに回復期間 28 日目に実施した。TK 測定用の血漿試料は、全動物から投与 1 日目（1 回目）、8 日目（3 回目）及び 22 日目（7 回目）の投与前及び投与後 9、24、36、48、60 及び 72 時間に採取した。最終投与（8 回目）の 24 時間後に全例で採血を行った。回復性試験の動物は、全例から最終投与後 48、72、96、120、144、168、216、264、312、360、504 及び 672 時間に採血した。全投与群について、1（投与前及び投与後 9 時間）、3、4 及び 7 回目並びに回復期間の血漿の一部を用いて、血漿中の Phe 濃度を分析した。抗体測定のため、投与開始前、投与 10、14、22 及び 28 日目に採血を行った。回復性試験の動物は 2 週目及び 4 週目に 1 回採血した。動物実験終了時に全身の剖検を実施し、病理組織学的検査用の組織を採取した。以下の器官（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、胆汁を排出した胆嚢を含む肝臓、肺、卵巣、下垂体、前立腺、顎下腺、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、上皮小体を含む甲状腺及び子宮）は、採取時に重量を測定した。全ての保存組織の病理組織学的検査を実施し、腎臓の糸球体と近位尿細管曲部の電子顕微鏡検査も行った。

<u>結果：</u>

全例が予定剖検日まで生存した。BMN 165 を 1.0 mg/kg までの用量で投与した動物の体重、体重増加量及び摂餌量に被験物質と関連する変化はみられなかった。1.0 mg/kg までの用量で、臨床病理パラメータに有意な変化はみられなかった。投与 4 週目に実施した心電図検査で、心電図パラメータに本薬の影響は認められなかった。

雄の一部（1.0 mg/kg 群の 3 例中 2 例、及び 0.01 mg/kg 群の 3 例中 1 例）で、腎臓の尿細管細胞にごく少量又は少量の色素が認められた。この変化は、近位尿細管上皮細胞の細胞質内に微細な褐色色素顆粒の存在を特徴とし、被験物質に関連する所見と考えられた。投与期間終了時には一部の動物で肝臓に被験物質との関連が考えられる軽微～軽度のクッパー細胞過形成が認められたが、この所見は対照群の動物でも回復期間に観察された。この変化は用量反応性が認められず、おそらく肝臓の細網内皮系としてのクッパー細胞の機能に起因すると考えられる。

雌雄カニクイザルに BMN 165 を 0.01、0.1 及び 1 mg/kg/dose の用量で投与したとき、投与部位の所見として、皮下組織で血管周囲に軽微～中等度のリンパ球及びマクロファージの浸潤が認められたが、この変化は用量依存性がみられず、回復期間 4 週目までに回復傾向が認められた。被験物質又は対照物質を皮下投与した動物では両方の投与部位の皮下組織に軽微～軽度の肉芽腫性炎症が認められた。

0.1 mg/kg 群の雄 1 例（肺、胆嚢、腎臓、結腸、膵臓、脾臓及び前立腺）、1 mg/kg 群の雄 1 例（肺）及び 1 mg/kg 群の雌 1 例（肺及び胃）で、主に中型の筋性動脈に軽微～軽度の血管変性が認められた。0.01 mg/kg 群及び対照群では、投与期間終了時又は回復期間の剖検で、いずれの動物にも血管変性が認められなかったことから、血管変性は被験物質に関連した病理組織学的変化の可能性があり、有害所見と考えられた。

本薬を 0.01 mg/kg 皮下投与した雄動物では、血漿中に BMN 165 は検出されなかったが、これはアッセイの感度と投与した薬物の用量が低いことに起因する可能性が高い。投与 4 週目には 1 週目及び 2 週目と比較して 3 用量とも血漿中濃度が著しく低下し、低用量の 2 群では定量下限（100 ng/mL）未満となった。この BMN 165 曝露量の変化は、免疫原性、特に中和又は除

去抗体の存在を示す可能性が考えられる。本試験の TK パラメータを表 2.6.6.3.3-2 に示し、2.6.4 に詳述した。

表 2.6.6.3.3-2 BMN 165 を週 2 回皮下投与したサルの TK パラメータ

Group	Dose, mg/kg	Time point	C_{max}, ng/mL	T_{max}, hr	AUC_{0-t}, ng•hr/mL	Accumulation Index, Dose 3/Dose 1
2	0.01	Dose 1	128 [b]	42.0 [b]	2318 [a]	NA
		Dose 3	280 [a]	36.0 [a]	7890 [a]	NA
3	0.1	Dose 1	689 (384)	33.0 (20.6)	30,066 (14,465)	NA
		Dose 3	1079 (787)	26.5 (19.7)	70,062 (40,973)	3.59 (6.07)
4	1.0	Dose 1	9873 (5372)	41.7 (13.7)	425,366 (178,337)	NA
		Dose 3	27,781 (12,193)	39.3 (29.2)	1,238,924 (397,836)	3.32 (1.67)

Data presented are mean (SD: standard deviation). NA: Not applicable.
a) n = 1.
b) n = 2.

BMN 165 の初回投与後、血漿中 Phe 濃度は用量依存的に減少した。1.0 mg/kg 群では、血漿中の BMN 165 蓄積のため、血漿中の Phe 濃度が定量下限を下回った。0.1 及び 1.0 mg/kg 群では、7 回目の投与までに血漿中の Phe 濃度がベースライン値に戻り、血漿中の BMN 165 濃度が減少したことと一致した。0.01 mg/kg 群の血漿中 Phe 濃度は溶媒対照群と同程度であった。

全ての群で少数例はベースラインで抗 rAvPAL IgG 抗体価が低値であった。溶媒対照群及び 0.01 mg/kg 群では、いずれの測定時点においても抗 rAvPAL IgG 抗体の反応が認められなかった。0.1 及び 1 mg/kg 群では抗 rAvPAL IgG 抗体価が経時的に上昇した。抗 rAvPAL-PEG IgM 抗体は測定した全ての時点で陰性であった。同時に、血漿中 Phe 濃度のベースライン値への上昇に伴い、投与 4 週目に BMN 165 濃度は著しく低下したが、抗 rAvPAL-PEG IgG 抗体価は投与期間及び回復期間を通して上昇した。

結論：

以上、サルに BMN 165 を週 2 回 4 週間反復皮下投与したときの無毒性量は、0.1 mg/kg/dose 以上の用量で毒性所見が認められたことから、0.01 mg/kg/dose であった。

2.6.6.3.4 BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験

（CTD: 4.2.3.2-4、0165-07-030）

試験の目的：

本 GLP 試験は、カニクイザルに BMN 165 を週 2 回 39 週間皮下投与した場合の毒性を評価し、TK パラメータを決定することを目的として実施した。13 週間の休薬期間を設けて、影響の回復性、持続性及び遅発性の影響を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.7-4 に示す。

材料と方法：

本試験には、未使用の雌雄カニクイザルを使用し、投与開始時に約 3～6 歳齢で、体重は雄が 3.2～4.8 kg、雌は 2.6～4.5 kg であった。動物を 6 群に割り付け、各週の 1 日目と 4 日目に週 2 回、溶媒又は BMN 165 を皮下投与した。背部の 3 か所の投与部位（投与部位 A、B、C）をロ

ーテーションして皮下投与を行い、最終投与は投与部位 D に実施した。試験デザインを表 2.6.6.3.4-1 に示す。

表 2.6.6.3.4-1　カニクイザルにおける 39 週間反復投与毒性・TK 試験の試験デザイン

Group	Compound	Dose (mg/kg)	Dosing Frequency	Dosing Phase No. and Gender per Group	Recovery Phase No. and Gender per Group
1	Vehicle	0	Twice weekly[a]	5M/5F	3M/3F
2	BMN 165	0.01	Twice weekly[a]	3M/3F	NA
3	BMN 165	0.1	Twice weekly[a]	3M/3F	NA
4	BMN 165	1.0	Twice weekly[a]	3M/3F	NA
5	BMN 165	3.0	Twice weekly[a]	4M/4F	3M/3F
6	BMN 165	7.0/5.0/3.0[b]	Twice weekly[a]	5M/5F	3M/3F

F: female; M: male; NA: Not applicable.
a) Dose administered on the first and fourth day of each dosing week.
b) Animals were administered 7.0 mg/kg on Days 1, 4, and 8; were not dosed on Days 11 and 15; were administered 5.0 mg/kg on Day 18, were not dosed from Day 22 to 43, and resumed dose administration at 3.0 mg/kg on Day 46.

動物の生死、異常行動、及び疼痛又は苦痛症状を 1 日 2 回観察した。1 日 1 回ケージサイド観察を行い。詳細な臨床観察を週 1 回実施した。摂餌量は毎日の観察時に定性的に評価した。体重は、投与開始前の期間に少なくとも 1 回、1 日目の投与前、その後は週 1 回測定した。眼科学的検査及び 10 誘導心電図システムを用いた心電図検査を、投与開始前及び 39 週目にそれぞれ 1 回実施した。

尿検査、血液学的検査、血液凝固検査及び血液化学的検査用の試料を、投与開始前、並びに投与 15、25、57、85、113、141、176、211、239、267、295、330 及び 366 日目に絶食下の動物で採取した。BMN 165 の曝露量、部分的又は完全な TK プロファイルを確認するために、非絶食動物で血漿を採取した。1 日目及び投与期間の最終週である 267 日目に、完全な TK プロファイルを得るための採血（投与後 9、24、48 及び 72 時間）を実施した。8、15、50、78、106、134、176、204 及び 232 日目には、部分的な TK プロファイルを得るための採血（投与前、投与後 48 及び 72 時間）を行い、さらに 78 及び 176 日目の投与後 9 時間の時点で採血した。これ以外の全ての週に 1 回、曝露量を確認するための血漿試料を採取した。休薬後の曝露量を確認するため、274、277、281、284、288、291、295、298、302、305、309、312、330 及び 366 日目に回復性試験の動物から血漿を採取した。全動物の全ての TK 測定時点で得られた血漿試料を用いて血漿中の Phe 濃度を測定した。抗体分析用の血清試料を、投与開始前並びに 8、15、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176、190、204、218、232、246、267、274、302、330 及び 366 日目に非絶食動物で採取した。

主試験の動物は投与 275 日目、回復性試験の動物は 366 日目に剖検を行った。全身の剖検を実施し、病理組織学的検査のため種々の組織を採取した。以下の器官（副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、胆汁を排出した胆嚢を含む肝臓、肺、下顎腺、卵巣、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、上皮小体を含む甲状腺、下垂体、前立腺及び子宮）は採取時に重量を測定した。保存組織を用いて病理組織学的検査（ピアレビュー及び第三者ピアレビューを含む）を実施した。対照群及び高用量群（3.0 mg/kg 群及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群）の全例で、腎皮質及び髄質の電子顕微鏡検査を実施した。対照群及び高用量群（3.0 mg/kg 群及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群）で一部の動物の肝

臓、腎臓及び心臓を用いて、BMN 165、PEG、IgG、IgM 及び補体マーカー（SC5b-9 及び C3）の IHC 染色を行った。

結果：

1、4 及び 8 日目に BMN 165 を 7.0 mg/kg 投与した雌は 1 週目に摂餌量の低下又は無摂餌が続き、有意な体重減少及び／又は活動性低下を示した。このため、7.0 mg/kg 群の全ての雌雄で 11 及び 15 日目の投与を中止し、摂餌量が正常化して体重増加が認められた 18 日目に 5.0 mg/kg で投与を再開した。雌では 18 日目の投与以降に症状の再発が認められ、7.0/5.0 mg/kg 群の雌雄は 22、25、29、32、36、39 及び 43 日目の投与を中止した。46 日目に 3.0 mg/kg で投与を再開し、その後の投与期間は症状の発現がなく投与を継続した。7.0 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 I04873）は、食欲不振と全身状態の悪化のため 12 日目に切迫屠殺した。この動物では切迫屠殺時に臨床病理学的所見として、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、網状赤血球数及び総タンパクの中等度減少が認められ、他の 7.0 mg/kg 群の雌で 15 日目に認められた臨床病理学的所見と一致していた。剖検時の肉眼的観察では皮膚の脱毛、胃の変色及び甲状腺の腫大が認められた。病理組織学的検査では、この動物で認められた所見が投与期間終了時に同群の他の動物でも認められ、BMN 165 に関連する所見として、胃、子宮及び膣にリンパ球／マクロファージの軽微な血管／血管周囲性浸潤、並びに中等度の胸腺萎縮が認められた。血漿中 BMN 165 濃度は同用量を投与した他の動物と同程度であった。この雌の血漿中 Phe 濃度は投与後 9 時間以内に定量下限（1.0 µmol/L）付近まで急速に低下し、2 日目から投与終了時まで定量下限未満であった。低い抗体価の抗 rAvPAL IgG 抗体が検出されたが、抗 rAvPAL IgM 抗体又は抗 BMN 165 中和抗体（NAb）は検出されなかった。

他の動物は全て主試験の投与期間又は回復期間終了時の予定剖検日まで生存した。7.0/5.0 mg/kg 群の雌で 1 及び 3 週目に認められた変化を除いて投与期間及び回復期間のいずれの動物でも一般状態、摂餌量、体重及び体重増加量に変化はみられなかった。眼科学的検査で本薬投与に関連した変化は認められなかった。麻酔下で、BMN 165 投与に起因する洞調律及び心電図所見の異常は認められなかった。7.0/5.0 mg/kg 群の雌で 15 及び 25 日目にのみ臨床病理学的変化が認められた。このような変化として、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、網状赤血球数、尿素窒素、総タンパク（アルブミン及びグロブリンの減少による）並びにコレステロールの軽度～中等度減少が認められた。これらの所見は少なくとも部分的には摂餌量の減少に起因しており、投与量を 3.0 mg/kg に減量することで回復した。その後の投与期間には、いずれの動物においても、これ以外の本薬投与に関連する臨床病理学的所見は認められなかった。

投与期間終了時の剖検では、BMN 165 投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。雄の前立腺、精嚢、精巣上体及び精巣並びに雌雄の脾臓で器官重量の増加が観察されたが、相関する肉眼的又は病理組織学的所見は認められなかった。7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雄、並びに 0.01、1.0、3.0 又は 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雌で、脾臓の絶対重量及び相対重量の増加が認められた。全投与群の雄で精巣上体、前立腺及び精巣の絶対・相対重量が増加し、1.0 mg/kg/dose 以上の投与群の雄で精嚢の絶対・相対重量が増加した。投与群間で動物の成熟度の違いが雄の生殖器の絶対・相対重量に影響した可能性がある。

BMN 165 投与に関連する病理組織学的所見として、動脈炎、投与部位の血管周囲性細胞浸潤、胸腺萎縮及び胸骨骨髄のリンパ性結節の増加が認められ、このうち動脈炎のみが有害所見と考えられた。3.0 mg/kg 群（グループ 5）の雄 1 例及び雌 4 例並びに 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群（グループ 6）の雄 3 例及び雌 3 例で広範な器官（腎臓、膀胱、膵臓、胆嚢、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肺、心臓、坐骨神経、涙腺、下顎リンパ節、精巣上体、精嚢、卵巣、子宮、子宮頸、膣、投与部位 C 及び D）に様々な程度で小動脈・細動脈の炎症が観察された。

動脈炎が認められた動物では、通常 1 つ又は複数の器官で所見が観察された。動脈炎の発現頻度及び程度に関する個体別データは 0165-07-030 試験報告書に記載しており、グループ別の要約を表 2.6.6.3.4-2 に示した。

表 2.6.6.3.4-2 39 週目における動脈炎の発現頻度及び程度

Sex	Male						Female					
Group	1	2	3	4	5[a]	6[a]	1	2	3[a]	4	5[a]	6[a]
No. Examined[d]	5[b]	3	3	3	4[b]	5	5[b,c]	3	3	3	4	4
Kidney	0	0	0	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0	0	0	0	2 (2.5)	2 (2.5)
Urinary Bladder	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (3.0)
Pancreas	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0	0	0	0	1 (3.0)	1 (1.0)
Gallbladder	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0	0	0	0	1 (2.0)	0
Esophagus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2.0)	0
Stomach	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0	1 (3.0)	2 (1.5)
Duodenum	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0	0	0	0	1 (2.0)	1 (1.0)
Jejunum	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0	0	0	0	1 (2.0)	0
Ileum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2.0)	1 (1.0)
Cecum	0	0	0	0	0	3 (1.0)	0	0	0	0	1 (4.0)	2 (2.0)
Colon	0	0	0	0	0	3 (1.0)	0	0	0	0	1 (3.0)	0
Rectum	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0	2 (2.0)	2 (1.5)
Lung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0
Heart	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0	2 (2.5)	1 (1.0)
Nerve, Sciatic	0	0	0	0	0	1 (2.0)	0	0	0	0	1 (3.0)	1 (1.0)
Lacrimal Gland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1.0)	0
Lymph Node, Mandibular[b]	0	0	0	0	0	1 (2.0)	0	0	0	0	0	0

表 2.6.6.3.4-2 39 週目における動脈炎の発現頻度及び程度（続き）

Sex	Male						Female					
Group	1	2	3	4	5[a]	6[a]	1	2	3[a]	4	5[a]	6[a]
No. Examined[d]	5[b]	3	3	3	4[b]	5	5[b,c]	3	3	3	4	4
Epididymis	0	0	0	0	0	1 (3.0)	-	-	-	-	-	-
Seminal Vesicle	0	0	0	0	0	1 (1.0)	-	-	-	-	-	-
Ovary	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	2 (2.0)	0
Uterus	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	2 (3.0)	2 (2.0)
Cervix	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1 (4.0)	0
Vagina[c]	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1 (3.0)	0
Subcutaneous Site C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1.0)	1 (1.0)
Subcutaneous Site D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (1.0)

a) Incidence and mean severity ( ) based on number of animals with finding.
b) No. animals examined for mandibular lymph node is “4” in Group 1 animals and “3” Group 5 males.
c) No. animals examined for vagina is “4” in Group 1 females.
d) Main study animals at Week 39.

一部の動物で認められた動脈炎は様々な程度のマクロファージ、リンパ球、線維芽細胞、好中球、好酸球及び形質細胞の細胞浸潤によって小～中動脈の外膜、中膜及び内膜が拡張又は閉塞することを特徴とし、時に細胞残屑、空胞又はタンパク性物質が認められた。動脈内腔で稀に血栓が観察された。動脈の炎症は重要な器官を含む多くの器官／組織に広く分布し、一部の器官／組織での重症度並びに器官の機能に対する障害作用が推定されることから、この変化は有害所見と考えられた。特定の好発部位がなく広範な器官に動脈炎が認められることから全身性動脈炎と一致すると考えられた。0.1 mg/kg 群の雌 1 例では、胃の小動脈の 1 か所で中膜内に少量の核融解片とアポトーシス細胞が認められた。この所見はカニクイザルの背景病変として散見される自然発生動脈炎の所見と一致すると考えられた。

血管周囲性細胞浸潤の発現頻度及び程度が用量依存的に増加し、0.01、0.1、1.0、3.0 及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の全動物並びに対照群の雄で、最終投与にのみ使用した投与部位 D を含む全ての皮下投与部位で、軽微～中等度の細胞浸潤が観察された。この浸潤はリンパ球、マクロファージ及び少数の好酸球と好中球を伴う形質細胞からなる混合型細胞浸潤による皮下静脈のカフ形成が特徴であった。浸潤マクロファージは時おり空胞化した細胞質を有しており、BMN 165 の食作用による PEG の細胞質内蓄積と一致すると考えられた。血管周囲性細胞浸潤は BMN 165 に関連すると考えられたが、有害所見とは判断しなかった。

対照群の雄及び 0.01 mg/kg 群の雌を除いて、全用量群の雌雄各 1 例（3.0 mg/kg 群の雌は 2 例）で軽微な糸球体症が認められた。この変化は、均質な好酸性基質（メサンギウム）の全体的な量的増加及び影響がみられた腎臓に散在する糸球体内で時おり見られる充実した細胞の増加が特徴であった。

軽微～中等度の胸腺萎縮が対照群の雄 2 例及び雌 1 例、0.1 mg/kg 群の雄 1 例、1.0 mg/kg 群の雄 1 例、3.0 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例並びに 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 2 例で認められた。重度の胸腺萎縮が 0.1 mg/kg 群の雄 1 例、3.0 mg/kg 群の雌雄各 1 例及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雄 2 例で認められた。概して、本薬を投与した動物で発現頻度及び程度が増加したことから、BMN 165 投与との関連が示唆された。しかし、直接的な用量反応性が認められなかったことから、この変化は BMN 165 の直接的な作用ではなく、治療レジメンに起因するストレスによる二次的な影響と考えられ、したがって有害所見ではないと考えられた。

対照群の雌 1 例、0.1 mg/kg 群の雄 1 例、1.0 mg/kg 群の雌 1 例、3.0 mg/kg 群の雌 1 例、及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雄雌各 3 例に胸骨骨髄で軽微～軽度のリンパ性結節が認められた。用量の増加に伴って一般に発現頻度及び程度が増加したことから、BMN 165 との関連が示唆された。この変化は前述の動脈炎に関連するリンパ球産生の増加を示唆しており、免疫反応亢進のエビデンスである可能性が考えられる。したがって、有害所見とは判断しなかった。

回復期間終了時の剖検では本薬投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。投与期間終了時の剖検を含めて本薬投与に関連した器官重量の変化は認められなかった。

回復期間終了時に BMN 165 に関連する病理組織学的所見として、胸腺萎縮及び胸骨骨髄にリンパ性結節の増加が認められた。これらの変化は有害所見とは考えられなかった。

3.0 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 2 例並びに 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 1 例で、軽微～重度の胸腺萎縮が認められた。対照群の雄 1 例でも軽度の胸腺萎縮が認められた。投与期間終了時に認められた胸腺萎縮は、回復期間終了時にも完全には回復していなかった。

3.0 mg/kg 群の雄 1 例及び雌 2 例並びに 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の雄 1 例で胸骨骨髄に軽微又は軽度のリンパ性結節が認められた。投与期間終了時に認められたリンパ性結節は回復期間終了時までに完全には消失しなかった。

投与期間終了時に認められたこれ以外の病理組織学的所見（動脈炎、皮下投与部位の血管周囲性細胞浸潤及び糸球体症）は、全て 13 週間の回復期間終了時に回復したと考えられた。

主試験の対照群と動脈炎を有する高用量群（3.0 及び 7.0/5.0/3.0 mg/kg 群）から選定した動物の肝臓、腎臓及び心臓の組織切片を用いて、BMN 165、PEG、IgG、IgM 並びに補体マーカー（C3 及び SC5b-9）に対する特異的 IHC 染色を行った。BMN 165 又は PEG を検出する試薬により、血管内腔、血管内皮又は種々の組織要素（血管内タンパク性物質、血管内皮成分、間質タンパク性物質及び単核細胞）内にサイズが 1～2 μm の顆粒若しくはタンパク性／顆粒性物質の小凝集体の染色が認められた。BMN 165 及び PEG の染色は、7.0/5.0/3.0 mg/kg 群の動物で肝臓のクッパー細胞及び少数の肝細胞でも観察されたが、肝臓では動脈炎は観察されなかった。PEG の染色は少数の動物で一部の尿細管上皮細胞の細胞質空胞でも観察された。グループ 1（溶媒対照群）の動物の肝臓、腎臓及び心臓で BMN 165 又は PEG 検出試薬による特異的な染色は認められなかった。

心臓及び腎臓の炎症がみられた筋性動脈／細動脈又は影響がみられなかった動脈／細動脈の血管壁（内膜／中膜）で BMN 165、PEG、特異抗体アイソタイプ（IgG 及び IgM）及び補体マーカー（C3 及び SC5b-9）による顆粒沈着の分布を検討した。一部の動物の心臓及び腎臓では、影響がみられなかった血管と比べて、炎症が認められた血管で PEG、IgG 又は IgM 試薬により

染色された沈着顆粒が増加した。グループ 5（3.0 mg/kg 群）及びグループ 6（7.0/5.0/3.0 mg/kg 群）の他の動物では炎症を示す血管が非常に少なく、動脈炎が存在しない又は極めて限局的である可能性が高いため、同様の顆粒沈着の増加はみられなかった。少数例では C3 染色顆粒の増加がみられたが、SC5b-9 染色顆粒の沈着はほとんどみられなかった。

グループ 5（3.0 mg/kg 群）及びグループ 6（7.0/5.0/3.0 mg/kg 群）の動物における動脈炎の組織学的所見及び IHC 染色パターンは、免疫複合体介在性の動脈炎と一致したが、その診断はできなかった。動脈炎のない動物でも同様のパターンがみられており、抗 rAvPAL IgG 抗体価、抗 rAvPAL IgM 又は中和抗体の形成との相関はなかった。3.0 mg/kg 群の雌で、雄と比べて曝露量が増加する場合があった。しかし、動物ごとの観察では、相対的な曝露量や器官の血流量は、動脈炎を示す器官のパターンや数に影響を及ぼさなかった。

サルの腎皮質（主に糸球体及び近位尿細管曲部）の電子顕微鏡検査では対照物質又は BMN 165 の投与に起因する影響は認められなかった。欧州医薬品庁（EMA）が 2012 年 11 月に公表した「CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population; EMA/CHMP/SWP647258/2012」の推奨に従い、本試験の脳切片を、脳室系及び脈絡叢上皮を内張りする上衣細胞等の細胞質空胞化の有無について、別の（ピアレビュー）病理学者により評価した。BMN 165 を投与したサルでは、脳及び中枢神経系に空胞は認められなかった。その後に実施した分析の詳細については、2.6.6.4.4 項及び BMN165-13-047 試験報告書に記載する。

TK パラメータの概要を表 2.6.6.3.4-3 及び 2.6.4.3.8 に示す。

表 2.6.6.3.4-3 BMN 165 を週 2 回皮下投与したサルの TK パラメータ

Group	Dose, mg/kg	Time point	C_{max}, ng/mL	T_{max}, hr	$AUC_{0\text{-}72h}$, ng•hr/mL	Accumulation Index, Week 39/Week 1
2	0.01	Week 1	51 (29)	43.2 (20.1)	2776 (1818)	< 1.0
		Week 39	- [a]	- [a]	- [a]	
3	0.1	Week 1	908 (761)	57.6 (21.5)	45,053 (39,358)	< 1.0
		Week 39	81 (132)	12.8 (7.5)	996 (1895)	
4	1.0	Week 1	23,427 (11,523)	72.0 (0.0)	928,020 (237,747)	< 1.0
		Week 39	637 (476)	18.0 (15.9)	28,431 (24,209)	
5	3.0	Week 1	47,654 (23,286)	49.7 (14.8)	2,334,176 (916,955)	< 1.0 [b]
		Week 39	21,831 (50,391)	18.6 (12.0)	1,205,170 (2,854,258)	
6	7.0	Week 1	144,598 (41,582)	53.1 (13.9)	6,122,640 (1,814,405)	< 1.0
	3.0	Week 39	3644 (4367)	23.1 (13.0)	144,935 (177,175)	

Data presented are mean (SD: standard deviation).
a) Parameter could not be calculated due to values BLQ.
b) Accumulation ratio was 2.987 (animal I04864, female) and 5.602 (animal I04868, female).

