オンキャスパー点滴静注用 3750

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床試験の概括評価

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　非臨床試験計画概略 6
1.1　緒言 6
1.1.1　PEG-L-アスパラギナーゼの開発 6
1.2　非臨床開発 7
1.2.1　PEG-L-アスパラギナーゼ 7
1.2.2　バッチ情報 15
1.2.3　GLP 16

2.　薬理試験 16
2.1　薬理試験 16
2.2　抵抗性／免疫原性 19
2.3　薬力学的薬物相互作用試験 20
2.4　安全性薬理試験 21
2.5　凍結乾燥剤を用いた試験 21
2.5.1　効力を裏付ける試験：イヌにおける 2 剤形の単回及び 4 週間反復静脈内投与の比較 PK/PD 試験［CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 – Report NP39227］ 21
2.6　結論 22

3.　薬物動態試験 22
3.1　分析法 23
3.2　吸収 23
3.3　分布 24
3.4　代謝及び排泄 24
3.5　PK/PD 25
3.6　凍結乾燥剤を用いた PD 試験 25
3.6.1　LC-MS/MS によるイヌ血漿中の L-アスパラギン定量法【CTD 4.2.2.1.6_study 15-8758 - Report NP39150】 25
3.6.2　イヌにおけるオンキャスパー 2 剤形の単回及び 4 週間反復 i.v.投与の比較 PK/PD 試験【CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 - Report NP39227】 26
3.6.3　ビーグル犬における 2 剤形の PK モデリング及びシミュレーションとヒト急性リンパ性白血病患者における予測［10］ 26
3.7　結論 27

4.　毒性試験 30
4.1　単回投与毒性試験 30
4.1.1　ネイティブ L-アスパラキナーゼの単回投与毒性試験 30
4.1.2　PEG-L-アスパラギナーゼの単回投与毒性試験 31
4.1.2.1　マウス 31
4.1.2.2　ラット 31
4.1.2.3　イヌ 31
4.2　反復投与毒性試験 31
4.2.1　ネイティブ L-アスパラキナーゼの反復投与毒性試験 31
4.2.1.1　ラットにおける反復投与毒性試験 31
4.2.1.2　イヌにおける反復投与毒性試験 32
4.2.2　PEG-L-アスパラギナーゼの反復投与毒性試験 32
4.2.2.1　2 週間毒性試験 32
4.2.2.2　4 週間投与毒性試験 32
4.2.2.3　3 カ月投与毒性試験 33
4.2.3　PEG-L-アスパラギナーゼの病態動物を用いた毒性試験 33

4.3　毒性変化の動物種間比較 33
4.4　遺伝毒性試験 36
4.4.1　Ames 試験 36
4.4.2　染色体異常試験 36
4.5　がん原性試験 36
4.6　生殖発生毒性試験 36
4.6.1　受胎能力 36
4.6.2　催奇形性 37
4.6.2.1　*In vitro* 試験 37
4.6.2.2　*In vivo* 試験 37
4.7　幼若動物を用いた毒性試験 38
4.8　その他の毒性試験 38
4.8.1　局所刺激性試験 38
4.8.2　免疫原性試験 38
4.8.3　PEG の毒性試験 38
4.8.4　分解生成物及び不純物の毒性試験 39
4.8.5　PEG-L-アスパラギナーゼ凍結乾燥剤に関する毒性試験 39
4.8.5.1　マウス足底内投与における 2 剤の毒性比較試験【CTD 4.2.3.6.1_Study 59000193 – Report NP39209】 39
4.8.5.2　イヌ及びヒト全血における血液適合性試験【CTD 4.2.3.7.7.1_Study 15-7530 – Report NP39212】 40
4.8.5.3　免疫原性評価：比較 PK/PD 試験イヌにおけるオンキャスパー 2 剤形の単回 i.v.投与後及び 4 週間反復投与の比較 PK/PD 試験【CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 - Report NP39227】 40
4.8.5.4　オンキャスパー凍結乾燥剤の賦形剤として添加の精製白糖の毒性評価 40
4.8.5.5　オンキャスパー2 剤形の製造工程関連不純物の遺伝毒性評価 41
4.9　毒性試験総括 41

5.　総括及び結論 42

6.　参考文献一覧 45

表目次

表 1.2:1　PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧 8
表 1.2:2　PEG-L-アスパラギナーゼ（凍結乾燥剤）：非臨床試験一覧 14
表 1.2:3　非臨床試験に用いた PEG-L-アスパラギナーゼ及びオンキャスパー凍結乾燥剤のバッチ情報 15
表 2.1:1　ネイティブ及び PEG-L-アスパラギナーゼの酵素特性 17
表 3.7:1　PEG-L-アスパラギナーゼを用いた PK/PD 及びトキシコキネティクス試験から得られた PD パラメーター 29
表 4.3:1　PEG-L アスパラギナーゼの主な毒性変化の動物種間比較 34

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ADA	Anti-Drug Antibody	抗薬物抗体
ALL	Acute Lymphoblastic Leukaemia	急性リンパ性白血病
ALT	Alanine Amino Transferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AS	Asparagine Synthetase	アスパラギン合成酵素
AST	Aspartate Amino Transferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area Under the Curve	薬物血中濃度時間曲線下面積
BW	Body Weight	体重
CL	Total Clearance	クリアランス
CL/F	Total Clearance for extravascular administration	血管外投与後の総クリアランス
CSF	Cerebro Spinal Fluid	脳脊髄液
E. coli	Escherichia Coli	大腸菌
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酵素結合免疫吸着測定法
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高性能液体クロマトグラフィー
i m.	Intramuscular	筋肉内
i.p.	Intraperitoneal	腹腔内
i.v.	Intravenous	静脈内
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
IU	International Unit	国際単位
KDa	Kilo Dalton	キロダルトン
K_m	Michaelis-Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
L-asp	L-asparaginase	L-アスパラギナーゼ
LD_{50}	Dose causing 50% Lethality	50%致死量
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	タンデム質量分析計
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
NOEL	No Observed Effect Level	無影響量
PBS	Phosphate Buffer Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD	Pharmacodynamic / Pharmacodynamics	薬力学
PEG	Polyethylene Glycol	PEG
PEG-L-asp	PEG-L-asparaginase	PEG-L-アスパラギナーゼ
PK	Pharmacokinetic / Pharmacokinetics	薬物動態
RES	Reticuloendothelial System	細胞内皮系
$t_{1/2}$	Apparent elimination half-life	見かけの消失半減期
Vss	Volume of distribution at steady state	定常状態の分布容積
Vz	Terminal Volume of distribution	終末相の分布容積

1.　非臨床試験計画概略

1.1　緒言

1.1.1　PEG-L-アスパラギナーゼの開発

本剤オンキャスパー点滴静注用 3750 単位（国際一般名称：pegasparagase、本邦での一般的名称：ペグアスパルガーゼ）は、L-アスパラギナーゼの PEG 化誘導体で、ATC 分類「抗悪性腫瘍薬と免疫調節薬」の「抗悪性腫瘍薬」（ATC 分類 L01XX24）に属する。製剤は 3750 U のペグアスパルガーゼを含む凍結乾燥剤であり、5.2 mL の注射用水で溶解することで、L-アスパラギナーゼ 750 U/mL の等張液となる。L-アスパラギナーゼの 1 IU は、pH 7.3 及び 37°C で 1 分あたり 1 μM のアンモニアを遊離するのに必要な酵素の量として定義されている。なお、U（単位）及び IU（国際単位）は同じ定義であり、相互に利用可能である。以下、本モジュールでは、ペグアスパルガーゼは、従来の L-アスパラギナーゼ（ネイティブ L-アスパラギナーゼ）と明確に区別するため、PEG-L-アスパラギナーゼと呼ぶ。

L-アスパラギナーゼは *E. coli* に由来する分子量約 135 kDa のタンパク質であり、抗原性を有するため抗体形成を引き起こす。PEG-L-アスパラギナーゼは *E. coli* 由来の L-アスパラギナーゼとモノメトキシポリエチレングリコール（PEG）が共有結合した複合体であり、それぞれの PEG 鎖と L-アスパラギナーゼの間の共有結合には、コハク酸を利用している。分子量約 300 kDa の PEG-L-アスパラギナーゼで改善された特性は、（1）抗 L-アスパラギナーゼ抗体に対する免疫反応低下、（2）免疫原性の低下、（3）全身クリアランスの低下による血漿中の半減期の延長である。PEG は、静脈内投与を繰り返しても有害な生理的反応を引き起こさない非免疫原性の合成ポリマーであり、さらに L-アスパラギナーゼを酵素による分解から保護する役割を持つ。

L-アスパラギナーゼの作用機序は、アスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに変換する酵素的切断とそれによる血漿中のアスパラギン枯渇である。正常細胞と異なり、特にリンパ芽球性腫瘍細胞はアスパラギンを合成できないと考えられており、アスパラギンを枯渇しタンパク質合成を阻害することで細胞の壊死がもたらされる。したがって、外因性 L-アスパラギンが供給されない限り、L-アスパラギナーゼは、白血病細胞以外を保護しながら白血球細胞を攻撃する特異的化学療法剤となる［22］。

PEG-L-アスパラギナーゼは、1994 年に米国及びドイツで承認されて以降、ほぼ 20 年間、リンパ系疾患の治療で日常的に使用されており、多くの情報及び関連研究が発表されている。本モジュールではこれらのデータを適切に要約し、薬理学的及び毒性学的プロファイル、薬物動態（PK）及び薬物動態／薬力学（PK/PD）について、関連する情報を記載した。ネイティブ L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼの薬理学的及び毒性学的プロファイルは非常に類似しているが、PK 特性は大きく異なっている。

当初、本剤はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）pH 7.3 中に PEG-L-アスパラギナーゼ 3750 U/5mL（750 U/mL）を含む等張滅菌溶液の単回使用バイアルとして液剤で市販された。凍結乾燥剤は、有効期間 8 カ月であった液剤の安定性を最大 36 カ月に改善し、医薬品としての実用性を確保する目的で開発された。2 剤形を分析及び非臨床で比較評価し、凍結乾燥剤を支持するデータを得た。

非臨床パッケージとして、液剤を用いた試験と液剤及び凍結乾燥剤の溶解液を用いて同等性を確認した追加試験を示す。2 剤形の同等性を支持する追加の *in vitro* 試験及びマウスとイヌを用いた *in vivo* 試験は以下のとおりである。

- マウスの足底内投与局所刺激性試験【CTD 4.2.3.6.1_Study 5900193 – Report NP39209】
- イヌ及びヒトの全血における血液適合性試験【CTD 4.2.3.7.7.1_Study 15-7530 – Report NP39212】
- オンキャスパー2 製剤（液剤及び凍結乾燥剤）のイヌ静脈内に単回及び 4 週間反復投与における抗薬物抗体、薬物動態及び薬力学的検討【CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 – Report NP39227】

今般承認申請する本薬の凍結乾燥剤は 3750 U/バイアルの凍結乾燥粉末として供給され、5.2 mL の注射用水で溶解することで、PEG-L-アスパラギナーゼ 750 U/mL の PBS 溶液となる。

1.2　非臨床開発

1.2.1　PEG-L-アスパラギナーゼ

1994 年の米国及びドイツでの承認は、当時の基準に従った非臨床データパッケージに基づいていた。すべての非臨床試験は等張液として調製された本剤の液剤で行った。大半の試験では[redacted]から供給されたネイティブ L-アスパラギナーゼから製造した PEG-L-アスパラギナーゼを用いたが、例外として、アカゲザルにおける PK 試験［6］及び【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】では[redacted]（現、[redacted]）から供給されたネイティブ L-アスパラギナーゼから製造した PEG-L-アスパラギナーゼも用いた。すべてのバッチは PEG-L-アスパラギナーゼと PBS で構成されており、これらを非臨床又は臨床試験に用いた。

PEG-L-アスパラギナーゼを用いて行った非臨床試験の一覧を、試験で用いたバッチ番号とともに表 1.2:1 に示す。

凍結乾燥剤の PEG-L-アスパラギナーゼを支持する非臨床試験の一覧を表 1.2:2 に示す。これらの試験の目的は、製剤に添加した 5%精製白糖に対する侵害受容反応の評価、イヌ及びヒトにおける製剤の血液適合性の決定、2 剤形の PK/PD 及び抗薬物抗体の同等性を評価することであった。

表 1.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧

Pharmacology							
Primary pharmacodynamics							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Doses**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
(Abuchowsk, 1984) [PE0150533]［1］	Preliminary antitumor efficacy study in mice	Mouse	No	0.5, 1, 2, 2.5, 5 IU/mouse	Single dose	i.p.	Not available[a]
(Abuchowsk, 1984) [PE0150533]［1］	Preliminary antitumor efficacy study in mice	Mouse	No	5, 10, 20 IU/mouse	Single dose	i.p.	Not available[a]
Study #6-NP39148 4.2.1.1.1	Antitumor efficacy of PEG-L-asparaginase in mice	Mouse	No	5, 10 IU/mouse (i.p.) 10, 20, 30 IU/mouse (i m.)	Single dose	i.p. i m.	[redacted]
1st Study (MacGrath) NP39259 4.2.1.1.2	Efficacy Studies In Dog - 1st study	Dog	No	15-200 IU/kg	Weekly or bi-weekly admin.	i.p.	
2nd Study (MacEwen 1987) [PE0150565]［24］	Efficacy Studies In Dog – 2nd study	Dog	No	10,30 IU/kg 30 IU/kg in combination with chemotherapy	Weekly with or without combination chemotherapy	i.p.	
3rd Study (MacEwen 1992)-[PE0150564]［21］	Efficacy Studies In Dog – 3rd study	Dog	No	30 IU/kg	Bi-weekly in combination chemotherapy	i m.	