血漿中 $AUC_{0\text{-}72hr}$ 及び C_{max} は、1 及び 39 週目の最初の投与後、用量に比例して増加が認められた。グループ 2～4 では BMN 165 の血漿中濃度が投与開始後 2 週間で上昇し、その後は急速に低下して定量下限（30 ng/mL）に近づいた。この BMN 165 曝露量の変化は免疫原性、特に中和又は除去抗体の存在を示す可能性が極めて高い。

溶媒対照群を含む全ての群の少数の動物は抗 rAvPAL-PEG IgG のベースライン抗体価が低値であった。BMN 165 を投与した全動物は 15～22 日目の間に測定可能な抗 rAvPAL-PEG IgG 抗体価を示し、その後の投与期間を通して用量依存的に抗体価が増加した。一般に、主試験の投与期間に抗 rAvPAL IgG の抗体価を示した動物では、回復期間にも測定可能な抗体価が持続した。

1 日目に 1.0 mg/kg 以上の BMN 165 を投与した動物では投与後 9 時間までに血漿中 Phe の著しい低下が認められ、3.0 及び 7.0 mg/kg を投与した動物では 2～11 日目まで定量下限（LLOQ = 1 µmol/L）未満であった。1.0 mg/kg 以上の用量ではほとんどの動物で 22 日目までに Phe 濃度がベースライン値に戻り、投与終了間際まで維持された。39 週目の Phe 低下の程度は、その時点での血漿中 BMN 165 濃度の低値に相当するが、残りの試験期間中の血漿中 TK は、Phe の低下を予測するものではなかった。

39 週目の最終投与後の BMN 165 の相対的な血漿中濃度は、血漿中 Phe の持続的な減少に相応した。

結論：

以上、サルに BMN 165 を週 2 回 39 週間反復皮下投与したときの無毒性量は、上述の毒性所見に基づき 1.0 mg/kg/dose と判断された。

2.6.6.4　反復投与毒性試験で得られた組織における PEG 空胞の検討

ラットを用いた毒性試験の組織で観察された空胞について更に検討し、その特徴を明らかにするために、ラット及びサルの反復投与毒性試験（試験番号 0165-08-019、0165-07-030 及び 0165-07-009）で得られた組織を用いて、遡及的に追加試験を 3 試験実施した。2016 年 3 月 15 日の米国食品医薬品局（FDA）からのフィードバックに基づき、バリデートされた PEG に特異的な IHC 法を用いて追加試験を実施した。これらの試験結果を以下に詳細に説明する。

2.6.6.4.1　BMN 165 の週 2 回皮下投与によるラット及びサルの長期反復投与毒性試験で得られた脳組織における上衣細胞空胞化の検討

（CTD: 4.2.3.2-5、BMN165-13-047）

試験の目的：

本試験は、EMA が 2012 年 11 月 16 日に公表した「CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population; EMA/CHMP/SWP 647258/2012」の要件を満たすために、これまでに実施したラット及びサルの長期反復投与毒性試験の 2 試験で得られた脳切片を用いて、病理学専門家が脈絡叢の上衣細胞で細胞質空胞化の有無を評価した。本試験の概要を表 2.6.7.7-5 に示す。

材料と方法：

以下の 2 試験の長期反復投与毒性試験で得られた全ての脳切片について、上衣細胞の細胞質空胞化を光学顕微鏡で評価した。

- 試験番号 0165-08-019「BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験、最終報告

書（2009 年 12 月 18 日）、Final Report Amendment No. 1（2016 年 11 月 30 日）、Final Report Amendment No. 2（2019 年 1 月 22 日）」

- 試験番号 0165-07-030「BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験、最終報告書（2009 年 12 月 18 日）、Final Report Amendment No. 1（2010 年 6 月 17 日）、Final Report Amendment No. 2（2016 年 9 月 13 日）、Final Report Amendment No. 3（2019 年 1 月 22 日）」

両試験は元々[redacted]（米国、[redacted]州[redacted]）で実施し、試験のデザイン、手順及び得られた所見の詳細については最終報告書に記載した。

脳の脈絡叢の脳室系を内張りする上衣細胞の細胞質空胞の有無について、脳切片のヘマトキシリン及びエオジン（H&E）染色標本を光学顕微鏡で評価した。脊髄中心管の上衣細胞は評価しなかった。スライドを 40 倍及び 100 倍で鏡検した。

結果：

ポリエチレングリコール（PEG）結合タンパク質製剤を投与した動物で、腎尿細管上皮の空胞化が報告されている(4)。試験番号 0165-08-019 及び 0165-07-030 のいずれの試験でも、病理組織学的に上衣細胞の細胞質空胞化は認められなかった。

EMA が 2012 年 11 月に公表した「CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population; EMA/CHMP/SWP647258/2012」の推奨に従い、これら 2 試験の脳切片を脳室系及び脈絡叢上皮を内張りする上衣細胞等の細胞質空胞化の有無について、別の（ピアレビュー）病理学者により評価した。

ラットの 26 週間投与毒性試験（試験番号 0165-08-019）及びサルの 39 週間投与毒性試験（試験番号 0165-07-030）で得られた全ての脳切片について、光学顕微鏡観察を実施した。脳の切片を倍率 40 倍で鏡検し、上衣細胞及び脈絡叢細胞の存在及び分布を調べた。これらの細胞の存在及び分布は全動物及び全群を通しておおむね一致しており、本評価の目的を許容すると判断した。次に、上衣細胞及び脈絡叢細胞を含む領域を倍率 100 倍で評価した。上衣細胞及び脈絡叢細胞の細胞質空胞化は評価したいずれの動物の脳切片でも確認されなかった。反復投与毒性試験で脳の上衣細胞に細胞質空胞化が認められなかったこと、及びピアレビュー病理学者がこの所見の有無を記録したデータ表を 0165-08-019 試験報告書に掲載した。

結論：

上衣及び脈絡叢の上皮細胞における細胞質空胞化の有無は毒性試験病理学者及びピアレビュー病理学者によって判定され、両者で一致した。上衣細胞及び脈絡叢上皮細胞の細胞質空胞化は、毒性試験病理学者及びピアレビュー病理学者のいずれによっても確認されなかった。したがって、両毒性試験について毒性試験病理学者とピアレビュー病理学者の間で完全な合意が得られた。結論として、ラット及びサルに BMN 165 を週 2 回皮下投与した結果、脳の上衣細胞及び脈絡叢細胞に明らかな空胞化の影響は認められなかった。

2.6.6.4.2　抗 PEG 抗体及び抗 BMN 165 抗体の結合を半定量的に評価する、ホルマリン固定パラフィン包埋ラット組織を用いた免疫組織化学染色法の開発及びバリデーション

（CTD: 4.2.3.2-6、BMN165-13-068）

試験の目的：

本試験は、BMN 165 の Crl:CD(SD)ラットにおける皮下投与毒性・TK 試験（試験番号 0165-08-019）で得られたホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織を用いて、抗 PEG 抗体及び抗 BMN 165 抗体の結合を半定量的に評価する IHC 法を開発し、バリデートすることを目的として実施した。本試験の概要を表 2.6.7.7-5 に示す。

材料と方法：

本試験の試料は空胞化の発現頻度／程度が最も高いことが報告されている、26 週（投与終了時）又は 17 週（中間）剖検の標本から選択した。

一連の手法開発試験により、抗 PEG 抗体と抗 BMN 165 抗体がコントロールタンパク質のスポットに結合する至適条件並びに各組織及び投与群の代表的な試料を明らかにした。試験方法の開発が終了後、抗 PEG 抗体及び抗 BMN 165 抗体の結合の選択性、正確性及び再現性を示すために、抗 PEG 抗体と抗 BMN 165 抗体の最適な結合が得られる手順を試験番号 0165-08-019 のグループ 1（対照群、0 mg/kg）及びグループ 4（BMN 165 25 mg/kg）の動物から選択したバリデーション組織（副腎、腎臓、肝臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓）のパネルに適用した。これらの組織及び空胞を含まないことが報告されているグループ 1 の組織で結合が起こることが予想されたため、最大量の空胞を含むことが報告されているグループ 4 の組織をバリデーションに用いた。

結果：

抗 BMN 165 抗体のバリデーション組織との結合の選択性、正確性及び再現性が確認された。しかし、前述の組織を用いた検討では抗 PEG 抗体との結合の選択性、正確性及び再現性は確認できなかった。そのため、毒性試験で得られた組織の半定量的評価と同様に、追加試験は全て抗 BMN 165 抗体のみを用いて実施した。

抗 BMN 165 抗体による染色の陽性反応はグループ 4（BMN 165 25 mg/kg）の動物の腎尿細管上皮並びに副腎、肝臓、リンパ節（下顎リンパ節・腸間膜リンパ節）及び脾臓の浸潤又は定住食細胞で認められた。グループ 1（対照群、0 mg/kg）の動物のこれらの組織は抗 BMN 165 抗体と結合しなかった。グループ 4 のバリデーション組織を用いた H&E 染色切片の評価では、腎尿細管上皮で細胞質空胞化／肥大並びに副腎、肝臓、リンパ節（下顎リンパ節・腸間膜リンパ節）及び脾臓で浸潤／定住食細胞の細胞質空胞化が認められ、PEG 又は BMN 165 のクリアランス機構と一致した。

試験番号 0165-08-019 のグループ 1 及びグループ 4 の動物から得られた脳、心臓、肺及び骨格筋（大腿部）の切片についても抗 BMN 165 抗体の結合を評価した。これらの組織では抗 BMN 165 抗体の結合は認められなかった。

各バリデーション組織（グループ 1 及びグループ 4 の副腎、腎臓、肝臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓）の切片を H&E で染色し、組織保存性と細胞質空胞化の有無について評価した。

副腎、肝臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓では空胞化した細胞はマクロファージ（組織球）であった。腎臓では髄質外層の尿細管上皮に空胞が認められたが、空胞化マクロファージはみられなかった。

BMN 165 を投与しなかった（0 mg/kg）動物では副腎、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、肝臓又は脾臓のどの試料にも空胞化マクロファージは認められなかった。評価した腎臓試料の 5 例では、いずれも尿細管細胞の細胞質空胞化／肥大は認められなかった。肝細胞及び伊東細胞の細胞質空胞化は評価した全 5 例の肝臓試料で認められた。この空胞形成は年齢が相当する無処置ラットで一般的にみられる肝脂質症に伴う空胞化と一致した。この空胞形成は偶発的な所見と考えられ記録しなかった。この追加試験で認められた他の空胞化所見は全て元の試験番号 0165-08-019 で認められた所見と一致した。

結論：

以上、抗 BMN 165 抗体の結合反応が腎尿細管上皮並びに副腎、肝臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓の浸潤又は定住食細胞で認められた。対照群（グループ 1、0 mg/kg）又は被験物質（グループ 4、BMN 165 25 mg/kg）を投与したラットの脳、心臓、肺及び骨格筋（大腿部）の切片では、抗 BMN 165 抗体による染色の陽性反応は認められなかった。H&E 染色切片の評価では、細胞質の空胞化／肥大が腎臓の尿細管上皮で認められ、細胞質空胞化が副腎、肝臓、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節及び脾臓の浸潤／定住食細胞で認められ、予想された PEG 又は BMN 165 のクリアランス機構と一致した。

2.6.6.4.3 毒性試験のラット組織における免疫組織化学（IHC）法を用いた抗 BMN 165 抗体の分析

（CTD: 4.2.3.2-7、BMN165-13-069）

試験の目的：

本試験は、ラットに BMN 165 を 4、17 又は 26 週間投与した後、組織中の薬物蓄積を比較するために、バリデートされた半定量的 IHC 法を用いて FFPE 組織における抗 BMN 165 抗体の結合を評価することを目的として実施した。本試験の概要を表 2.6.7.7-5 に示す。

材料と方法：

試験番号 0165-07-009 及び 0165-08-019 のグループ 1（溶媒対照群、0 mg/kg）及びグループ 3（BMN 165、8 mg/kg 群）のラットから得られた FFPE 組織（副腎、腎臓、肝臓、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節及び脾臓）にウサギ抗 BMN 165 IgG 抗体（抗 BMN 165 抗体、RbPEG-PAL IgG）を適用した。毒性試験報告書で空胞化が報告されている組織に加えて、（空胞化の有無に関わらず）両試験のグループ 3 の動物から得られた全ての腎臓組織を病理組織学的に評価した。グループ 3 の各組織の評価のためにグループ 1 から適切な数の組織を選択し、背景組織試料として評価した。本試験に用いた IHC 法は既に試験番号 BMN165-13-068 で開発され、試験法として文書化している。

結果：

BMN 165 を 8 mg/kg の用量で 4、17 又は 26 週間投与したラットで、それぞれ 20 例中 10 例、20 例中 20 例及び 30 例中 22 例の動物の血管及び一部の腎上皮細胞に抗 BMN 165 抗体の結合が認められた。これは、BMN 165 を 17 及び 26 週間投与したラットで類似した空胞化の重症度と発現頻度を示した病理組織学的所見と相関がみられた。グループ 1 では溶媒を 4、17 及び 26 週間投与した、それぞれ 6 例中 0 例、6 例中 0 例及び 6 例中 0 例で抗 BMN 165 抗体の結合が陰性であった。肝臓組織 2 例中 2 例（17 及び 26 週間投与）の血管及び類洞並びに脾臓組織 6 例中 1 例（4 週間投与）の濾胞リンパ球で結合が認められた。副腎、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節では、どの時点の評価でも抗 BMN 165 抗体の特異的結合はみられなかった。BMN 165 を投与した動物の H&E 染色切片の評価では、尿細管上皮の細胞質空胞化は試験番号 0165-08-019 で認められた被験物質関連の尿細管細胞空胞化／肥大の所見と一致していた。この細胞質空胞化は発現頻度が対照群及び被験物質投与群共に 17 週間投与で最も低く、26 週間投与で最も高かった。抗 BMN 165 抗体は尿細管上皮の細胞質空胞に結合しなかった。同様に、空胞化した組織球細胞は、脾臓、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節の切片に存在する場合、抗 BMN 165 抗体と結合しなかった。アイソタイプ対照抗体（ウサギ IgG）と評価したいずれの組織との結合も認められなかった。

対照群（グループ 1）及び BMN 165 投与群（グループ 3）の腎臓組織を用いて、抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）及びアイソタイプ対照抗体（ウサギ IgG 5.0 µg/mL）の結合を評価した。

評価した溶媒対照群の全ての組織試料で、抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）の結合が陰性であった。アイソタイプ対照抗体のウサギ IgG（5.0 µg/mL）による特異的な染色は、評価したいずれの組織切片においても認められなかった。

2.6.6.4.3.1 4、17 又は 26 週間投与後の腎臓における抗 BMN 165 抗体染色の陽性結果

BMN 165 を 8 mg/kg の用量で 4、17 又は 26 週間投与した雌雄ラットで、腎臓における抗 BMN 165 抗体による特異的結合の陽性結果の発生率、強度及び発現頻度を表 2.6.6.4.3-1 に示す。

表 2.6.6.4.3-1 BMN 165 の 8 mg/kg を 4、17 又は 26 週間投与したラットの腎臓における、特異的抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）結合の陽性結果のまとめ

Sex	Weeks on Study	Incidence [a]	Intensity	Incidence [a] by Frequency		
				Rare	Occasional	Common
Male	4	3/10	Minimal (1+)	0/10	2/10	1/10
	17	10/10	Minimal (1+)	5/10	3/10	2/10
	26	13/15	Minimal (1+)	7/15	5/15	1/15
Female	4	7/10	Minimal (1+)	1/10	1/10	4/10
			Mild (2+)	0/10	0/10	1/10
	17	10/10	Minimal (1+)	0/10	2/10	8/10
	26	9/15	Minimal (1+)	2/15	2/15	5/15

a) Incidence number positive at that intensity and frequency / total number evaluated.
Intensity: 1+ = minimal, 2+ = mild.
Frequency: Rare (< 1-25% of cells of a particular cell type), Occasional (> 25-50% of cells of a particular cell type), Common (> 50-75% of cells of a particular cell type), Frequent (> 75-100% of cells of a particular cell type).

腎臓における抗 BMN 165 抗体特異的な結合の陽性結果は全体的な発現頻度及び強度が雌雄で同程度であった。陽性結果の発現頻度から見た雄の発生率は稀な（Rare）結合と時折（Occasional）の結合で類似しており、普通（Common）の結合の発現頻度は低かった。雌では陽性結果の発現頻度から見た発生率は稀な（Rare）結合は低く、普通（Common）の結合が最も高かった。腎臓では抗 BMN 165 抗体結合の陽性パターンも雌雄でおおむね類似していた。腎臓の糸球体並びに皮質、髄質及び乳頭の間質血管で血管（内皮及び管腔内物質）における抗体結合が認められた。血管の染色は血管内腔を循環する被験物質（BMN 165）の可能性が高い。上皮細胞の抗体結合は細胞質で認められ、少数の組織試料では腎乳頭にのみ存在した。抗 BMN 165 抗体結合の陽性結果は尿細管上皮細胞の空胞では見られなかった。この結合パターンは既実施のバリデーション試験（BMN165-13-068）で BMN 165 25 mg/kg を投与した動物の腎臓で見られた抗 BMN 165 抗体特異的な結合の陽性結果と一致する。本試験（8 mg/kg）及びバリデーション試験（BMN165-13-068）で腎皮質及び髄質の尿細管上皮に抗 BMN 165 抗体結合の陽性結果が認められなかったことから、BMN 165 は糸球体から排泄され、尿細管上皮への蓄積はほとんど又は全くないことが示唆される。

2.6.6.4.3.2　4、17 又は 26 週間投与後の脾臓、副腎皮質、肝臓、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節における抗 BMN 165 抗体染色の陽性結果

BMN 165 を 4 週間投与後、脾臓組織 4 例中 1 例の濾胞リンパ球で時おり軽微な抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）による染色が認められたが、4 例中 3 例は陰性であった。副腎皮質の組織試料は抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）による染色が陰性であった。これらの組織試料では、アイソタイプ対照抗体であるウサギ IgG による染色の陽性結果はみられなかった。

BMN 165 を 17 週間投与後、肝臓の組織試料 1 例中 1 例で類洞細胞（おそらくクッパー細胞）の細胞質及び血管に、時おり軽微な抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）による染色が認められた。この結合は腎臓の血管で見られた染色と一致しており、おそらく循環中の BMN 165 も反映すると考えられる。脾臓（1 例）、下顎リンパ節（5 例）及び腸間膜リンパ節（2 例）の全ての組織試料は抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）による染色が陰性であった。これらの組織試料では、アイソタイプ対照抗体であるウサギ IgG による染色の陽性結果はみられなかった。

BMN 165 を 26 週間投与後、肝臓の組織試料 1 例中 1 例で類洞細胞（おそらくクッパー細胞）の細胞質及び血管に稀に軽微な抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）による染色が認められた。脾臓（1 例）、下顎リンパ節（5 例）及び腸間膜リンパ節（4 例）の全ての組織試料は抗 BMN 165 抗体（5.0 µg/mL）による染色が陰性であった。これらの組織試料ではアイソタイプ対照抗体であるウサギ IgG による染色の陽性結果はみられなかった。

2.6.6.4.3.3　細胞質空胞化

抗 BMN 165 抗体の結合を評価した全ての組織試料について、H&E 染色切片で細胞質の空胞化についても検討した。細胞質の空胞化は腎臓の尿細管上皮並びに脾臓及びリンパ節の組織球細胞で認められた。腎臓の尿細管上皮における細胞質空胞化／肥大の発現頻度を表 2.6.6.4.3-2 に示す。

表 2.6.6.4.3-2　BMN 165 の 0 又は 8 mg/kg を 4、17 又は 26 週間投与したラットの腎臓における尿細管上皮の細胞質空胞化のまとめ

Weeks on Test	Group (mg/kg BMN 165)	Incidence [a]
		Overall
4	0	0/6
	8	0/20
17	0	0/6
	8	6/20
26	0	0/8
	8	10/30

a) Incidence number positive at that intensity and frequency / total number evaluated, males and females combined. Severity in all affected animals was minimal (1+).

BMN 165 を 8 mg/kg 投与した動物の尿細管上皮における細胞質空胞化は試験番号 0165-08-019［ラットの 26 週間投与毒性試験及び 17 週間中間剖検（GLP 適合）］で認められた被験物質関連の尿細管細胞空胞化／肥大の所見と一致した。この空胞化は 17 週間投与で発現頻度が低く、26 週間投与で最も高かった。

4、17 及び 26 週間投与した動物では、脾臓組織の脾洞組織球細胞（マクロファージ）の細胞質空胞化が、それぞれ 4 例中 4 例で軽微、1 例中 1 例で軽度及び 1 例中 1 例で軽微であった。下顎リンパ節のリンパ洞組織球細胞（マクロファージ）における同様の細胞質空胞化は、17 及び 26 週間投与で、それぞれ 5 例中 5 例が軽微、5 例中 5 例が軽微であった。腸間膜リンパ節では、リンパ洞組織球細胞の細胞質空胞化は 17 及び 26 週間投与で、それぞれ 2 例中 1 例及び 4 例中 2 例が軽微であった。これらに相当する対照群 1 例の組織試料では、脾臓、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節のリンパ洞組織球細胞に細胞質の空胞化は認められなかった。対照群及び投与群の副腎皮質（4 週間投与）又は肝臓（17 及び 26 週間投与）の組織試料では、いずれの細胞にも細胞質の空胞化は認められなかった。

結論：

本試験条件下では、BMN 165 を 8 mg/kg の用量で 4、17 又は 26 週間投与したラットのそれぞれ 20 例中 10 例、20 例中 20 例及び 30 例中 22 例に血管（循環中の BMN 165）と腎臓の一部の上皮細胞に抗 BMN 165 抗体の結合が認められた。抗体結合の陽性反応はまた肝臓試料 2 例中 2 例（17 及び 26 週間投与）の血管及び類洞並びに脾臓試料 6 例中 1 例（4 週間投与）の濾胞リンパ球でも認められた。副腎、腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節では抗 BMN 165 抗体の特異的な結合はみられなかった。本試験で観察された抗体結合の陽性反応は BMN 165 のクリアランス機構と一致する。H&E 染色切片の評価では、BMN 165 を 8 mg/kg 投与した動物の腎尿細管上皮における細胞質の空胞化は試験番号 0165-08-019 で認められた被験物質関連の尿細管細胞空胞化／肥大の所見と一致していた。この空胞化は 17 週間投与で発現頻度が低く、26 週間投与で最も高かった。抗 BMN 165 抗体は尿細管上皮の細胞質空胞と結合しなかった。同様に、脾臓、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節の切片では空胞化した組織球細胞は抗 BMN 165 抗体と結合しなかった。評価したいずれの組織でもアイソタイプ対照抗体（ウサギ IgG）との結合は認められなかった。

2.6.6.4.4　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・TK 試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験で得られたラット組織を用いる抗 PEG 抗体の免疫組織化学的検査

（CTD: 4.2.3.2-2、0165-08-019）

試験の目的：

本 GLP 適合試験は、BMN 165 を 0、8 及び 25 mg/kg の用量で投与した試験番号 0165-08-019 で得られた 17 及び 26 週間投与後のラット組織切片を用いて、PEG の IHC 染色法により PEG の蓄積を半定量的に評価することを目的として実施した。PEG 染色の評価と PEG 蓄積の半定量的分析に既実施の試験番号 0165-08-019「BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・TK 試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験」で得られた FFPE 組織を使用した。本試験の概要を表 2.6.7.7-5 に示す。

材料と方法：

PEG の IHC 染色法は既に Seventh Wave Laboratories LLC で開発されバリデートされている。以下の 7 組織（副腎、腎臓、脾臓、肝臓、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節及び精巣）について、抗 PEG 抗体の結合を検出するため IHC 染色法と光学顕微鏡観察を行った。陰性対照及び陽性対照組織として、それぞれグループ 1（対照物質／溶媒）及びグループ 4（BMN 165 25 mg/kg）の皮下投与部位を用いた。GLP 基準（21 CFR Part 58）に準拠して実施した試験番号 0165-08-019 の 17 週中間剖検及び 26 週間投与終了時剖検の動物から組織の試料を採取した。グループ 1［対照群（溶媒：10 mmol/L TRIS、135 mmol/L NaCl 及び 1 mmol/L *t*-CA）：雄 3 例、雌 3 例、精巣は雄 6 例］、グループ 3（BMN 165 8 mg/kg：雄 3 例、雌 3 例、精巣は雄 6 例）及びグループ 4（BMN 165 25 mg/kg：雄 3 例、雌 3 例、精巣は雄 6 例）から組織試料を採取した。

IHC 染色法に必要な品質を有する組織の試料数が十分に確保できたため、本試験では入手した全ての FFPE 組織を使用したのではない。試験デザインを表 2.6.6.4.4-1 に示す。

表 2.6.6.4.4-1　FFPE ラット組織を用いた PEG の IHC 染色法の試験デザイン*

Antibody/Stain	Concentration†	Tissue Samples	Control Tissue
Anti-PEG	1.22 - 1.29 mg/mL	Adrenal, Kidney, Spleen, Liver, Lymph Nodes (Mesenteric and Mandibular), and Testis	Subcutaneous Injection Site
Rabbit IgG	0.5 mg/mL		

* Tissues were from the 17-week interim and 26-week terminal euthanasia from BioMarin Study No. 0165-08-019. Group 1 was administered control article/diluent (10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L NaCl, 1 mmol/L *trans*-Cinnamic Acid) only, Group 3 was administered BMN 165 (8 mg/kg), and Group 4 was administered BMN 165 (25 mg/kg).
† Concentration range for anti-PEG represents two lots used in this study.

FFPE 組織試料は Seventh Wave Laboratories LLC により IHC 染色処理を行った。すなわち、試験番号 0165-08-019 のグループ 1、グループ 3 及びグループ 4 の動物から得られたラットの FFPE 組織［副腎、腎臓、脾臓、肝臓、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、精巣及び皮下投与部位（対照組織）］切片を一次抗体（ウサギ抗 PEG IgG 抗体）又はアイソタイプ対照抗体であるウサギ IgG とインキュベートした。

PEG の IHC 染色は明視野顕微鏡による染色結果の検査並びに染色強度（染色領域の存在と強度）及び染色頻度（染色領域の相対密度）の半定量的スコアリングにより評価した。染色パタ

ーン（染色領域の分布）についても評価した。本試験で特異的な染色の陽性結果の特徴づけに用いた半定量的評価の基準を表 2.6.6.4.4-2 に示す。

表 2.6.6.4.4-2　FFPE 組織を用いた IHC 染色の染色強度、頻度及びパターンの特徴の評価基準

Staining Strength (Presence and Intensity)	
Score	**Result**
0	No Labeled Cells “Negative”
±	Very faint stain “Equivocal”
1+	Light stain “Minimal”
2+	Light-medium stain “Mild’
3+	Moderate stain “Moderate”
4+	Dark stain “Marked”
M	Tissue missing or inadequate
Staining Frequency (Relative Density)	
Score	**Result**
Negative	No Labeled Cells/Tissue Element: “Negative”
Rare	< 1 - 25% of cells of a particular cell type/tissue element
Occasional	> 25 - 50% of cells of a particular cell type/tissue element
Common	> 50 - 75% of cells of a particular cell type/tissue element
Frequent	> 75 - 100% of cells of a particular cell type/tissue element
M	Tissue missing or inadequate
Staining Pattern (Distribution)	
Score	**Result**
Cell type or tissue element	Specifics of that cell type (e.g., epithelium) or tissue element (e.g., plasma)
Subcellular or extracellular	Membrane, cytoplasm, cytoplasmic filaments, basement membrane

各スライドの光学顕微鏡による半定量的スコアリングと観察結果を Excel 2010 スプレッドシートに直接入力した。

結果：

溶媒対照群の動物における抗 PEG 抗体の結合

グループ 1 の組織切片では、いずれの組織にも IHC 染色による特異的な抗 PEG 抗体の染色は認められなかった。

BMN 165 を投与した動物の各組織における抗 PEG 抗体の結合：腎臓

17 週中間剖検ではグループ 4 の動物で腎臓に軽度～中等度の染色強度で染色が認められ、染色領域は主に血管内腔（血漿、内皮細胞）のみであった。雌の腎切片は雄と比べて染色強度及び頻度が増加しており、評価した 3 切片のいずれも空胞化（透明空胞を有する）した尿細管上皮細胞の Rare 又は Occasional な染色が認められた。グループ 3 の腎臓切片では血管内腔（血漿、内皮細胞）のみに染色が認められた。グループ 3 はグループ 4 と比べて染色強度及び頻度が低下し、雌雄で同程度であった。雌 1 例は染色が陰性であった。

26 週間投与後の剖検では、グループ 4 の動物で腎臓に軽度～中等度の染色強度、及び Common 又は Frequent の染色頻度で抗 PEG 抗体の染色が認められた。グループ 3 の腎臓切片ではグループ 4 と比べて染色強度が弱く（軽微～軽度）、染色頻度が低かった（Rare～Common）。

副腎

17 週中間剖検ではグループ 4 の副腎で主に軽度の抗 PEG 抗体の染色が認められ、染色領域は血管内腔と類洞に限定され、その中で血漿及び内皮細胞の染色がみられた。グループ 3 の副腎の染色はグループ 4 と比べて染色強度（主に軽微）及び頻度（Rare～Common）が著しく低かった。BMN 165 を投与した雌の副腎は雄と比べて染色強度及び頻度が僅かに増加した。

26 週間投与後の剖検ではグループ 4 の全ての副腎で Occasional、Common 又は Frequent の染色頻度で、抗 PEG 抗体による軽度の染色が認められた。染色領域は血管内腔と類洞に限定され、その中で血漿及び内皮細胞の染色が認められた。グループ 3 の副腎の染色はグループ 4 と比べて染色強度（陰性又は軽微）及び染色頻度（Negative～Common）が著しく低かった。BMN 165 を投与した雌の副腎は雄と比べて染色強度及び頻度が僅かに増加した。

肝臓

17 週中間剖検ではグループ 4 の動物の肝臓切片で染色頻度が Common 又は Frequent、染色強度が軽度～中等度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 の肝臓切片はグループ 4 と比べて染色強度及び頻度が僅かに低下し、いずれも雌で僅かに増加した。概して、抗 PEG 抗体による染色は血管内腔、類洞及び類洞内細胞の細胞質のみであった。

26 週間投与後の剖検ではグループ 4 の動物の肝臓切片で染色強度が軽度、染色頻度が Common 又は Frequent の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 の肝臓切片はグループ 4 と比べて染色強度（軽微又は軽度）及び染色頻度（Rare 又は Common）が低下した。抗 PEG 抗体による染色は血管内腔、類洞及び類洞内細胞の細胞質のみであった。

脾臓

17 週中間剖検ではグループ 4 の脾臓切片で染色頻度が Occasional～Frequent、染色強度が軽度～重度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 4 の雌の脾臓切片は雄と比べて染色強度及び頻度が増加した。グループ 3 の脾臓切片は雄と比べて雌で染色強度及び染色の増加に性差がみられたグループ 4 と比較して染色強度及び頻度が低下した。概して、抗 PEG 抗体による染色は血漿及び血管内皮細胞のみであった。検査した切片では縦方向に薄切した切片は血漿成分の染色が全くみられず内皮細胞が明瞭に染色された。

26 週間投与後の剖検ではグループ 4 の脾臓切片で染色頻度が Rare～Frequent、染色強度が軽微～重度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。雄と比べて雌は僅かに染色強度が高く染色頻度が増加した。グループ 3 の脾臓切片は染色強度が陰性～軽度、染色頻度は Negative 又は Rare であった。

腸間膜リンパ節

17 週中間剖検ではグループ 4 の腸間膜リンパ節切片で染色頻度が Common 又は Frequent、染色強度が中等度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 の腸間膜リンパ節は染色頻度が Occasional 又は Common、染色強度が軽度～中等度を示し、雌では染色強度が僅かに強く

染色頻度が増加した。抗 PEG 抗体の染色は一部のリンパ洞組織球の細胞質、リンパ洞のリンパ液及び／又は血管内腔の血漿及び内皮細胞にのみ認められた。

26 週間投与後の剖検ではグループ 4 の腸間膜リンパ節切片で染色頻度が Rare～Frequent、染色強度が軽度又は中等度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 はグループ 4 と比べて染色が弱く、染色強度が陰性～軽度、染色頻度が Negative～Occasional の抗 PEG 抗体による染色が認められた。抗 PEG 抗体の染色は一部のリンパ洞組織球の細胞質、リンパ洞のリンパ液及び／又は血管内腔の血漿及び内皮細胞にのみ認められた。

下顎リンパ節

17 週中間剖検ではグループ 4 の下顎リンパ節切片で染色頻度が Common 又は Frequent、染色強度が軽微～中等度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。雌の下顎リンパ節は雄と比べてより強い抗 PEG 抗体の染色を示した。グループ 3 はグループ 4 と比べて染色強度（軽微又は軽度）及び染色頻度（Rare～Common）が低かった。雌は雄と比べて染色強度及び染色頻度が高かった。抗 PEG 抗体の染色は一部のリンパ洞組織球の細胞質、リンパ洞のリンパ液及び／又は血管内腔の血漿及び内皮細胞にのみ認められた。

26 週間投与後の剖検ではグループ 4 の下顎リンパ節切片で染色頻度が Occasional 又は Common、染色強度が軽度又は中等度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 はグループ 4 と比べて染色強度が弱く［痕跡（equivocal）～軽度］、染色頻度が低かった（Rare 又は Occasional）。抗 PEG 抗体の染色は一部リンパ洞組織球の細胞質、リンパ洞のリンパ液及び／又は血管内腔の血漿及び内皮細胞にのみ認められた。

精巣

17 週中間剖検ではグループ 4 の精巣切片で染色頻度が Common 又は Frequent、染色強度が軽度～中等度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 はグループ 4 と比べて染色頻度が Rare～Occasional、染色強度は痕跡又は軽微であった。抗 PEG 抗体の染色は血管内腔の血漿及び内皮細胞にのみ認められた。

26 週間投与後の剖検ではグループ 4 の精巣切片で染色頻度が Rare～Frequent、染色強度が痕跡～軽度の抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 はグループ 4 と比べて染色強度（陰性～軽微）及び染色頻度（Negative 又は Rare）が低かった。抗 PEG 抗体の染色は血管内腔（血漿及び内皮細胞）にのみ認められた。

まとめ：

本試験（試験番号 0165-08-019）の免疫組織化学検査では、17 週又は 26 週の剖検で得られたグループ 4 の組織切片（腎臓、副腎、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節及び精巣）でかなり類似した抗 PEG 抗体による染色が認められた。グループ 3 の組織切片では（本薬を 25 mg/kg 投与したラットと比べて）染色強度が弱く染色頻度が低いものの、抗 PEG 抗体による組織切片の染色は 17 週と 26 週の時点でかなり類似していた。25 mg/kg を投与したラットの 17 週剖検においてのみリンパ節の洞組織球及び腎尿細管細胞で、時おり抗 PEG 抗体による細胞質の染色が認められた。全体として、BMN 165 を 8 又は 25 mg/kg の用量で投与したラットでは、抗 PEG 抗体による染色が両剖検時点共に主に組織切片の血管部分（血漿、リンパ液及び／又は内皮細胞）で観察され、染色強度はこれらの動物に投与した用量を反映した。

2.6.6.5　遺伝毒性試験

BMN 165 の遺伝毒性試験は実施していない。BMN 165 はその作用機序から遺伝毒性作用を有する可能性は低いと考えられる。

2.6.6.6　がん原性試験

BMN 165 のがん原性試験は実施していない。BMN 165 は遺伝子組換え *Anabaena variabilis* フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（rAvPAL）と PEG の 2 つのサブユニットで構成される。包括的な文献調査により、PAL に発がん性のエビデンスがないことが明らかとなり、その作用機序から rAvPAL が発がん性を示すことは予想されない。PEG の発がん性に関する文献調査では、発がん性を示唆する結果は得られなかった。ラット及びマウスに PEG を経口投与した試験では、炎症の低減と化学的に誘発した結腸癌の抑制を示した(5) (6)。BMN 165 の作用機序から DNA との結合や細胞増殖への影響も予想されない。また、BMN 165 は増殖因子でも免疫抑制剤でもないことから、ICH S6(R1)「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に基づき、標準的ながん原性試験は不要と考えられる。

2.6.6.7　生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験を 5 試験（ラット 3 試験、ウサギ 2 試験）実施し、BMN 165 の生殖発生に及ぼす影響を評価した。ラットを用いた試験では ICH S5(R3)「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」の生殖発生ステージ A、B、C 及び D を評価し、ウサギを用いた試験では ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C 及び D を評価した。

2.6.6.7.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.7.1.1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験

（CTD: 4.2.3.5.1-1、BMN165-12-037）

<u>試験の目的：</u>

本試験は BMN 165 を雌雄 Crl:CD(SD)ラットの交配前から交配、着床及び硬口蓋閉鎖まで投与し、生殖発生に及ぼす影響を評価することを目的として実施した。本試験は雌ラットの発情周期、卵管輸送、着床及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検出するため、ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ A、B、C 及び D を評価するようデザインした。また、本試験では実施済みの試験で雄ラットの生殖器官の組織学的検査により検出されなかった機能的影響（交尾行動、精巣上体内の精子成熟など）の検出を可能にした。本試験の成績を BMN165-12-037 試験報告書にまとめ、概要を以下に記す。本試験の概要を表 2.6.7.12-1 に示した。

<u>材料と方法：</u>

雌雄の Crl:CD(SD)ラット（雌雄各 25 匹/群）に、対照物質として BMN 165 の溶媒（TRIS 10 mmol/L、塩化ナトリウム 135 mmol/L、*t*-CA 1 mmol/L、アンモニア 1 mmol/L、pH 7.0 ± 0.5）、及び被験物質の BMN 165 を 0、2、8 又は 20 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回皮下投与した。

雄は交配前 41 日（約 6 週間前）から交配期間を通して投与し、剖検の前日まで合計 77 回以上投与した。雌は交配前 28 日（約 4 週間前）から投与を開始し、交配期間中及び妊娠 17 日まで合計 47 回以上投与した。試験デザインを表 2.6.6.7.1-1 に示す。

表 2.6.6.7.1-1 ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Main Study Rats		No. of Toxicokinetic Rats [a]	
					M	F	M	F
1	Control Article	0	0	2.5	25	25	3	3
2	BMN 165	2	0.8	2.5	25	25	3	3
3	BMN 165	8	3.2	2.5	25	25	3	3
4	BMN 165	20	8	2.5	25	25	3	3

a) Toxicokinetic rats were primarily used for BMN 165 exposure and Phe biomarker evaluations in plasma.

本試験では動物の生死、臨床症状、体重、体重変化、摂餌量、性周期観察、交配及び受胎能、臨床病理学的検査、血漿中 BMN 165 濃度、血清中抗体濃度（抗 PAL IgG 抗体）、血漿中 Phe 濃度、卵巣・子宮検査、雄性生殖能の評価（精子の運動性、濃度及び精子数）、器官重量、剖検所見、並びに胎児検査（体重、性別、外表検査、内臓検査及び骨格検査）について評価した。被験物質の影響を明らかにするために、被験物質投与群の各パラメータを対照群の各パラメータと比較した。

結果：

最後に調製したグループ 4 の 8 mg/mL 投与液が理論値の-15.6%であったことを除いて、分析した全ての投与液サンプルは平均濃度が理論値の±15%（個々の投与液の値は±20%）であり、許容基準の範囲内であった。観察された濃度低下は軽微であり、この投与液は試験のほぼ最終週に予定剖検前の雄の投与にのみ使用されたため、試験全体への影響はなかった。

雄ラット

BMN 165 を投与した全ての動物は予定剖検日まで生存した。

対照群の 1 例は損傷による有害な臨床所見のため投与 5 日目に安楽死させた。この早期死亡例は対照群で発生したため被験物質との関連はなかった。

いずれの投与量でも被験物質に関連した臨床症状は認められなかった。新たな部位に皮下投与した最終投与時においても過敏症の徴候はみられなかった。

20 mg/kg 群では投与期間を通して被験物質に関連した体重増加抑制が認められた。20 mg/kg 群では投与期間（1～78 日目）の全体的に対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた。投与期間の 22～29 日目、36～41 日目、64～71 日目及び 71～78 日目には平均体重増加量も対照群と比較して有意に減少した。20 mg/kg 群の体重は 41、57、64、71 及び 78 日目に有意に低下した。2、8 及び 20 mg/kg 群の 78 日目の平均体重は対照群のそれぞれ 100%、98.8%及び 91.7%であった。

絶対及び相対摂餌量は 20 mg/kg 群で 1～78 日目の全投与期間を通して有意に減少し、これは観察された体重増加量の減少と一致した。対照群と比較して有意に達しなかった 8～15 日目の相対摂餌量を除いて、絶対及び相対摂餌量のいずれも投与期間内の各測定間隔で有意に減少した。

交配及び受胎能に関する全ての指標［交配日数、交尾動物数、受胎率（妊娠動物数／交尾動物数）、交配 1 週目又は 2 週目に交尾が確認された動物数、及び妊娠動物数／交配動物数］は 20 mg/kg/日の高用量の被験物質投与による影響を受けなかった。

いずれの投与量でも剖検時に被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。

剖検時の最終体重は 20 mg/kg 群で対照群と比べて有意に減少した。生殖器官の重量は 20 mg/kg/日の高用量の BMN 165 投与による影響を受けなかった。いずれの用量でも精子の運動性及び濃度に対する被験物質の影響は認められなかった。

20 mg/kg/日の高用量の BMN 165 投与は血液学的及び臨床生化学パラメータに影響を及ぼさなかった。毒性学的に意義のある差異はみられなかった。

試験期間を通して用量依存的な BMN 165 の曝露がみられた。投与量 2 mg/kg/日では 8 日目の投与前に採取した血漿で 3 例中 1 例のみが被験物質濃度が測定可能であったが、15 日目には定量下限未満（BLQ、< 78 ng/mL）に戻った。BMN 165 の血漿中濃度は 3 例共に試験終了時の 64 又は 79 日目まで BLQ であった。

20 mg/kg 群の 22～79 日目を除いて、全群の全動物で血漿中の Phe が検出された。2 mg/kg 群では投与期間を通して Phe 濃度が対照群の値と同程度であった。8 mg/kg 群の Phe 濃度は 8～79 日目に低下し、43～79 日目には LLOQ（1.00 µmol/L）に近い濃度まで著しく低下した。20 mg/kg 群の Phe 濃度は 8～79 日目まで対照群の値と比べて著しく低下し、LLOQ を上下した。予想された薬理学的反応が観察され、おおむね測定期間を通じて Phe と BMN 165 の逆相関が認められた。

2、8 及び 20 mg/kg 群では試験期間を通して主試験のそれぞれ 25 例中 13 例、25 例中 5 例及び 25 例中 4 例の雄で血清中に抗 PAL IgG 抗体が検出された。これらの動物はいずれも 1 日目のスクリーニングでは陰性であったが、試験終了時（78～82 日目）の試料では陽性であった。20 mg/kg 群の雄 2 例は 1 日目に抗 PAL IgG 抗体がベースラインの陽性であった。BMN 165 の干渉によるアッセイの許容限界（2 µg/mL）が存在するため、抗体に関する所見の解釈には注意が必要である。

<u>雌ラット</u>

いずれの投与量でも被験物質に関連した死亡例はなかった。

2 mg/kg 群の 1 例は円背位、胸部腫脹、粘膜蒼白及び呼吸困難などの有害な臨床症状を示したため投与 26 日目に切迫屠殺した。この死亡例は非用量依存的な一事象であったため、被験物質との関連はないと考えられた。20 mg/kg 群の 2 例が妊娠 21 日に分娩した。この 2 例の分娩は当該試験施設における背景値の範囲内にあることから、被験物質との関連は考えられなかった。これ以外の全ての動物は妊娠 21 日の予定剖検日まで生存した。

交配前及び妊娠期間中に認められた全ての臨床症状は被験物質とは関連がないと考えられた。雄と同様に新規の部位に皮下投与した最終投与時にも過敏症の徴候はみられなかった。

交配前期間に 20 mg/kg 群では平均体重増加量が各測定期間で対照群と比較して減少した。投与 1～28 日目の全期間の平均体重増加量も減少した。体重増加量は 8～15 日目、15～22 日目及び全期間の 1～28 日目に有意に減少した。20 mg/kg 群では母動物の妊娠期間中にも体重増加量の減少が観察され、妊娠 7～10 日、12～15 日、15～18 日、18～21 日及び全期間の妊娠 0～21

日に体重増加量が有意に減少した。また、交配前期間（投与 15、22 及び 28 日目）及び妊娠期間（妊娠 0～21 日）の平均体重にも統計学的に有意な減少が認められた。

20 mg/kg 群では絶対及び相対摂餌量が交配前期間の 8～15 日目、15～22 日目及び 22～28 日目（絶対摂餌量のみ）の期間並びに 1～28 日目の全期間で対照群と比較して有意に減少した。妊娠期間中、20 mg/kg 群の母動物の絶対摂餌量（g/日）は投与期間中の各測定間隔及び妊娠 0～21 日の全期間で有意に減少した。

交配前期間の 14 日当たりの発情期発現数は 4 群間で同等であった。交配及び受胎能に関する全てのパラメータ［交配日数、交尾動物数、受胎率（妊娠動物数／交尾動物数）、交配 1 週目又は 2 週目に交尾が確認された動物数及び妊娠動物数／交配動物数］は、20 mg/kg/日の高用量の被験物質投与による影響を受けなかった。

いずれの投与量でも剖検時に被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。

剖検時の最終体重は 20 mg/kg 群で対照群と比べて有意に減少した。最終体重は 0（対照群）、2 及び 8 mg/kg 群間で同等であった。20 mg/kg 群で卵巣の絶対重量が対照群と比較して減少し、これは最終体重の減少を反映していた。左卵巣の絶対重量のみが有意に減少した（$p \leq 0.05$）。卵巣重量と最終体重の比は両群間で有意差はなかった。

20 mg/kg/日の高用量の BMN 165 投与は血液学的及び臨床生化学パラメータに影響を及ぼさなかった。毒性学的に意義のある差異はみられなかった。

0（対照群）、2、8 及び 20 mg/kg 群のそれぞれ 24 例（96.0%）、24 例（100%）、23 例（92.0%）及び 23 例（92.0%）の雌ラットで妊娠が確認された。

平均黄体数及び着床数は 8 及び 20 mg/kg 群で対照群と比較して有意に減少した。その結果、20 mg/kg 群で同腹児数及び生存胎児数の平均値も有意に減少した。20 mg/kg 群では胎児体重（雄、雌及び合算）も有意に減少した。

8 及び 20 mg/kg 群では異常を有する胎児数及び同腹児（litter）数並びに一腹当たりの異常を有する胎児数がいずれも対照群と比較して有意に増加した。いずれの投与群においても被験物質に関連した胎児の外表又は軟部組織の奇形や変異は認められなかった。8 mg/kg 群で異常を有する胎児数が増加したのは、この系統のラットで一般的にみられる頸肋、頸椎の二分中心及び肋骨の不完全骨化などの変異の増加によるものであった。20 mg/kg 群で認められた異常を有する胎児数の増加は縫合拡大（鼻骨・前頭骨）、鱗状骨の不完全骨化、前頭骨の不完全骨化、腰椎弓の不完全骨化、肋骨の不完全骨化及び恥骨の不完全骨化の有意な増加を反映したものであった。20 mg/kg 群では一腹の 1 胎児当たりの胸骨中心及び中手骨の平均骨化数が対照群と比較して有意に減少した。さらに、20 mg/kg 群では一腹の 1 胎児当たりの中足骨の平均骨化数が対照群と比較して減少した。

BMN 165 の曝露は試験期間を通して用量依存的であり、曝露量は雄と比べて雌で高値であった。投与量 2 mg/kg/日では 8 日目の投与前に採取した血漿中で測定可能な濃度の被験物質が認められたのは 3 例中 1 例のみであり、これが妊娠 21 日までの試験期間中継続した。2 mg/kg 群の残りの 2 例の雌では、妊娠期間の始まり（投与 29 日目／妊娠 0 日）又は妊娠期間の中間時点の妊娠 12 日に明らかな曝露が認められた。概して、8 及び 20 mg/kg 群では被験物質の曝露が 8 日目から各群 3 例全てに認められ、試験期間を通して継続した。BMN 165 の血漿中濃度は

8 mg/kg 群では低下又は比較的一定の傾向があったが、20 mg/kg 群の血漿中濃度は試験期間を通して増加する傾向があった。胎児への曝露が認められたのは 20 mg/kg 群で評価した 2 腹中 1 腹のみであった。

投与 22 日目並びに妊娠 0 及び 12 日には対照群及び 2 mg/kg 群の全例で血漿中の Phe 濃度が検出されたが、8 mg/kg 群の 1 例では検出されなかった。20 mg/kg 群では投与 15 及び 22 日目又は妊娠 0 及び 12 日には血漿中の Phe 濃度は検出されず（LLOQ、1.00 µmol/L）、妊娠 21 日には 1 例のみ検出された。2 mg/kg 群では血漿中 Phe 濃度が投与期間（交配前及び妊娠期間）中一貫して対照群と同程度に減少した。8 mg/kg 群では試験期間中 Phe 濃度が対照群及び 2 mg/kg 群よりも低値であった。20 mg/kg 群では投与 8 日目～妊娠 21 日まで Phe 濃度が著しく低下し、LLOQ 未満又は僅かに上回った。予想された薬理学的反応が観察され、おおむね測定期間を通じて Phe と BMN 165 の逆相関が認められた。

2、8 及び 20 mg/kg 群では試験期間を通してそれぞれ 28 例中 10 例、25 例中 0 例及び 25 例中 0 例の雌で血清中に抗 PAL IgG 抗体の発現が認められた。いずれも投与 1 日目のスクリーニングでは陰性であったが、試験終了時（妊娠 21 日）の試料では陽性であった。BMN 165 の干渉によるアッセイの許容限界（2 µg/mL）が存在するため、抗体に関する所見の解釈には注意が必要である。

結論：

本試験の成績に基づき、雄ラットの一般毒性に関する無毒性量は 8 mg/kg/日、生殖能（交配、受胎能及び雄を介した発生毒性）に関する無毒性量は最高投与量の 20 mg/kg/日であった。母動物の一般毒性に関する無毒性量は 8 mg/kg/日、交配及び受胎能に対する無毒性量は 20 mg/kg/日、胚・胎児発生毒性の無毒性量は 2 mg/kg/日であった。本試験における曝露量を基にした安全域を 2.6.4 の表 2.6.4.9-1 に示す。

2.6.6.7.2　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.7.2.1　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験

（CTD: 4.2.3.5.2-1、BMN165-11-027）

試験の目的：

本試験はウサギにおける胚・胎児発生に関する試験の用量設定の情報を得ること並びに BMN 165 の妊娠及び胚・胎児発生に対する影響を予備的に評価することを目的として実施した。本試験は ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C～D を評価するよう計画した。加えて、BMN 165 の TK 及び免疫原性（抗 PAL IgG）の特性についても検討した。試験デザインを以下の表 2.6.6.7.2-1、表 2.6.6.7.2-2 及び表 2.6.6.7.2-3 に示す。また、本試験の概要を表 2.6.7.13-1 に示す。

材料と方法：

表 2.6.6.7.2-1 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン ― パートA

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Main Study Animals	No. of Toxicokinetic Animals
Dose Administration on Days 7 to 20 of Presumed Gestation						
1	Control Article	0	0	2	10	3
2	BMN 165	2	1	2	10	3
Dose Administration on Days 7 to 14 of Presumed Gestation						
3	BMN 165	2	1	2	10	3
Dose Administration on Days 13 to 20 of Presumed Gestation						
4	BMN 165	2	1	2	10	3

表 2.6.6.7.2-2 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン ― パートB

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Main Study Animals	No. of Toxicokinetic Animals
Dose Administration on Days 7 to 20 of Presumed Gestation						
5	BMN 165	20	10	2	10	3
Dose Administration on Days 11 to 16 of Presumed Gestation						
6	BMN 165	20	10	2	10	3
Dose Administration on Days 15 to 20 of Presumed Gestation						
7	BMN 165	20	10	2	10	3

表 2.6.6.7.2-3 ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験の試験デザイン ― パートC

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Main Study Animals	No. of Toxicokinetic Animals
Dose Administration on Days 7 to 20 of Presumed Gestation						
8	BMN 165	5	2.5	2	10	3
Dose Administration on Days 11 to 16 of Presumed Gestation						
9	BMN 165	5	2.5	2	10	3
Dose Administration on Days 15 to 20 of Presumed Gestation						
10	BMN 165	5	2.5	2	10	3

雌 New Zealand White ウサギに被験物質又は対照物質（溶媒）を妊娠 7～20 日（グループ 1、2、5 及び 8）、妊娠 7～14 日（グループ 3）、妊娠 11～16 日（グループ 6 及び 9）、妊娠 13～20 日（グループ 4）又は妊娠 15～20 日（グループ 7 及び 10）に 1 日 1 回皮下投与した。投与液の容量を最新の体重に基づいて調整し、毎日ほぼ同時刻に投与した。

本試験では臨床症状、体重、体重変化、摂餌量、摂水量、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固検査及び臨床生化学検査）、TK パラメータ、IgG 抗体産生、Phe 濃度、卵巣・子宮検査、胎児検査及び剖検所見を評価した。

結果：

投与液の試料で UV-Vis 分光法を用いて BMN 165 を分析した結果、使用に適する濃度であった（目標濃度の± 15%以内）。

BMN 165 を 20 mg/kg/日の用量で投与した結果、重度の母動物毒性が発現したため本用量群は早期に試験を終了した。20 mg/kg/日の用量では体重減少を伴う食欲不振、脱水、自発運動低下などの母動物への影響が生じ、発生毒性の十分な評価はできなかった。このため、以下に 2 及び 5 mg/kg/日投与群の成績を記載する。

2 及び 5 mg/kg 群では被験物質に関連した流産、早期分娩及び死亡例はなかった。妊娠 13～20 日に被験物質を投与した 2 mg/kg 群の雌 1 例が妊娠 29 日に同腹児を出産し、その後安楽死させた。また、妊娠 11～16 日に被験物質を投与した 5 mg/kg 群の 1 例が妊娠 24 日で流産し、その後安楽死させた。投与した動物数に対して 1 例の早産及び 1 例の流産は予想された事象であり、これらの事象はいずれも BMN 165 に関連するとは考えられなかった。母動物の生存中及び剖検後の観察結果について以下に述べる。2 及び 5 mg/kg 群のこれ以外の母動物は予定剖検日まで生存した。

BMN 165 を 2 又は 5 mg/kg/日の用量で投与した結果、有害な臨床症状は見られなかった。体重、体重増加量、絶対・相対摂餌量及び摂水量は投与群間でほぼ同程度であった。

2 及び 5 mg/kg 群では母動物に本薬投与と関連した剖検所見は認められなかった。

対照群の 10 例中 9 例が妊娠した。妊娠 7～20 日、妊娠 7～14 日及び妊娠 13～20 日に BMN 165 を投与した 2 mg/kg 群では、それぞれ 9 例、10 例及び 8 例が妊娠した。妊娠 7～20 日、妊娠 11～16 日及び妊娠 15～20 日に投与した 5 mg/kg 群では、それぞれ 9 例、7 例及び 9 例で妊娠が認められた。

BMN 165 を 5 mg/kg の用量で妊娠 7～20 日に投与した母動物では、対照群と比較して着床後胚損失率が増加した。この着床後胚損失率の増加は全般的な吸収胚の増加として明らかであった（一腹当たりの吸収胚数が対照群の 0.2 に対して 5 mg/kg 群は 1.2）。一腹当たり着床後胚損失率、死亡・吸収胚発生率及び一腹当たり平均吸収胚数は試験施設における背景データの範囲を上回った。

各投与期間に BMN 165 を 5 mg/kg 投与した各グループで胎児体重が減少した。

BMN 165 に関連した胎児の変化は 5 mg/kg 群の各投与期間のグループにのみ認められた。2 mg/kg 群で認められた胎児の変化はこの所見が投与期間の異なるグループの中で 1 例の胎児にのみ観察されたことから、母動物への BMN 165 投与とは関連がないと考えられた。

2 及び 5 mg/kg 群ではいずれの測定時点でも血液学的検査、血液凝固検査及び臨床生化学検査値に用量依存的な傾向はみられなかった。

検討した 3 用量では BMN 165 の曝露量は投与後最初の 24 時間に増加し、投与前のトラフ値で示されるとおり、一般に 1 日 1 回投与で少なくとも 5 日間蓄積が続いた。1 日 1 回の投与間隔ではいずれの投与期間でも定常状態には達しなかった。BMN 165 の血漿中濃度は、5 mg/kg を妊娠 7～20 日に投与したグループに加えて、2 mg/kg を投与した全グループでおおむね最終投与までに減少した。また、投与前のトラフ値で示されるとおり、他の全ての BMN 165 投与群の血漿中濃度は最終投与まで蓄積が続いた。5 mg/kg/日の用量では分割投与による平均蓄積

率は 1.30～22.1 倍の範囲であった。20 mg/kg/日の投与では平均蓄積率は 39.6～47.8 倍の範囲であった。BMN 165 の胎児血漿中濃度は 2 mg/kg/日投与による妊娠 15 日の血漿でのみ測定可能であった。これ以外の妊娠 27 日に採取した全ての胎児血漿試料では、測定可能な濃度の薬物は認められなかった。

2、20 及び 5 mg/kg/日の用量におけるウサギ血漿中の BMN 165 の TK パラメータの概要は BMN165-11-027 試験報告書に記載した。

動物番号 9835（20 mg/kg/日、妊娠 11～16 日投与）が妊娠 11 日に 50 TU の最小の抗体価を示し、動物番号 6683（5 mg/kg/日、妊娠 7～20 日投与）が妊娠 7 日に 100 TU の低抗体価を示した以外には、妊娠 7、11 又は 15 日の投与前に採取した試料の 30 例中 28 例では、抗 PAL IgG 抗体は検出されなかった。合計 30 例のウサギのうち 4 例（動物番号 6683 は 5 mg/kg/日投与、他の 3 例は 2 mg/kg/日投与）が妊娠 27 日の試験終了時に 400 TU 以上の抗 PAL IgG 抗体価を示した。

おおむね予想された BMN 165 の薬理作用が観察された。BMN 165 を 2 又は 5 mg/kg/日の用量で投与した結果、2 mg/kg/日投与で約 3 日間、5 mg/kg/日投与で 6 日間明らかな被験物質の曝露が認められ、血漿中 Phe 濃度を約 6 日間おおむね定量下限（LLOQ）以下に完全に抑制した。BMN 165 を 20 mg/kg/日の用量で投与した結果、投与期間及びそれより長い曝露期間 Phe 濃度を LLOQ 以下に抑制したが、母動物に重篤な影響が発現したことから、ウサギの胚・胎児発生に関する試験で BMN 165 の投与量 20 mg/kg/日は使用できなかった。

結論：

本試験の結果に基づき、ウサギの胚・胎児発生に関する試験では妊娠期間中に BMN 165 の 2 又は 5 mg/kg/日を最長 6 日間投与することが可能である。これらの投与量では期待される薬理学的効果の血漿中 Phe 濃度の抑制が可能となり、軽微な母動物毒性の発現が予想される。

2.6.6.7.2.2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験

（CTD: 4.2.3.5.2-2、BMN165-12-036）

試験の目的：

本試験は妊娠 New Zealand White（Hra:(NZW)SPF）ウサギに BMN 165 を着床から硬口蓋閉鎖まで曝露し、母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を評価することを目的として実施した。本試験は ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C～D を評価するよう計画した。試験デザインを表 2.6.6.7.2-4 に示す。また、本試験の概要を表 2.6.7.13-2 に示す。

材料と方法：

表 2.6.6.7.2-4　ウサギの胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg)	Dose Period (DGs)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Main Study Animals	No. of Toxicokinetic Animals
1	Control Article	0	7-20	0	2	20	3
2	BMN 165	2	7-12	1	2	20	3
	Control Article [a]	0	13-20	0	2		
3	Control Article [b]	0	7-10, 17-20	0	2	20	3
	BMN 165	2	11-16	1	2		
4	Control Article	0	7-14	0	2	20	3
	BMN 165	2	15-20	1	2		
5	BMN 165	5	7-12	2.5	2	20	3
	Control Article [a]	0	13-20	0	2		
6	Control Article [b]	0	7-10, 17-20	0	2	20	3
	BMN 165	5	11-16	2.5	2		
7	Control Article	0	7-14	0	2	20	3
	BMN 165	5	15-20	2.5	2		

a) Toxicokinetic 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.
b) Toxicokinetic 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.
DG: Day of Presumed Gestation.