表 1.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧（続き）

Secondary pharmacodynamics							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Doses**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
Sapra 2005 NP39159 4.2.1.2.3	*In vitro* cytotoxicity of Oncaspar against pancreatic cell lines	Not applicable	No	Serial dilution up to 20 IU/mL	4 days incubation at 37°C	*in vitro*	Not available[b]
Denis 1- NP39162 4.2.1.2.2	*In vitro* activity of Oncaspar against pancreatic cell lines and tissue specimens	Not applicable	No	Serial dilution	14 days incubation at 37°C/5%CO_2	*in vitro*	Not available[b]
Denis 2 - NP39163 4.2.1.2.1	*In vivo* therapeutic efficacy of Oncaspar as a single agent and in combination with gemcitabine in a xenograft model of human pancreatic cancer (MiaPaCa-2)	Mouse	No	**PEG:** 12,500; 25,000 IU/kg; Gemcitabine: 80 mg/kg	**PEG:** single dose **Gemcitabine:** twice weekly for 2 weeks	i.p.	Not available[b]
Pharmacokinetics							
Analytical and validation							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Doses**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
#06-8473-NP39151 4.2.2.1.1	Validation of an enzyme activity assay for the determination of Oncaspar (PEG-L-asparaginase) in sodium heparinized rat plasma	Not applicable	No	Not applicable	Not applicable	Not applicable	[redacted]
#06-8481-NP39147 4.2.2.1.2	Validation of an enzyme activity assay for the determination of Oncaspar (PEG-L-asparaginase) in sodium heparinized dog plasma	Not applicable	No	Not applicable	Not applicable	Not applicable	
#06-8938-NP39158 4.2.2.1.3	Validation of a liquid chromatographic method with MS/MS detection for the determination of L-asparagine and L-glutamine in dog and rat plasma	Not applicable	No	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable

表 1.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧（続き）

Absorption and PK/PD							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Doses**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
(Abuchowsk, 1984) [PE0150533]［1］	Plasma asparaginase levels in un-immunized and pre-immunized mice	Mouse	No	5 IU/mouse ≈250 IU/kg	Single dose	i.p.	Not available[a]
#7- NP39223 4.2.2.2.4	Blood circulating life of PEG-L-asparaginase in mice	Mouse	No	260 IU/kg	Single dose	i.p., i.v., i m.	[redacted]
#53- NP39224 4.2.2.2.2	Blood circulating life of PEG-L-asparaginase and unmodified L-asparaginase administered i.m. to mice	Mouse	No	400 IU/kg	Single dose	i.m.	
Pharmacokinetics							
Absorption and PK/PD							
#04-2861- NP39226 4.2.2.2.1	Compounds [redacted], [redacted], and Oncaspar. Comparative single dose pharmacokinetics and pharmacodynamic study in rats via intravenous or intramuscular injection	Rat	No	26, 87 and 260 IU/kg	Single dose	i.v., i.m.	Not available
(Ho, 1988) [PE0151770]［18］	Plasma asparaginase levels in rabbits	Rabbit	No	40 IU/kg	Single dose	i.v.	Not available
#04-3082- NP39178 4.2.2.2.3	Compounds [redacted], [redacted], and Oncaspar. A comparative single dose pharmacokinetics and pharmacodynamic study in dogs using the intravenous or intramuscular injection	Dog	No	26, 87 and 260 IU/kg	Single dose	i.v., i.m.	[redacted]
Berg 1993 [PE0150557]［6］ and NIH Study-NP39179 4.2.2.2.6	Plasma asparaginase levels in monkeys	Monkey	No	2,500 IU/m^2 (≈ 208 IU/kg)	Single dose	i.m.	

表 1.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧（続き）

Toxicokinetic							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Doses**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
#824-015- NP39217 4.2.3.1.2	A single intravenous dose comparative pharmacokinetics, pharmacodynamic and toxicity study between [redacted] and [redacted] (ONCASPAR) in rats	Rat	Yes	0, 100 and 500 IU/kg	Single dose	i.v.	[redacted]
#824-016- NP39211 4.2.3.1.3	A single intravenous dose comparative pharmacokinetics, pharmacodynamic and toxicity study between [redacted] and [redacted] (ONCASPAR) in Beagle dogs	Dog	Yes	0, 100 and 500 IU/kg	Single dose	i.v.	
#3-NP39218 4.2.3.2.4	4-week intramuscular toxicity study of PEG-L-asparaginase in rats	Rat	Yes[f]	100, 200 and 400 IU/rat	5 time a week	i.m.	29
#4a- NP39220, 4.2.3.2.3 #4b- NP39221 4.2.3.2.6	Toxicity of PEG-L- asparaginase in dogs	Dog	Yes[f]	200 and 1,200 IU/kg	once a week for 2 weeks	i.m., i.v.	28 29

表 1.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧（続き）

Toxicology							
Single-dose							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Doses**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
#1-NP39222 4.2.3.1.1	Maximum tolerated dose of PEG-L-asparaginase in a single dose study	Mouse	Yes[f]	0 – 5,000 - 10,000 - 25,000 - 40,000 - 100,000 IU/kg	Single dose	i.p.	[redacted]
#824-015[e]- NP39217 4.2.3.1.2	A single intravenous dose comparative pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity study between ENZ-2285 and ENZ-002 (Oncaspar) in rats	Rat	Yes	0 – 100 – 500 IU/kg	Single dose	i.v.	
#824-016[e] NP39211 4.2.3.1.3	A single intravenous comparative pharmacokinetics, pharmacodynamic and toxicity study between [redacted] and [redacted] (Oncaspar) in Beagle dogs	Dog	Yes	0 – 100 – 500 IU/kg	Single dose	i.v.	
Repeat-dose							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Dose**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
#4a- NP39220 4.2.3.2.3 #4b- NP39221 4.2.3.2.6	Toxicity of PEG-L- asparaginase in dogs	Dog	Yes[f]	200 – 1,200 IU/kg	once a week for 2 weeks	i.m., i.v.	[redacted]
#2- NP39233 4.2.3.2.5	Subacute toxicity of PEG-L-asparaginase administered i.p. to rats – a 28 day study	Rat	Yes[f]	0 - 10 - 30 - 60 IU/kg	5 time a week for 4 weeks	i.p.	
#3- NP39218 4.2.3.2.4	Subacute toxicity study of PEG-L-asparaginase administered i.m. to rats - a five week study	Rat	Yes[f]	0 - 100 – 200 - 400 IU/kg	5 time a week for 4 weeks	i.m.	
#8- NP39213 4.2.3.2.1	Additional subacute toxicity of PEG-L-asparaginase administered i.p. to rats	Rat	Yes[f]	0 - 400 IU/kg	5 time a week for 4 weeks	i.p.	
#5- NP39210 4.2.3.2.2	Subchronic toxicity of PEG-L-asparaginase In mice : a three month study	Mouse	Yes[f]	0 - 50 – 200 – 500 IU/kg	once a week for 13 (i.p.) or 17 (i.m.) weeks	i.m., i.p.	

表 1.2.1:1　PEG-L-アスパラギナーゼ（液剤）：非臨床試験一覧（続き）

Toxicology							
Genotoxicity							
Study code	**Study Type**	**Species**	**GLP**	**Dose**	**Duration of dosing**	**Route of administration**	**Batch**
49515- NP39215 4.2.3.3.1.1	Mutagenicity study	Salmonella typhimurium (TA97a, TA98, TA100 and TA102 strains)	Yes	75 IU/plate, with and without S-9 activation	not applicable	*in vitro* study	[redacted]
Other toxicity							
#29- NP39219 4.2.3.7.2.1	Determination of immunogenic properties of PEG-L-asparaginase	Mouse	Yes[f]	10.5 IU/mouse ≈ 525 IU/kg	once a week for 12 weeks	i m., i.p.	[redacted]

a [redacted]製造バッチ ［1］
b [redacted]製造バッチ（試験報告書にバッチ番号の記載なし）
c 文献情報［18］
d PEG-L-アスパラギナーゼ（[redacted]製造、[redacted]製造 L-アスパラギナーゼ使用）
e 2.6.6 毒性試験の概要文参照
f 米国 GLP（CFR Title 21 Part 58）に従って実施された毒性試験

表 1.2:2 PEG-L-アスパラギナーゼ（凍結乾燥剤）：非臨床試験一覧

Study code	Study Type	Species	GLP	Doses	Duration of dosing	Route of administration	Batch
Pharmacokinetics							
Analytical and validation							
15-8758-NP39150 4.2.2.1.6	Partial Validation of an LC-MS/MS Bioanalytical Method for the Analysis of L-Asparagine in Dog Plasma	Dog	Yes[a]	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Absorption and PK/PD							
15-3297- NP39227 4.2.2.2.8	A Comparative, Single-Dose and 4-Week Repeat-Dose, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Oncaspar liquid and lyophilized Presentations	Dog	Yes[a]	500 IU/kg once, or 500 IU /kg once weekly (Days 1, 15, 22,29 and 36)	Single dose, repeat dose	i.v.	Oncaspar liquid: [redacted], Oncaspar lyophilized: [redacted]
Toxicology							
Local Tolerance							
5900193- NP39209 4.2.3.6.1	Nociceptive Effects by Test Items Following Intra-plantar Injection in Mice	Mice	No	50 µL	once	Intraplantar s.c.	-
Other toxicity							
15-7530- NP39212 4.2.3.7.7.1	Determination of Hemocompatibility in Dog and Human Whole Blood	Dog, human	Yes[a]	750 IU/mL	not applicable	*in vitro*	Oncaspar liquid : [redacted], Oncaspar lyophilized : [redacted]

a　米国 GLP（CFR Title 21 Part 58）に従って実施された試験

1.2.2　バッチ情報

非臨床試験に用いた PEG-L-アスパラギナーゼのバッチごとの特性を表 1.2:3 に要約する。

バッチ番号[redacted]、[redacted]及び[redacted]は[redacted]、[redacted]以降は[redacted]で製造されたバッチである。バッチ番号[redacted]及び[redacted]は、イヌにおける毒性試験で大量の PEG-L-アスパラギナーゼを投与するために調製された高濃度バッチ（1200 IU/mL）である。非臨床試験においても使用された初期の臨床バッチ（[redacted]、[redacted]及び[redacted]）の出荷規格は[redacted] IU/mL であったが、治療レベルで投与する必要量を提供するために最終的には 750 IU/mL（[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]）とした。

表 1.2:3 非臨床試験に用いた PEG-L-アスパラギナーゼ及びオンキャスパー凍結乾燥剤のバッチ情報

Batch number	[redacted]	Specific activity [redacted]	Purity (%)
PEG-L-asparaginase (Oncaspar liquid)			
Not available[a]	Not available	Not available	Not available	Not available
Not available[b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	Not available
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	Not available	Not available	Not available	Not available
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
PEG-L-asparaginase (Oncaspar lyophilized presentation)			
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

a　Rutgers University 製造バッチ［1］
b　文献情報［18］
c　PEG-L-アスパラギナーゼ（[redacted]製造、[redacted]製造 L-asparaginase 使用）

PEG-L-アスパラギナーゼは、[redacted]から提供されたネイティブ L-アスパラギナーゼから製造しているが、当該製品を用いた非臨床試験は行わなかった。しかしながら、[redacted]及び[redacted]から提供されたネイティブ L-アスパラギナーゼで製造した製剤と分析学的同等であることを示す包括的な比較パッケージが利用可能である。これには、[redacted]及び[redacted]のネイティブ L-アスパラギナーゼを出発物質とする活性成分の比較試験、それぞれを原薬とする製剤の比較試験が含まれている。

エンジニアリング[redacted]ロット及びプロセスバリデーション[redacted]ロットのバッチ分析の結果、凍結乾燥剤は出荷規格内であった【3.2.P.5.4 ロット分析】。

1.2.3　GLP

過去 20 年間、PEG-L-アスパラギナーゼは急性リンパ性白血病（ALL）に対する化学的療法剤として単剤又は併用療法で使用されていることから、PEG-L-アスパラギナーゼの薬理学的及び毒性学的特性、臨床における有効性及び安全性は大幅に解明されており、研究の結果が文献でも発表されている。PD、PK 及び毒性学的試験のほとんどは、1980 年代から 1990 年代初頭にかけて当時の GLP に従って行われた。PEG-L-アスパラギナーゼの特性を評価するために数十年前に行われたこれらの試験は、最近の GLP 試験ガイドラインの要求事項に完全には準拠していない。より最近行われた非 GLP の PK/PD 試験【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 – Report NP39226（ラットにおける単回 i.v.又は i.m.投与の[redacted]、[redacted]及びオンキャスパーの比較 PK/PD 試験）及び CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 – Report NP39178（イヌにおける単回 i.v.又は i.m.投与の[redacted]、[redacted]及びオンキャスパーの比較 PK/PD 試験）】において、PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー）と[redacted]を比較した。これらの試験は最近の非臨床試験の基準に従って行われたことから、これらの試験から得た PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー）治療に関するデータについて後ほど考察する。

PEG-L-アスパラギナーゼで行われた試験の GLP 準拠状況を表 1.2:2 に示す。

2.　薬理試験

2.1　薬理試験

1.　作用機序

L-アスパラギナーゼの PEG 化は、L-アスパラギナーゼの作用機序に影響を及ぼすことはない。L-アスパラギナーゼは、L-アスパラギンを L-アスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。L-アスパラギンは、アスパラギン合成酵素（Asparagine Synthetase　以下 AS）によってアスパラギン酸とグルタミンから合成される非必須アミノ酸である。ALL 細胞を含むある種の悪性細胞は、AS を欠損しており L-アスパラギンを合成する能力を持たないため、細胞膜外から L-アスパラギンを取り込んでいる。これらの細胞では、L-アスパラギンの欠乏はタンパク質合成を速やかに阻害し、その後の核酸合成を阻害することから、正常細胞の損傷を伴わずに細胞毒性効果を発揮する［14,22］。