雌ウサギに対照物質（TRIS 10 mmol/L、塩化ナトリウム 135 mmol/L、*t*-CA 1 mmol/L、アンモニア 1 mmol/L、pH 7.0 ± 0.5）又は被験物質である BMN 165（PEG 化プロセス C で生産）を表 2.6.6.7.2-4 に示すとおり 0、2 又は 5 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回皮下投与した。

本試験では臨床症状、母動物の体重・体重変化、摂餌量、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固検査及び臨床生化学検査）、血漿中 BMN 165 濃度（曝露量）、血漿中 Phe 濃度、卵巣・子宮検査、胎児検査（外表検査、内臓検査及び骨格検査）及び剖検所見を評価した。

結果：

いずれの投与液も使用に適する濃度であった（平均値は目標濃度の±15%以内、個々の試料は ± 20%以内）。

グループ 2、3、4、5、6 及び 7 でそれぞれ合計 1、0、0、1、1 及び 2 例が流産し、グループ 7 で 1 例が妊娠 29 日に分娩した。グループ 2 で認められた妊娠 29 日分娩の 1 例及び流産の 1 例は、試験施設における背景データの範囲内であった。したがって、5 mg/kg 群（グループ 5、6 及び 7）の流産のみが被験物質投与に関連すると考えられた。これ以外の全てのウサギは予定剖検日まで生存した。

本試験の結果の概要を表 2.6.6.7.2-5 に示す。

表 2.6.6.7.2-5　被験物質に関連する所見の概要

Dose (mg/kg)	0 (Control Article)	2	2	2	5	5	5
Dose Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
BMN 165 Dose Period (DG)	7 to 20	7 to 12	11 to 16	15 to 20	7 to 12	11 to 16	15 to 20
N (+ Toxicokinetic)	20 (3)	20 (3)	20 (3)	20 (3)	20 (3)	20 (3)	20 (3)
Aborted and Euthanized	0	1	0	0	1	1	2
Delivered and Euthanized	0	0	0	0	0	0	1
Clinical Observations	-	-	↑	↑	↑	↑	↑
Maternal Body Weight (g)	-	-	-	-	-	↓	-
Maternal Body Weight Gain (g) [a]	-	↓	-	-	↓	↓	↓
Absolute Food Consumption (g/day) [a]	-	↓	↓	-	↓	↓	↓
Relative Food Consumption (g/kg/day) [a]	-	↓	↓	-	↓	↓	↓
Gross Necropsy	-	-	-	-	-	-	-
Embryo-Fetal Death [b]	-	-	-	-	↑	-	-
Fetal Weight (combined, male and female)	-	-	↓ (female only)	-	↓	↓	↓
Fetal Abnormalities	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Malformations	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Variations	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Skeletal Ossification	-	-	-	-	↓	↓	↓
Hematology	-	-	-	-	-	-	-
Reticulocytes	-	-	-	-	-	-	↑
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-
Exposure to BMN 165							
Maternal	-	+	+	+	+	+	+
Fetal	-	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓

表 2.6.6.7.2-5　被験物質に関連する所見の概要（続き）

DG: Day of Gestation; -: no effect or exposure; +: exposure; N: Number.
↑: increased or significantly increased value relative to control group; ↓: decreased significantly decreased value relative to control group.
a) The changes (increases) reflect observations for the cumulative dosing interval.
b) Embryo-Fetal Deaths includes dead fetuses, early resorptions and late resorptions.

結論：

以上、New Zealand White ウサギに BMN 165 を 2 又は 5 mg/kg/日の用量で器官形成期の妊娠 7～12 日、11～16 日又は 15～20 日に分割して 1 日 1 回皮下投与した。先に実施した用量設定試験（試験番号 BMN165-11-027）で投与期間が 7 日を超えると曝露量の減少が認められたことから、投与期間を分割することにより各投与期間で本薬の曝露が確認された。

BMN 165 の血漿中曝露量に加えて、予想される薬理作用である血漿中 Phe の減少を試験期間を通して測定した。

BMN 165 を 2 又は 5 mg/kg/日の用量で投与した結果、各投与期間で過剰な薬理作用による血漿中 Phe 濃度の顕著な減少が認められた。2 及び 5 mg/kg 群では Phe 濃度が低下した状態で母動物の所見（体重増加量及び摂餌量の減少）が認められた。2 mg/kg 群では母動物の妊娠 11～16 日に BMN 165 を子宮内曝露した雌胎児の体重が減少した。5 mg/kg 群でも各投与期間で胚・胎児死亡、胎児体重の減少及び胎児の奇形・変異などの胚・胎児発生に及ぼす影響が認められた。

本試験の結果に基づき、母動物の毒性及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は器官形成期のいずれの投与期間においても 2 mg/kg/日未満であった。

2.6.6.7.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.7.3.1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験

（CTD: 4.2.3.5.3-1、BMN165-14-013）

試験の目的：

本試験は BMN 165 を雌 Crl:CD(SD)ラットに着床から授乳及び離乳まで投与し、母動物に対する有害作用並びに出生児の発生に及ぼす影響を検出することを目的として実施した。本試験は ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C～F を評価するよう計画したが、帝王切開による胎児の評価（ステージ C 及び D）は他試験（試験番号 BMN165-12-037）で実施しているため実施しなかった。この期間の曝露で誘発される影響の発現が遅れる可能性があるため、F_1 世代ラットの性成熟まで観察を続けた。また、雌の F_0 世代について BMN 165 の血漿中曝露量に対応する血漿中 Phe 濃度を測定した。試験デザインを以下の表 2.6.6.7.3-1 に示し、本試験の概要を表 2.6.7.14-1 に示す。

材料と方法：

表 2.6.6.7.3-1 ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する試験の試験デザイン

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Female Animals	
					Main Study	Toxicokinetic Study [a]
1	Control Article	0	0	2.5	25	3
2	BMN 165	2	0.8	2.5	25	3
3	BMN 165	8	3.2	2.5	25	3
4	BMN 165	20	8	2.5	25	3

a) Toxicokinetic animals were primarily used for test article exposure and Phe evaluations.

雌ラットに交配前 28 日から交配期間中及び剖検の前日まで被験物質又は対照物質を 1 日 1 回皮下投与した。最新の体重に基づいて投与液の容量を調整し、毎日ほぼ同時刻に投与した。投与時には薬液を連続的に撹拌した（シリンジ充填のための短時間の中断を除く）。分娩中の母動物には次の投与日まで被験物質又は対照物質を投与しなかった。これらの事象は生データに記録した。

F_1 世代の出生児には被験物質又は対照物質を直接投与しなかったが、母動物の妊娠期間中（子宮内曝露）又は授乳期間中に、乳汁を介して被験物質又は対照物質に曝露されたと考えられる。

F_0 世代の雌について動物の生死、臨床症状、異常行動、体重、体重変化、摂餌量、分娩状況、乳汁中薬物濃度、TK 測定、血漿中 Phe 濃度、血清抗体パラメータ、卵巣・子宮検査及び肉眼的病理所見を評価した。F_1 世代の出生児について動物の生死、臨床症状、体重、体重変化、摂餌量、性成熟、行動学的検査（受動的回避学習及び M 字型水迷路試験）、出生児の血中薬物濃度、生殖能力、肉眼的病理所見、器官重量、卵巣・子宮検査並びに胎児検査（体重、性別及び外表異常）を評価した。

結果：

F_0 世代雌ラット

最高 20 mg/kg/日までの BMN 165 投与では被験物質に関連した死亡例はなかった。20 mg/kg 群の母動物 1 例を重篤な臨床症状のため授乳 20 日に安楽死させた。重篤な臨床症状は全て授乳 20 日にのみ認められ、鼻部の損傷による二次的な影響と考えられたことから、この 1 例の早期死亡例は被験物質とは関係がないと考えられた。これ以外の全ての母動物は予定剖検日まで生存した。

高用量の 20 mg/kg/日で BMN 165 投与に関連した有害な臨床症状は観察されなかった。20 mg/kg 群では交配前の投与期間（1～28 日目として算出）及び 22～28 日目に体重増加量の有意な減少が認められた。このような体重増加抑制の結果、20 mg/kg 群では 28 日目の体重が対照群と比較して有意に減少した。妊娠期間中は 20 mg/kg 群で妊娠 0、7、10、12、15、18 及び 20 日の平均体重が対照群と比較して有意に減少した。妊娠期間中の平均体重増加量は妊娠 0～7 日、7～10 日、18～20 日及び 0～20 日に有意に減少した。授乳期間中は 20 mg/kg/日群で平均体重が授乳 1、4、7 及び 10 日に対照群と比較して有意に減少した。高用量の 20 mg/kg/日の BMN 165 投与では授乳期間中の体重増加量に影響はみられなかった。

絶対摂餌量(g/日)は 20 mg/kg 群で交配前の投与期間(1～28 日目)に有意に減少した。20 mg/kg 群では投与 8～15 日目、15～22 日目及び 22～28 日目に摂餌量の有意な減少が認められた。妊娠期間中（妊娠 0～21 日）は 20 mg/kg 群で摂餌量が有意に減少した。20 mg/kg 群では投与期間中の妊娠 0～7 日、7～10 日、12～15 日及び 18～21 日に摂餌量の有意な減少が認められた。授乳期間中（授乳 1～14 日）には 20 mg/kg 群で摂餌量が有意に減少した。20 mg/kg 群では投与期間中の授乳 1～4 日及び 7～10 日に摂餌量の有意な減少が認められた。

高用量の 20 mg/kg/日の BMN 165 投与は交配及び受胎能の指標に影響を及ぼさなかった。20 mg/kg 群で分娩後 1～4 日に全出生児が死亡した母動物数並びに生後 1 日、2～4 日及び 5～7 日に死亡した出生児数が有意に増加した。20 mg/kg 群では出生児の生存率及び哺育率、生後 4、7、14、18 及び 21 日の平均生存児数並びに生後 1、4、7、14、18 及び 21 日の平均体重が有意に減少した。20 mg/kg 群では出生児を哺育しない母動物数が対照群と比較して有意に増加した。20 mg/kg 群では対照群と比べて統計学的に有意ではないが、出生児が冷触感、非哺育又は脱水を示す母動物数が全て増加した。高用量群の一腹の出生児 1 例では、立ち直り反射の障害、運動失調及び緩徐呼吸が認められた。高用量の 20 mg/kg/日では、母動物及び出生児に BMN 165 投与に関連する肉眼的病変は認められなかった。

F_1 世代雌雄ラット

F_1 世代の雌雄ラットは離乳後に全て予定剖検日まで生存した。雄雌の F_1 ラットの離乳後に、母動物への BMN 165 投与に関連した有害な臨床症状は観察されなかった。

母動物に 20 mg/kg/日の用量で投与した結果、F_1 世代の離乳後の成長に影響は認められなかった。20 mg/kg 群で認められた母動物の体重減少は持続せず、有害所見とは判断しなかった。

20 mg/kg 群の F_1 世代の雄ラットの平均体重は離乳時の低体重を反映して生後 22～78 日に対照群（0 mg/kg/日）と比較して有意に減少した。20 mg/kg 群の体重増加量は生後 22～29 日、29～36 日及び 36～43 日に有意に減少した。平均体重及び体重増加量は生後 120 日前後の試験終了時まで残りの試験期間は同等であった。20 mg/kg 群の F_1 世代の雌ラットの平均体重は、離乳時のわずかな低体重を反映して生後 22 及び 29 日目に対照群と比較して有意に減少した。離乳後の期間には 20 mg/kg 群の体重増加量に有意差はみられなかった。平均体重は妊娠期間を含めて試験終了時まで残りの試験期間は同程度であった。

母動物への 20 mg/kg/日の BMN 165 投与では F_1 世代の離乳後の摂餌量に影響はみられなかった。

20 mg/kg 群では包皮分離が対照群と比較して有意に遅延し、膣開口が僅かに遅延した。これらの遅延はいずれも離乳時の体重が僅かに低いことを反映しており、包皮分離日又は膣開口日の平均体重に群間差がなかったため有害所見とは判断しなかった。

母動物に 20 mg/kg/日の用量で BMN 165 を投与した結果、出生児の学習及び記憶、交配及び受胎能並びに帝王切開で評価したいずれの指標にも影響は認められなかった。母動物への薬物投与に関連した肉眼的病変は認められなかった。20 mg/kg 群では F_1 世代の雄ラットの精巣上体及び精巣重量並びにこれら器官重量の剖検時体重比に影響はみられなかった。20 mg/kg 群では F_1 世代のラットから得た F_2 世代の胎児に変化は認められなかった。

BMN 165 を 2、8 及び 20 mg/kg/日の用量で投与したラットでは、授乳 14 日に各群 3 例の全ての TK 測定用ラットで血漿中に測定可能な濃度の BMN 165 が存在した。血漿中の BMN 165 濃度は用量と共に増加した。本試験では F_1 世代の出生児の血漿中に測定可能な濃度の BMN 165 は認められなかった。

2 mg/kg 群の母動物の 5 例中 1 例で乳汁中に測定可能な濃度の BMN 165 が認められた。8 及び 20 mg/kg 群の母動物では 5 例全例で乳汁中に測定可能な濃度の BMN 165 が認められた。乳汁中の BMN 165 濃度は用量と共に増加した。

対照群の血漿中 Phe 濃度は試験期間を通して測定可能であり、妊娠第 2 週から分娩まで減少し、その後の授乳期間は増加した。

2、8 及び 20 mg/kg 群の Phe 濃度は授乳 14 日に対照群と比較して減少した。2 mg/kg 群では各測定時点の Phe 濃度が対照群で観察された傾向に従ったが、8 mg/kg 群では低値が持続し、20 mg/kg 群では概して定量可能濃度を下回った。

結論：

以上、ラットに BMN 165 を 1 日 1 回皮下投与したとき、8 mg/kg/日までの用量で忍容性は良好であった。20 mg/kg/日の用量では F_0 世代の雌ラットの体重増加量及び摂餌量が減少し、分娩後 1～4 日に全出生児が死亡した母動物数及び生後 7 日までの出生児の死亡が増加した。
20 mg/kg/日の用量では出生児の生存率及び哺育率、平均出生児数、並びに出生児の平均体重が有意に減少した。母動物への 20 mg/kg/日の投与では F_1 世代の出生児に有害な臨床症状が認められた。本試験の結果から、一般毒性及び生殖毒性に関する無毒性量はいずれも 8 mg/kg/日と考えられた。本試験における曝露量を基にした安全域を 2.6.4 の表 2.6.4.9-1 に示す。

2.6.6.7.3.2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 ― F_1 世代の追加生後発生評価

（CTD: 4.2.3.5.3-2、BMN165-18-080）

試験の目的：

本試験は BMN 165 を雌 Crl:CD(SD)ラットに着床から授乳及び離乳まで投与し、母動物に対する有害作用並びに次世代の発生に及ぼす影響を検出することを目的として実施した。本試験は ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C～F を評価するよう計画したが、帝王切開による胎児の評価（ステージ C 及び D）は他試験（試験番号 BMN165-12-037）で実施しているため実施しなかった。また、F_0 世代の雌及び F_1 世代の出生児について血漿中 Phe 濃度を測定した。BMN 165 の曝露量及び抗 PAL IgG 抗体の分析のために、採取した試料を保存した。

前述の例外を除いて、生殖発生ステージ C～F はすでに試験番号 BMN165-14-013 で評価している。安全性評価のため FDA は F_1 世代の生後発生に関する 7 項目の指標を検討する追加試験の実施を要請した。このため、本試験の主要な目的は以前に実施した試験と同じ投与スケジュールを用いて追加の指標に及ぼす影響を検討することである。両試験をブリッジングするエンドポイントとして、F_1 世代で生後 24 日に実施した受動的回避試験に加えて、薬理作用である血漿中 Phe 濃度の測定を F_0 及び F_1 世代で実施した。本試験の概要を表 2.6.7.14-2 に示す。

材料と方法：

試験デザインを以下の表 2.6.6.7.3-2 に示す。

表 2.6.6.7.3-2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 ― F_1 世代の追加生後発生評価の試験デザイン

Group No.	Test Material	Dose Level (mg/kg/day)	Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	No. of Animals
1	Control Article	0	0	2.5	22
2	BMN 165	2	0.8	2.5	22
3	BMN 165	8	3.2	2.5	22
4	BMN 165	20	8	2.5	22

雌ラットに交配前 28 日から交配期間中及び剖検の前日まで被験物質又は対照物質を 1 日 1 回皮下投与した。被験物質又は対照物質を 51～82 回投与した。最新の体重に基づいて投与液の容量を調整し、毎日ほぼ同時刻に投与した。投与時には投与液を連続的に撹拌した（シリンジ充填のための短時間の中断を除く）。分娩中の母動物には被験物質又は対照物質を投与しなかった。これらの事象は生データに記録した。

F_1 世代の出生児には被験物質又は対照物質を直接投与しなかったが、母動物の妊娠期間中（子宮内曝露）又は授乳期間中に、乳汁を介して被験物質又は対照物質に曝露されたと考えられる。

F_0 世代について動物の生死、臨床症状、体重、体重増加量、摂餌量、交尾率、分娩状況、母動物の観察、Phe 濃度、肉眼的病理所見及び卵巣・子宮検査などの指標／エンドポイントを評価した。

F_1 世代について動物の生死、臨床症状、体重、体重増加量、生後発達に関する指標、機能観察総合評価法（FOB）、自発運動量、受動的回避学習、肉眼的病理所見及び雄性生殖器重量などの指標／エンドポイントを評価した。

結果：

F_0 世代雌ラット

2 及び 8 mg/kg 群では BMN 165 投与に関連した死亡例はなかった。20 mg/kg 群の 3 例は重篤な臨床症状が認められたため授乳 2～7 日の間に安楽死させた。これらの母動物は出生児を哺育しなかった。これらの死亡例では先行して有害な臨床症状が観察されたことから、BMN 165 投与に関連すると考えられた。これ以外の全ての母動物は授乳 21 日の予定剖検日まで生存した。

交配前及び妊娠期間中にはいずれの用量でも BMN 165 と関連する臨床症状は観察されなかった。授乳期間中には 2 及び 8 mg/kg 群で本薬投与に関連した臨床症状はみられなかった。本薬投与に関連する臨床症状は 20 mg/kg 群の早期死亡例に限定され、円背位、脱水の疑い（皮膚の張りによる）及び立毛が認められた。

交配前には 20 mg/kg 群の平均体重増加量が 8～15 日目（対照群の 89.1%）、15～22 日目（対照群の 53.4%）及び 22～28 日目（対照群の 53.6%）の各期間で減少し、8～28 日目の全期間で減少が認められた。20 mg/kg 群の 28 日目の平均体重は対照群の 95.3%であった。母動物の平均体重増加量の減少は妊娠期間中も持続し、20 mg/kg 群の妊娠 0～21 日の体重増加量は対照群の 78.3%であった。20 mg/kg 群の平均体重増加量は妊娠中の投与期間の妊娠 0～3 日（対照群の

87.8%)、3～7 日(対照群の 66.9%)、12～15 日(対照群の 72.4%)及び 18～21 日(対照群の 59.8%)の期間に減少した。20 mg/kg 群の母動物の平均体重は妊娠 0～21 日の期間に減少し（対照群の 89.0%～95.7%)、妊娠 21 日には対照群の 89.0%に減少した。

交配前の期間には 20 mg/kg 群の平均摂餌量が 1～28 日目の期間で減少（対照群の 90.0%）したが、BMN 165 投与とは関連がないと考えられた。妊娠期間中には 20 mg/kg 群の母動物の平均摂餌量が妊娠 3～7 日（対照群の 84.8%）及び 18～21 日（対照群の 79.9%）の期間に有意に減少した。さらに、妊娠 7～18 日の各期間（対照群の 86.9%～93.5%）及び妊娠 0～21 日の期間（対照群の 88.5%）に平均摂餌量が減少した。

交配及び受胎能に関するいずれの指標にも BMN 165 に関連した影響はみられなかった。20 mg/kg 群では有害な臨床症状が発現し生後 2～4 日に早期死亡した出生児数及び全出生児が生後 1～4 日に死亡した母動物の割合が有意に増加した。さらに、20 mg/kg 群では出生児の生存率、生後 4、7、10、14、17 及び 21 日の平均生存児数、体重測定を実施した生後 4、7、10、14、17 及び 21 日の平均同腹児数並びに生後 4、7 及び 10 日における出生児の一腹当たり平均体重が有意に減少した。また、20 mg/kg 群では冷触感、腹部に乳汁が見られない、授乳や哺育がない、削痩、自発運動低下、疎毛、脱水の疑い（皮膚の張りにより軽度～重度)、(全身又は四肢の）蒼白、並びに頭部、鼻部、胸部、頸部、口吻部、腹部、体幹下部又は左後肢、尾部又は尾先端部、背部及び右眼が白色、紫色又は黒色を示す同腹児数が増加した。これらの所見の多くは出生児を哺育しない母動物で発生しており、出生児の BMN 165 曝露とは直接の関連はないと考えられた。

いずれの用量でも離乳前の F_1 世代の出生児で反射反応、生後発達、歩行又は微細運動機能の指標に BMN 165 投与と関連する影響は認められなかった。また、いずれの用量でも F_0 世代の雌ラット及び離乳前の F_1 世代の出生児に本薬に関連する肉眼的所見は認められなかった。

F_1 世代雌雄ラット

離乳後の F_1 世代の雌雄ラットは、全て生後 35 日の予定剖検日まで生存した。

離乳後には F_1 世代の雌雄共に母動物への BMN 165 投与に関連する有害な臨床症状は観察されなかった。母動物に本薬を 2、8 又は 20 mg/kg/日の用量で投与した結果、F_1 世代の平均体重及び体重増加量、機能観察バッテリー、受動的回避試験、自発運動量、反射反応、身体的発達並びに雄の剖検時器官重量に影響を及ぼさなかった。

対照群では試験期間中、測定可能な濃度の血漿中 Phe が認められた。2、8 及び 20 mg/kg 群では授乳 14 日に Phe 濃度が対照群の値と比べて減少又は定量下限未満であった。各測定時点の Phe 濃度は、2 及び 8 mg/kg 群では投与 22 日目又は 29 日目／妊娠 0 日まで対照群で観察された傾向に従い、その後の試験期間は減少した。20 mg/kg 群では試験期間を通しておおむね定量可能な濃度を下回った。F_1 世代の出生児の Phe 濃度に性差はなく、生後 14 日には Phe 濃度が用量依存的に低下した。

結論：

以上、BMN 165 は 8 mg/kg/日以下の用量で忍容性が良好であった。20 mg/kg/日の投与により母動物の平均体重、体重増加量及び摂餌量が減少して有害な臨床症状が発現し、生後 2～4 日に早期死亡した出生児数及び全出生児が生後 1～4 日に死亡した母動物数が増加した。20 mg/kg

群では出生児の生存率、体重測定時の平均同腹児数、出生児の一腹当たりの平均体重及び哺育期間の平均生存児数が減少した。加えて、母動物への 20 mg/kg/日の投与で F_1 世代の出生児に有害な臨床症状が観察された。しかし、これらの所見の多くは出生児を哺育しない母動物で発生しており、出生児の BMN 165 曝露とは直接の関連はないと考えられた。

BMN 165 の投与により母動物の血漿中 Phe 濃度が用量依存的に減少し、20 mg/kg 群では授乳 14 日に定量下限未満であった。母動物の Phe 濃度の減少ほど重度ではないが、生後 14 日には F_1 世代の出生児の Phe 濃度も同様に用量依存的な減少がみられた。

以上の結果に基づき、母動物の毒性及び次世代の発生毒性に関する無毒性量はいずれも 8 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.8　局所刺激性試験

独立した BMN 165 の局所刺激性試験は実施しなかった。反復投与毒性試験の一部として局所刺激性を評価した。

ラットの 4 週間投与試験では、1、8 及び 25 mg/kg 群の動物の 2 か所の投与部位で、軽微～軽度のリンパ球／マクロファージ浸潤が認められた。被験物質を投与した動物で軽微～重度の線維化が認められ、8 mg/kg 以上の投与群の動物でより高頻度に観察された。2 週間の休薬により回復性が示された。26 週間投与試験では、投与期間終了後に肉眼的に投与部位の肥厚が観察された。リンパ球浸潤（1 mg/kg 以上）及び線維化（8 mg/kg 以上）に加えて、1 mg/kg 以上の群で軽微～顕著な空胞化組織球の浸潤が観察され、この変化は既述の PEG 化タンパク質の投与に関連する影響と一致した(2)。

カニクイザルの 4 週間投与試験では、投与期間終了後に用量依存的ではないが、全投与群で皮下組織に軽微～中等度のリンパ球及びマクロファージの血管周囲性浸潤が観察された。この変化は回復期間 4 週目までに回復傾向が認められた。39 週間投与試験では、投与期間終了後に血管周囲性細胞浸潤の用量依存的な増加が認められ、リンパ球、マクロファージ及び少数の好酸球及び好中球を伴う形質細胞からなる混合型細胞浸潤による皮下静脈のカフ形成が特徴であった。マクロファージは時おり空胞化した細胞質を有しており、PEG の細胞質内蓄積と一致した。

全体として、投与部位への影響は動物に外因性タンパク質を投与した場合の免疫刺激反応、並びに食作用により PEG を蓄積した組織球細胞で予想される空胞化と一致した。

ペグバリアーゼはヒトにおいても外因性タンパク質であることから、患者で観察された何らかの注射部位反応は同様の作用機序の可能性が高い。理論的なリスクは存在するものの、ヒトでは PEG に起因する長期の空胞化は報告されていない。ペグバリアーゼの臨床試験では、注射部位反応及びペグバリアーゼに対する有害な免疫反応をモニターしており、2.7.4.2.3.2（免疫系障害）及び 2.7.4.2.3.12.2（注射部位反応）に記載している。

2.6.6.9　その他の毒性試験

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験番号 BMN165-12-036）では、過剰な薬理作用（血漿中 Phe の枯渇）により胚・胎児発生に影響が認められた。FDA はこの主張を一層裏付けるために新規にピボタルな試験を実施するよう要請した。生体内には Phe 産生に利用できる

既知の *in vivo* 生化学的経路がないため、Phe は食物からの摂取によってのみ得られる。そのため非植物性の人工 Phe 低減飼料又は植物性の 2 種の Phe 低減飼料を用いて、BMN 165 と同様に血漿中 Phe 濃度の減少が可能か否かを検討する飼料摂取試験を実施した。試験の結果から、要請されたピボタルな試験は実施できなかった。

2.6.6.9.1　非妊娠ウサギを用いたフェニルアラニン低減飼料の 14 日間経口摂取試験

（CTD: 4.2.3.7.3-1、BMN165-18-081）

試験の目的：

本試験は血漿中 Phe 濃度を低下させるために雌 New Zealand White ウサギ（CRL:KBL(NZW)）に Phe 非含有飼料、次いで植物性の 2 種の Phe 低減飼料を給与し、忍容性及び嗜好性を評価することを目的として実施した。血漿中 Phe 濃度の経時的な低下を評価するために試験期間を通して Phe 濃度を測定した。本試験の結果に基づき、雌に BMN 165 を着床から硬口蓋閉鎖まで（ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C～D）曝露し、胚・胎児発生に及ぼす影響を評価する試験で、これらの飼料の使用が可能か否かを決定した。この飼料摂取試験には非妊娠ウサギを用いた。本試験の概要を表 2.6.7.17-1 に示す。

材料と方法（第 1 相）：

動物は試験施設に入荷し試験の第 1 相に割り付けた時点で 5～7 ヵ月齢、体重が 3305～4035 g であった。無作為化及び第 2 相の試験群への割り付け時の体重は 3562～4296 g であった。本試験の両相で臨床症状、体重、体重変化、摂餌量、摂水量及び血漿中 Phe 濃度を評価した。

本試験の第 1 相の試験デザインを表 2.6.6.9.1-1 に示す。第 1 相の目的は Phe を 9 g/kg 含有する人工飼料でウサギを飼育し、飼料の摂取性を確認した後、ウサギに Phe を 0、2.5 又は 4.5 g/kg 含有する人工飼料の給与を継続することであった。

表 2.6.6.9.1-1　試験デザイン（第 1 相）

Day of Study, Phase 1	Standard Rabbit Chow #5322 [a]	Control Artificial Diet [b]	Ratio of 5322: CAD
1	150 to 156 g	0 g	100:0
5	112 to 115 g	38 to 41 g	75:25
8	75 to 78 g	75 to 78 g	50:50
14	0 g	150 to 156 g	0:100
17 [c]	150 to 156 g	0 g	100:0

* Note: Due to low food consumption and decreasing body weights, Timothy Hay Mini Bales [Bio-Serv; 24.1 mg Phe/100 g diet = 0.0241% Phe, (w/w)] were given as a supplement to 100% CAD in the afternoon on 24 April 2019. CAD: Control Artificial Diet.

a) PMI Nutrition [8 g Phe/kg diet = 0.8% (w/w)].
b) Bio-Serv [9 g Phe/kg diet = 0.9% (w/w)].
c) Date of termination of Phase 1 and return of the rabbits to #5322 diet.

試験第 1 相では 20 匹のウサギを 1 群に割り付けた。入荷後 8 日目から順化期間を設けてウサギを人工飼料に移行するための新飼料を導入した。飼料は Certified Rabbit Chow® #5322（PMI® Nutrition International）と Rabbit Diet, Purified, Amino Acid Defined, Complete, 3/16” Pellet, 0.9% Phe（Bio-Serv）を種々の割合で配合した混合物 150～156 g である。上記の飼料を各動物に毎日給与した。ウサギが人工飼料の摂取を受容するまでの期間は通常濃度の Phe を含有しており、受容後に Phe を 0、2.5 又は 4.5 g/kg 含有する人工飼料に切り替えた。

結果（第 1 相）：

試験第 1 相の結果では、ウサギは混合飼料から標準的なウサギ飼料のみを摂取し、Phe 含量低減飼料の割合に応じて混合飼料を拒絶した。その結果、実質的に人工飼料を拒絶することが示された。これらの結果から、Phe を 0、2.5 又は 4.5 g/kg 含有する人工飼料に完全に切り替えることは科学的に実行可能な選択肢ではないことが明らかとなった。このようにウサギが人工飼料を拒絶し、その後体重減少が認められたため、人工飼料の給与を中止してこの試験第 1 相を早期に終了した。この試験第 1 相を通じて、平均血漿中 Phe 濃度は飼料変更前の Phe 濃度と比べて給与した混合飼料の摂取量に影響されなかった。摂餌量（標準飼料又は人工飼料）の減少にもかかわらず、その後の血漿中 Phe 濃度に影響はなかった。

材料と方法（第 2 相）：

試験第 2 相は PMI Nutritional International TestDiet Division で製造した飼料を用いて開始した。標準飼料#5322 を元にアルファルファをベースとする Phe 低減飼料を調製した。大豆粕を除去することにより Phe 濃度を 8 g/kg から 2.2 g/kg に低減し、食物繊維を 18.5%［5WTW（食物繊維 18%）と表記］又は食物繊維を 21.7%［5WTX（食物繊維 22%）と表記］含有する飼料を毎日ウサギに給与した。

ウサギに標準飼料を 39 日間給与した後、試験第 2 相を開始した。第 2 相の試験デザインを表 2.6.6.9.1-2 に示す。

表 2.6.6.9.1-2　試験デザイン（第 2 相）

Group No.	Test Material	Fiber (%)/Phe Level (g/kg)	Female Numbers
1	5WTW	18/2.2	6301-6310
2	5WTX	22/2.2	6311-6320

試験第 2 相では同じ雌ウサギ 20 匹を 2 群（グループ 1 及び 2）に分け、各群に 10 匹を割り付けた。ウサギに食物繊維含量/Phe 濃度が 18%/2.2g/kg 又は 22%/2.2g/kg の試験飼料を試験 1 日目（第 1 相終了後 40 日目の試験飼料給与初日）～14 日目（試験 1～14 日目）まで給与し、最後の採血を行って動物を試験施設のコロニーに戻した試験 15 日目まで継続した。

結果（第 2 相）：

アルファルファをベースとし Phe 含量が通常の約 25%で食物繊維を 22%又は 18%含有する飼料を 2 週間給与した試験第 2 相では、ウサギはこれらの飼料を良好に摂取して第 2 相の期間中は全体的に摂餌量が増加したが、依然として通常の摂餌量を下回っており、この試験期間で体重が減少した。しかし、血漿中 Phe 濃度はいずれの Phe 低減飼料の給与によっても、実質的には減少しなかった。

結論：

以上、非妊娠の雌 New Zealand White ウサギは非植物性人工飼料の摂取を拒絶したため、血漿中 Phe 濃度を低下させる手段として Phe 含量を低減した人工飼料を使用することはできなかった。ウサギは植物をベースとする 2 種の Phe 低減飼料を良好に摂取したが、この飼料を 2 週間給与しても血漿中 Phe 濃度は低下しなかった。Phe 低減飼料を 2 週間給与して体重減少を引

き起こすほど摂餌量が減少した場合でも、血漿中 Phe 濃度は低下しなかったことから、飼料操作によるウサギの血漿中 Phe 濃度の低下は不可能であることが明らかとなった。

2.6.6.10　考察及び結論

BMN 165 の毒性と過剰な薬理作用の特徴を明らかにするために、非臨床安全性試験としてラット及びサルにおける単回投与及び反復投与毒性試験を実施した。ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験も実施した。

高用量の BMN 165 投与後の毒性及び忍容性を評価するため、単回投与毒性試験を実施した。サルに本薬 60 mg/kg を単回投与すると、有害所見として薬理作用から予想された血漿中 Phe の減少に起因する病的状態（脱水、食欲不振及び活動性低下を特徴とする）が認められた。

最長 39 週間までの反復投与毒性試験では、主要な所見としてサルで動脈の炎症、ラットで一部組織の空胞化、及び正常動物の血漿中 Phe 濃度が検出限界以下に低下したことに起因する生殖毒性が認められた。

カニクイザルで観察された用量依存性の動脈炎は動物に外因性酵素を長期投与したことに関連する免疫介在性反応に起因すると考えられた。回復期間にはいずれの動物にも本所見が認められず、回復性が示唆された。

ラットの反復投与毒性試験で一部の組織に空胞化が認められたが、組織の機能に対する影響は認められなかった。空胞化の特徴を一層明らかにするために実施した追加試験では、空胞化は種特異的（ラットのみ）であり、ラット及びサルのいずれにおいても脈絡叢を含む中枢神経系には観察されず、ラットの 26 週間投与試験では PEG の蓄積が定常状態に達していたことが示された。ヒトの 60 mg/日投与では、PEG の 1 週当たり総投与量が体重 70 kg で 17 mg/kg/週になると予想される。PEG の総投与量を非臨床試験と比較すると、BMN 165 を 1、8 及び 25 mg/kg の用量で週 2 回投与したラットで、それぞれ 5.56、44.48 及び 139.0 mg/kg/週であった。非臨床試験の動物種（ラット）に本薬を 1、8 及び 25 mg/kg の用量で週 2 回投与したとき、PEG の 1 週当たり総投与量は、ヒトの 60 mg/日投与に対してそれぞれ 0.33 倍、2.62 倍及び 8.18 倍であった。

ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験では、体重増加量の減少並びに母動物毒性及び胎児毒性が認められ、野生型の動物で血漿中 Phe 濃度が持続的に正常値以下に低下したことと合致した。これらの所見は用量及び時間依存的であり、回復期間後に消失又は部分的に回復した。

非臨床試験で確認した有害所見は BMN 165 の臨床試験でモニターする安全性エンドポイントに関する情報提供に有用であった。

2.6.6.11　参考文献

(1) Kilberg MS, Pan YX, Chen H, Leung-Pineda V. Nutritional control of gene expression: How mammalian cells respond to amino acid limitation. Annu Rev Nutr 25, 59-85. 2005.

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

(3) Webster R, Elliott V, Park BK, Walker D, Hankin M, Taupin P (2009). PEG and PEG conjugates toxicity: Towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. In PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications (F. M. Veronese, ed.), pp. 127-146. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

(4) Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, Brändli-Baiocco A, Cavagnaro J, Dempster M, et al. PEGylated biopharmaceuticals: Current experience and considerations for nonclinical development. Toxicol Path 43, 959-983. 2015.

(5) Corpet DE, Parnaud G, Delverdier M, Peiffer G, Tache S. Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens. Cancer Res 60, 3160-3164. 2000.

(6) Karlsson PC, Hughes R, Rafter JJ, Bruce WR. Polyethylene glycol reduces inflammation and aberrant crypt foci in carcinogen-initiated rats. Cancer Letters 223, 203-209. 2005.

目次

2.6.7　毒性試験概要表....3
2.6.7.1　毒性試験：一覧表....3
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表....7
2.6.7.3　トキシコキネティクス：試験成績の一覧....8
2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧....12
2.6.7.5　単回投与毒性試験....14
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験....16
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験....17
2.6.7.8　*In Vitro* 遺伝毒性試験....58
2.6.7.9　*In Vivo* 遺伝毒性試験....58
2.6.7.10　がん原性試験....58
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験....58
2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び胚・胎児発生に関する試験....59
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験....66
2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験....84
2.6.7.15　新生児を用いた試験....94
2.6.7.16　局所刺激性試験....94
2.6.7.17　その他の毒性試験....95

表目次

表 2.6.7.1-1　毒性試験一覧 3
表 2.6.7.2-1　トキシコキネティクス試験の一覧表 7
表 2.6.7.3-1　トキシコキネティクス試験成績の一覧 8
表 2.6.7.4-1　被験物質一覧 12
表 2.6.7.5-1　単回投与毒性試験 14
表 2.6.7.7-1　BMN 165 のラットにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 2 週間回復性試験 17
表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験 20
表 2.6.7.7-3　BMN 165 のカニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験 36
表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験 39
表 2.6.7.7-5　反復投与毒性試験の動物組織におけるポリエチレングリコール空胞の検討 54
表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験 59
表 2.6.7.13-1　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験 66
表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験 71
表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験 84
表 2.6.7.14-2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 － F_1 世代の追加生後発生評価 90
表 2.6.7.17-1　フェニルアラニン低減飼料摂取試験 95

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧

Test Article: BMN 165

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Dates	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity									
Single-Dose Toxicity	Rat / Crl:CD(SD)	IV SC	Single dose	0 (IV) 1 (IV) 5 (IV) 25 (IV) 0 (SC) 10 (SC) 25 (SC) 250 (SC)	GLP [a]	[redacted]	02/19/07 - 03/05/07	0165-07-003	4.2.3.1-1
Single-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	SC	Single dose	0 4 12 60	GLP [a]	[redacted]	02/20/07 - 03/14/07	0165-07-007	4.2.3.1-2
Repeat-Dose Toxicity									
Repeat-Dose Toxicity	Rat / Crl:CD(SD)	SC	4 weeks (twice per week)	0 1 8 25	GLP [a]	[redacted]	05/08/07 - 06/18/07	0165-07-009	4.2.3.2-1
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	26 weeks (twice per week)	0 1 8 25	GLP [a]	[redacted]	05/01/08 - 12/18/09	0165-08-019	4.2.3.2-2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧（続き）

Test Article: BMN 165

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Dates	Study Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	SC	4 weeks (twice per week)	0 0.01 0.1 1	GLP [a]	[redacted]	05/15/07 - 07/10/07	0165-07-008	4.2.3.2-3
Repeat-Dose Toxicity	Monkey/ Cynomolgus	SC	39 weeks (twice per week)	0 0.01 0.1 1.0 3.0 7.0/5.0/3.0	GLP [a]	[redacted]	11/14/07- 12/18/09	0165-07-030	4.2.3.2-4
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD) Monkey/ Cynomolgus	SC	Rat: 17 or 26 weeks Monkey: 39 weeks (twice per week) [b]	Rat: 0, 1, 8, 25 Monkey: 0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 7.0/5.0/3.0	Non-GLP	[redacted]	09/13/13 - 12/13/13	BMN165-13-047	4.2.3.2-5
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	17 or 26 weeks (twice per week) [c]	0 25	GLP [a]	[redacted]	02/05/14 - 09/30/15	BMN165-13-068	4.2.3.2-6
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	4, 17, or 26 weeks (twice per week) [d]	0 8	GLP [a]	[redacted]	12/02/14 - 10/01/15	BMN165-13-069	4.2.3.2-7

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧（続き）

Test Article: BMN 165

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Dates	Study Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	17 or 26 weeks (twice per week) [e]	0 8 25	GLP [a]	[redacted]	07/18/16 - 11/11/16	0165-08-019	4.2.3.2-2
Reproductive and Developmental Toxicity									
Reproductive Toxicity (Fertility and Embryo-fetal Development)	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	M: 6 weeks PC - euthanasia F: 4 weeks PC - G17 (Daily)	0 2 8 20	GLP [a]	[redacted]	11/06/12 - 01/25/13	BMN165-12-037	4.2.3.5.1-1
Reproductive Toxicity (Embryo-fetal Development, DRF)	Rabbit/ New Zealand White	SC	G7-20 G7-14 G13-20 G11-16 G15-20 (Daily)	0 2 5 20	GLP [a]	[redacted]	04/22/11 - 02/01/12	BMN165-11-027	4.2.3.5.2-1
Reproductive Toxicity (Embryo-fetal Development)	Rabbit/ New Zealand White	SC	G7-20 G7-10, 17-20 G7-12 G7-14 G11-16 G13-20 G15-20 (Daily)	0 2 5	GLP [a]	[redacted]	11/04/12 - 11/30/12	BMN165-12-036	4.2.3.5.2-2

表 2.6.7.1-1 毒性試験一覧（続き）

Test Article: BMN 165

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (Frequency)	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Dates	Study Number	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity									
Reproductive Toxicity (Prenatal and Postnatal Development)	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	4 weeks PC - L21 (Daily)	0 2 8 20	GLP [a]	[redacted]	06/16/14 - 12/17/14	BMN165-14-013	4.2.3.5.3-1
Reproductive Toxicity (Prenatal and Postnatal Development)	Rat/ Crl:CD(SD)	SC	4 weeks PC - L21 (Daily)	0 2 8 20	GLP [a]	[redacted]	02/26/19 - 02/18/20	BMN165-18-080	4.2.3.5.3-2
Other Toxicity Studies									
Feasibility Study [f]	Rabbit/ New Zealand White	Oral (Dietary)	Phase 1: 17 days Phase 2: 15 days (Daily)	-	Non-GLP	[redacted]	03/29/19 - 02/17/20	BMN165-18-081	4.2.3.7.3-1

IV: Intravenous; SC: Subcutaneous; PC: Pre-cohabitation; G: Gestation day; L: Lactation day; DRF: Dose Range Finding.

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

b) Brain section slides from the 26-week chronic rat study (0165-08-019) and the 39-week chronic monkey study (0165-07-030) were peer reviewed.

c) Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples from Groups 1 (0 mg/kg) and 4 (25 mg/kg) in Study 0165-08-019 at 17-week interim and 26-week main terminations were used.

d) FFPE tissue samples from Groups 1 (0 mg/kg) and 3 (8 mg/kg) at 4-week termination in the sub-chronic rat study (0165-07-009) and at 17-week interim and 26-week main terminations in Study 0165-08-019 were used.

e) FFPE tissue samples from Groups 1 (0 mg/kg), 3 (8 mg/kg), and 4 (25 mg/kg) in Study 0165-08-019 at 17-week interim and 26-week main terminations were used.

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

2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2-1　トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: BMN 165

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity	Rat	IV SC	IV: 0, 1, 5, 25 SC: 0, 10, 25, 250	GLP [a]	0165-07-003	4.2.3.1-1
Single-Dose Toxicity	Monkey	SC	0, 4, 12, 60	GLP [a]	0165-07-007	4.2.3.1-2
Repeat-Dose Toxicity	Rat	SC	0, 1, 8, 25	GLP [a]	0165-07-009	4.2.3.2-1
Repeat-Dose Toxicity	Rat	SC	0, 1, 8, 25	GLP [a]	0165-08-019	4.2.3.2-2
Repeat-Dose Toxicity	Monkey	SC	0, 0.01, 0.1, 1	GLP [a]	0165-07-008	4.2.3.2-3
Repeat-Dose Toxicity	Monkey	SC	0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 7.0/5.0/3.0	GLP [a]	0165-07-030	4.2.3.2-4
Reproductive Toxicity (Embryo-fetal Development, DRF)	Rabbit	SC	0, 2, 5, 20	GLP [a]	BMN165-11-027	4.2.3.5.2-1

IV: Intravenous; SC: Subcutaneous; DRF: Dose Range Finding.

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

2.6.7.3 トキシコキネティクス：試験成績の一覧

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: BMN 165

Study No.: 0165-07-003		AUC_{0-t} (ng•hr/mL)		C_{max} (ng/mL)		T_{max} (hr)		$t_{1/2}$ (hr)	
Dose (mg/kg)	Method of Administration	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
1	IV	482,444	729,590	10,450	14,750	3.00	6.00	30.1	26.6
5		3,541,647	3,679,396	85,813	89,520	3.00	1.00	25.3	36.5
25		9,375,503	12,336,871	141,835	262,640	12.0	6.00	38.0	45.5
10	SC	1,305,825	915,040	16,807	16,542	24.0	12.0	41.6	52.9
25		2,284,300	2,301,153	28,940	29,580	36.0	48.0	33.4	NA
250		32,967,008	36,535,770	187,560	225,200	120	72.0	38.5	50.0

IV: Intravenous; NA: Not applicable; SC: Subcutaneous.

Study No.: 0165-07-007	AUC_{0-t} (ng•hr/mL) (SD)		C_{max} (ng/mL) (SD)		T_{max} (hr) (SD)		$t_{1/2}$ (hr) (SD)	
Dose (mg/kg)	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
4	6,008,005 (777,272)	3,243,668 (1,363,514)	37,180 (6272)	21,493 (8918)	56.0 (6.9)	48.0 (31.2)	NA NA	64.4 NA
12	18,860,690 (11,429,075)	22,903,655 (2,226,733)	104,327 (46,337)	189,947 (54,617)	108 (52)	104 (37)	92.0 NA	50.6 NA
60	11,753,160 (5,655,311)	6,885,560 (8,147,343)	219,493 (45,288)	217,280 (41,942)	80.0 (34.6)	52.0 (38.6)	NA NA	NA NA

NA: Not applicable; SD: Standard deviation.

表 2.6.7.3-1　トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Test Article: BMN 165

Study No.: 0165-07-009		AUC_{0-t} (ng•hr/mL)		C_{max} (ng/mL)		T_{max} (hr)	
Dose (mg/kg)	**Dose No.**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
1	1	80,425	72,350	1938	1932	24.0	36.0
	4	NA	2465	NA	230	NA	0
	7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	1	968,380	1,241,165	25,652	28,213	48.0	36.0
	4	7818	1365	468	107	9.00	24.0
	7	147,790	169,018	4403	5882	9.00	36.0
25	1	3,304,015	2,680,523	83,893	61,353	60.0	60.0
	4	1,588,160	168,338	36,960	5168	12.0	36.0
	7	4,123,605	1,386,565	77,087	35,773	36.0	36.0

NA: Not applicable.

Study No.: 0165-08-019		AUC_{0-t} (ng•hr/mL)		C_{max} (ng/mL)		T_{max} (hr)	
Dose (mg/kg)	**Week**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
1	1	75,652	60,406	1352	1299	24	48
	8	0	8188	0	552	NA	0
	16	114,660	16,372	5671	499	72	0
	27	124,876	10,064	3673	315	72	24
8	1	1,917,172	970,572	49,483	26,775	48	48
	8	2,722,848	511,604	75,867	12,817	8	24
	16	1,768,028	429,352	34,267	10,625	48	72
	27	1,584,332	489,192	25,758	11,242	8	8
25	1	8,122,412	2,983,308	194,717	62,633	48	72
	8	13,324,672	6,394,576	284,233	126,767	8	0
	16	5,566,084	3,997,860	145,583	68,383	0	24
	27	8,750,660	3,815,748	236,870	69,017	24	48

NA: Not applicable.

表 2.6.7.3-1　トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Test Article: BMN 165

Study No.: 0165-07-008		AUC_{0-t} (ng•hr/mL) (SD)		C_{max} (ng/mL) (SD)		T_{max} (hr) (SD)	
Dose (mg/kg)	**Dose No.**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
0.01	1	2318 (NA)	NA	128 (NA)	NA	42.0 (NA)	NA
	3	7890 (NA)	NA	280 (NA)	NA	36.0 (NA)	NA
0.1	1	32,850 (11270)	27,283 (19,308)	805 (469)	573 (331)	26.0 (29.4)	40.0 (6.9)
	3	39,679 (NA)	90,318 (42,579)	570 (406)	1588 (778)	9.00 (0)	44.0 (6.9)
1	1	402,864 (172,912)	447,867 (200,984)	10,578 (6476)	9168 (4664)	45.6 (10.0)	37.8 (16.9)
	3	1,292,579 (425,589)	1,185,270 (409,625)	31,615 (10,181)	23,947 (13,931)	48.0 (30.6)	30.6 (28.2)

NA: Not applicable; SD: Standard deviation.

Study No.: 0165-07-030		AUC_{0-t} (ng•hr/mL) (SD)		C_{max} (ng/mL) (SD)		T_{max} (hr) (SD)	
Dose (mg/kg)	**Week**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
0.01	1	2497 (2168)	3054 (1826)	42 (36)	60 (24)	48.0 (0.0)	40.0 (27.7)
	39	0	0	0	0	NA	NA
0.1	1	21,888 (19,500)	68,219 (43,388)	481 (468)	1335 (825)	72.0 (NA) [a]	48.0 (24.0)
	39	384 (283)	1609 (2787)	47 (19)	115 (200)	14.0 (8.7)	9.0 (NA) [b]
1.0	1	779,795 (27,166)	1,076,245 (273,240)	16,315 (2157)	30,538 (13,249)	72.0 (0.0)	72.0 (0.0)
	39	23,122 (25,337)	33,739 (27,179)	545 (503)	729 (537)	27.0 (19.7)	9.0 (0.0)
3.0	1	2,049,863 (368,465)	2,618,490 (1,223,670)	41,446 (7430)	53,861 (32,090)	51.4 (9.1)	48.0 (19.6)
	39	2,285,423 (3,858,063)	124,917 (209,396)	40,325 (68,427)	3337 (4613)	17.6 (16.0)	19.7 (7.3)
7.0	1	5,753,322 (1,149,781)	6,399,628 (2,228,218)	151,725 (37,678)	139,253 (46,054)	52.0 (18.1)	54.0 (11.1)
3.0	39	190,483 (164,691)	116,467 (189,490)	4950 (4572)	2828 (4333)	33.6 (13.1)	16.5 (8.0)

NA: Not applicable; SD: Standard deviation.
a)　N = 2, b) N = 1.

表 2.6.7.3-1 トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Test Article: BMN 165

Study No.: BMN165-11-027			AUC_{0-t} (ng•hr/mL) (SD)	C_{max} (ng/mL) (SD) [a]	T_{max} (hr) (SD) [a]
Daily Dose (mg/kg)	**Group**	**Gestation Day**	**F_0 Female Plasma**		
2	2	7	246,499 (60,972)	28,933 (7557)	24 (0.0)
		20 [b]	NA	NA	NA
	3	7	255,153 (53,523)	28,333 (11,140)	24.0 (0.0)
		14	2497 (2689)	287 (206)	8.0 (4.0)
	4	13	236,841 (78,413)	23,767 (4277)	24.0 (0.0)
		20	39,087 (14,558)	6447 (7322)	4.0 (6.9)
20	5	7	1,540,675 (835,831)	175,333 (74,501)	24.0 (0.0)
		20 [c]	NA	NA	NA
	6	11	902,140 (171,863)	121,700 (23,381)	24.0 (0.0)
		16	524,800,000 (71,079,460)	2,270,000 (357,631)	18.67 (9.24)
	7	15	821,924 (135,163)	125,000 (16,371)	24.0 (0.0)
		20	149,335,333 (22,955,192)	1,800,000 (376,431)	2.67 (2.31)
5	8	7	667,767 (233,542)	77,667 (33,307)	22.0 (3.5)
		20	894,271 (727,892)	64,660 (51,990)	2.7 (4.6)
	9	11	635,113 (148,866)	59,633 (22,107)	22.0 (3.5)
		16	13,367,667 (1,790,769)	767,667 (86,234)	10.7 (12.2)
	10	15	635,113 (148,866)	59,000 (11,004)	22.0 (3.5)
		20	61,481,104 (60,820,245)	744,000 (247,586)	10.0 (7.2)

BLQ: Below the limit of quantitation; DG: Day of presumed gestation; NA: Not applicable; SD: Standard deviation.

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 DG20 for Group 2.

c) Due to unscheduled terminal procedures occurring on DG18 for all animals in Group 5, dosing and collecting samples after DG18 were not possible.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質一覧

表 2.6.7.4-1　被験物質一覧

Test Article: BMN 165

Lot Number	Purity (%) [a]	Specified Impurities		Study Number	Type of Study
		Free rAvPAL (%) [b]	Free PEG (mg/mg) [c]		
Proposed Specification	**≥ 97**	**≤ 0.1**	**NA**	**NA**	**NA**
0702010165 [d]	99.3	< 0.05	0.38	0165-07-003	Single-Dose Rat (IV/SC)
0702010165 [d]	99.3	< 0.05	0.38	0165-07-007	Single-Dose Monkey (SC)
NP160701 [e]	99.2	< 0.05	0.18, 0.23 [f]	0165-07-009	4-Week Repeat-Dose Rat (SC)
NP160701 [e]	99.2	< 0.05	0.18, 0.23 [f]	0165-07-008	4-Week Repeat-Dose Monkey (SC)
Proposed Specification	**≥ 95**	**≤ 0.2**	**≤ 0.7**	**NA**	**NA**
NP160702 [e]	100	< 0.1	0.5	0165-07-030	39-Week Repeat-Dose Monkey (SC)
NP160706 [e]	100	< 0.1	0.3		
NP160801 [e]	100	< 0.1	0.2		
AP160703 [e]	100	< 0.1	0.5		
FIN-0426 [g]	100	NA	NA	0165-08-019	26-Week Repeat-Dose Rat (SC)
AP160802 [e]	100	< 0.1	0.3		
AP160703 [e]	100	< 0.1	0.5		
NP160801 [e]	100	< 0.1	0.2		
P1605-10005 [e]	100	< 0.1	0.3	BMN165-11-027	DART (Embryo-fetal Development DRF) Rabbit (SC)
2011-165-15-111511 [e]	99	< 0.1	0.3	BMN165-12-036	DART (Embryo-fetal Development) Rabbit (SC)
2011-165-15-111511 [e]	99	< 0.1	0.3	BMN165-12-037	DART (Fertility and Embryo-fetal Development) Rat (SC)
P1626-14103 [e]	100	< 0.1	0.1	BMN165-14-013	DART (Prenatal and Postnatal Development) Rat (SC)
Proposed Specification	**≥ 98.5**	**≤ 0.2**	**≤ 0.1**	**NA**	**NA**
P1626B-18116 [e]	99.3	< 0.1	0.1	BMN165-18-080	DART (Prenatal and Postnatal Development) Rat (SC)

表 2.6.7.4-1 被験物質一覧（続き）

DART: Developmental & Reproductive Toxicity; DRF: Dose Range Finding; IV: Intravenous; NA: Not applicable; SC: Subcutaneous.

a) Purity by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (C4 column, A_{214} Detection).
b) Free rAvPAL by Anion Exchange Chromatography.
c) Free PEG (mg PEG/mg protein) by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (C4 column, Charged Aerosol Detection).
d) Test article manufactured by BioMarin Process Development.
e) Test article manufactured by BioMarin Clinical Manufacturing.
f) Value obtained from retest of test article for stability assessment.
g) Test article manufactured by Althea Technologies, Inc.; testing for specified impurities was not conducted (no proposed specifications existed).