L-アスパラギナーゼは最初にモルモットの血清から単離され、その後、ネイティブ L-アスパラギナーゼを生産するためにより効率的で低廉な原料源を調査した結果、大量生産のために *E. coli* 及び *Erwinia* の 2 種類の細菌が選択された［25］。細菌由来の 2 種類の L-アスパラギナーゼは、活性又は特異性において違う酵素特性を示した。実際には、L-グルタミンの加水分解も L-アスパラギナーゼによって仲介される［25］。

PEG-L-アスパラギナーゼは、*E. coli* 由来のネイティブ L-アスパラギナーゼ（L-アスパラギナーゼアミド加水分解酵素、タイプ EC-2、EC-3.5.1.1）を PEG 化した酵素である［16］。

E. coli 由来のネイティブ L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼ、*Erwinia* 由来のネイティブ L-アスパラギナーゼの特性を表 2.1:1 に示す。

表 2.1:1 ネイティブ及び PEG-L-アスパラギナーゼの酵素特性

	E. coli		***Erwinia***
	Native L-asparaginase	**PEG-L-asparaginase**	**L-asparaginase**
Activity (IU/mg protein)	280-400	280-400	650-700
K_m (μM)-L-asparaginase	12	12	12
K_m (μM)-L-glutaminase	3000	3000	1400
L-Glu/L-Asp (maximal activity)	0.03	0.03	0.10
Molecular weight (modified from ［25］)	141000	298000-303000	138000

E. coli 由来のネイティブ L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼは、*Erwania* 由来の L-アスパラギナーゼと比較して L-アスパラギナーゼ活性が低かったが、グルタミナーゼ活性が低く L-アスパラギンに対する特異性が高かった。*E. coli* 由来の L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼのグルタミナーゼ活性はわずか 2%であったが、*Erwania* 由来の L-アスパラギナーゼのグルタミナーゼ活性は 10%であった［25］。

E. coli から調製した L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼの選択は、大量の L-アスパラギナーゼを産生する細菌の中で、L-アスパラギナーゼ活性及び L-グルタミナーゼ活性に関して適切であった。

2.　抗増殖活性

1953 年、正常モルモット血清投与後のリンパ腫退行が、マウス及びラットにおいて最初に観察された。1960 年代初頭に、モルモット血清中に存在する L-アスパラギナーゼが抗腫瘍活性の原因物質であることが証明された。

E. coli から L-アスパラギナーゼ（タイプ EC-2）が単離精製されて以降、当該酵素の治療効果は、マウスの白血病とリンパ腫、児童及び成人の原発性リンパ腫及び急性リンパ性白血病において確認された。

ネイティブ L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼの抗増殖活性が、複数の動物モデルを用いて *in vitro* と *in vivo* で研究された。

3.　*in vitro* 試験

前治療を行っていない ALL 患者から採取した骨髄単核細胞の *in vitro* 生存に及ぼすネイティブ L-アスパラギナーゼの効果を、未処理細胞と比較した。さらに、L-アスパラギナーゼ療法の *in vivo* 抗白血病効果の指標として、採取した骨髄単核細胞の生存率及び白血病性浸潤物の絶対数における変化を、L-アスパラギナーゼ単回投与前及び 5 日後に調査した。

白血病細胞は、診断日及び L-アスパラギナーゼ（2500 又は 25000 IU/m^2）の i.m.投与 5 日後に骨髄から採取した。診断日に採取した骨髄 2 mL を、0、0.0001、0.001、0.01、0.1 及び 1 IU/mL の L-アスパラギナーゼ存在下で 2～9 日間培養した。最初の段階で培地中の L-アスパラギン濃度は正常ヒト血清と同等の 50 µM であったが、0.01、0.1 及び 1 IU/mL の L-アスパラギナーゼ添加後 5 分以内に 95%超が減少した。最低濃度である 0.001 及び 0.0001 IU/mL の L-アスパラギナーゼでは、95%超のアスパラギン枯渇にそれぞれ 1～6 時間及び 12～24 時間要した。白血球細胞の *in vitro* 殺細胞効果は L-アスパラギナーゼ濃度に依存せず、試験した濃度範囲では用量反応性がないことが示唆された。白血球細胞死及び全細胞死の比較から、L-アスパラギナーゼは白血病細胞を優先的に死滅させることが示された。

in vitro 結果と同様に、L-アスパラギナーゼ単剤を 2500 又は 5000 IU/mL 投与された患者でみられた白血病浸潤物の変化が同様であったことが、*in vivo* 評価によって示された。L-アスパラギナーゼによる白血球細胞の殺細胞効果は *in vitro* 及び *in vivo* で良好な相関関係を示したが、L-アスパラギナーゼに対する奏効は用量レベルと無関係であった［5］。

ALL 治療に最適な L-アスパラギン枯渇について、Haley らは、L5178Y 細胞の最大成長の 50%に必要なアスパラギン濃度が 20 µM（=2.6 mg/L）、最適成長に十分な濃度が 70 µM（=9.2 mg/L）と言及した［17］。この数値は、血漿中の L-アスパラギナーゼの正常濃度が 4～10 mg/L であることと一致している。Broom は、培養条件で 6C3HED 細胞の成長刺激に必要な L-アスパラギンの最低濃度を 3.8～7.6 µM（0.5～1 mg/L）、24 時間後の最適成長に必要な量は 20～50 mg/L であったと報告した［7］。

in vitro における PEG-L-アスパラギナーゼの抗増殖活性を、ヒト膵臓癌細胞株 3 種類（MIAPaCa、PANC-1、Bx-PC3）を用いて評価した。1.0 IU/mL の PEG-L-アスパラギナーゼ存在下で、PANC-1 細胞において 61%、MIAPaCa 細胞において 100%、10 IU/mL の PEG-L アスパラギナーゼ存在下で、Bx-PC3 細胞において 51%の腫瘍コロニー阻害がみられた。PEG-L-アスパラギナーゼの IC_{50} 値は、MIAPaCa 細胞において 0.13 IU/mL、PANC-1 細胞において 0.25 IU/mL であった【CTD 4.2.1.2.2_Denis Study Report 1 - Report NP39162】。

4.　*in vivo* 試験

- マウス

L-アスパラギナーゼの抗増殖活性について、L5178Y 細胞を移植した CDF1 マウスを用いた *in vivo* 試験が行われた［35,36,38］。5～23 IU の単回及び反復腹腔内（i.p.）投与は生存期間延長に効果的であり、最大 16 日の反復投与は単回投与よりも効果的ではなかった。細胞接種 8、5、3 及び 1 日前に PEG-L-アスパラギナーゼ 9 IU/マウスで前処理、接種 3 日後に 5、9 又は 14 IU/マウスで後処理をしたが、生存期間の延長はみられなかった。反復投与を成功させるための制限要因の 1 つとして、白血球細胞抵抗性発生及び酵素に対する抗体形成があげられた［38］。

薬剤の治療活性は、免疫抑制剤であるシクロフォスファミド（250 mg/kg）を単回 i.p.投与し、前処理（白血病細胞接種の最大 120 日前から L-アスパラギナーゼ 9 IU 投与）及び後処理（投与後 3 日に L-アスパラビナーゼ 5～39 IU を単回 i.p.投与）を行った際に保持された［35］。

Vadlamudi がその後に行った試験において、様々な治療スケジュールで L-アスパラギナーゼ（23 IU、i.p.投与）及びメトトレキサート（MTX）（1.08 mg/kg）を併用することで、L5178Y 細胞における治療的相乗作用が観察された。L5178Y 担がんマウスに MTX を 5 日連続で投与し、その 3 日後に L-アスパラギナーゼを 5 日連続で投与することで治療的相乗効果がみられたが、同じ投与スケジュールで MTX に先行して L-アスパラギナーゼを投与した場合は効果はみられなかった［36］。

ネイティブ L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼ 5～20 IU 投与における抗腫瘍活性が、L5178Y 担がん BDF1 マウスで比較された。PEG-L-アスパラギナーゼは試験した全用量レベルで効果を示したが、ネイティブ L-アスパラギナーゼは最高用量でのみ効果を示した。6C3HED 細胞を移植した C3H/HeJ マウスにおいても同様の結果であった。完全治療に必要な用量は、ネイティブ L-アスパラギナーゼが 5 IU/マウスであったのに対し、PEG-L-アスパラギナーゼはその半分の 2.5 IU/マウスであった。PEG-L-アスパラギナーゼは、i.m.投与より i.p.投与で効果的であったが、高用量の i.m.投与も治癒の誘導に効果的であった［1］。

MiaPaCa 細胞異種移植モデルで抗腫瘍活性を評価した。PEG-L-アスパラギナーゼ 12500 IU/kg の単回 i.p.投与の結果、無処理の対照区と比較して 59%の腫瘍増殖抑制が観察された【CTD 4.2.1.2.1_Denis Study Report 2 - Report NP39163】。

- イヌ

自然発生悪性リンパ腫担がんイヌに、PEG-L-アスパラギナーゼ単剤、又はビンクリスチン、シクロホスファミド、MTX 及びプレドニゾンを併用し i.p.投与した 2 試験が行われた【CTD 4.2.1.1.2_McGrath study – Report NP39259】［24］。これらの結果から、PEG-L-アスパラギナーゼは単剤でも低用量（10～30 IU/kg）で抗腫瘍効果を示すが、高用量（200 IU/kg）で効果の改善がみられないことが示された。McEwen［24］によって全奏効率が 70%で、既に化学療法耐性を示したイヌにおいても PEG-L-アスパラギナーゼが有効であったことが示された。奏効期間は 14～102 日（中央値 48 日）であった。

次に、非ホジキンリンパ腫担がんイヌで、L-アスパラギナーゼ及び PEG-L-アスパラギナーゼの有効性を比較する 2 試験が行われた。131 例に L-アスパラギナーゼ（400 IU/kg、i.m.又は i.p.）又は PEG-L-アスパラギナーゼ（10～30 IU/kg、i.m.）が投与された結果、両化合物は同等の治療効果を示したが、PEG-L-アスパラギナーゼの方が薬物関連副作用の発現が少なかった［21,32］。

2.2　抵抗性／免疫原性

1.　*in vitro* 試験

in vitro 試験によって、アスパラギナーゼ抵抗性細胞において、AS 発現が増加することが示されたことから、AS の活性上昇が薬剤耐性生存を可能にするとの仮説が展開された［4,27,28,31］。

2.　*in vivo* 試験

L-アスパラギナーゼ耐性マウスに腫瘍を移植し、24 時間以内に L-アスパラギナーゼを投与すると腫瘍成長と AS の循環系への移行率が著しく増加することから、AS の主要な供給源は原発腫瘍であることが示された［12］。

耐性発現における 2 番目に重要なメカニズムは、血清中に存在する異種タンパク質である L-アスパラギナーゼに対する中和抗体の誘導である。抗体が形成されることで、L-アスパラギナーゼの活性が低下し、活性持続期間が短くなり、アスパラギン枯渇が不完全になる。後者の現象は臨床症状がないことから、silent inactivation と名付けられた［26］。

小児 ALL 患者 7 例から採取された骨髄を免疫不全 NOD/SCID マウスに異種移植した試験において、L-アスパラギナーゼ耐性のメカニズムとして多剤耐性が関与しない可能性が示唆されている［15］。

3.　抗 L-アスパラギナーゼ抗体

L-アスパラギンが細菌由来のタンパク質であることから、反復投与後は抗 L-アスパラギナーゼ抗体の形成が予想される。抗アスパラギナーゼ抗体は、L-アスパラギナーゼの薬物動態及び薬力学に重大な影響を及ぼすと考えられている（silent inactivation、免疫複合体形成、L-アスパラギナーゼのクリアランス増加、アレルギー性反応）。

L-アスパラギナーゼの PEG 化は、抗 L-アスパラギナーゼ抗体に対する免疫原性及び免疫反応性を低下させる［1,32］。外来タンパク質に対する特異的抗体産生は、臨床使用で過敏反応を引き起こす可能性がある［3］。

2.3　薬力学的薬物相互作用試験

PEG-L-アスパラギナーゼと様々な動物モデルの腫瘍治療で使用される他の薬剤の薬力学的薬物相互作用の潜在性の説明には、文献情報が利用可能である。

MiaPaCa 細胞異種移植モデルにおいて、PEG-L-アスパラギナーゼとゲムシタビンを併用することで、相乗的抗腫瘍活性が認められた。PEG-L-アスパラギナーゼ（12500 又は 25000 IU/kg、Day 1 に i.p 投与）及びゲムシタビン（80 mg/kg、Day 1、4、7 及び 10 に i.p.投与）をそれぞれ単剤又は併用で投与した。未処理の対照区と比較した腫瘍増殖抑制効果は、PEG-L-アスパラギナーゼ単剤で 59%、ゲムシタビン単剤で 63.5%、両剤併用で 85.9%であった。PEG-L-アスパラギナーゼの増量に伴う奏効の増加はみられなかった【CTD 4.2.1.2.1_Denis Study Report 2-Report NP39163-4.2.1.2.1】。

自然発生悪性リンパ腫を有するイヌにおいて、抗腫瘍活性が評価された。20 例が PEG-L-アスパラギナーゼ（10～30 IU/kg、i.p.、週 1 回投与）単剤又は 1 サイクルの化学療法（ビンクリスチン、シクロホスファミド、MTX 及びプレドニゾン）で処置され、続けて維持療法として PEG-L-アスパラギナーゼ（30 IU/kg、i.p.、週 1 回投与、17 例）が投与された。PEG-L-アスパラギナーゼ単剤の奏効率（完全奏効及び部分奏効）が 70%（14/20 例）であったのに対し、化学療法剤と追加することで 88%（15/17 例）となった［24］。