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 2.6.7.5-1 単回投与毒性試験

Test Article: BMN 165

Species /Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-lethal Dose	LD_{50}	Noteworthy Findings	Study Number
Rat / Crl:CD(SD)	Intravenous (IV) Subcutaneous (SC)	0 (IV) 1 (IV) 5 (IV) 25 (IV) 0 (SC) 10 (SC) 25 (SC) 250 (SC)	Male and Female N=5 / gender / group (satellite TK groups of N=3 / gender / vehicle control or N=6 / gender / dose group)	25 (IV) 250 (SC)	Not determined (> 25 mg/kg IV, > 250 mg/kg SC)	• NOAEL at 25 (IV) and 250 (SC) • No BMN 165-related mortality or morbidity (n=1 male each at 5 mg/kg IV and 10 mg/kg SC following blood collections) • Red skin or scaly skin on the back and/or rough haircoat at 250 mg/kg SC • Body weights at 250 mg/kg were 87.5% (males) and 92.5% (females) of control (Day 8). Weight gain decreased compared to controls (70.5% for males and 91.2% for females) for Days 1-11. • C_{max} and $AUC_{0\text{-}96h}$ roughly dose proportional between the 1.00 and 5.00 mg/kg doses (male and female). 25 mg/kg C_{max} and $AUC_{0\text{-}96h}$ had less than proportional increase. No marked (> 2-fold) sex differences observed.	0165-07-003

表 2.6.7.5-1 単回投与毒性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Species /Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-lethal Dose	LD_{50}	Noteworthy Findings	Study Number
Monkey / Cynomolgus	SC	0 4 12 60	Male and Female N=3 / gender / group	12	$12 < LD_{50} < 60$	• Morbidity and mortality of 3 females and 2 males 5 days post-dose and 1 male 6 days post-dose • Plasma phenylalanine reduced below level of quantitation (BLOQ) at 4, 12 and 60 mg/kg within 12 hours of dose administration and remained decreased through 192 hours post dose for all surviving animals. • IgG titers ranged from < 50 to 1350 following 4 and 12 mg/kg doses • IgM titers: positive value at termination (n=1 male) 4 mg/kg • Clinical observations including hunched, rough haircoat, thin appearance, depression, dehydration, anorexia, hypoactivity, vomitus and reduced abdominal turgor at 60 mg/kg • At 12 mg/kg, lower absolute reticulocyte count and mean corpuscular volume (Day 10). n=1 male and n=1 female at 12 mg/kg, had notably decreased red cell mass (Day 10) • Macroscopic Findings: GI discoloration and ulceration at 60 mg/kg • Histopathology: Mucosal atrophy, congestion/hemorrhage, degeneration and necrosis of glandular epithelium, erosion/ulceration and subacute inflammation of stomach at 60 mg/kg • Kidney cortex and medulla examined by electron microscopy; no findings	0165-07-007

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の試験は実施しなかった。

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7.7-1 BMN 165 のラットにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 2 週間回復性試験

Report Title: A 4-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Rats with a 2-Week Recovery Phase

Species/Strain: Rats/Crl:CD(SD)
Initial Age: 46-52 days old
Date of First Dose: 08 May 2007
Duration of Dosing: Twice Weekly for 4 Weeks
Duration of Post-dose: 2 Weeks
Method of Administration: Subcutaneous Injection
Vehicle/Formulation: 10 mmol/L TRIS, 140 mmol/L Sodium Chloride, pH 7.5 ± 0.1
Test Article: BMN 165
Study No.: 0165-07-009
Location in CTD: 4.2.3.2-1
GLP Compliance: GLP [a]

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 25 mg/kg twice weekly for 4 weeks

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

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1 (Low)**		**8 (Mid)**		**25 (High)**	
Number of Animals [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Toxicokinetics:								
AUC_{0-t} (ng•hr/mL)								
Day 1 (Dose 1)	-	-	72,350	80,425	1,241,165	968,380	2,680,523	3,304,015
Day 11 (Dose 4)	-	-	2465	-	1365	7818	168,338	1,588,160
Day 22 (Dose 7)	-	-	-	-	169,018	147,790	1,386,565	4,123,605
C_{max} (ng/mL)								
Day 1 (Dose 1)	-	-	1932	1938	28,213	25,652	61,353	83,893
Day 11 (Dose 4)	-	-	230	-	107	468	5168	36,960
Day 22 (Dose 7)	-	-	-	-	5882	4403	35,773	77,087

表 2.6.7.7-1 BMN 165 のラットにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 2 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1 (Low)**		**8 (Mid)**		**25 (High)**	
Number of Animals [a]	**M: 3**	**F: 3**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Antibody Titers:								
Baseline IgG Range	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
Baseline Incidence of Positive	0/3	0/3	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Range of IgG Titers								
Day 28 (Dose 8)	< 50	<50 [b]	< 50 - 450	< 50 - 12,150	< 50 - 50	< 50 - 150	< 50 - 150	< 50 - 150
Day 42 (Recovery Termination)	< 50	< 50 [b]	< 50 - 450	< 50 - 12,150	< 50 - 50	< 50	< 50 - 450	< 50 - 1350
IgM Titers	Two low dose (1 mg/kg) females had positive IgM titers. All other animals were negative.							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1 (Low)**		**8 (Mid)**		**25 (High)**	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15**	**F: 15**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund	0/15	0/15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/15	0/15
Histopathology [c]								
Fibrosis - Subcutan Site A Day 29	0	0	1	0	10	1	6	1
Day 56	0	0	-	-	-	-	0	0
Fibrosis - Subcutan Site B Day 29	0	0	0	0	0	0	5	0
Day 56	0	0	-	-	-	-	0	0
Infiltrates of lymphocytes/macrophages								
Subcutan Site A Day 29	0	2	6	2	5	6	6	5
Day 56	0	0	-	-	-	-	1	0
Subcutan Site B Day 29	1	0	2	0	6	2	7	3
Day 56	0	0	-	-	-	-	0	0
Liver: Vacuolation, Kupffer Cells								
Day 29	1/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10	3/10
Day 56	2/5	0/5	-	-	-	-	0/5	0/5

表 2.6.7.7-1　BMN 165 のラットにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 2 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1 (Low)		8 (Mid)		25 (High)	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15**	**F: 15**
Histopathology [c]								
Spleen: Vacuolation, Reticuloendothelial Cells								
Day 29	0/10	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	6/10	2/10
Day 56	0/5	0/5	-	-	-	-	3/5	4/5
Clinical Pathology								
Globulin:								
Day 28 - Dosing Phase	2.1	2.1	2.2	2.3*	2.1	2.2	2.2	2.1
Day 15 - Recovery Phase	2.0	2.1	-	-	-	-	2.1	2.2
Activated Partial Thromboplastin Time:								
Day 28 - Dosing Phase	21.2	20.3	21.3	20.3	22.0	20.9	22.5*	21.4*
Day 15 - Recovery Phase	21.4	21.2	-	-	-	-	21.9	20.9

-: No noteworthy findings.
Dunnett’s Test: * = $p < 0.05$.
a) Toxicokinetic animals: n = 6 per gender per dose group, n = 3 per gender per dose group per TK sample timepoint, n = 6 per gender per dose group per antibody sample timepoint.
b) Control Group Females: 1 death on study (not test article related), n = 2 by day 28.
c) Numerics signifies the number of animals affected.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験

Report Title: 26-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with a 12-Week Recovery Period and a 17-Week Interim Euthanasia with a 4-Week Recovery Period with rAvPAL-PEG in Rats

Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)

Duration of Dosing: Twice weekly for 17 or 26 Weeks. The first 33 or 53 injections were dosed in the scapular region (site A), while the final dose was injected in the lumbar region (site B).

Test Article: BMN 165

Initial Age: 49 to 55 days

Duration of Post-dose: 4 or 12 Weeks

Study No.: 0165-08-019

Date of First Dose: 09 May 2008

Method of Administration: Subcutaneous Injection

Location in CTD: 4.2.3.2-2

Vehicle/Formulation: 10 mmol/L tris (hydroxymethyl) aminomethane, 135 mmol/L sodium chloride, 1 mmol/L *trans*-Cinnamic acid, and 1 mmol/L ammonia

GLP Compliance: GLP [a]

No Observed Adverse Effect Level: 1 mg/kg/dose

Gender	**Male**				**Female**			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Number of Toxicity Animals - Interim Phase								
Dosing Phase (Dosing for 17 weeks)	10	10	10	10	10	10	10	10
Recovery Phase (4 weeks of recovery following 17 weeks of dosing)	5	0	0	5	5	0	0	5
Number of Toxicity Animals - Terminal Phase								
Dosing Phase (Dosing for 26 weeks)	15	15	15	15	15	15	15	15
Recovery Phase (12 weeks of recovery following 26 weeks of dosing)	5	0	0	5	5	0	0	5

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	**Male**				**Female**			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Number of Toxicokinetic Animals	9	9	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics								
Week 1 of the Dosing Phase								
$AUC_{0\text{-}72\ hr}$ (ng•hr/mL)	NA	60,406	970,572	2,983,308	NA	75,652	1,917,172	8,122,412
C_{max} (ng/mL)	NA	1299	26,775	62,633	NA	1352	49,483	194,717
Week 8 of the Dosing Phase								
$AUC_{0\text{-}72\ hr}$ (ng•hr/mL)	NA	8188	511,604	6,394,576	NA	0	2,722,848	13,324,672
C_{max} (ng/mL)	NA	552	12,817	126,767	NA	0	75,867	284,233
Week 16 of the Dosing Phase								
$AUC_{0\text{-}72\ hr}$ (ng•hr/mL)	NA	16,372	429,352	3,997,860	NA	114,660	1,768,028	5,566,084
C_{max} (ng/mL)	NA	499	10,625	68,383	NA	5671	34,267	145,583
Week 27 of the Dosing Phase								
$AUC_{0\text{-}72\ hr}$ (ng•hr/mL)	NA	10,064	489,192	3,815,748	NA	124,876	1,584,332	8,750,660
C_{max} (ng/mL)	NA	315	11,242	69,017	NA	3673	25,758	236,870

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund (Toxicity Animals)	0	3 [b]	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Thinning Haircoat, Dorsal Abdomen (Back)	0	0	0	0	0	0	0	1
Thinning Haircoat, Dose Site	0	0	0	0	0	0	0	18
Body Weight (%) [c]								
Number of Toxicity Animals	35	24	25	35	35	25	25	35
Day 113 of the Interim Phase - Dosing Phase	562 g	-1.42 (554 g, 44.1)	0.53 (565 g, 54.1)	-4.80 (535 g, 44.3)	315 g	2.22 (322 g, 38.6)	0.63 (317 g, 32.3)	-2.22 (308 g, 27.2)
Number of Toxicity Animals	5	0	0	5	5	0	0	5
Day 32 of the Interim Phase - Recovery Phase	562 g	NA	NA	-0.71 (558 g, 41.9)	285 g	NA	NA	10.53 (315 g, 30.3)

NA: Not applicable.

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

b) The death and unscheduled euthanasia on Days 71, 133, and 164 of the dosing phase were not considered test article related.

c) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100. The values in the parenthesis present the actual mean body weight and standard deviation.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Body Weight [Continued (%)] [a]								
Number of Toxicity Animals	20	12	15	20	20	15	15	20
Day 183 of the Terminal Phase - Dosing Phase	624 g	-1.28 (616 g, 46.9)	-0.48 (621 g, 64.0)	-4.49 (596 g, 58.5)	348 g	-0.29 (347 g, 30.6)	0.00 (348 g, 43.8)	-5.75 (328 g, 31.1)
Number of Toxicity Animals	5	0	0	5	5	0	0	5
Day 81 of the Terminal Phase - Recovery Phase	635 g	NA	NA	1.57 (645 g, 79.3)	386 g	NA	NA	-9.33 (350 g, 37.8)
Body Weight Gain (g) [b]								
Number of Toxicity Animals	35	24	25	35	35	25	25	35
Days 1 to 113 of the Interim Phase - Dosing Phase	304	297 (41.8)	308 (47.2)	277* (40.4)	129	135 (35.9)	131 (28.5)	122 (21.7)
Number of Toxicity Animals	5	0	0	5	5	0	0	5
Days 4 through 32 of the Interim Phase - Recovery Phase	0	NA	NA	9 (11.4)	-5	NA	NA	-4 (4.0)
Number of Toxicity Animals	20	12	15	20	20	15	15	20
Days 120 to 183 of the Terminal Phase - Dosing Phase	70	58 (9.3)	60 (13.7)	58 (18.6)	35	34 (8.8)	32 (16.1)	23* (10.4)
Number of Toxicity Animals	5	0	0	5	5	0	0	5
Days 4 through 81 of the Terminal Phase - Recovery Phase	16	NA	NA	24 (11.7)	19	NA	NA	23 (22.5)

NA: Not applicable.

Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

a) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100. The values in the parenthesis present the actual mean body weight and standard deviation.

b) Group means for the actual calculated body weight gain are shown. The values in the parenthesis present the standard deviation.

表 2.6.7.7-2 BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Food Consumption (%) [a]								
Number of Toxicity Animals	35	25	25	35	35	25	25	35
Days 8 through 14 of the Dosing Phase	214 g	0.47 (215 g, 18.1)	0.47 (215 g, 17.0)	-5.14* (203 g, 12.4)	-	-	-	-
Days 22 through 28 of the Dosing Phase	222 g	2.25 (227 g, 15.8)	3.15 (229 g, 20.2)	-4.50* (212 g, 14.7)	-	-	-	-
Days 36 through 42 of the Dosing Phase	231 g	-1.30 (228 g, 17.0)	-1.30 (228 g, 15.8)	-6.06* (217 g, 15.0)	-	-	-	-
Days 43 through 49 of the Dosing Phase	198 g	-2.53 (193 g, 14.1)	-0.51 (197 g, 14.8)	-6.06* (186 g, 18.4)	-	-	-	-
Days 71 through 77 of the Dosing Phase	217 g	-3.69 (209 g, 18.8)	-0.46 (216 g, 20.0)	-6.45* (203 g, 21.5)	-	-	-	-
Days 78 through 84 of the Dosing Phase	226 g	-6.64* (211 g, 16.4)	-3.10 (219 g, 21.8)	-10.62* (202 g, 15.6)	-	-	-	-
Days 85 through 91 of the Dosing Phase	199 g	-5.53* (188 g, 15.8)	-1.01 (197 g, 14.6)	-6.03* (187 g, 15.8)	-	-	-	-
Days 113 through 119 of the Dosing Phase	192 g	-1.04 (190 g, 18.5)	-1.04 (190 g, 15.9)	-3.13 (186 g, 20.8)	-	-	-	-
Number of Toxicity Animals	20	12	15	20	20	15	15	20
Days 176 through 182 of the Dosing Phase	225 g	0.00 (225 g, 17.9)	-2.67 (219 g, 18.2)	-5.78 (212 g, 20.5)	-	-	-	-

-: No noteworthy findings.

Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

a) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100. The values in the parenthesis present the actual mean food consumption and standard deviation.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Macroscopic Observations								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Dosing Phase)	15	12	15	15	15	15	15	15
Subcutaneous Site A, Thickened	0	0	2	6	0	0	1	3
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Interim Phase - Dosing Phase)	10	10	10	10	10	10	10	10
Kidney								
Vacuolation/Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal								
Minimal	0	0	0	3	0	0	1	2
Liver								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	5	0	0	1	6
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Spleen								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	5	0	0	1	4
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	5	0	0	2	7
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Interim Phase - Dosing Phase)	10	10	10	10	10	10	10	10
Lymph Node, Mandibular								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	4	0	0	5	4
Slight	0	0	0	3	0	0	0	5

a) Each animal in all toxicity groups euthanized at the interim phase - dosing phase euthanasia, terminal phase - dosing phase euthanasia, or terminal phase - recovery phase euthanasia and from each animal that died or was euthanized at an unscheduled interval were processed and examined microscopically. Testes from males and the kidney from each animal in the interim phase - recovery phase euthanasia were processed and examined microscopically.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Interim Phase - Dosing Phase)	10	10	10	10	10	10	10	10
Adrenal, Cortex								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	3
Testes								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	10	NA	NA	NA	NA
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	4	0	0	0	3	4	0
Slight	0	1	7	0	0	0	5	0
Moderate	0	0	3	8	0	0	0	6
Marked	0	0	0	2	0	0	0	4
Fibrosis								
Minimal	0	0	3	1	0	0	2	1
Slight	0	0	2	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	1	9	0	0	0	9
Infiltrate, Lymphocytes								
Minimal	0	2	1	3	0	2	2	4
Slight	0	1	0	0	0	0	1	0
Degeneration, Skeletal Muscle/Adipocytes, Dermis								
Minimal	0	0	0	2	0	0	0	0

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Interim Phase - Dosing Phase)	10	10	10	10	10	10	10	10
Subcutaneous Injection Site B								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	0	8	4	0	0	4	2
Slight	0	0	0	2	0	0	0	4
Moderate	0	0	0	2	0	0	0	2

NA: Not applicable.

a) Each animal in all toxicity groups euthanized at the interim phase - dosing phase euthanasia, terminal phase - dosing phase euthanasia, or terminal phase - recovery phase euthanasia and from each animal that died or was euthanized at an unscheduled interval were processed and examined microscopically. Testes from males and the kidney from each animal in the interim phase - recovery phase euthanasia were processed and examined microscopically.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Interim Phase - Recovery Phase)	5	0	0	5	5	0	0	5
Kidney								
Vacuolation/Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal								
Minimal	0	NA	NA	4	0	NA	NA	0
Testes								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	3	NA	NA	NA	NA
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Dosing Phase)	15	12	15	15	15	15	15	15
Kidney								
Vacuolation/Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal								
Minimal	0	0	8	10	0	0	1	7
Slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Liver								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	8	0	0	1	7
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Spleen								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	7	0	0	1	9
Slight	0	0	0	3	0	0	0	5
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1

表 2.6.7.7-2 BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Dosing Phase)	15	12	15	15	15	15	15	15
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	7	0	0	4	11

NA: Not applicable.

a) Each animal in all toxicity groups euthanized at the interim phase - dosing phase euthanasia, terminal phase - dosing phase euthanasia, or terminal phase - recovery phase euthanasia and from each animal that died or was euthanized at an unscheduled interval were processed and examined microscopically. Testes from males and the kidney from each animal in the interim phase - recovery phase euthanasia were processed and examined microscopically.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Dosing Phase)	15	12	15	15	15	15	15	15
Lymph Node, Mandibular								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	10	0	0	5	11
Slight	0	0	0	3	0	0	0	3
Adrenal, Cortex								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	4
Testes								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	0	0	13	NA	NA	NA	NA
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	6	1	0	0	8	1	0
Slight	0	2	3	1	0	0	6	2
Moderate	0	0	11	8	0	0	6	9
Marked	0	0	0	6	0	0	0	4
Fibrosis								
Minimal	0	5	0	0	0	0	3	1
Slight	0	0	1	1	0	0	7	2
Moderate	0	0	13	13	0	0	3	12

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Dosing Phase)	15	12	15	15	15	15	15	15
Subcutaneous Injection Site A								
Degeneration, Skeletal Muscle/Adipocytes, Dermis								
Minimal	0	0	2	6	0	0	2	4
Slight	0	0	0	5	0	0	0	7
Moderate	0	0	0	2	0	0	0	3

NA: Not applicable.

a) Each animal in all toxicity groups euthanized at the interim phase - dosing phase euthanasia, terminal phase - dosing phase euthanasia, or terminal phase - recovery phase euthanasia and from each animal that died or was euthanized at an unscheduled interval were processed and examined microscopically. Testes from males and the kidney from each animal in the interim phase - recovery phase euthanasia were processed and examined microscopically.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Dosing Phase)	15	12	15	15	15	15	15	15
Subcutaneous Injection Site B								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	1	12	8	0	1	5	10
Slight	0	0	0	1	0	0	0	1
Degeneration, Skeletal Muscle/Adipocytes, Dermis								
Minimal	0	0	2	2	0	0	2	6
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Recovery Phase)	5	0	0	5	5	0	0	5
Kidney								
Vacuolation/Hypertrophy, Tubule Cell, Focal/Multifocal								
Minimal	0	NA	NA	4	0	NA	NA	3
Slight	0	NA	NA	1	0	NA	NA	0
Liver								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1
Spleen								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	3	0	NA	NA	4
Slight	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1

表 2.6.7.7-2 BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Recovery Phase)	5	0	0	5	5	0	0	5
Lymph Node, Mesenteric								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	1	0	NA	NA	5

NA: Not applicable.

a) Each animal in all toxicity groups euthanized at the interim phase - dosing phase euthanasia, terminal phase - dosing phase euthanasia, or terminal phase - recovery phase euthanasia and from each animal that died or was euthanized at an unscheduled interval were processed and examined microscopically. Testes from males and the kidney from each animal in the interim phase - recovery phase euthanasia were processed and examined microscopically.

表 2.6.7.7-2　BMN 165 のラットにおける 26 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 12 週間回復性試験、並びに 17 週中間剖検及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male				Female			
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**	**0 (Control)**	**1 (Low)**	**8 (Mid)**	**25 (High)**
Histopathology [a]								
Number of Toxicity Animals - Euthanasia (Terminal Phase - Recovery Phase)	5	0	0	5	5	0	0	5
Lymph Node, Mandibular								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	5	0	NA	NA	5
Adrenal, Cortex								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1
Testes								
Vacuolation, Histiocytic Cells								
Minimal	0	NA	NA	4	NA	NA	NA	NA
Subcutaneous Injection Site A								
Infiltrate, Histiocytic Cells, Vacuolated								
Minimal	0	NA	NA	4	0	NA	NA	2
Fibrosis								
Minimal	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1
Slight	0	NA	NA	4	0	NA	NA	2

NA: Not applicable.

a) Each animal in all toxicity groups euthanized at the interim phase - dosing phase euthanasia, terminal phase - dosing phase euthanasia, or terminal phase - recovery phase euthanasia and from each animal that died or was euthanized at an unscheduled interval were processed and examined microscopically. Testes from males and the kidney from each animal in the interim phase - recovery phase euthanasia were processed and examined microscopically.

表 2.6.7.7-3　BMN 165 のカニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験

Report Title: 4-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 4-week Recovery Period

Species/Strain: Cynomolgus monkeys/ *Macaca fascicularis*

Duration of Dosing: Twice Weekly for 4 Weeks

Test Article: BMN 165

Initial Age: 2 to 3 years

Duration of Post-dose: 4 Weeks

Study No.: 0165-07-008

Date of First Dose: 15 May 2007

Method of Administration: Subcutaneous Injection

Location in CTD: 4.2.3.2-3

Vehicle/Formulation: 10 mmol/L TRIS, 140 mmol/L Sodium Chloride, pH 7.5 ± 0.1

GLP Compliance: GLP [a]

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 0.01 mg/kg twice weekly for 4 weeks

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

Dose (mg/kg):	**0 (Control)**		**0.01 (Low)**		**0.1 (Mid)**		**1 (High)**	
Number of Animals:	**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics:								
$AUC_{0\text{-}t}$ (ng•hr/mL)								
Day 1 (Dose 1)	-	-	-	2318	27,283	32,850	447,867	402,864
Day 8 (Dose 3)	-	-	-	7890	90,318	39,679	1,185,270	1,292,579
C_{max} (ng/mL)								
Day 1 (Dose 1)	-	-	-	128	573	805	9168	10,578
Day 8 (Dose 3)	-	-	-	280	1588	570	23,947	31,615
Antibody Titers:								
Baseline IgG Range	< 50	< 50 - 150	< 50	< 50 - 1350	< 50 - 450	< 50 - 450	< 50 - 50	< 50 - 150
Baseline Incidence of Positive	0/5	3/5	0/3	1/3	2/3	1/3	1/5	1/5
Range of IgG Titers								
Day 28	< 50 - 450	< 50 - 50	< 50 - 1350	< 50 - 450	150 - 1350	50 - 450	1350 - 36,450	50 - 4050
Day 53	< 50	< 50	-	-	-	-	4050 - 12,150	1350 - 12,150
IgM Titers	One control male and one control female had positive IgM titers							

表 2.6.7.7-3 BMN 165 のカニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.01 (Low)		0.1 (Mid)		1 (High)	
Number of Animals:	**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Noteworthy Findings:								
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenylalanine								
Day 1 - dosing phase (pre-dose)	31.6	30.9	43.2	16.7	35.4	44.2	48.1	40.1
Day 1 - dosing phase (9 hrs. post dose)	40.1	57.4	78.9	37.6	24.0	22.6	1.2*	0.0*
Day 8 - dosing phase	56.3	53.4	89.5	83.9	0.0*	3.0*	0.0*	0.0*
Day 11 - dosing phase	58.8	48.2	60.8	84.9	10.4	-	0.0	0.0*
Day 22 - dosing phase	31.0	31.1	27.8	27.5	20.9	33.3	37.6	33.9
Histopathology - Dosing Phase								
Subcutaneous Site A								
Infiltrate, Lymphocytes/Macrophages, Perivascular Subcutis	0	+1	+2, ++1	+2, ++1	+2, ++1	+1, ++1, +++1	+2, ++1	+1, ++2
Inflammation, Granulomatous, Subcutis	0	+2	++1	+2	+2	+1	0	+1
Subcutaneous Site B								
Infiltrate, Lymphocytes/Macrophages, Perivascular, Subcutis	0	+1	+3	+3	+3	+2, ++1	++2	+1, ++1, +++1
Inflammation, Granulomatous, Subcutis	+1	0	+2	+1	0	+2	0	++1
Kidney								
Pigment, Tubule Cell	0	0	+1	0	0	+1	+1, ++1	0
Liver								
Hypertrophy/Hyperplasia, Kupffer Cell	0	0	0	+1	+2	+2, ++1	++1	0^

表 2.6.7.7-3　BMN 165 のカニクイザルにおける 4 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose (mg/kg):	0 (Control)		0.01 (Low)		0.1 (Mid)		1 (High)	
Number of Animals:	**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Histopathology - Recovery Phase								
Subcutaneous Site A								
Infiltrate, Lymphocytes/Macrophages, Perivascular Subcutis	0	0	-	-	-	-	+1	0
Inflammation, Granulomatous, Subcutis	+1	0	-	-	-	-	0	0
Subcutaneous Site B								
Infiltrate, Lymphocytes/Macrophages, Perivascular, Subcutis	0	0	-	-	-	-	+1	0
Inflammation, Granulomatous, Subcutis	0	0	-	-	-	-	+1	0
Kidney								
Pigment, Tubule Cell	0	0	-	-	-	-	+1	+1
Liver								
Hypertrophy/Hyperplasia, Kupffer Cell	+1	+2	-	-	-	-	+1	0
Degeneration of Blood Vessels - Dosing Phase	0	0	0	0	+/++1	0	+/++1	+/++1

-: No noteworthy findings; +: Minimal; ++: Slight; +++: Moderate.
Dunnett’s Test: * = $p \leq 0.05$.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験

Report Title: 39-Week Subcutaneous Injection Toxicity and Toxicokinetic Study with rAvPAL-PEG in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery Phase

Species/Strain: Cynomolgus monkeys/ *Macaca fascicularis*

Duration of Dosing: Twice weekly for 39 weeks

Test Article: BMN 165

Initial Age: 3 to 6 years

Duration of Post-dose: 13 Weeks

Study No.: 0165-07-030

Date of First Dose: 17 December 2007

Method of Administration: Subcutaneous Injection

Location in CTD: 4.2.3.2-4

Control Article/Diluent: 10 mmol/L tris (hydroxymethyl) aminomethane, 135 mmol/L sodium chloride, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, and 1 mmol/L ammonia

GLP Compliance: GLP [a]

No Observed Adverse Effect Level: 1.0 mg/kg/dose

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

Gender	**Male**						**Female**					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Number of Toxicity Animals	8	3	3	3	7	8	8	3	3	3	7	8
Tokicokinetics:												
Week 1 of the Dosing Phase												
$AUC_{0\text{-}72\ hr}$ (ng•hr/mL)	NA	3054	68,219	1,076,245	2,618,490	6,399,628	NA	2497	21,888	779,795	2,049,863	5,753,322
C_{max} (ng/mL)	NA	60	1335	30,538	53,861	139,253	NA	42	481	16,315	41,446	151,725
Week 39 of the Dosing Phase												
$AUC_{0\text{-}72\ hr}$ (ng•hr/mL)	NA	0	1609	33,739	124,917	116,467	NA	0	384	23,122	2,285,423	190,483
C_{max} (ng/mL)	NA	0	115	729	3337	2828	NA	0	47	545	40,325	4950
Noteworthy Findings:												
Died or Sacrificed Moribund (Toxicity Animals)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 [b]
Clinical Observations												
Hypoactivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

NA: Not applicable.