2.4　安全性薬理試験

独立した安全性薬理試験は行っておらず、また文献による報告もない。毒性試験の試験デザインに統合された安全性薬理のエンドポイントは、PEG-L-アスパラギナーゼが、中枢神経系、心臓、腎臓又は呼吸器の機能に影響を及ぼさないことが示唆されている。しかしながら、いくつかの理由で、健康動物ではヒトで観察されている副作用を予測することができないことから、PEG-L-アスパラギナーゼのような化合物の安全性試験に適したモデルではない。

逆に、自然発生腫瘍を有する疾患の動物モデルは、有効性又は安全性のいずれかに関して予測可能であることが見いだされていることから、ヒトにおける安全性のより良いモデルとなる。

ネイティブ L-アスパラギナーゼ又は PEG-L アスパラギナーゼのいずれかを投与されたイヌモデルの有害反応には、細菌由来酵素の免疫原性に関連する過敏反応、食欲不振、嘔吐に加え、発作及び膵炎の散発的なエピソードが含まれていた。これらの有害事象は定性的に同等であるが、イヌ疾患モデルではネイティブ L-アスパラギナーゼ投与後の方が PEG-L-アスパラギナーゼ投与後より頻度が高い。

これらの所見は臨床においても確認されている。文献によれば、PEG-L-アスパラギナーゼよりもネイティブ L-アスパラギナーゼの方が神経毒性の明らかな兆候を示し、小児より成人に対してより影響がみられる。さらに、心臓又は呼吸器の徴候はヒトで報告されておらず、動物で観察された所見から確認された［25］。

申請者は、健康動物モデルは予測性が乏しいこと、臨床で得られる多くの情報が利用可能であることを理由として、新たな安全性薬理試験は不要と考えた。

2.5　凍結乾燥剤を用いた試験

2.5.1　効力を裏付ける試験：イヌにおける 2 剤形の単回及び 4 週間反復静脈内投与の比較 PK/PD 試験［CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 – Report NP39227］

GLP 準拠の 15-3297 試験は、イヌにおいて 2 剤形のオンキャスパーの PK、PD 及び抗薬物抗体産生を比較するために行った単回及び 4 週間反復 i.v.投与の PK/PD 試験である。

ビーグル犬に単回又は週 1 回（1、15、22、29 及び 36 日）、液剤（ロット番号：[redacted]）又は凍結乾燥剤（ロット番号：[redacted]）を 500 IU/kg（0.667 mL/kg BW）の用量で低速ボーラス i.v.投与後、血漿中のアスパラギンを HPLC で定量することで PD を評価した。

結論として、血漿中のアスパラギンは 41 例全例で投与後 336 時間まで、41 例中 40 例で投与後 552 時間までのすべての測定時点で完全に枯渇していたことから、両剤形の活性によってアスパラギンの実質的減少が予想されることが示された。

2.6　結論

正常細胞と違いアスパラギンを合成する能力を持たないリンパ腫細胞において、L-アスパラギナーゼによるアスパラギンの枯渇は、腫細胞の生存を阻止する興味深い活性であることが証明された。アスパラギンが細胞外から供給されない限り、腫細胞は生存不可能である。

L-アスパラギナーゼは、白血病細胞以外を保護しながら白血球細胞を攻撃する特異的化学療法剤となる。

E. coli L-アスパラギナーゼは、本質的特性、製造の容易さから、優れた候補であることが判明した。しかしながら、すべての異種タンパク質と同様に、中和抗体形成を含む免疫反応を誘導し、L-アスパラギナーゼ活性及び活性持続期間を減少させる silent inactivation を引き起こす。

PEG 化することで、抗体形成が誘導される可能性を低くなることが示された。PEG 化によって酵素活性の半減期を延長することで、投与量を減量し投与間隔を長期化する投与計画、過敏反応減少が期待される。

イヌに液剤又は凍結乾燥剤の溶液を投与し、血漿中のアスパラギン枯渇を評価した。試験の結果、血漿中のアスパラギンは 41 例全例で投与後 336 時間まで、41 例中 40 例で投与後 552 時間までのすべての測定時点で定量下限値未満まで枯渇していたことから、液剤及び凍結乾燥剤の両方がアスパラギンの本質的減少に効果があることが示された。

3.　薬物動態試験

PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼを投与した動物及びヒト試料からタンパク質を直接測定する代替法として、アスパラギナーゼ活性を指標として PK を解析した。血漿中の L-アスパラギン枯渇は、PK/PD 評価における薬力学的エンドポイントとしても用いた。

ほどんどの試験において PK 解析にはコンパートメント法を用い、最新の毒性学試験においてのみノンコンパートメント法を用いた【CTD 4.2.3.1.2_Study #824-015 - Report NP39217、CTD 4.2.3.1.3_Study #824-016 - Report NP39211 - 4.2.3.1.3】。

PEG-L-アスパラギナーゼの PK 又はトキシコキネティクスを、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルに対する i.m、i.v.又は i.p の単回投与後、ラット（i.m.）及びイヌ（i.m.及び i.v.）に対する反復投与後に調査した。

PEG 化複合体であることから予想されたとおり、PEG-L-アスパラギナーゼはネイティブ L-アスパラギナーゼよりも長時間にわたって循環血中に存在した。投与経路に関係なく、PEG-L-アスパラギナーゼ活性の半減期（$t_{1/2}$）は、マウスで約 3.0～3.5 日、ウサギで 5.6 日であり、ネイティブアスパラギナーゼの $t_{1/2}$（マウス：約 0.21～0.24 日；ウサギ：0.8 日）と比較して延長がみられた［1］【CTD_4.2.2.2.2_Study #53 - Report NP39224［18］】。

さらに、PEG-L-アスパラギナーゼで免疫化したマウスにおいて PEG-L-アスパラギナーゼのクリアランスに影響はみられず、$t_{1/2}$ は 3.5 日を示した。対照的にネイティブ L-アスパラビナーゼで免疫化したマウスにおいて、ネイティブ L-アスパラギナーゼは速やかにクリアランスされた［1］。

3.1　分析法

アスパラギナーゼ活性の定量法、循環血中の L-アスパラギン及び L-グルタミンを含めたアミノ酸枯渇の定量法について、簡潔に要約する。

PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼの免疫原性を決定するために、試験物質投与後の試験動物の血漿中に含まれる抗体量を定量した。

1.　アスパラギナーゼ活性定量

アスパラギナーゼ活性は、37°C での L-アスパラギン酸形成を測定する結合酵素分析法で評価した。最初の段階で、L-アスパラギンは試料に含まれるネイティブ L-アスパラギナーゼ又は PEG-L-アスパラギナーゼによってL-アスパラギン酸に加水分解される。次の段階で、L-アスパラギン酸は α-ケトグルタル酸及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の存在下でオキサロ酢酸へ変換される。最終段階で、オキサロ酢酸と NADH はリンゴ酸デヒドロゲナーゼによってリンゴ酸と NAD になる。本法は最初に Cooney［11］が発表し 、その後 Jayaram［19］が深く特徴づけた。本法は、わずかな変更が加えられたものの、PEG-L-アスパラギナーゼ開発プログラムの数年間にわたって実質的に同じで、20[redacted]年にラット及びイヌの血漿中の定量法として完全にバリデーションされた【CTD 4.2.2.1.1_Study #06-8473 – Report NP39151、CTD 4.2.2.1.2_Study #06-8481 – Report NP39147】。

2.　アミノ酸定量

L-アスパラギン、L-アスパラギン酸及び L-グルタミン量は、アスパラギナーゼ活性定量と同じ原理に基づく結合酵素分析法若しくは蛍光検出器又はタンデム質量分析計（MS/MS）を組み合わせた HPLC を用いて、主に血漿から定量した。採血中及び採血後の *ex-vivo* での L-アスパラギン加水分解を避ける目的で、様々な温度条件又は阻害剤で L-アスパラギナーゼ活性を失活させた。HPLC-MS/MS によるラット及びイヌ血漿中の L-アスパラギン及び L-グルタミン定量法は、20[redacted]年にバリデーションされた【CTD 4.2.2.1.3_Study #06-8938 - Report NP39158】。

3.　抗 PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼ抗体定量

PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼの免疫特性を決定するために、循環血中の抗 PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼ抗体を ELISA で検出した。

3.2　吸収

PEG-L-アスパラギナーゼの i.m.投与における絶対的バイオアベイラビリティーは、マウスで 76.2%【CTD 4.2.2.2.4_Study #7 – Report NP39223 - 4.2.2.2.4】、ラットで約 43.0%～61.0%【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 - Report NP39226】及びイヌで 96.0%～114%【CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 - Report NP39178】であった。単回投与後の全身曝露は、i.v.投与ラット、i.v.及び i.m.投与イ

ヌにおいて 26～500 IU/kg の用量範囲で直線的かつ極めて比例的であり、i.m.投与ラットにおいて同じ用量範囲で直線的かつ過比例的であった【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 – Report NP39226、CTD 4.2.3.1.2_#824-15 – Report NP39217、CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 – Report NP39178、CTD 4.2.3.1.3_#824-16 – Report NP39211】。

アスパラギナーゼ活性は、PEG-L-アスパラギナーゼを 1 週間に 5 回、4 週連続で反復 i.m.投与したラットの血漿中に蓄積し用量依存性を示した【CTD 4.2.3.2.4_Study #3 – Report NP39218】。逆に、PEG-L-アスパラギナーゼを 1 週間に 1 回、2 週連続で i.v.又は i.m.投与したイヌでは、血漿中にアスパラギナーゼ活性の蓄積は認められなかった【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a – Report NP39220、CTD 4.2.3.2.6_Study #4b – Report NP39221】。

ラット及びイヌにおいて、性差に起因すると考えられる PK の大きな差異は認められなかった。

3.3　分布

分子量約 300 kDa の PEG 複合体であることから予想されるとおり、ラット及びイヌで算出された分布容積はそれぞれの種の全血中濃度/結晶中濃度（B/P）比に近く、PEG-L-アスパラギナーゼが体循環外に分布していないことが示された。PEG-L-アスパラギナーゼの組織内分布の評価に利用可能な試験はないが、サルの血液脳脊髄液（CSF）関門を通過しなかった［1］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】一方で、妊娠ウサギに対するネイティブ L-アスパラギナーゼの i.v.投与で、胎盤関門を通過する低い潜在性が認められた［2］。

3.4　代謝及び排泄

血漿中のアスパラギナーゼ活性は、すべての試験動物種において単一指数関数的に減少し、見かけの消失半減期は、マウスで約 3～3.5 日、ウサギで 5.6 日、イヌ及びサルで 6～7 日であった。総クリアランス（CL）又はサルにおける血管外投与後の総クリアランス（CL/F）はすべての試験動物種で非常に低く、少なくともラットとイヌでは用量に依存せず、PEG-L-アスパラギナーゼの PK は、試験した動物種において試験した用量範囲で直線的であった。

PEG-L-アスパラギナーゼの代謝及び排泄に関する試験は行っていない。しかしながら、分子量 70 kDa 以上のタンパク質は、主に肝に取り込まれ、タンパク質分解、免疫系によるクリアランスなどの複数経路で体から排泄されることが報告されている［8］。一方で、PEG 化は、血漿中のプロテアーゼから生体分子をマスキングし、細胞内皮系（Reticuloendothelial System　以下 RES）及び免疫系が仲介するクリアランスを減少させる最も成功した手法の 1 つである［8,23］。PEG-L-アスパラギナーゼにおいても、ネイティブ L-アスパラギナーゼとの比較で $t_{1/2}$ の延長及びより低い CL が認められた。

ヒトにおける試験で、PEG-L-アスパラギナーゼ活性及びタンパク質が PEG-L-アスパラギナーゼを投与された患者の尿中にみられなかったことから、PEG-L-アスパラギナーゼが尿排泄以外でクリアランスされることが示唆された［5］。

最終的に、PEG化タンパク質に含まれるPEGの代謝に関するデータはないが、文献によれば、未変化体の尿排泄が PEG 化タンパク質の分解によって生じた PEG の主要なクリアランス経路になるであろう。未変化体の胆汁排泄は主要な経路ではないと考えられている［39］。

3.5　PK/PD

PEG-L-アスパラギナーゼの作用機序から、すべての試験動物種（ラット、イヌ、ウサギ及びサル）において PEG-L-アスパラギナーゼを投与後、L-アスパラギンの血漿中濃度は定量下限未満に急速に低下し、血漿中に有意なアスパラギナーゼ活性が検出されるまで L-アスパラギンは枯渇したままであった。少なくともサルにおいては、アスパラギナーゼ活性約 0.1 IU/mL が L-アスパラギンの完全枯渇のカットオフ値とみなせるであろう【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 – Report NP39226、CTD 4.2.3.1.2_Study #824-15 – Report NP39217［18］、CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 – Report NP39178、CTD 4.2.3.1.3 Study_#824-16 – Report NP39211［6］、CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179］。PEG-L-アスパラギナーゼを i.m 投与したサルでみられた CSF 中の L-アスパラギンの短時間かつより急速な枯渇は、L-アスパラギンの全身枯渇の結果と考えられた［6］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study– Report NP39179】。

逆に、ラット及びイヌにおいて PEG-L-アスパラギナーゼ単回投与後の L-グルタミン枯渇は認められなかった【CTD 4.2.3.1.2_Study #824-15 – Report NP39217、CTD 4.2.3.1.3 Study #824-16 – Report NP39211】。

概して、PK/PD における強い相関と一致して、L-アスパラギン枯渇は用量依存であり、ネイティブ L-アスパラギナーゼ投与後にみられる枯渇より長時間持続することが示された。

3.6　凍結乾燥剤を用いた PD 試験

凍結乾燥剤のために以降の試験を追加し、バリデーション結果を CTD 4.2.2.1 に示した。

3.6.1　LC-MS/MS によるイヌ血漿中の L-アスパラギン定量法【CTD 4.2.2.1.6_study 15-8758 - Report NP39150】

イヌ血漿中の L-アスパラギン定量に用いるカラムの種類、グラジエント溶出の設定、中間濃度品質管理試料（MQC）濃度を変更したため、LC-MS/MS による定量法の部分バリデーションを行った。本法は既に試験報告書【CTD 4.2.2.1.3_study number 06-8938 - Report NP39158】でバリデーションされていた。本法では、イヌ血漿のタンパク質沈澱後に、陽イオンモードのターボイオンスプレーを備えた LC-MS/MS を用いる。

液剤と凍結乾燥剤の *in vivo* 同等性を証明するために、次の試験を行った。

3.6.2　イヌにおけるオンキャスパー 2 剤形の単回及び 4 週間反復 i.v.投与の比較 PK/PD 試験【CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 - Report NP39227】

イヌにおいて 2 剤形のオンキャスパーの PK、PD 及び抗薬物抗体産生を比較するために、単回及び 4 週間反復 i.v.投与の PK/PD 試験を GLP 準拠で行った。ビーグル犬に単回又は週 1 回（1、15、22、29 及び 36 日；雌雄各 5 例/群）、液剤（ロット番号：[redacted]）又は凍結乾燥剤（ロット番号：[redacted]）0.667 mL/kg 体重を低速ボーラス i.v.投与した。500 U/kg 体重（10000 U/m^2）は、良好な忍容性が予測され、L-アスパラギナーゼ活性が検出可能であり、ヒトにおける推奨用量（10000 U/m^2）に対して 4 倍の曝露マージンを持つ用量として選択された。PK パラメーターは血漿中のアスパラギナーゼ活性を評価し、PD は血漿中のアスパラギン量を HPLC で定量して評価した。

単回投与で投与後 552 時間までの PK/PD、反復投与で投与後 552 時間までの PK/PD 及び抗薬物抗体に関するデータを得た。

凍結乾燥剤反復投与群の雄 1 例（Animal No. 4183）及び液剤単回投与群の雌 1 例（Animal No. 1682）が、初回投与日のそれぞれ 7 日後及び 6 日後に死亡した。重度の急性壊死性出血性肺炎と診断され、試験物質との関連性はないと考えられた。組織病理学的評価から、肺の重度かつ致命的な細菌感染に関連する所見が確認され、試験物質と関連する所見はみられなかった。全群で同じ例数を確保するため、両死亡例の代わりにナイーブ動物 2 例を追加し、PK/PD 解析を行った。

単回投与又は反復投与で両剤形の PK に性差は認められなかった。両剤形は、それぞれ単回投与又は併用投与で、投与後 552 時間まで同等の PK プロファイルを示した。$AUC_{0\text{-}552}$ 及び C_{max} の比較では剤形間の有意差はみられなかった。C_{max} は凍結乾燥剤が液剤よりわずかに低かったが（8%）、投与方法及び投与経路（低速ボーラス i.v.）を考慮すると、許容範囲内かつ技術的限界内であると考えられた。

同等性分析の結果、幾何平均比の両側 90%信頼区間が生物学的同等性を担保する範囲である 0.8～1.25 に完全に収まったことから、両剤形は C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}552}$ の両方で同等であることが示された。

さらに、本試験で収集したイヌの 2 剤形分の PK データを用いて追加の PK モデリング及びシミュレーションを行った結果、ヒトに液剤を投与した場合と同等の AUC 及び C_{max} が得られると予測された（詳細は 3.6.3 項参照）。

3.6.3　ビーグル犬における 2 剤形の PK モデリング及びシミュレーションとヒト急性リンパ性白血病患者における予測［10］

本解析の目的は、イヌで 2 剤形投与後のアスパラギナーゼの母集団 PK モデルを構築し、ALL 患者におけるモデルの予測性能を決定することであった。PD 活性及び抗薬剤抗体に関する試験結果を組み合わせた PK モデルの予測性能は、小児及び成人 ALL 患者に対する凍結乾燥剤の投薬を支持する。

イヌに2剤形をi.v.投与した後の母集団PKモデル【CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 - Report NP39227】は、ALL 患者におけるモデルの予測性能を確認するために構築され、体重に応じたヒトの PK パラメーターに対するアロメトリックコンポーネントスケーリングを含んでいた。共分散分析の結果、凍結乾燥剤は液剤と比較して統計学的に有意である 7.4%大きい分布容積を示した。イヌの母集団 PK モデルのパラメーター推定値を用い、AALL07P4 試験【CTD 5.3.5.1-2_Report NP39441】及び DFCI-11-001 試験【CTD 5.3.5.1-3_Report NP39424】の全患者の体重と投薬量を考慮した最終イヌモデルの PK パラメーターを用いてシミュレーションすることで外部バリデーションを行った。AALL07P4 試験（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00671034）は、1～30 歳で National Cancer Institute（NCI）高リスク前駆 B 細胞 ALL と新たに診断された患者を対象とした臨床試験であった。DFCI-11-001 試験（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01574274）は、ALL 及びリンパ芽球性リンパ腫と新たに診断された児童及び青少年を対象としたオンキャスパー又はもう 1 つの治験薬の安全性及び実施可能性の確認するための臨床試験であった。

両試験において、凍結乾燥剤の単回 i.v.投与後の ALL 患者におけるアスパラギナーゼ活性の予測 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ の中央値は、液剤で予測される中央値のそれぞれ 7%以内及び 5%以内となることから、凍結乾燥剤は液剤と非常に類似した C_{max} 及び AUC の中央値を示すと予測されることが示唆された。

イヌの母集団 PK モデルは、液剤の初回投与における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ の中央値について、AALL07P4 試験でそれぞれ観察値の約 4%以内及び約 45%以内、DFCI-11-001 試験でそれぞれ観察値の約 1%以内及び約 49%以内と予測した。

3.7　結論

非臨床の比較 PK 試験において、PEG-L-アスパラギナーゼで免疫化した動物でも、PEG-L-アスパラギナーゼの血漿中半減期がネイティブ L-アスパラギナーゼと比較して延長することが証明された。ネイティブ L-アスパラギナーゼで免疫化されたマウスでネイティブ L-アスパラギナーゼが速やかに除去されたのと比較して、PEG-L-アスパラギナーゼはより長期的に血漿中の L-アスパラギン枯渇させ、PEG-L-アスパラギナーゼの PK/PD 関係も良好であることが示された。PEG-L-アスパラギナーゼ投与後のラット及びイヌにおいて L-グルタミン枯渇がみられなかったことで、PEG-L-アスパラギナーゼの作用機序の高い特異性が示された。

動物とヒトの PK パラメーターを表 3.7:1 に要約する。PEG-L-アスパラギナーゼの PK は、すべての試験動物種とヒトで試験した用量範囲で線形を示し、クリアランスが低く、高い分子量から予測されるとおり分布容積が小さいと特徴づけられた。分布容積は動物種の血液量の多さの順であったことから、PEG-L-アスパラギナーゼが体循環外に分布しないことが示された。PEG-L-アスパラギナーゼはサルの血液 CSF 関門を通過しなかったが、胎盤関門を通過する低い潜在性がある。

PEG-L-アスパラギナーゼの代謝及び排泄に関する情報はほとんどないが、利用可能な情報から、PEG-L-アスパラギナーゼが尿排泄以外の経路で除去されることが示唆されている。可能性がある

経路にはタンパク質分解及びRESによる血漿からの除去が含まれるが、肝が仲介する代謝及び胆汁への排泄も除外されない。

当初の本剤開発には、PBS pH 7.3 中に PEG-L-アスパラギナーゼ 3750 mL/5mL（750 U/mL）を含む等張滅菌溶液（液剤）が用いられた。凍結乾燥した PEG-L-アスパラギナーゼを用いた追加の非臨床試験は、本凍結乾燥剤を支持するために実施された。GLP準拠で行った比較PK/PD試験【CTD 4.2.2.2.8_15-3297 – Report NP39227】において、液剤及び凍結乾燥剤は、C_{max}及び$AUC_{0\text{-}552}$の幾何平均比の両側 90%信頼区間が生物学的同等性を担保する 0.8～1.25 に完全に収まったことから、C_{max}及び$AUC_{0\text{-}552}$に関して同等であることが示された。

さらに、イヌで剤形変更前後の母集団 PK モデリング及びシミュレーションを行い、その結果は ALL 患者におけるアスパラギナーゼ活性を高度に予測していた。イヌで観察された製剤効果を ALL 患者のアスパラギナーゼ活性対時間プロファイルの予測に用いた結果、凍結乾燥剤のAUC及びC_{max}が液剤と非常に類似した数値になると予測されることが示唆された。

表 3.7:1 PEG-L-アスパラギナーゼを用いた PK/PD 及びトキシコキネティクス試験から得られた PD パラメーター

Parameter	Units	Mouse	Rat	Rabbit	Dog	Monkey[b]	Human[c]
AUC/Dose	(d*IU/mL)/(IU/kg)	0.16	30-41	204	95-144	0.25	0.010
$t_{1/2}$[a]	D	2.2-3.8	2.0-3.3	5.98	4.5-11.7	6.1	5-15
Vss or Vz	mL/kg	Not available	39.3-97.6	Not available	39.5-56.7	Not available	57.0
Vss or Vz	mL[d]	Not available	9.8-24	Not available	395-567	Not available	3420
CL or CL/F	mL/d/kg	0.16	11.5-20.6	2.8	3.1-6.0	4.1	3.4
CL or CL/F	mL/h/kg	0.01	0.48-0.86	0.12	0.13-0.26	0.18	0.14
F (i.m.)	%	76.2	43.0-61.0	Not available	96.0-114	Not available	Not available

a　overall administration routes
b　i m. dosing
c　adults, modified from clinical study ASP-001【CTD 4.3_Report NP39418】
d　assuming 0.02 kg body weight (BW) for mouse; 0.25 kg BW for rats, 10 kg BW for dog and 60 kg BW for humans
F：absolute bioavailability

4.　毒性試験

L-アスパラギナーゼの毒性プロファイルは、長年にわたってよく知られている。PEG-L-アスパラギナーゼとネイティブ L-アスパラギナーゼは、同様の薬理学的特性を有するため、毒性プロファイルは大きく変わらない可能性がある。さらに、PEG-L-アスパラギナーゼの副作用の種類は、L-アスパラギナーゼの副作用の種類とほぼ一致している。

ヒトにおける L-アスパラギナーゼの毒性は、外来タンパク質に対する免疫学的感作（過敏症）及びタンパク質合成阻害に関連する有害事象（肝や膵臓などの高レベルのタンパク質合成阻害に伴う臓器系の障害）によって特徴付けられる。PEG-L-アスパラギナーゼと L-アスパラギナーゼ製剤で生じる副作用の頻度は類似している。しかし、肝毒性、膵毒性、凝固障害、消化器症状及び腎機能障害の発生率は、i.v.投与よりも i.m.投与の方が低率である［25］。

神経毒性（うつ病、嗜眠、倦怠感、傾眠、錯乱、過敏性、興奮及びめまい）は、L-アスパラギナーゼで治療された成人患者に発生するが、児童にはめったに発生しなかった。神経毒性は、脳内の L-アスパラギン及び L-グルタミンの不足からも生じる可能性があることが議論されている。多くの患者で血中アンモニアの上昇がみられるが、アンモニア濃度と毒性との重症度に関する相関性は明確にはなっていない［25］。

最初の詳細な系統的毒性試験は、異なる投与経路（i.v.又は i.p.）で、異なる種（マウス、ラット、イヌ、ネコ及びウサギ）で実施された［20］。

マウス、ラット及びイヌにおいて、PEG-L-アスパラギナーゼを用いて単回投与及び反復投与の毒性試験を実施した。その結果、軽度の毒性変化が確認された。ラットとイヌの一般状態は、大量の PEG-L-アスパラギナーゼ投与においても変化はみられなかった。マウスでは、単回 25000 IU/kg 以上の非常な大量投与においてのみ、自発運動低下及び体重減少が観察された。

ラットとイヌで実施された二つの i.v.単回投与毒性試験では、PEG-L-アスパラギナーゼ投与に関連するわずかな変化がみられた。

L-アスパラギナーゼの遺伝毒性（PEG-L-アスパラギナーゼの Ames 試験及びウサギの L-アスパラギナーゼの染色体異常）及び生殖発生毒性、胎児毒性（*in vitro* 又は *in vivo*）については、限られたデータしかない。

4.1　単回投与毒性試験

4.1.1　ネイティブ L-アスパラキナーゼの単回投与毒性試験

初期の単回投与毒性試験は、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ウサギの i.v.投与にて実施された。LD_{50} は、マウスとラットで 200000 IU/kg、ネコとイヌで 50000 IU/kg である。ウサギの死亡率は一貫しておらず、LD_{50} は 500 又は 1000 IU/kg から 10000 IU/kg の範囲である。5 種すべてで、自発運動低下、食欲不振、倦怠感、体重減少が観察された。また、ネコやイヌにおいて嘔吐がみられた［20］。

4.1.2　PEG-L-アスパラギナーゼの単回投与毒性試験

4.1.2.1　マウス

C3H/HeJ マウスに 5000、10000、25000、40000 又は 100000 IU/kg の用量で i.p.投与により実施された（動物数 4～8 例/用量）。LD_{50} は確立できなかった。死亡は、高用量（25000 及び 100000 IU/kg）投与群の 5 例にみられた。同用量投与群ではわずかな肝毒性が観察された。25000 IU/kg 投与群で投与に関連する変化としては自発運動低下、円背位及び立毛である。体重減少（最大 20%）がすべての投与群で観察された。脾臓（10000 IU/kg の投与量から）と肝臓（25000 IU/kg の投与量から）の重量の減少が発生した［37］【CTD 4.2.3.1.1_Study #1 – Report NP39222】。