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) One female given 7.0 mg/kg/dose was euthanized on Day 12 of the dosing phase due to test article-related anorexia and poor body condition. The most notable clinical pathology findings for this female were moderately decreased red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, absolute reticulocyte count, and total protein. Macroscopically, alopecia of the skin, discoloration of the stomach, and enlarged thyroids were noted for this animal and, histologically, this animal had test article-related moderate atrophy of the thymus; however, the cause of morbidity remained unclear.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Number of Toxicity Animals	8	3	3	3	7	8	8	3	3	3	7	8
Food Consumption												
Low	6	2	2	3	3	7	8	3	3	3	7	8
None	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	4	5
Body Weight [b]												
Day 8 of the dosing phase (%)	-	-	-	-	-	-	3.5 kg (0.60)	-2.9 (0.35)	-8.6 (0.40)	0.0 (0.50)	-5.7 (0.53)	-11.4 (0.56)
Hematology [c]												
Number of Toxicity Animals	8	3	3	3	7	8	8	3	3	3	7	7
Red Blood Cell Count ($\times 10^6$/µL), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	5.38	3.9	-11.0	-3.5	-7.4	-11.7*
Red Blood Cell Count ($\times 10^6$/µL), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	5.28	3.2	-8.9	-0.4	-6.8	-10.6
Hemoglobin (g/dL), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	13.3	0.0	-5.3	-3.0	-9.8	-14.3*
Hemoglobin (g/dL), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	12.8	0.8	-2.3	1.6	-9.4	-13.3*
Hemoglobin (g/dL), Day 57 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	13.4	0.0	0.0	-1.5	-6.7	-6.0
Hematocrit (%), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	41.2	1.2	-5.8	-1.7	-9.2	-14.1*
Hematocrit (%), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	40.8	0.5	-3.2	2.5	-8.1	-11.5

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

-: No noteworthy findings.
Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.
b) For control, group mean is shown. For treated groups, percent differences from control are shown. Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100. Values in parentheses are standard deviation.
c) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Hematology (continued) [b]												
Number of Toxicity Animals	8	3	3	3	7	8	8	3	3	3	7	7
Absolute Reticulocyte Count ($\times 10^3/\mu L$), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	106.7	-12.8	-14.9	-15.5	-39.6*	-81.0*
Absolute Reticulocyte Count ($\times 10^3/\mu L$), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	94.2	-1.5	-3.0	-15.8	-10.0	55.1
Clinical Chemistry [b]												
Urea Nitrogen (mg/dL), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	19	-5.3	10.5	-10.5	0.0	-26.3*
Urea Nitrogen (mg/dL), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	16	0.0	25.0	0.0	6.3	18.8
Total Protein (g/dL), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	7.8	3.8	0.0	-1.3	-1.3	-11.5*
Total Protein (g/dL), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	7.5	5.3	1.3	4.0	0.0	-2.7
Cholesterol (mg/dL), Day 15 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	145	-5.5	18.6	-4.8	-12.4	-26.2
Cholesterol (mg/dL), Day 25 of the Dosing Phase	-	-	-	-	-	-	149	-7.4	14.8	4.0	-12.8	-9.4
Phenylalanine (µmol/L) [b]												
Number of Toxicity Animals	8	3	3	3	7	8	8	3	3	3	7	8
Day 1 of the Dosing Phase (9 hours post-dose)	85.8	-1.2	-22.3	-51.0*	-78.4*	-86.6*	73.2	-14.5	-0.4	-51.0	-89.6*	-93.7*

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

-: No noteworthy findings.
Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.
b) Hematology, clinical chemistry, and phenylalanine parameters: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Phenylalanine (µmol/L), (continued) [b]												
Number of Toxicity Animals	8	3	3	3	7	8	8	3	3	3	7	8
Day 2 of the Dosing Phase	83.9	0.2	-6.3	-87.6*	BDL	BDL	64.7	-17.2	-31.7	-93.5*	BDL	BDL
Day 3 of the Dosing Phase	93.7	-5.8	-15.2	-81.2*	BDL	BDL	67.7	-18.3	-29.5	-81.8*	BDL	BDL
Day 4 of the Dosing Phase	93.5	-15.6	-15.4	-83.2*	-98.9 [c]	BDL	64.3	-14.5	-38.7*	-88.3*	BDL	BDL
Day 8 of the Dosing Phase	42.2	6.6	-23.0	-97.4 [c]	BDL	BDL	32.7	6.1	-12.5	-96.6 [c]	BDL	BDL
Day 10 of the Dosing Phase	104.9	-7.9	-21.5	-94.3*	BDL	-97.9 [c]	53.6	13.1	-16.4	-91.2 [c]	BDL	-96.5 [c]
Day 11 of the Dosing Phase	100.0	-12.1	-20.8	-89.1*	BDL	BDL	55.2	-1.8	-22.8*	-90.4 [c]	BDL	BDL
Day 15 of the Dosing Phase	40.7	-1.7	-5.4	-41.5 [c]	-8.4	-3.7 [c]	33.0	0.6	-5.2	-32.4 [c]	6.1 [c]	-55.2 [c]
Day 267 of the Dosing Phase (9 hours post-dose)	102.8	8.4	-26.1	-38.7 [c]	-26.3	-62.2*	79.8	0.6	-16.4	-26.8	-66.0*	-77.7*
Day 268 of the Dosing Phase	77.5	-4.4	-22.3	-57.2*	-45.7*	-60.6*	59.9	7.3	6.7	-8.3	-66.9*	-77.0 [c]
Day 269 of the Dosing Phase	67.3	1.0	-14.3	-42.2	-20.2	-52.9*	51.0	25.9	7.3	-24.7	-46.1	-64.3 [c]
Day 270 of the Dosing Phase	73.5	-4.8	-9.1	-18.4	-2.7	-29.0	64.9	-17.1	-5.4	-9.6	-33.9	-25.7

BDL: Below detectable limit.

Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Percent difference is calculated as [(treated group mean-control group mean)/control group mean] × 100.

c) Group excluded from statistical analysis due to the low number of samples.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Organ Weights - Dosing Phase - Final Phase Sacrifice [b] (%)												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	2	3	3	4	4
Prostate	1.942 g	+60.865	+55.510	+27.446	+93.254	+73.532	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Seminal Vesicles	8.791 g	-2.980	-15.436	+18.439	+63.804	+20.339	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Epididymis	3.965 g	+20.101	+23.430	+30.441	+45.246	+42.774	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Testis	23.481 g	+43.729	+24.863	+33.504	+65.743	+65.419	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Spleen	5.577 g	-19.670	-5.559	-17.608	-9.432	+17.626	3.464 g	+4.128	-16.715	+16.426	+11.663	+42.812
Histopathology - Dosing Phase - Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	3	3	3	4	4
Arterial Inflammation												
Kidney												
Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Urinary Bladder												
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pancreas												
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

NA: Not applicable.

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) Absolute weights differed from controls in the direction indicated. The number indicates percent difference for the absolute organ weights. Actual organ weights are presented for the control animals.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Histopathology - Dosing Phase - Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	3	3	3	4	4
Arterial Inflammation (Continued)												
Gallbladder												
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Esophagus												
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Stomach												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1[b]	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Duodenum												
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Jejunum												
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ileum												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) Not test article-related.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Histopathology – Dosing Phase – Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	3	3	3	4	4
Arterial Inflammation (Continued)												
Cecum												
Minimal	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Colon												
Minimal	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rectum												
Minimal	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Lung												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart												
Minimal	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nerve, Sciatic												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Histopathology - Dosing Phase - Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	3	3	3	4	4
Arterial Inflammation (Continued)												
Lacrimal Gland												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph Node, Mandibular [b]												
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Epididymis												
Moderate	0	0	0	0	0	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Seminal Vesicle												
Minimal	0	0	0	0	0	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ovary												
Slight	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	2	0
Uterus												
Minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	0	1
Slight	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	1	0
Moderate	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	0	1
Marked	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	1	0
Cervix												
Marked	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	1	0

NA: Not applicable.

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) The number of animals examined is four males and four females given 0 mg/kg/dose (control article) and three males given 3.0 mg/kg/dose.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Histopathology - Dosing Phase - Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	3	3	3	4	4
Arterial Inflammation (Continued)												
Vagina [b]												
Moderate	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	0	0	1	0
Subcutaneous Site C												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Subcutaneous Site D												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cellular Infiltrate												
Subcutaneous Site A												
Minimal	2	1	3	2	2	3	1	1	3	1	2	0
Slight	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	1	3
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
Subcutaneous Site B												
Minimal	2	1	3	1	1	1	1	2	3	1	1	0
Slight	0	0	0	2	2	2	0	0	0	1	1	3
Moderate	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	2	1
Subcutaneous Site C												
Minimal	1	2	2	2	0	2	2	2	3	2	1	1
Slight	0	0	1	1	2	1	0	1	0	1	3	0
Moderate	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	3

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

NA: Not applicable.

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) The number of control animals examined was four females.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Histopathology - Dosing Phase - Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	5	3	3	3	4	5	5	3	3	3	4	4
Cellular Infiltrate (Continued)												
Subcutaneous Site D												
Minimal	1	2	3	2	2	3	0	1	2	2	1	3
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Kidney												
Glomerulopathy												
Minimal	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1
Marrow, Sternum												
Nodules, Lymphoid												
Minimal	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	2
Slight	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1
Thymus [b]												
Atrophy												
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Slight	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
Marked	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1	0

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

b) The number of examined thymus was two for males given 0.01 mg/kg/dose and three for males given 3.0 mg/kg/dose.

表 2.6.7.7-4　BMN 165 のカニクイザルにおける 39 週間皮下投与毒性・トキシコキネティクス試験及び 13 週間回復性試験（続き）

Test Article: BMN 165

Gender	Male						Female					
Daily Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0**	**3.0**	**7.0/5.0/ 3.0 [a]**
Histopathology - Recovery Phase - Final Phase Sacrifice												
Number of Toxicity Animals	3	0	0	0	3	3	3	0	0	0	3	3
Marrow, Sternum												
Nodules, Lymphoid												
Minimal	0	NA	NA	NA	0	1	0	NA	NA	NA	2	0
Slight	0	NA	NA	NA	1	0	0	NA	NA	NA	0	0
Thymus												
Atrophy												
Minimal	0	NA	NA	NA	0	1	0	NA	NA	NA	1	1
Slight	1	NA	NA	NA	0	0	0	NA	NA	NA	0	0
Moderate	0	NA	NA	NA	0	1	0	NA	NA	NA	0	0
Marked	0	NA	NA	NA	1	0	0	NA	NA	NA	0	0
Severe	0	NA	NA	NA	0	0	0	NA	NA	NA	1	0

NA: Not applicable.

a) Group 6 animals were administered 7.0 mg/kg/dose on Days 1, 4, and 8 of the dosing phase; animals were not dosed on Days 11 and 15 of the dosing phase; animals were administered 5.0 mg/kg/dose on Day 18 of the dosing phase and not dosed on Days 22 through 43 of the dosing phase; and animals resumed twice weekly dosing beginning on Day 46 of the dosing phase at a dose level of 3.0 mg/kg/dose.

表 2.6.7.7-5　反復投与毒性試験の動物組織におけるポリエチレングリコール空胞の検討

Test Article: BMN 165

Test System	Method of Administration	Duration, Administration Schedule (Number per Group)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study/Report Number
Rat/Crl:CD(SD) Monkey/Cynomolgus	SC	Rat: 17 or 26 weeks Monkey: 39 weeks (twice per week) [a]	Rat: 0, 1, 8, 25 Monkey: 0, 0.01, 0.1, 1, 3, 7/5/3 [b]	• The presence or absence of cytoplasmic vacuolation in ependymal and choroid plexus epithelial cells, as determined by the study pathologists and the reviewing pathologist, was consistent. • No cytoplasmic vacuolation in ependymal and choroid plexus epithelial cells was identified by either the study pathologist or the reviewing pathologist.	BMN165-13-047
Rat/Crl:CD(SD)	SC	17 or 26 weeks (twice per week) [c]	0, 25	• Selectivity, accuracy and precision of anti-PEG binding was not able to be confirmed in tissues. • Positive binding of anti-BMN 165 was present in renal tubular epithelium and in infiltrating or fixed phagocytes in adrenal gland, liver, mandibular lymph node, mesenteric lymph node, and spleen. • There was no positive staining by anti-BMN 165 in sections of brain, heart, lung, or skeletal muscle (thigh) samples from control (Group 1, BMN 165 0 mg/kg) or test article (Group 4, BMN 165 25 mg/kg) samples. • Cytoplasmic vacuolation/hypertrophy in H&E stained sections was present in renal tubular epithelium, and cytoplasmic vacuolation was present in infiltrating and fixed phagocytes in adrenal gland, liver, mandibular lymph node, mesenteric lymph node, and spleen, consistent with the anticipated clearance mechanisms of PEG or BMN 165.	BMN165-13-068

表 2.6.7.7-5 反復投与毒性試験の動物組織におけるポリエチレングリコール空胞の検討（続き）

Test Article: BMN 165

Test System	Method of Administration	Duration, Administration Schedule (Number per Group)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study/Report Number
Rat/Crl:CD(SD)	SC	4, 17, or 26 weeks (twice per week) [d]	0, 8	• Binding of anti-BMN 165 was present in blood vessels (circulating BMN 165) and some epithelial cells in the kidney of 10/20, 20/20, and 22/30 rats dosed with BMN 165 at 8 mg/kg for 4, 17, and 26 weeks, respectively. • Positive binding was also present in blood vessels and sinusoids in 2/2 liver samples (Weeks 17 and 26) and in follicular lymphocytes in 1/6 spleen samples (Week 4). There was no specific binding of anti-BMN 165 in adrenal, mesenteric lymph node or mandibular lymph node. • The positive binding observed in this study is consistent with clearance mechanisms of BMN 165. • Cytoplasmic vacuolation in renal tubular epithelium, evaluated in H&E sections of animals dosed with BMN 165 at 8 mg/kg was consistent with the diagnosis of test article related vacuolation/hypertrophy, tubule cell in BioMarin Study No. 0165-08-019. This vacuolation was least frequent at 17 weeks and most frequent at 26 weeks. Anti-BMN 165 did not bind to the cytoplasmic vacuoles in renal tubular epithelium. Similarly, vacuolated histiocytic cells, when present in sections of spleen, mandibular lymph node and mesenteric lymph node, did not bind anti-BMN 165.	BMN165-13-069

表 2.6.7.7-5 反復投与毒性試験の動物組織におけるポリエチレングリコール空胞の検討（続き）

Test Article: BMN 165

Test System	Method of Administration	Duration, Administration Schedule (Number per Group)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study/Report Number
Rat/Crl:CD(SD)	SC	17 or 26 weeks (twice per week) [e]	0, 8, 25	• Similar anti-PEG staining was present in the test samples (kidney, adrenal gland, liver, spleen, mesenteric lymph node, mandibular lymph node, and testis) at the 17-week or 26-week time points from Group 4 (25 mg/kg BMN 165) animals. • Although weaker and less frequent (compared with rats administered 25 mg/kg BMN 165) anti-PEG staining was present in test samples from Group 3 (8 mg/kg BMN 165) animals, and the staining was fairly similar between the 17-week or 26-week time points. • Cytoplasmic staining (anti-PEG) was noted occasionally in sinus histiocytes (lymph node) or renal tubular cells (only in rats administered 25 mg/kg at Study Week 17). • Overall, anti-PEG staining at both time points (in rats administered 8 or 25 mg/kg), was predominantly observed in the vascular compartment (plasma, lymph fluid and/or on endothelial cells) of the tissue samples, and the staining intensity reflected the dose administered to these rats.	0165-08-019

表 2.6.7.7-5 反復投与毒性試験の動物組織におけるポリエチレングリコール空胞の検討（続き）

a) Brain section slides from the 26-week chronic rat study (0165-08-019) and the 39-week chronic monkey study (0165-07-030) were peer reviewed. For rats, n = 10M+10F/group (17-week interim), n = 15M+15F/group (26-week terminal) or n = 5M+5F/group (12-week recovery; 0 and 25 mg/kg only). For monkeys, n = 5M+5F/group (39-week terminal; 0 and 7.0/5.0/3.0 mg/kg), n = 3M+3F/group (39-week terminal; 0.01, 0.1 and 1.0 mg/kg), n = 4M+4F/group (39-week terminal; 3.0 mg/kg) or n = 3M+3F/group (13-week recovery; 0, 3.0 and 7.0/5.0/3.0 mg/kg).
b) Animals were administered 7.0 mg/kg on Days 1, 4, and 8; were not dosed on Days 11 and 15; were administered 5.0 mg/kg on Day 18, were not dosed from Days 22 to 43, and resumed twice-weekly dose administration at 3.0 mg/kg on Day 46.
c) Formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples (adrenal gland, brain, heart, kidney, liver, lung, mandibular lymph node, mesenteric lymph node, skeletal thigh muscle, and spleen) from Groups 1 (0 mg/kg) and 4 (25 mg/kg) in Study 0165-08-019 at 17-week interim and 26-week main terminations were used; for each tissue, n = 2M+3F/group.
d) FFPE tissue samples from Groups 1 (G1, 0 mg/kg) and 3 (G3, 8 mg/kg) at 4-week termination in the sub-chronic rat study (0165-07-009) were used: adrenal gland [n = 1M (G1) or 1M (G3)], kidney [n = 3M+3F (G1) or 10M+10F (G3)], and spleen [n = 1M (G1) or 4M (G3)]. FFPE tissue samples from G1 (0 mg/kg) and G3 (8 mg/kg) at 17-week interim termination in the 26-week chronic rat study (0165-08-019) were used: kidney [n = 3M+3F (G1) or 10M+10F (G3)], liver [n = 1M (G1) or 1F (G3)], mandibular lymph node [n = 1M (G1) or 5F (G3)], mesenteric lymph node [n = 1M (G1) or 2F (G3)], and spleen [n = 1M (G1) or 1F (G3)]. FFPE tissue samples from G1 and G3 at 26-week main termination in 0165-08-019 were also used: kidney [n = 4M+4F (G1) or 15M+15F (G3)], liver [n = 1F (G1) or 1F (G3)], mandibular lymph node [n = 1F (G1) or 5F (G3)], mesenteric lymph node [n = 1F (G1) or 4F (G3)], and spleen [n = 1F (G1) or 1F (G3)].
e) FFPE tissue samples (adrenal gland, kidney, liver, mandibular lymph node, mesenteric lymph node, spleen, and testis) from Groups 1 (0 mg/kg), 3 (8 mg/kg), and 4 (25 mg/kg) in Study 0165-08-019 at 17-week interim and 26-week main terminations were used; for each tissue at each time point, n = 3M+3F/group (or 6M/group for testis). Injection sites from n = 4M/group (Groups 1 and 4) were used for negative and positive control purposes, respectively.

2.6.7.8　*In Vitro* 遺伝毒性試験

In vitro 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.9　*In Vivo* 遺伝毒性試験

In vivo 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.10　がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

重要な試験以外の生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験

Report Title: Fertility and Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rats
Test Article: BMN 165
Design similar to ICH 4.1.1/ICH 4.1.3? Yes
Duration of Dosing: M: 6 weeks prior to mating
F: 4 weeks prior to mating through Day 17 of gestation
Study No.: BMN165-12-037
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)
Day of Mating: Day 0
Location in CTD: 4.2.3.5.1-1
Initial Age: 69 to 74 days
Day of C-Section: Day 21 of gestation
GLP Compliance: GLP [a]
Date of First Dose: 06 Nov 2012
Method of Administration: Subcutaneous Injection
Vehicle/Formulation: BMN 165 Placebo (10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L Ammonia), pH 7.0 ± 0.5
Special Features: Measurement of phenylalanine levels, anti-drug antibodies and clinical pathology
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Males: Gen Tox 8 mg/kg/day, F_0 Females: Gen Tox 8 mg/kg/day, F_0 Generation: Reproductive Tox 20 mg/kg/day, F_1 Litters: Developmental Tox 2 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		0 (Control Article)	2	8	20
Males	Mean Exposure (ng/mL)				
	DS 1	0.0	0.0	0.0	0.0
	DS 8	0.0	1480	1260	40,967
	DS 15	0.0	0.0	0.0	43,200
	DS 22	0.0	0.0	1008	122,467
	DS 29	0.0	0.0	2533	100,700
	DS 43	0.0	0.0	29,833	179,000
	DS 64	0.0	153	27,067	217,667
	DS 79	0.0	3162	20,400	266,667

DS: Day of study.

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

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-12-037 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control Article)**	**2**	**8**	**20**
Males:	Mean Exposure (ng/mL) (cont'd)				
	Mean Phenylalanine (µmol/L)				
	DS 1	68.7	67.0	71.4	72.2
	DS 8	70.7	69.1	46.9	30.3
	DS 15	64.3	67.2	53.2	12.9
	DS 22	73.2	72.1	59.7	0.517
	DS 29	74.0	69.3	54.4	2.94
	DS 43	62.4	68.6	7.76	0.0
	DS 64	78.5	77.7	30.5	0.0
	DS 79	67.2	54.6	15.6	0.0
	No. with anti-drug antibodies at end of dosing (DS 78 to 82)	NA	13	5	4
	No. Evaluated (Number of TK rats)	25 + (3)	25 + (3)	25 + (3)	25 + (3)
	No. Died or Euthanized Moribund	1	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight (%) [a]	480.4 g	99.7	99.5	94.2*
	Food Consumption (%) [b]	28.6 g/day	99.7	96.5	89.2**
	Clinical Pathology	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	2.7	2.4	2.7	2.6
	No. of Males that Mated	24	24 [c]	25	25
	No. of Fertile Males (%)	23 (95.8)	24 (100)	23 (92.0)	23 (92.0)
	Reproductive Organ Weights	-	-	-	-
	Sperm Motility and Count	-	-	-	-

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

-: No noteworthy findings; DS: Day of Study; NA: Not applicable.
Dunnett's Test: * = p ≤ 0.05, ** = p ≤0.01, Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a) After 6 weeks of dosing.
b) After 10 weeks of dosing.
c) Excludes one male that had no female to mate with.
For controls, group means are shown. For treated groups, percent of control values are shown.

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-12-037 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control Article)**	**2**	**8**	**20**
Females:	Mean Exposure (ng/mL)				
	DS 1	0.0	0.0	0.0	0.0
	DS 8	0.0	6267	44,967	135,633
	DS 15	0.0	6967	6455	156,500
	DS 22	0.0	7367	53,100	302,667
	DS 29/DG 0	0.0	5961	83,533	322,667
	DG 12	0.0	9280	69,567	349,333
	DG 21	0.0	7397	57,800	395,667
	DG 21 Fetuses	0.0	0.0	0.0	202
	Mean Phenylalanine (µmol/L)				
	DS 1	66.8	67.4	64.4	67.3
	DS 8	63.1	49.1	14.7	1.70
	DS 15	72.9	56.3	30.5	0.0
	DS 22	67.0	43.0	11.0	0.0
	DS 29/DG 0	59.8	40.2	1.05	0.0
	DG12	59.6	34.8	4.88	0.0
	DG 21	47.2	29.4	10.8	0.350
	No. with anti-drug antibodies at end of dosing (DG 21)	NA	10	0	0

DS: Day of Study; DG: Day of Gestation; NA: Not applicable.

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-12-037 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		0 (Control Article)	2	8	20
Females:	(cont'd)				
	No. Evaluated (Number of TK rats)	25 + (3)	25 + (3)	25 + (3)	25 + (3)
	No. Died or Euthanized Moribund	0	1	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight (%) [a]	270.8 g	100.4	99.6	93.5**
	Gestation Body Weight (%) [a]	451.4 g	100.4	98.4	85.3**
	Premating Food Consumption (%) [a]	18.6 g/day	101.1	100.5	91.4**
	Gestation Food Consumption (%) [a]	25.2 g/day	104.8	98.0	89.3**
	Clinical Pathology	-	-	-	-
	Mean No. Estrous Cycles/14 days	3.4	3.1	3.4	3.3
	Mean No. Days Prior to Mating	2.6	2.4	2.7	2.6
	No. of Females Sperm Positive	25	24	25	25
	No. of Pregnant Females (%)	24 (96.0)	24 (100)	23 (92.0)	23 (92.0)
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
	Mean No. Corpora Lutea	16.3	15.7	15.0*	14.4**
	Mean No. Implantations	15.8	14.4	14.3*	13.6**
	Mean % Preimplantation Loss	3.4	7.9	4.1	5.8
	Mean No. Live Conceptuses	14.8	13.6	13.3	12.8*
	Mean No. Resorptions	1.0	0.9	1.0	0.8
	No. Dead Conceptuses	0	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	6.1	5.8	6.6	5.4

-: No noteworthy findings.
Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a) At end of premating or gestation period.
For controls, group means are shown. For treated groups, percent of control values are shown.

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-12-037 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		0 (Control Article)	2	8	20
Litters:	Mean Fetal Body Weight (g)	5.57	5.75	5.79	5.09**
	Fetal Sex Ratios (% males)	46.7	49.6	51.5	54.1
	Fetal Anomalies:				
	Gross External	-	-	-	-
	Visceral Anomalies	-	-	-	-
	Skeletal Anomalies				
	Nasal-Frontal Suture Large				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (42.8)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (15.1)##
	Nasals Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (9.5)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.4)
	Frontals Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (4.2)	0 (0.0)	9 (42.8)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	22 (15.8)##
	Squamosal Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (4.2)	1 (4.3)	8 (38.1)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	1 (0.6)	14 (10.1)##
	Parietal Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (4.2)	0 (0.0)	3 (14.3)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	3 (2.2)
	Lumbar Vertebral Arch - Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (9.5)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.2)##

-: No noteworthy findings.
Dunnett's Test: ** = $p \leq 0.01$ Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.12-1　BMN 165 のラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-12-037 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control Article)**	**2**	**8**	**20**
Litters:	(cont'd)				
	Sacral Vertebral Arch - Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (9.5)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.4)
	Ribs Wavy				
	No. Litters (%)	1 (4.2)	2 (8.3)	0 (0.0)	3 (14.3)
	No. Fetuses (%)	1(0.5)	2 (1.2)	0 (0.0)	4 (2.9)
	Ribs Short				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (13.0)	2 (9.5)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.9)	2 (1.4)
	Ribs Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	3 (12.5)	2 (8.7)	6 (28.6)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	4 (2.4)#	2 (1.2)	7 (5.0)##
	Ischium and/or Pubis Incompletely Ossified				
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (33.3)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (6.4)##
	Percent Fetuses/Litter with Any Alteration	0.8	2.7	4.4*	13.0**
	Mean Sternal Centers/Fetus/Litter	4.00	4.00	4.00	3.97**

Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
Fisher's Exact Test: # = $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13-1 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験

Report Title: A Dose Range-finding Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG by Subcutaneous Injection in Rabbits
Test Article: BMN 165
Design similar to ICH 4.1.3? Yes
Duration of Dosing: DGs 7-20 (Groups 1, 2, 5, and 8), DGs 7-14 (Group 3), DGs 11-16 (Groups 6 and 9), DGs 13-20 (Group 4) or DGs 15-20 (Groups 7 and 10)
Study No.: BMN165-11-027
Species/Strain: Rabbit/[Hra:(NZW)SPF]
Initial Age: 6-7.5 months
Date of First Dose: 27 Apr 2011
Day of Mating: DG 0
Location in CTD: 4.2.3.5.2-1
Day of C-Section: DG 29
GLP Compliance: Yes (Parts A and C)
Method of Administration: Subcutaneous Injection
Vehicle/Formulation: BMN 165 Placebo (10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L Ammonia), pH 7.1 ± 0.1
Special Features: Study was conducted in 3 parts: A, B and C
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 2 mg/kg/day, F_1 Litters: 2 mg/kg/day

		Part A				Part C		
Dose Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**8**	**9**	**10**
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2**	**2**	**2**	**5**	**5**	**5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-20**	**7-14**	**13-20**	**7-20**	**11-16**	**15-20**
Does:	Mean AUC (0-24 hrs, 1st day of dosing)	N/A	246,499	255,153	236,841	667,767	635,113	583,740
	No. Examined	10	10	10	10	10	10	10
	No. Pregnant	9	9	10	8	9	7	9
	No. Delivered	0	0	0	1	0	0	0
	No. Aborted	0	0	0	0	0	1	0
	Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-
	Body Weight (DG 29) (%) [a]	3.92 kg	100.5	97.4	97.2	89.5	92.1	95.2
	Food Consumption (DGs 7-29) (%) [a]	134.8 g	102.9	95.5	94.1	63.6	91.1	104.1
	Water Consumption (DGs 7-29) (%) [a]	279.2 g	84.9	86.7	93.0	56.5	71.8	91.4

表 2.6.7.13-1 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験（続き）

Test Article: BMN 165

		Part A				Part C		
Dose Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**8**	**9**	**10**
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2**	**2**	**2**	**5**	**5**	**5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-20**	**7-14**	**13-20**	**7-20**	**11-16**	**15-20**
Does:	Mean No. Corpora Lutea	9.8	9.2	10.2	9.4	8.6	9.0	10.1
	Mean No. Implantations	8.8	8.0	9.3	8.7	8.0	7.7	8.3
	Mean % Preimplantation Loss	10.6	13.7	8.8	6.7	6.2	13.8	17.6

Note: Administration of the 20 mg/kg/day dose of BMN 165 (Part B) caused severe maternal toxicity that resulted in the early termination of the groups assigned to this dose level. Therefore, the results described in CTD summarize the results of the 2 and 5 mg/kg/day dose groups only.

N/A: Not Applicable.

-: No noteworthy findings, DG: Day of presumed gestation.

a) At end of gestation. For controls, group means are shown. For treated groups, percent of Group 1 values are shown.