4.1.2.2　ラット

Sprague Dawley ラットの 100 及び 500 IU/kg の i.v.投与では、体重増加抑制及び摂餌量の減少など、わずかな変化があった。

より高用量投与では、総タンパク質及び/又はグロブリン（両性）のわずかな減少とコレステロールの増加を引き起こした。MTD は 500 IU/kg である【CTD 4.2.3.1.2_Study # 824-015 – Report NP39217】。

4.1.2.3　イヌ

イヌでは、100 及び 500 IU/kg を i.v.投与したところ、軟便、投与部位の硬結及び流涙（雌のみ）の発生率が増加した。また、雄において網状赤血球と総タンパク質はわずかに減少した。MTD は 500 IU/kg である【CTD 4.2.3.1.3_Study #824-016 – Report NP39211】。

単回投与毒性試験では、動物種間で毒性変化に顕著な違いはなかった。すべての単回投与毒性試験において、観察された毒性変化は、体重の減少、自発運動低下、立毛（マウスのみ）に要約される。脾重量の減少は、本剤の潜在的な免疫抑制作用に起因すると思われる。

4.2　反復投与毒性試験

4.2.1　ネイティブ L-アスパラキナーゼの反復投与毒性試験

4.2.1.1　ラットにおける反復投与毒性試験

雌雄のラットに週 5 日、13 週間、200、800 又は 3000 IU/kg の用量を i.p.投与された。その結果、一般状態、血液学的パラメーターに影響を認めなかった。体重では、雄のみ、体重増加抑制が確認された。病理組織学的には、門脈周囲性肝細胞に脂肪浸潤を伴う軽度の腫大が確認されている［20］。

ネイティブ L-アスパラギナーゼの肝毒性の可能性についてラットで検討された。L-アスパラギナーゼは最大 90 日までの様々な期間、200、800、3200 IU/kg/日の用量を i.p.投与された。血清ビリルビン、アルカリホスファターゼ及びトランスアミナーゼは、対照群に比して有意な差を示さなかった。最高用量群の雄 1 例だけがトランスアミナーゼ活性の急激な増加を示した。病理組織学的には、肝において肝細胞融解、細胞浸潤、細網組織変化及び肝細胞内脂質含有量の明らかな増加が、主に投与後 15 日に 16/36 例で顕著にみられた［9］。

4.2.1.2　イヌにおける反復投与毒性試験

L-アスパラギナーゼを雌雄のイヌに週 5 日、13 週間、200、800 及び 3000 IU/kg の用量で i.v.投与した。

3000 IU/kg 投与において、投与 1～2 時間後に嘔吐が発生し、その後、頻度は漸減し、4 週後に消失した。同用量では、投与初期に体重減少が生じた。生化学及び血液学的検査では、目立った変化はみられなかった。病理組織学的検査では、数例の胸腺萎縮とは別に、1 例の肝細胞に微細滴状の脂肪浸潤が軽度に発現した［20］。

これらの試験に関しては、中和抗体が産生される可能性があるため、結果を慎重に考慮する必要がある。

4.2.2　PEG-L-アスパラギナーゼの反復投与毒性試験

4.2.2.1　2 週間毒性試験

4.2.2.1.1　イヌ

本試験は、ビーグル犬に週 1 回、2 週間、200 及び 1200 IU/kg 用量を i.v.又は i.m.投与した。体重増加は、200 IU/kg 投与では影響を受けなかったが、1200 IU/kg 投与で増加抑制がみられた。酵素活性が血液から消失する投与 3～4 週後には体重増加抑制は消失した。血清アラニントランスアミナーゼ活性の増加は、4 例中 1 例で発生した。本試験条件下では、PEG-L-アスパラギナーゼは、生存、一般状態、摂餌量、飲水量及び尿検査の結果に影響を与えなかった［37］【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a – Report NP39220、CTD 4.2.3.2.6_Study #4b – Report NP39221】。

4.2.2.2　4 週間投与毒性試験

4.2.2.2.1　ラット

雌雄の Wistar ラットに、週 5 回、4 週間、10，30 又は 60 IU/kg の用量を i.p.、100，200，400 IU/kg の用量を i.m.投与した。100、200 及び 400 IU/kg の用量の i.m.投与の雌において、対照群に比較して体重が減少した。脾重量は、対照群よりわずかに低値であった。体重増加遅延、肝重量の低下、軽度の小球性低色素性貧血の結果から、雌ラットは雄よりも PEG-L-アスパラギナーゼに感受性が高いように推察された［37］【CTD 4.2.3.2.5_Study #2 – Report NP39233、CTD 4.2.3.2.4_Study #3 – Report NP39218】。

別の研究では、Sprague Dawley ラットに週 5 回、4 週間、400 IU/kg の用量を i.p.投与したところ、雌雄ともに摂餌量減少及び体重増加抑制を示した【CTD 4.2.3.2.1_Study #8 – Report NP39213】。

4.2.2.3　3 カ月投与毒性試験

4.2.2.3.1　マウス

本試験は、雌雄の Swiss-Webster マウスに 50、200 又は 500 IU/kg の用量を週 1 回、反復（i.p.：13 週間、又は i.m.：17 週間）で投与した。

i.p.投与の最高用量において、門脈周囲性肝細胞空胞変性、脾重量減少が観察された［37］【CTD 4.2.3.2.2_Study #5 – Report NP39210】。

i.m.投与の最高用量では、投与局所を含めて病理学的変化はみられなかった［37］【CTD 4.2.3.2.2_Study #5 – Report NP39210】。

反復投与において、投与期間に関係なく、マウス、ラット、イヌの一般状態に変化はみられなかった。

4.2.3　PEG-L-アスパラギナーゼの病態動物を用いた毒性試験

悪性リンパ腫罹患のイヌに PEG-L-アスパラギナーゼ（毎週 10～30 IU/kg、i.p.投与、N=20）を単独又は化学療法剤（ビンクリスチン、シクロホスファミド、MTX 及びプレドニゾン）と併用して 1 サイクル投与し、その後、PEG-L-アスパラギナーゼ（毎週 30 IU/kg、i.p.投与、N=17）で維持療法を行った。その際に発現した毒性は、大規模な腫瘍崩壊症候群（2 例）、播種性血管内凝固症候群（1 例）、過敏反応（1 例）、嘔吐（3 例）、軟便（3 例）による死亡がみられた［24］。

4.3　毒性変化の動物種間比較

試験で使用した各種動物で観察された主な毒性変化を表 4.3:1 に要約した。全動物種（ラット、マウス、イヌ）において、L-アスパラギナーゼと PEG-L-アスパラギナーゼとの毒性変化は、非常に類似している。最も頻度の高いものは、摂餌量減少と体重減少又は体重増加抑制であった。また、マウスとラットを用いたいくつかの試験では、脾重量減少がみられた。肝細胞の脂肪浸潤や水疱性細胞質変化が観察されたが、細胞壊死や肝機能の著しい変化はみられなかった。また、嘔吐が、L-アスパラギナーゼを投与したイヌでのみ発生した。

結論として、PEG-L-アスパラギナーゼは、L-アスパラキナーゼと同様に、強い毒性のある物質とは考えられず、ヒトへの適用は可能であると考えられる。

表 4.3:1 PEG-L アスパラギナーゼの主な毒性変化の動物種間比較

Effect	Single dose						Repeat-dose				
	Mouse		Rat		Dog		Mouse	Rat		Dog	
	L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp	L-asp	PEG-L-asp
Decreased motility	+	+	+		+						
Decreased food consumption	+		+	+	+				+		
Decreased weight/ Body weight Gain	++	++	++	+	++		+	+	+	++	+
Soft stool						+					
Emesis					+					+	
Haematology						↓reticulo-cytes			Mild anaemia		
Spleen weight decrease		+					+		+		
Liver											
Weight decrease		+							+		
Transaminases									↑AST	↑AST ↑ALT	↑ALT
Synthesis				↓total protein ↓globulin ↑cholesterol		↓total protein			↑phosphatase alkaline ↓total protein		
Histopathology		a					b	c		d	
Thymus atrophy										+	

Histopathology:

a minor changes without hepatocytes necrosis

b hydropic cytoplasmatic changes

c　hepatocytes swelling and fatty infiltration
d　hepatocytes fatty infiltration

4.4　遺伝毒性試験

ICH S6（R1）（CPMP/ ICH / 302/95）によると、医薬品に対して標準的に実施されている遺伝毒性試験は、バイオ医薬品には適用されていない。しかし、PEG-L-アスパラギナーゼについては、Ames 試験を実施した。

4.4.1　Ames 試験

PEG-L-アスパラギナーゼは、*S. typhimurium* の 4 菌株（TA97、T98、TA100 及び TA102）を用いて、75 IU/plate の濃度で Ames 試験を行ったところ、代謝活性化の有無にかかわらず変異原性を示さなかった。なお、陽性対照物質は設けていない【CTD 4.2.3.3.1.1_Study 49515 – Report NP39215】。

4.4.2　染色体異常試験

L-アスパラギナーゼを投与した妊娠ウサギ（母子）の核型を確認し、正常な結果が示された［2］。

in vitro 試験において、L-アスパラギナーゼは、培養ウサギ白血球において、核型を変化させることなく、有糸分裂数を減少させた。

結論として、遺伝毒性/染色体異常誘発性のリスクは、非常に低いと判断される。

4.5　がん原性試験

PEG-L-アスパラギナーゼの適用疾患を踏まえ発がん性試験は必要ではないため実施していない。

PEG-アスパラギナーゼは DNA と相互作用する又は変異細胞の増殖を誘導しないと考えられている。

4.6　生殖発生毒性試験

PEG-L-アスパラギナーゼの生殖発生毒性に関する試験は実施していない。

L-アスパラギナーゼを用いた胚毒性試験は、ラット及びウサギにおいて催奇形性が認められている。治療域の用量で複数の奇形と胚死が観察された。生殖能力及び出生前後の発達への影響については、検討されていない。

4.6.1　受胎能力

生殖能力に関する試験は、雌雄ともに行われていない。なお、反復投与毒性試験において生殖器や性ホルモンへの障害は検出されず、報告もされていない。

4.6.2　催奇形性

4.6.2.1　*In vitro* 試験

L-アスパラキナーゼは，ラットの培養胚の頭部形成期（9.5 日）に催奇形性を示すことがわかっている。培養液に L-アスパラギナーゼを 1.5 IU/mL 添加した 9.5 日目の胚は、脳、眼、顔及び体幹の奇形とともに成長・発育の遅延を示した。神経外胚葉の変化が組織学的に観察され、頭頂部の強い血管拡張がみられた。10.5 日目の処理では、対照群に比較して成長とタンパク質含有量にわずかな差が生じた［29］。

その後の研究では、0.05～1.5 IU/mL の L-アスパラギナーゼを 10.5 日目と 11.5 日目の両胚期に投与したところ、内臓の卵黄嚢内胚葉細胞の変形が観察された。これらの観察結果から，L-アスパラギナーゼの二重の催奇形性メカニズムが想定された。それは、主に若い胚（卵黄嚢に侵入する前）に直接作用するものと，卵黄嚢を介して作用するものである［30］。

4.6.2.2　*In vivo* 試験

4.6.2.2.1　ラット

In vivo 試験における L-アスパラギナーゼの催奇形性については、いくつかの研究が行われている。

ある研究では、雌のラットに 300、1000、3000 及び 10000 IU/kg を妊娠 6 日目から 15 日目まで i.v.投与した。300 IU/kg が無影響量（NOEL）であった［20］。

観察された胚毒性及び催奇形性は明らかに用量相関性を示した。10000 IU/kg ではすべての胎児が吸収された。胎児奇形としては、小眼球症、脊椎奇形、胸郭列及び exenteria であった。

別の研究では、妊娠中の Sprague-Dawley ラットに、妊娠 7 日目と 8 日目に L-アスパラギナーゼの 100 及び 1000 IU/kg を i.v.投与した。ラット胎児に奇形やその他の影響は認められなかった［2］。

4.6.2.2.2　ウサギ

L-アスパラギナーゼの胚毒性及び催奇形性効果の種差については、Adamson［2］により報告されている。ニュージーランドウサギの妊娠 8 日目と 9 日目に 50 又は 100 IU/kg を i.v.投与したところ、生存可能な先天性奇形を持つ胎児がみられた。

L-アスパラギナーゼは、妊娠 8 日目に胎盤を通過し（卵黄嚢に存在）、したがって、形態形成中の胚で起こる生化学的事象に直接干渉する可能性があることも証明された。

以上の催奇形性試験において、ラットの結果が Adamson［2］と Lorke［20］とで異なっていた。この違いは、以下のように説明できる。投与量が、100 及び 1000 IU/kg［2］と 300、1000、3000 及び 10000 IU/kg［20］と異なり、投与期間が、それぞれ妊娠 7～8 日と 6～15 日と異なっていた。さらに、Lorke は NOEL を 300 IU/kg とした。

以上の結果を総合判断すると、一貫して、L-アスパラギナーゼは、動物における胚毒性／催奇形性の可能性があるものと考えられる。

4.7　幼若動物を用いた毒性試験

PEG-L-アスパラギナーゼは小児に適応されるが、幼少の動物を用いた研究は行われていない。しかし、L-アスパラギナーゼが数十年にわたって臨床現場で使用され、患者のほとんどが成人ではなく小児であったことを考えると、これは許容できることである。

Narta［25］によると、神経毒性（抑うつ、嗜眠、疲労、傾眠、混乱、過敏性、興奮及びめまい）は、PEG-L-アスパラギナーゼを使用した成人患者にみられるが、小児にはほとんどみられない。これは、本申請承認資料の【2.7.4 臨床安全性の概要】で報告された内容と一致している。