表 2.6.7.13-1　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**8**	**9**	**10**
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2**	**2**	**2**	**5**	**5**	**5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-20**	**7-14**	**13-20**	**7-20**	**11-16**	**15-20**
Litters:	No. Litters Evaluated	9	9	10	7	9	6	9
	Mean No. Live Fetuses	8.6	7.7	9.0	8.4	6.8	7.0	8.2
	Mean No. Resorptions	0.2	0.3	0.3	0.3	1.2	0.7	0.1
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	2.2	5.3	3.4	2.6	12.8	6.7	1.2
	Mean Fetal Body Weight (g)	43.40	44.22	39.98	39.58	29.46	33.25	32.30
	Fetal Sex Ratios (% males)	44.1	53.7	51.4	53.0	47.2	43.1	41.8
	Fetal Anomalies:							
	Gross External							
	Body: Edema							
	No. Litters (%)	1 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	1 (16.7)	1 (11.1)
	No. Fetuses (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.6)	3 (7.1)	1 (1.4)
	Fore and/or Hindlimb(s): Flexed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	1 (16.7)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.6)	1 (2.4)	0 (0.0)
	Snout: Short							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (14.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Palate: Cleft							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (44.4)	2 (33.3)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (27.9)	15 (35.7)	0 (0.0)
	Jaw: Micrognathia							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	1 (16.7)	1 (11.1)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (11.5)	5 (11.9)	1 (1.4)

表 2.6.7.13-1　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**8**	**9**	**10**
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2**	**2**	**2**	**5**	**5**	**5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-20**	**7-14**	**13-20**	**7-20**	**11-16**	**15-20**
Litters:	No. Litters Evaluated	9	9	10	7	9	6	9
	Fetal Anomalies (cont'd):							
	Gross External							
	Eye: Lid(s) Open							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (44.4)	3 (50.0)	2 (22.2)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (41.0)	18 (42.8)	5 (6.8)
	Eye: Enlarged							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (33.3)	1 (16.7)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (4.9)	1 (2.4)	0 (0.0)
	Ears: Low Set							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	1 (16.7)	6 (66.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (14.8)	8 (19.0)	33 (44.6)
	Ears: Rotated							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (33.3)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (5.4)
	Head: Domed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (44.4)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	18 (24.3)
	Head: Exencephaly							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (14.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Head: Meningocele							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	2 (33.3)	1 (11.1)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (9.8)	14 (33.3)	1 (1.4)

表 2.6.7.13-1 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与用量設定試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**8**	**9**	**10**
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2**	**2**	**2**	**5**	**5**	**5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-20**	**7-14**	**13-20**	**7-20**	**11-16**	**15-20**
Litters:	No. Litters Evaluated	9	9	10	7	9	6	9
	Fetal Anomalies (cont'd):							
	Gross External							
	Fore and/or Hindlimb(s): Rotated							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (44.4)	1 (16.7)	1 (11.1)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (16.4)	3 (7.1)	1 (1.4)
	Fore and/or Hindlimb(s): Short							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	1 (16.7)	1 (11.1)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (14.8)	5 (11.9)	2 (2.7)
	Digits: Splayed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (8.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Digits: Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験

Report Title: Embryo-fetal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rabbits
Design similar to ICH 4.1.3? Yes
Species/Strain: Rabbit/[Hra:(NZW)SPF]
Initial Age: 6-7 months
Date of First Dose: 04 Nov 2012
Duration of Dosing: DGs 7-10 (Groups 3 and 6), DGs 7-20 (Group 1), DGs 7-12 (Groups 2 and 5), DGs 7-14 (Groups 4 and 7), DGs 11-16 (Groups 3 and 6), DGs 13-20 (Groups 2 and 5), DGs 15-20 (Groups 4 and 7) or DGs17-20 (Groups 3 and 6)
Day of Mating: Day 0
Day of C-Section: DG 29
Method of Administration: Subcutaneous Injection
Vehicle/Formulation: BMN 165 Placebo (10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L Ammonia), pH 7.0 ± 0.5
Test Article: BMN 165
Study No.: BMN165-12-036
Location in CTD: 4.2.3.5.2-2
GLP Compliance: GLP [a]

Special Features: Measurement of phenylalanine levels, anti-drug antibodies, clinical pathology and bioanalysis
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: < 2 mg/kg/day, F_1 Litters: < 2 mg/kg/day

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

Dose Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2/0**	**0/2**	**0/2**	**5/0**	**0/5**	**0/5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**
Does:	No. Examined	20	20	20	20	20	20	20
	No. Pregnant	20	20	19	20	20	20	18
	No. Delivered	0	0	0	0	0	0	1
	No. Aborted	0	1	0	0	1	1	2
	Clinical Observations							
	Scant Feces	2	3	10#	5	18##	16##	15##
	Thin Body Condition	1	1	1	0	6##	12##	7##
	Sparse Hair Coat: Head/Neck	0	0	0	0	4##	2	2
	Dehydration - Mild	1	1	0	0	6##	4	5##
	Dehydration - Moderate	0	1	0	0	3	3##	2

DG: Day of presumed gestation. Fisher's Exact Test: # = $p \leq 0.05$, ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2/0**	**0/2**	**0/2**	**5/0**	**0/5**	**0/5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**
Does:	Clinical Observations (cont'd)							
	Yellow, Green and/or Brown Perioral Substance	0	0	0	0	8##	0	0
	Yellow and/or Brown Perioral Substance	0	0	0	0	0	0	3##
	Yellow Perioral Substance	0	0	0	0	0	6##	0
	Yellow and/or Brown Perinasal Substance	0	0	0	0	8##	10##	3##
	Excess Salivation	0	0	0	0	8##	7##	3##
	Neck, Perioral, Mouse, Face, Chin, Both Forelimbs and/or Forepaws: Yellow and/or Brown Fur	0	0	0	0	6##	0	0
	Urine Staining	0	0	0	0	6##	4##	0
	Reduced Feces	1	0	5##	0	2	5##	3
	No Feces in Cage Pan	0	1	0	0	5##	0	0
	Neck, Chin, Eye Lids, Under Mouth, Periorbital membranes and/or Underside of neck: Red and/or Dark Pink	0	0	0	0	4##	0	0
	Red and/or Brown Substance on Perivaginal, Facial and/or Genital Area Fur	0	1	0	0	0	3##	1
	Face, Neck, Mouth, Nose and/or Head: Yellow Fur	0	0	0	0	0	0	5##

DG: Day of presumed gestation. Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2/0**	**0/2**	**0/2**	**5/0**	**0/5**	**0/5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**
Does:	Clinical Observations (cont'd)							
	Ptosis	0	0	0	0	3##	1	0
	Ungroomed Coat	3	5	2	3	9	9##	6
	Injection Site (s): Purple and/or Red	11	10	7	4##	9	11	4##
	Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-
	Body Weight (DG 29) (%) [a]	3.75 kg	106.4	103.5	102.1	102.1	97.9	98.1
	Food Consumption (DGs 7-29) (%) [a]	146.2 g/day	89.5	87.5*	95.7	71.3**	75.2**	77.2**
	Relative Food Consumption (DGs 7-29) (%) [a]	40.9 g/kg/day	82.9**	83.1**	92.7	68.5**	74.3**	79.5**
	Mean No. Corpora Lutea	9.4	10.0	9.6	9.0	9.8	9.4	9.9
	Mean No. Implantations	9.0	9.3	8.9	8.5	9.4	8.9	9.5
	Mean % Preimplantation Loss	3.4	7.5	6.3	5.9	4.0	4.9	3.5

-: No noteworthy findings; DG: Day of presumed gestation.
Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$. Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.
a) At end of gestation. For controls, group means are shown. For treated groups, percent of Group 1 values are shown.

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		**0**	**2/0**	**0/2**	**0/2**	**5/0**	**0/5**	**0/5**
Dose Period (DGs)		**7-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**
Litters:	No. Litters Evaluated	20	19	19	20	19	19	18
	Mean No. Live Fetuses	8.8	9.1	8.5	8.2	8.0	8.4	9.3
	Mean No. Resorptions	0.2	0.2	0.4	0.4	1.3**	0.5	0.3
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0	0	1	0
	Mean % Postimplantation Loss	2.2	7.5	4.8	4.7	14.5	6.2	2.4
	Mean Fetal Body Weight (g)	43.65	43.00	40.37	40.90	28.98**	26.86**	28.22**
	Fetal Sex Ratios (% males)	50.7	51.8	55.9	44.8	45.4	36.0**	51.1
	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Body: Edema							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (26.3)##	10 (52.6)##	13 (86.7)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.9)##	21 (13.2)##	102 (73.4)##
	Fore and/or Hindlimb(s): Flexed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (63.2)##	2 (10.5)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (15.7)##	2 (1.2)	0 (0.0)
	Snout: Short							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (42.1)##	12 (63.2)##	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (24.2)##	65 (40.9)##	0 (0.0)
	Palate: Cleft							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.5)	0 (0.0)	17 (89.5)##	18 (94.7)##	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.7)	0 (0.0)	54 (35.3)##	117 (73.6)##	3 (2.2)##

DG: Day of presumed gestation.
Dunnett's Test: ** = $p \leq 0.01$. Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Jaw: Micrognathia							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	8 (42.1)##	11 (57.9)##	6 (40.0)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	38 (24.8)##	59 (37.1)##	21 (15.1)##
	Eye: Lid(s) Open							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (15.8)	0 (0.0)	14 (73.7)##	19 (100.0)##	6 (40.0)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.7)	0 (0.0)	86 (56.2)##	147 (92.4)##	11 (7.9)##
	Eyes: Discolored							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (63.2)##	0 (0.0)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	31 (20.3)##	0 (0.0)	1 (0.7)
	Abdominal Cavity: Fluid-Filled							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Brain: Ventricle Dilation							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Eyes: Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)

DG: Day of presumed gestation.
Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Eye: Bulge Depressed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (31.6)##	1 (5.3)	5 (33.3)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (7.2)##	2 (1.2)	12 (8.6)##
	Eyes: Corneal Opacity							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (93.3)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	110 (79.1)##
	Eyes: Small							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	9 (47.4)##	1 (5.3)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	20 (13.1)##	2 (1.2)	1 (0.7)
	Ears: Low Set							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (3.3)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Ears: Rotated							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (5.3)	1 (5.3)	0 (0.0)	14 (73.7)##	13 (68.4)##	12 (80.0)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	1 (0.6)	0 (0.0)	72 (47.0)##	42 (26.4)##	68 (48.9)##
	Head: Domed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	5 (26.3)##	11 (73.3)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	13 (8.2)##	76 (54.7)##
	Head: Firm Raised Area							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	8 (42.1)##	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.0)##	41 (25.8)##	0 (0.0)

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Head: Meningocele							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.5)	1 (5.3)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)	1 (0.6)	0 (0.0)
	Heart: Atria Large							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Heart: Semilunar Valves Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Fore and/or Hindlimb(s): Rotated							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	13 (68.4)##	9 (47.4)##	12 (80.0)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	74 (48.4)##	33 (20.8)##	43 (30.9)##
	Fore and/or Hindlimb(s): Short							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (31.6)##	8 (42.1)##	2 (13.3)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (16.3)##	16 (10.1)##	7 (5.0)##
	Digits: Short							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (26.3)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (5.2)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Digits: Splayed							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (31.6)##	1 (5.3)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (4.6)##	1 (0.6)	0 (0.0)

DG: Day of presumed gestation. Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2 BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Digits: Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (63.2)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	27 (17.6)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Digits: Fused							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (63.2)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	54 (35.3)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Digits: Constricted							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (21.0)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.6)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Bladder: Distended							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Body: Abdominal Distention							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (5.3)	1 (5.3)	1 (5.0)	3 (15.8)	0 (0.0)	2 (13.3)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.6)	3 (2.0)	0 (0.0)	2 (1.4)
	Body: Accentuated Fat Pads							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (21.0)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (5.9)##	0 (0.0)	0 (0.0)

DG: Day of presumed gestation.
Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Body: Thin Skin							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	6 (31.6)##	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)	13 (8.2)##	6 (4.3)##
	Body: Umbilical Hernia							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Diaphragm: Hernia							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (21.0)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (4.6)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Gallbladder: Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Liver: Protrudes Through Umbilicus							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Lungs: Intermediate Lobe Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Lungs: Small							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (15.8)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.0)##	0 (0.0)	0 (0.0)

DG: Day of presumed gestation. Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Kidneys: Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (31.6)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.9)##	0 (0.0)	0 (0.0)
	Kidneys: Low Set							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (36.8)##	0 (0.0)	2 (13.3)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (5.2)##	0 (0.0)	2 (1.4)
	Kidneys: Small							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (73.7)##	0 (0.0)	2 (13.3)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	50 (32.7)##	0 (0.0)	2 (1.4)
	Kidneys: Fused							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Tongue: Protrudes							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	5 (26.3)##	10 (52.6)##	6 (40.0)##
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	10 (6.5)##	55 (34.6)##	21 (15.1)##
	Vessels: Aorta Passes Dorsal to the Trachea and Esophagus							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)

DG: Day of presumed gestation.
Fisher's Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group		1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)		0	2/0	0/2	0/2	5/0	0/5	0/5
Dose Period (DGs)		7-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20	7-12/13-20	7-10, 17-20/ 11-16	7-14/15-20
Litters (cont'd):	Fetal Anomalies:							
	Gross External / Visceral							
	Vessels: Arise in Incorrect Order							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Vessels: Distended Aorta							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Vessels: Innominate Artery Absent							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	1 (6.7)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)	0 (0.0)	1 (0.7)
	Vessels: Right Subclavian Arises to the Left of the Left Subclavian							
	No. Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	No. Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)

DG: Day of presumed gestation.

表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group	1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)	**0**	**2/0**	**0/2**	**0/2**	**5/0**	**0/5**	**0/5**
Dose Period (DGs)	**7-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**
Plasma BMN 165, ng/mL, Doe (DG 7-20):							
DG 8 Sampling Time Point 0 hr	BLOQ						
DG 14 Sampling Time Point 0 hr	BLOQ						
DG 16 Sampling Time Point 0 hr	BLOQ						
DG 21 Sampling Time Point 24 hr	BLOQ						
Plasma BMN 165, ng/mL, Fetus, (DG 21):	BLOQ						
Plasma BMN 165, ng/mL, Doe, (DG 7-12):							
DG 8 Sampling Time Point 0 hr		23,567±379			60,350±19,021		
DG 10 Sampling Time Point 0 hr		Not Sampled			99,050±138,522		
DG 13 Sampling Time Point 24 hr		94,100±94,611			438,667±127,222		
Plasma BMN 165, ng/mL, Fetus, (DG 19):		279±123			1160±570		
Plasma BMN 165, ng/mL, Doe, (DG 11-16):							
DG 12 Sampling Time Point 0 hr			8060±10,949			1450±257	
DG 14 Sampling Time Point 0 hr			117,767±26,404			200,667±46,458	
DG 17 Sampling Time Point 24 hr			51,067±32,853			300,333±84,311	
Plasma BMN 165, ng/mL, Fetus, (DG 19):			317±28			1240±190	
Plasma BMN 165, ng/mL, Doe, (DG 15-20):							
DG 16 Sampling Time Point 0 hr				20,267±1701			53,767±3456
DG 18 Sampling Time Point 0 hr				96,267±30,027			239,000±36,000

DG: Day of presumed gestation; BLOQ: Below level of quantitation.

表 2.6.7.13-2　BMN 165 のウサギにおける胚・胎児発生に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Dose Group	1	2	3	4	5	6	7
Dose Level (mg/kg)	**0**	**2/0**	**0/2**	**0/2**	**5/0**	**0/5**	**0/5**
Dose Period (DGs)	**7-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**	**7-12/13-20**	**7-10, 17-20/ 11-16**	**7-14/15-20**
Plasma BMN 165, ng/mL, Fetus, (DG 21):				576±51			567±369
Plasma Phenylalanine, µmol/L, Doe (DG 7-20):							
DG 8 Sampling Time Point 0 hr	48.0±2.3						
DG 14 Sampling Time Point 0 hr	52.1±4.0						
DG 16Sampling Time Point 0 hr	51.8±2.1						
Plasma Phenylalanine, µmol/L, Fetus, (DG 21, 24 hr):	58.2±4.1						
Plasma Phenylalanine, µmol/L, Doe, (DG 7-12):							
DG 8 Sampling Time Point 0 hr		9.23±8.25			1.41±1.99		
DG 10 Sampling Time Point 0 hr		Not Sampled			0.00±0.00		
DG 13 Sampling Time Point 24 hr		3.93±5.56			0.00±0.00		
Plasma Phenylalanine, µmol/L, Doe, (DG 11-16):							
DG 12 Sampling Time Point 0 hr			0.00±0.00			0.00±0.00	
DG 14 Sampling Time Point 0 hr			0.347±0.600			0.00±0.00	
DG 17 Sampling Time Point 24 hr			7.93±10.90			0.00±0.00	
Plasma Phenylalanine, µmol/L, Doe, (DG 15-20):							
DG 16 Sampling Time Point 0 hr				19.5±4.9			5.01±0.33
DG 18 Sampling Time Point 0 hr				0.00±0.00			0.00±0.00
DG 21 Sampling Time Point 24 hr				3.43±5.95			0.00±0.00

DG: Day of presumed gestation.

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験

Report Title: Developmental and Peri-/Post-natal Reproduction Study of Subcutaneous rAvPAL-PEG in Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation

Test Article: BMN 165; generated using PEGylation Process D

Design similar to ICH 4.1.2? Yes

Duration of Dosing: beginning 28 days before cohabitation, during cohabitation and continued through to the day before euthanasia.

Study No.: BMN165-14-013

Species/Strain: Rat/ Crl:CD(SD)

Day of Mating: Day 0

Location in CTD: 4.2.3.5.3-1

Initial Age: 66 days of age at arrival

Method of Administration: Subcutaneous Injection

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: 16 Jun 2014

Vehicle/Formulation: BMN 165 Placebo (10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L Ammonia), pH 7.0 ± 0.5 (Aqueous solution)

Litters Culled: Not Culled

Special Features: Dosing starts 28 days prior to cohabitation to ensure sufficient blood levels during gestation and lactation

No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 8 mg/kg/day, F_1 Males: 8 mg/kg/day, F_1 Females: 8 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**2**	**8**	**20**
F_0 Females:	Toxicokinetics: AUC	NC	NC	NC	NC
	No. Pregnant	24	24	24	25
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
	No. Aborted or with Total Res. of Litter	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight (%) [a]	279.8 g	99.4	99.1	94,6*
	Gestation Body Weight (%) [a]	435.1 g	97.9	97.4	89.1**
	Lactation Body Weight (%) [a]	353.1 g	101.9	102.5	102.6
	Premating Food Consumption (%) [a]	18.8 g	96.8	96,8	92.6**
	Gestation Food Consumption (%) [a]	25.4 g	94.5	94.5*	87.4**
	Lactation Food Consumption (%) [a]	55.8 g	96.2	97.1	88.9**
	Mean Duration of Gestation (days)	22.5	22.9**	22.5	22.6
	Abnormal Parturition	-	-	-	-

表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験（続き）

-: No noteworthy findings; NC: Not calculated.
Dunnett's Test: * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$.
a) At end of gestation or lactation. For controls, group means are shown. For treated groups, percent of control values are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-14-013 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**2**	**8**	**20**
F_1 Litters: (Preweaning)	No. Litters Evaluated	24	24	24	25
	Mean No. of Implantations	15.6	16.0	15.8	14.9
	Mean No. Pups/Litter	15.0	15.0	14.9	13.8
	Mean No. Liveborn Pups/Litter	14.8	14.8	14.8	13.7
	Mean No. of Litters with Stillborn Pups/Litter	0.2	0.2	0.1	0.1
	Postnatal Survival to Day 4	98.0	97.4	96.6	82.8##
	Postnatal Survival to Weaning	98.8	99.1	100	89.8##
	No. of Total Litters Losses	0	0	0	3##
	Change in Pup Body Weights (g) [a]	34.5	33.7	32.8	30.2**
	Pup Sex Ratios (% males)	49.0	51.8	48.7	53.8
	Pup Clinical Signs	-	-	-	-
	Pup Necropsy Observations	-	-	-	-

-: No noteworthy findings.
Dunnett's Test: ** = $p \leq 0.01$. Fisher Exact Test: ## = $p \leq 0.01$.
a) From birth to weaning.

表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-14-013 (Continued)					
Daily Dose (maternal dose mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**2**	**8**	**20**
F_1 Males: (Postweaning)	No. Evaluated Postweaning	25	25	25	25
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight Change (g) [a]	464.6	466.0	459.8	445.2
	Food Consumption (%) [b]	25.0 g	100.4	98.4	96.0
	Preputial Separation	45.1	45.1	45.3	47.6**
	Motor Activity (passive voidance/water maze)	-	-	-	-
	Learning and Memory (passive voidance/water maze)	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	2.4	2.8	2.9	3.1
	No. of Males that Mated	24	25	25	24
	No. of Fertile Males	22	25	24	23

-: No noteworthy findings.
Dunnett's Test: ** = $p \leq 0.01$.
Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a) From weaning to mating.
b) At the end of postweaning period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent of control values are shown.

表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-14-013 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**2**	**8**	**20**
F_1 Females: (Postweaning)	Toxicokinetics: AUC	NC	NC	NC	NC
	No. Evaluated	25	25	25	25
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight Change (g) [a]	232.1	251.6	244.2	249.7
	Gestation Body Weight Change (g) [a]	174.8	190.8	183.1	178.0
	Premating Food Consumption (%) [b]	17.5 g	104.6	101.1	103.4
	Gestation Food Consumption (%) [b]	25.2 g	105.2	102.4	107.1
	Mean Age of Vaginal Patency (days)	33.8	33.8	34.3	35.6
	Motor Activity (passive avoidance/water maze)	-	-	-	-
	Learning and Memory (passive avoidance/water maze)	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	2.5	2.8	2.9	3.2
	No. of Females Sperm Positive	25	25	25	25
	No. of Pregnant Females	23	25	24	24
	Mean No. Corpora Lutea	16.6	17.2	16.3	15.7
	Mean No. Implantations	16.0	16.4	15.6	14.9
	Mean % Preimplantation Loss	3.4	5.2	4.7	4.9

-: No noteworthy findings; NC: Not calculated.
Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a) From birth to mating.
b) At the end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent of control values are shown.

表 2.6.7.14-1　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生並びに行動／機能評価に関する皮下投与試験（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-14-013 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**2**	**8**	**20**
F_2 Litters:	Mean No. Live Conceptuses/Litter	15.4	16.1	15.0	14.3
	Mean No. Resorptions	0.6	0.3	0.6	0.6
	No. of Litters with Dead Conceptuses	0	0	1	0
	No. Dead Conceptuses	0	0	1	0
	Mean % Postimplantation Loss	3.6	1.9	3.8	3.9
	Fetal Body Weights (g)	5.32	5.40	5.48	5.61**
	Fetal Sex Ratios (% males)	47.8	48.8	52.8	54.2
	Fetal Anomalies				
	One fetus - snout misshaped, small oral opening and eye bulge depressed	0	0	1	0
	Thread like tail	0	1	0	1

Dunnett's Test: ** = $p \leq 0.01$.

表 2.6.7.14-2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 － F_1 世代の追加生後発生評価

Report Title: A Peri-/Post-natal Development Study of rAvPAL-PEG Administered by Subcutaneous Injection in Rats with Additional Developmental Assessments in F1 Generation

Test Article: BMN 165

Design similar to ICH 4.1.2? Yes

Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)

Initial Age: 62 Days

Date of First Dose: 22 Apr 2019

Duration of Dosing: 28 days prior to cohabitation through Day 21 Postpartum

Day of Mating: DG 0

Litters Culled: Not Culled

Method of Administration: Subcutaneous Injection

Vehicle/Formulation: BMN 165 Placebo (10 mmol/L TRIS, 135 mmol/L Sodium Chloride, 1 mmol/L *trans*-cinnamic acid, 1 mmol/L Ammonia), pH 7.0 ± 0.5

Study No.: BMN165-18-080

Location in CTD: 4.2.3.5.3-2

GLP Compliance: Yes

Special Features: Additional Developmental Assessments, Plasma Concentration, Antibody Evaluation

No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 8 mg/kg/day, F_1 Generation (Males and Females): 8 mg/kg/day

Dose Level (mg/kg/day)		**0 (Control)**	**2**	**8**	**20**
F_0 Females:	**Phenylalanine (Phe) (µmol/L)**				
	DS 1	68.8 ± 2.1	62.0 ± 8.1	63.2 ± 6.3	62.2 ± 2.0
	DS 8	63.0 ±1.9	58.8 ± 7.8	59.0 ± 10.1	14.3 ± 23.2
	DS 15	42.1 ±0.8	56.3 ± 9.5	37.1 ± 16.7	7.22 ± 5.33
	DS 22	62.9 ± 1.1	60.0 ± 4.4	14.1 ± 19.1	0.00 ± 0.00
	DS 29/DG 0	71.2 ± 8.7	57.3 ± 4.7	0.00 ±0.00	0.00 ± 0.00
	DG 7	71.3 ± 7.1	59.1 ±13.9	1.34 ± 0.27	0.00 ± 0.00
	DG 14	64.3 ± 5.6	52.5 ± 14.7	0.377 ± 0.652	0.00 ± 0.00
	DL 1	56.3 ± 2.8	31.1 ± 10.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	DL 7	73.9 ± 14.2	36.9 ± 31.7	0.807 ± 1.397	0.00 ± 0.00
	DL 14	67.7 ± 12.1	41.8 ± 17.8	3.26 ± 1.17	0.00 ± 0.00
F_1 Litters: Preweaning	**Phenylalanine (Phe) (µmol/L)**				
	PND 14	95.9 ± 16.6	90.0 ± 10.2	84.8 ± 13.0	66.8 ± 9.8

DS: Day of Study (Premating); DG: Day of Gestation; DL: Day of Lactation; PND: Postnatal Day.

表 2.6.7.14-2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 ー F_1 世代の追加生後発生評価（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-18-08 (Continued)					
Dose Level (mg/kg/day)		**0 (Control)**	**2**	**8**	**20**
F_0 Females: (Continued)	No. Pregnant	21	20	20	21
	No. Died or Sacrificed Moribund [a]	0	0	1	3
	No. Aborted with Total Res. of Litter	0	0	0	0
	Mean No. Days Prior to Mating	2.7	3.0	2.4	3.1
	No. of Females Sperm Positive	22	22	22	22
	Clinical Observations [b]				
	Piloerection	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
	Dehydration	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (1)
	Hunched Posture	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2)
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight DS 28 (%) [c]	287.5 g	-1.18	-2.54	-4.70
	Gestation Body Weight DG 21 (%) [c]	472.8 g	-0.53	-2.33	-10.96**
	Lactation Body Weight DL 21 (%) [c]	366.6 g	+1.80	+2.65	+2.32
	Premating Food Consumption DS 1-28 (%) [c]	48.2 g/day	0.00	-10.79	-9.96
	Gestation Food Consumption DG 0-21(%) [c]	30.4 g/day	-7.57*	-6.91*	-11.51**
	Lactation Food Consumption DL 1-14 (%) [c]	68.1 g/day	-0.44	+1.76	-6.17
	Mean Duration of Gestation (days)	22.9	22.8	22.8	22.7
	Abnormal Parturition	0	0	1	0

-: No noteworthy findings; DS: Day of Study (Premating); DG: Day of Gestation; DL: Day of Lactation.
Dunnett's Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

a) Early deaths were observed from DG 23 - DL 7. Three deaths in the 20 mg/kg/day dose group were considered related to BMN 165 because they were preceded by adverse maternal clinical observations.
b) Clinical observations considered test article related occurred during lactation, and are denoted as: number of observations (number of animals).
c) At end of premating, gestation or lactation. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.14-2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 ー F_1 世代の追加生後発生評価（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-18-080 (Continued)					
Dose Level (mg/kg/day)		**0 (Control)**	**2**	**8**	**20**
F_1 Litters: Preweaning	No. Litters Evaluated	21	20	19	20
	Mean No. of Implantations	16.6	15.8	15.2	15.6
	Mean No. Pups/Litter	15.8	15.2	14.2	14.4
	Mean No. Liveborn Pups/Litter	15.5	14.9	14.1	14.2
	No. of Litters with Stillborn Pups	3	3	1	2
	Total Litter Loss PNDs 1-4 (N)	0	0	0	3
	Total Litter Loss PNDs 5-21 (N)	0	0	0	0
	Mean Weight/Litter PND 4 (g)	9.5	10.1	10.1	8.2*
	Mean Weight/Litter PND 21 (g)	42.4	44.8	48.8**	40.9
	Pup Sex Ratios (% males)	47.0	54.4	50.2	51.0
	Reflex and Physical Development	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Pup Clinical Signs [d]				
	Cold to touch	2	2	1	59
	Dehydration	0	3	0	56
	Not nursing	0	0	0	36
	Not nesting	0	0	0	19
	No milk band present	1	2	0	78
	Thin body condition	1	5	0	148
	Decreased motor activity	1	1	0	29
	Whole body or extremities pale	0	0	0	30
	Discoloration (white, purple or black), various locations	8	1	18	28
	Pup Necropsy Observations	-	-	-	-

-: No noteworthy findings; PND: Postnatal Day.
Dunnett's Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.
d) Number of occurrences.

表 2.6.7.14-2　BMN 165 のラットにおける出生前及び出生後の発生に関する皮下投与試験 ー F_1 世代の追加生後発生評価（続き）

Test Article: BMN 165

Study No. BMN165-18-080 (Continued)					
Dose Level (mg/kg/day)		**0 (Control)**	**2**	**8**	**20**
F_1 Males: Postweaning	No. Evaluated	22	22	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Organ Weights	-	-	-	-
	Body Weight (PND 35) (%) [e]	157.4 g	+1.33	+1.02	-8.01*
	Functional Observation Battery	-	-	-	-
	Passive Avoidance	-	-	-	-
F_1 Females: Postweaning	No. Evaluated	22	22	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight (PND 35) (%) [e]	132.9 g	+3.91	+4.06	-3.76
	Function Observational Battery	-	-	-	-
	Passive Avoidance	-	-	-	-

-: No noteworthy findings; PND: Postnatal Day.
Dunnett's Test: * = $p < 0.05$.
e) At the end of postweaning period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.15 新生児を用いた試験

新生児を用いた試験は実施しなかった。

2.6.7.16 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.7.17 その他の毒性試験

表 2.6.7.17-1　フェニルアラニン低減飼料摂取試験

Test System	Method of Administration	Duration, Administration Schedule (Number per Group)	Doses (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study/Report Number
Rabbit/ New Zealand White	Oral (Dietary)	Phase 1: 17 days (daily, N=20 females) Phase 2: 15 days (daily, N=10 females/group)	-	• Rabbits refused consumption of a non-plant based defined diet, precluding its use in evaluating dietary Phe restriction as a means of reducing plasma Phe levels. • The use of two plant-based reduced Phe diets, while better accepted by the rabbits, were unsuccessful in reducing plasma Phe levels when diets were provided for up to two weeks. • The inability of reduced Phe diet to reduce plasma Phe levels for two weeks, even when consumed at reduced amounts that resulted in body weight reduction, demonstrates that dietary manipulation is not a viable option to reduce plasma Phe levels in rabbits.	BMN165-18-081

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