4.8　その他の毒性試験

4.8.1　局所刺激性試験

PEG-L-アスパラギナーゼの i.m.投与後の局所刺激性について、マウスを用いた 17 週間反復投与毒性試験で検討した【CTD 4.2.3.2.2_Study #5 – Report NP39210】。投与局所の病理学的検査により，PEG-L-アスパラギナーゼの忍容性が確認された。

4.8.2　免疫原性試験

PEG-L-アスパラギナーゼ（約 525 IU/kg を i.p.又は i.m.投与）とネイティブ L-アスパラギナーゼ（約 525 IU/kg を i.p.投与）との免疫原性の比較試験を Swiss-Webster マウスで行った。

3 週目までに、ネイティブ L-アスパラギナーゼで免疫したマウスは、抗体の存在を示した。対照的に、PEG-L-アスパラギナーゼを i.p.又は i.m.で投与したマウスの抗体価は、試験期間中ずっと 1:50 以下であった。これは、L-アスパラギナーゼを PEG で修飾することで、酵素の免疫原性が明らかに完全に失われたことが示唆された【CTD 4.2.3.7.2.1_Study #29 – Report NP39219】。

PEG-L-アスパラギナーゼの免疫原性が L-アスパラギナーゼと比較して低下していることは、C3H/HeJ 及び BDF1 マウスでも報告されている［1］。

4.8.3　PEG の毒性試験

CHMP 安全作業部会の回答（EMA/CHMP/SWP/647258, 2012）によると、いくつかの PEG 化タンパク質で空胞化した細胞の存在が確認されている。

PEG 化タンパク質を動物に繰り返し非経口投与すると、様々な臓器のマクロファージや組織球の細胞空胞化がみられる場合がある。

マクロファージや組織球の空胞化は、異物を除去するための正常な生理反応と考えられているが、いくつかの PEG 化タンパク質が以下のような細胞内の空胞化を引き起こす理由は、まだ解明されていない。

1. 脈絡叢上皮細胞（上衣細胞）、40 kDa 以上の分子で PEG 化されたタンパク質の反復投与毒性試験で観察された。免疫組織化学的検査において、細胞質の空胞が PEG を含んでいることを確認している。
2. 腎尿細管細胞［欧州公開評価報告書（EPAR）Cimzia®; EPAR SomaVert; Bendele, 1998］。

このような空胞の存在について、PEG-L-アスパラギナーゼをラットに 5 回/週、4 週間投与反復投与した 3 試験【CTD 4.2.3.2.5_Study #2 – Report NP39233、CTD 4.2.3.2.4_Study #3 - Report NP39218、CTD 4.2.3.2.1_Study #8 – Report NP39213】及びマウスに 1 回／週、13 又は 17 週間反復投与した 1 試験【CTD 4.2.3.2.2_Study #5 – Report NP39210】において検討している。

それら 4 試験の標準的病理組織学的検査において、脳及び腎臓に変化は認められなかった。

以上の結果を踏まえ、細胞の空砲化については以下のような結果となる。

- 脈絡叢上皮細胞（上衣細胞）：脳には病変が認められなかった。
- 腎尿細管細胞：腎臓は標的臓器として同定されなかった。
- マクロファージや組織球の空胞化：これらの変化は確認されなかった。

結論として、脈絡膜上皮細胞や腎尿細管細胞での細胞空胞化は予想されない。もし、PEG-L-アスパラギナーゼが上皮細胞の空胞化を誘発しても、血液 CSF 関門を通過しないため、脈絡膜上皮細胞への影響は考えられない。

4.8.4　分解生成物及び不純物の毒性試験

CPMP/ICH/2887/99 Rev 1 Safety によると該当しない。

4.8.5　PEG-L-アスパラギナーゼ凍結乾燥剤に関する毒性試験

以下の毒性試験は、従来の液剤と現在の凍結乾燥剤との *in vitro* 及び *in vivo* 試験で比較し、その同等性を実証するために実施した。

4.8.5.1　マウス足底内投与における 2 剤の毒性比較試験【CTD 4.2.3.6.1_Study 59000193 – Report NP39209】

本試験の目的は、本薬の液剤に 5%精製白糖（凍結乾燥剤の賦形剤）を添加することで、マウスの左後肢への皮下投与後の行動異常の誘発性を評価することであった。被検物質は、被験物質 A（5%精製白糖を含むオンキャスパー液剤）、被験物質 B（オンキャスパー液剤）、被験物質 C（25%マンニトール含有 PBS）及び被験物質 D（25%精製白糖含有 PBS）とし、陽性対照として 5%ホルマリン、陰性対照として PBS を用いた。

評価項目は、投与した足を噛む、舐める、振る、たじろぐなどのマウスの行動異常を、投与後 10 分間、1 分単位で測定した。さらに、投与足の腫れや赤みの度合いを個別に評価した。

陽性対照群では、投与足の腫脹と明らかな行動異常が観察された。被検物質の C 及び D 投与群では、0〜10 分の間を通して持続的な行動異常を示し、60 分後には肉球の腫れが生じた。

被検物質 A 及び B 投与群は、陰性対照群に比して、マウスに有意な異常行動及び足の腫脹を生じさせなかった。

4.8.5.2　イヌ及びヒト全血における血液適合性試験【CTD 4.2.3.7.7.1_Study 15-7530 – Report NP39212】

本試験は、2 種類の剤形の溶血性を調べるために実施した。この試験の目的は、オンキャスパーの液剤と凍結乾燥剤 のイヌとヒトの血液に対する溶血性を調べることである。各製剤をイヌ及びヒトの全血を 1：4 の割合でそれぞれ混合した後、37°C で 20 分間インキュベートし、ヘモグロビンの測定により溶血の有無を確認した。4 相からなる 2 回（n=2）の独立した分析の結果、オンキャスパー 750 IU/mL 濃度において、両剤形はヒト全血に対して血液適合性への影響は認められなかった。イヌ全血を用いた結果では、溶血作用は認められなかったが、溶媒対照群の処理がプロトコール基準を満たさなかった（水処理の技術的問題）ことから評価することができなかった。

4.8.5.3　免疫原性評価：比較 PK/PD 試験イヌにおけるオンキャスパー 2 剤形の単回 i.v.投与後及び 4 週間反復投与の比較 PK/PD 試験【CTD 4.2.2.2.8_Study 15-3297 - Report NP39227】

GLP 準拠の 15-3297 試験は、イヌにおいて 2 剤形のオンキャスパーの PK、PD 及び抗薬物抗体産生を比較するために行った単回及び 4 週間反復 i.v.投与の PK/PD 試験であった。

抗薬物抗体（ADA）の評価から、投与された動物から分析された試料において、ADA 反応（ADA の産生又は増加）が中等度の発生率であったことが示されており、群間に明白な違いはないようにみられた。ADA の産生又は増加は、単回投与群（液剤 1/10 例、凍結乾燥剤 3/10 例）及び反復投与群（液剤 3/10 例、凍結乾燥剤 1/10 例）で検出可能であった。

すべての試料で中和抗体（NAb）を評価した結果、10%の試料（10/111 例：投与前 2 例、22 日後 5 例、36 日後 3 例）が、ADA の中和に陽性であった。22 日後又は 36 日後で陽性を示した 8 例のうち、1 例はグループ 1（単回投与、液剤）、1 例はグループ 2（単回投与、凍結乾燥剤）、3 例はグループ 3（反復投与、液剤）、3 例はグループ 4（反復投与、凍結乾燥剤）であった。総合すると、4 例は液剤投与後に中和抗体陽性を示し、4 例は凍結乾燥剤投与後に陽性を示した。

要約すると、免疫原性について、オンキャスパー液剤又はオンキャスパー凍結乾燥剤の 500 IU/kg BW 用量では差はみられなかった。

4.8.5.4　オンキャスパー凍結乾燥剤の賦形剤として添加の精製白糖の毒性評価

凍結乾燥剤と液剤の原薬の製造工程での原材料は同じである。凍結乾燥剤の製造工程は、あらかじめ製剤化された原薬に精製白糖を添加した後、滅菌ろ過、無菌充填を行う。精製白糖の毒性

は、参考文献［34］【CTD 4.2.3.7.7.2_Report NP39448】に記載されている毒性学的リスクアセスメントの枠内で公開されたデータに基づいて評価した。要約すると、IgG の i.v.投与（IVIG）後の急性腎不全を除いて、市販されている精製白糖含有製品による健康への副作用は観察されなかった。IVIG 製品に含まれる精製白糖による腎障害の閾値は 1 g/kg BW とされ［40］、オンキャスパーの凍結乾燥剤を用いた臨床試験用量に対して 160 倍を超える安全マージンに相当する。

オンキャスパー凍結乾燥剤は、成人及び小児の患者に、指示された用量で i.v.又は i.m.に投与する場合、精製白糖によるリスクはないと考えられる。

4.8.5.5　オンキャスパー2 剤形の製造工程関連不純物の遺伝毒性評価

オンキャスパーの初期液剤及び現在の凍結乾燥剤の原薬や最終製剤に残留する可能性のある製造工程関連不純物の健康被害について、ICH M7 ガイドラインに従って遺伝毒性及び変異原性を評価した。本目的のため、*in vitro* 及び *in vivo* 試験による毒性学的データが考慮された。実験的証拠がない場合、変異原性に関する警告部分構造の発生を、ICH M7 ガイドラインに準拠し、Lhasa Ltd.（Leeds、UK）の Derek（バージョン 4.1.0）及び Sarah（バージョン 1.2.0）を用いて *in silico* で調査した。その結果は、報告書［33］【CTD 4.2.3.7.6.1_Report NP39449】にまとめられている。

実験的、毒性学的データが得られているすべての製造工程関連不純物及び反応中間体は、非遺伝毒性又は非発がん性であることが示された。反応中間体又は原材料に含まれる不純物に由来する PEG 誘導体など、実証的証拠を欠くすべての化合物について、*in silico* 解析を行ったところ、遺伝毒性や変異原性に関する構造的な警告は認められなかった。

したがって、オンキャスパーの評価された製造工程関連不純物について変異原性の可能性はないと考えられる。

4.9　毒性試験総括

マウス、ラット及びイヌに対して、単回又は反復投与毒性試験を実施した。その結果は、次のように要約できる。

- 摂餌量及び体重の減少
- 脾重量のわずかな減少（血中リンパ球への影響なし）
- 肝細胞の脂肪浸潤（細胞壊死又は肝機能異常の発生なし）

PEG-L-アスパラギナーゼの遺伝毒性/染色体異常誘発性に関する情報はほとんどなかった。Ames スポットテストから入手可能なデータでは、遺伝毒性を有していなかった。L-アスパラギナーゼは妊娠ウサギとその胎児に核型異常を誘発しなかった。

定型的生殖発生毒性試験は、PEG-L-アスパラギナーゼで実施しなかった。しかしながら、L-アスパラギナーゼのラット及びウサギの *in vivo* 及び *in vitro* の試験において、胚毒性/催奇形性を有することを示した。したがって、妊娠中は PEG-L-アスパラギナーゼを使用してはならない。

i.m.投与されたマウスでは、筋肉耐性は 17 週間良好であった。

オンキャスパーの凍結乾燥剤について実施された追加の非臨床試験は、凍結乾燥剤の賦形剤である 5%精製白糖の添加が、マウスの局所忍容性に影響を及ぼさないことを示した。750 IU/mL の最終濃度でのヒト全血に対する血液適合性を液剤及び凍結乾燥剤について検討したが、両剤形とも影響は観察されなかった。免疫原性プロファイル変化の兆候はなかった。賦形剤として添加された精製白糖の毒性評価では、添加用量を i.v.又は i.m.投与しても危険性がないことが示された。

さらに、オンキャスパーの製造工程関連不純物の遺伝毒性について、液剤及び凍結乾燥剤で評価したが、変異原性を示さなかった。

結論として、オンキャスパーは、急性リンパ芽球性白血病患者に安全に投与できる、既知の毒性プロファイルを持つ物質である。

5.　総括及び結論

オンキャスパーは、*E. coli* に由来する L-アスパラギナーゼ 3750 IU に相当する PEG-L-アスパラギナーゼを唯一の有効成分として含む注射剤である。PEG-L-アスパラギナーゼは、数十年にわたって臨床使用されており、よく知られた物質とみなされるであろう。

L-アスパラギナーゼの PEG 化は、L-アスパラギンを L-アスパラギン酸とアンモニアに切断し血漿中のアスパラギンを枯渇させる活性に影響を与えない。L-アスパラギナーゼによるアスパラギン枯渇は、正常細胞と異なりアスパラギンを合成できないリンパ芽球性腫瘍細胞の生存を阻止する興味深い活性であることが裏付けられた。結果として、L-アスパラギナーゼは白血病細胞以外の正常細胞を保護しながら白血球細胞を攻撃する特異的化学療法剤となる。アスパラギンの持続的枯渇は、0.1 IU/mL を超える L-アスパラギナーゼ活性で達成できる。

L-アスパラギナーゼを PEG 化することでネイティブ L-アスパラギナーゼよりクリアランスが低くなり酵素活性の半減期が延長することから、投与量の減量、投与間隔を延長する投与計画が可能となり、さらに免疫原性及び抗薬物抗体に対する免疫反応性が減少した。

血漿中のアスパラギナーゼ活性に続いて、PEG-L-アスパラギナーゼの薬物動態は、ヒトを含むすべての動物種において数日程度の長い半減期につながる遅いクリアランスによって特徴づけられることが確認された。分布容積はそれぞれの種の血液量に近いことから、PEG-L-アスパラギナーゼが体循環外に分布しなかったことが示された。PEG-L-アスパラギナーゼはサルの血液 CSF 関門を通過せず、胎盤関門を通過する低い潜在性がある。

PEG-L-アスパラギナーゼの代謝及び排泄に関する情報はほとんどないが、利用可能な情報は、PEG-L-アスパラギナーゼが尿排泄以外の経路で除去されることを示唆している。可能性がある経路にはタンパク質分解及び RES による血漿からの除去が含まれるが、肝が仲介する代謝及び胆汁への排泄も除外されない。文献で示唆されるように、タンパク質複合体の分解によって放出された PEG は、未変化体の尿排泄が主要な経路と考えられ、胆汁による排泄は動物及びヒトにおいて主要な経路ではないと予想される。

PEG-L-アスパラギナーゼをマウス、ラット及びイヌに対して、単回又は反復投与毒性試験を実施した結果、主な変化は次のように要約される。

- 摂餌量及び体重の減少
- 脾重量のわずかな減少（血中リンパ球への影響なし）
- 肝細胞の脂肪浸潤（細胞壊死又は肝機能異常の発生なし）

PEG-L-アスパラギナーゼの遺伝毒性/染色体異常誘発性に関する情報はほとんどなかった。Ames スポットテストから入手可能なデータでは、遺伝毒性を有していなかった。L-アスパラギナーゼは妊娠ウサギとその胎児に核型異常を誘発しなかった。

定型的生殖発生毒性試験は、PEG-L-アスパラギナーゼでは実施しなかった。しかしながら、L-アスパラギナーゼのラット及びウサギの *in vivo* 及び *in vitro* の試験において、胚毒性/催奇形性を有することが示された。したがって、妊娠中は PEG-L-アスパラギナーゼの使用は禁忌である。

本製造販売承認申請に係る臨床試験の被験者は小児患者が大半であったことから、幼若動物を用いた非臨床毒性試験の未実施は、ヒトへの外挿性の観点から許容可能と考えられる。また、Narta［25］は、成人よりも小児の方が、主に中枢神経系有害事象の発生が低いことを報告している。

i.m.投与されたマウスでは、投与局所筋肉機能は 17 週間良好であった。

PEG 化されたタンパク質の長期投与により誘発される典型的病変は、ラット 4 週間反復投与毒性試験及びマウス 17 週間反復投与毒性試験において観察されなかった。

オンキャスパーは開発当初、液剤であった。その後、安定性を向上させ、36 カ月間安定な凍結乾燥剤が開発された（オンキャスパー液剤の保存期間 8 カ月）。そこで、凍結乾燥剤への剤形変更の妥当性を確認するために、両製剤に関する分析及び非臨床の比較試験を実施した。

オンキャスパーの凍結乾燥剤について実施された追加の非臨床試験では、凍結乾燥剤の賦形剤である 5%精製白糖の添加は、マウスの局所忍容性に影響を及ぼさなかった。ヒト全血に対する血液適合性を液体及び凍結乾燥剤について検討したが、両剤形とも影響は認められなかった。イヌを対象とした薬物動態の比較試験により、液体と凍結乾燥剤を単回及び複数回投与後 PK の同等性に関する明らかな証拠が得られた。幾何平均値の比の両側 90%信頼区間は、生物学的同等性を示す従来のマージン（0.8～1.25）に完全に収まっており、両剤形は C_{max} 及び AUC_{0-552} に関して同等であることが示された。イヌの薬力学関連の測定値には明らかな群間差はなかった。

オンキャスパー液剤及び凍結乾燥剤の溶解液を用いた比較 PK/PD 試験を、主要な臨床投与経路である i.v.投与で行った（本剤は海外では i.m.投与も承認用法となっている）。以前に i.v.又は i.m 投与で行った非臨床 PK/PD 試験では、複数の用量レベルで臨床的曝露量にまたがっていた（Study 04-3082）。比較データは、イヌにおけるオンキャスパーのバイオアベイラビリティーは i.m 投与の用量と関係なく約 100%であることを一貫して示し、i.v.投与においても同等の血漿曝露（C_{max} 及び AUC_{0-inf}）及び消失半減期が示された【CTD 4.2.2.2.3_Study 04-3082 – Report NP39178】。包括的な分析の比較データから、凍結乾燥剤の溶解液が液剤と非常に同等性が高いことが証明され、オンキャスパー液剤（i.m.及び i.v.投与）又は凍結乾燥剤の溶解液（i.v.投与）が、総じてイヌにおいて同等の曝露であることが示唆された。イヌにおいても凍結乾燥剤の溶液が同等の曝露を与えることが合理的に推測できたことから、i.m.投与による追加の非臨床 PK 試験は行わなかった。

精製白糖の毒性と遺伝毒性の評価は、液剤と凍結乾燥剤のいずれにおいてもリスクがないと予想されることを示した。

包括的な分析及び非臨床の同等性評価に加えて、剤形変更前後の母集団 PK モデリング及びシミュレーションをイヌで行った。凍結乾燥剤を投与したイヌにおける PK を用いて、ALL 患者における濃度対時間プロファイルを予測したところ、凍結乾燥剤は AUC 及び C_{max} において液剤と非常に類似していることが予想された。

結論として、非臨床試験において、凍結乾燥剤は薬剤の非臨床 PK、PD 及び抗薬物抗体産生に影響を及ぼさないことが示され、製剤の安全性及び有効性にも影響を及ぼさないことが示された。凍結乾燥剤は 3750 U/バイアルの凍結乾燥粉末として供給され、5.2 mL の注射用水で溶解することで、PEG-L-アスパラギナーゼ 750 U/mL の PBS 溶液となる。L-アスパラギナーゼ 1 U は、pH 7.3 及び 37°C で 1 分あたり 1 μM のアンモニアを遊離させるために必要な酵素量と定義されている。U（ユニット）と IU（国際濃度）は同じ定義であり双方使用可能である。

本剤は毒性プロファイルが既知の薬剤であり、本剤が対象とする小児及び成人を含めた ALL 患者に安全に投与することが可能である。

6. 参考文献一覧

1) Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR Jr, Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, Viau AT, Davis FF. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. Cancer Biochem Biophys. 1984 Jun;7(2):175-86 [PE0150533]

2) Adamson RH, Fabro S, Hahn MA, Creech CE, Whang-Peng J. Evaluation of the embryotoxic activity of L-asparaginase. Arch Int Pharmadyn Ther. 1970 Aug;186(2):310-20 [PE0150549]

3) Armstrong JK Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ, Garratty G. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukaemia patients. Cancer. 2007 Jul 1;110(1):103-11 [PE0151448]

4) Aslanian AM, Fletcher BS, Kilberg MS. Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce l-asparaginase resistance in MOLT 4 leukaemia cells. Biochem J. 2001 Jul 1;(Pt 1):321-8 [PE0151449]

5) Asselin BL, Whitin JC, Coppola DJ, Rupp IP, Sallan SE, Cohen HJ. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. J Clin Oncol. 1993;11(9):1780-6 [PE0150554]

6) Berg SL, Balis FM, McCully CL, Godwin KS, Poplack DG. Pharmacokinetics of PEG-L-asparaginase and plasma and cerebrospinal fluid L-asparagine concentrations in the rhesus monkey. Cancer Chemother Pharmacol. 1993;32(4):310-4 [PE0150557]

7) Broome JD. Evidence that the L-asparaginase of guina pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. J Exp Med. 1963 Jul;118:121-48 [PE0151451]

8) Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)– protein conjugates. Advanced Drug Delivery Reviews. 2003;55,1261-77 [PE0150558]

9) Celle G, Dodero M, Pannacciulli I. The liver damaging effect of L-asparaginase−An experimental study of chronic toxicity. Eur J Cancer. 1973 Jan;9(1):55-7 [PE0151453]

10) [redacted] [NP39450]

11) Cooney DA, Capizzi RL, Handschumacher RE. Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man. Cancer Res. 1970 Apr;30(4):929-35 [PE0151454]

12) Cooney DA, King VD, Cable RG, Taylor B Jr, Wodinsky I. L-asparagine synthetase in serum as a marker for neoplasia. Cancer Res . 1976;36(9):3238-45 [PE0151455]

13) EMA/CHMP/SWP/647258 -2012 - CHMP Safety working party's response to PDCO regarding the use of PEGylated products in the paediatric population [PE0151479]

14) Ettinger AR. Pegasparaginase (Oncaspar). J. Pediatr Oncol Nurs. 1995 Jan;12(1):46-8 [PE0150560]

15) Fichtner I, Paal K, Borgmann A, Badiali L, Wurm R, Henze G. Chemo and radiation sensitivity of xenografted acute lymphoblastic leukaemias correlation to the expression of multidrug resistance proteins. Anticancer Res. 2003;23(3B):2657-64 [PE0151457]

16) Fu CH, Sakamoto KM. PEG-asparaginase. Expert Opin. Pharmacother. 2007;8(12):1977-84 [PE0150561]

17) Haley EE, Fischer GA, Welch AD. The requirement for L-asparagine of mouse leukaemia cells L5178Y in culture. Cancer Res. 1961 May;21:352-6 [PE0151458]

18) Ho DH, Wang CY, Lin JR, Brown N, Newman RA, Krakoff IH. Polyethylene glycol-L-asparaginase and L-asparaginase studies in rabbits. Drug Metab Dispos. Jan-Feb 1988;16(1):27-9 [PE0151770]

19) Jayaram HN, Cooney DA, Jayaram S, Rosenblum L. A Simple and rapid method for the estimation of L-asparaginase in chromatographic and electrophoretic effluents: comparison with other methods. Anal Biochem. 1974 Jun;59(2):327-46 [PE0151459]

20) Lorke D, Tettenborn D. Experimental studies on the toxicity of crasnitin in animals. Recent Result Cancer Res. 1970;33:174-80 [PE0150563]

21) MacEwen EG, Rosenthal RC, Fox LE, Loar AS, Kurzman ID. Evaluation of L-asparaginase: polyethylene glycol conjugate versus native L-asparaginase combined with chemotherapy. A randomized double-blind study in canine lymphoma. J Vet Intern Med. Jul-Aug 1992;6(4):230-4 [PE0150564]

22) Machelle MS. 1994 Biotechnology drug approvals. American Pharmacy 1995 Mar;NS35(3):12-3 [PE0150566]

23) Markovsky E, Baabur-Cohen H, Eldar-Boock A, Omer L, Tiram G, Ferber S, Ofek P, Polyak D, Scomparin A, Satchi-Fainaro R. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. J Control Release. 2012 Jul;161(2):446-60 [PE0151481]

24) MacEwen EG, Rosenthal R, Matus R, Viau AT, Abuchowski A. A preliminary study on the evaluation of asparaginase. Polyethylene glycol conjugate against canine malignant lymphoma. Cancer. 1987 Jun 15;59(12):2011-5 [PE0150565]

25) Narta UK, Kanwar SS, Azmi W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukaemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2007 Mar;61(3):208-21. Epub2006 Oct 2 [PE0150568]

26) Pinheiro JP, Boos J. The best way to use asparaginase in childhood acute lymphatic leukaemia−still to be defined? Br J Haematol. 2004 Apr;125(2);117-27 [PE0151471]

27) Prager MD, Bachynsky N. Asparagine synthetase in asparaginase resistant and susceptible mouse lymphomas. Biochem Biophys Res Commun. 1968 Apr 5;31(1):43-7 [PE0151460]

28) Prager MD, Bachynsky N. Asparagine synthetase in normal and malignant tissues: correlation with tumor sensitivity to asparaginase. Arch Biochem Biophys. 1968 Sep 20;127(1):645-54 [PE0151461]

29) Sanfeliu C, Nebot-Cegarra J, Domenech-Mateu JM. Teratogenic effects of L-asparaginase in rat embryos in vitro. Acta Anat (Basel) 1986;125(3):152-60 [PE0151467]

30) Sanfeliu C, Nebot-Cegarra J, Calvet S, Domenech-Mateu JM. Effects of L-asparaginase on rat embryonic development and yolk sac membrane in vitro. Teratology. 1989 Oct;40(4):375-86 [PE0151466]

31) Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, Stigter RL, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Slater R, Pieters R. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. Blood. 2003 Apr 1;101(7):2743-7. Epub 2002 Nov 14 [PE0151468]

32) Teske E, Rutteman GR, van Heerde P, Misdorp W. Polyethylene glycol-L-asparaginase versus native L-asparaginase in canine non-Hodgkin's lymphoma. Eur J Cancer 1990;26(8):891-5 [PE0150585]

33) [redacted] [NP39449]

34) [redacted] [NP39448]

35) Vadlamudi S, Padarathsingh M, Bonmassar E, Waravdekar V, Goldin A. Studies on neutralization of L-asparaginase activity in vitro and in vivo. Cancer. 1971 Jun;27(6):1321-7 [PE0150574]

36) Vadlamudi S, Krishna B, Reddy VV, Goldin A. Schedule-dependent therapeutic synergism for L-asparaginase and methotrexate in leukemic ((L5178Y) mice. Cancer Res. 1973 Sep;33(9):2014-9 [PE0150573]

37) Viau AT, Abuchowski A, McCoy JR, Kazo GM, Davis FF. Toxicologic studies of a conjugate of asparaginase and polyethylene glycol in mice, rats, and dogs. Am J Vet Res. 1986 Jun;47(6):1398-401 [PE0151470]

38) Vladamudi S, Padarathsingh M, Waravdekar VS, Goldin A. Factors influencing the therapeutic activity of L-asparaginase (NSC 109229) in leukemic (L5178Y) mice. Cancer Res. 1970 May;30(5):1467-72 [PE0150575]

39) Webster, Didier E, Harris P, Siegel N, Stadler J, Tilbury L, Smith D. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. Drug Metab Dispos. 2007 Jan;35(1):9-16 [PE0150576]

40) Zhang R, Szerlip HM. Reemergence of sucrose nephropathy: acute renal failure caused by high-dose intravenous immune globulin therapy, South Med J. 2000 Sep;93(9):901-4 [PE0151473]