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）

2.6.4　薬物動態試験の概要文

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　まとめ 8
1.1　PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014） 8
1.2　PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014_[redacted]；液剤） 8
1.3　PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014_[redacted]；凍結乾燥剤） 13
2.　分析法 14
2.1　PEG-L-アスパラギナーゼの活性定量法 14
2.2　結合酵素アッセイによるラット血漿中のオンキャスパー（PEG-L-アスパラギナーゼ）定量法のバリデーション結果【CTD 4.2.2.1.1_Study #06-8473 –Report NP39151】 15
2.3　結合酵素アッセイによるヘパリン化イヌ血漿中のオンキャスパー（PEG-L-アスパラギナーゼ）定量法のバリデーション【CTD 4.2.2.1.2_Study #06-8481- Report NP39147】 16
2.4　L-アスパラギン及び他アミノ酸の定量法 16
2.5　LC-MS/MS によるイヌ及びラット血漿中の L-アスパラギン及び L-グルタミン定量法のバリデーション【CTD 4.2.2.1.3_Study #06-8938 – Report NP39158】 17
2.6　抗 PEG-L-アスパラギナーゼ又は抗ネイティブ L-アスパラギナーゼ抗体定量法 18
2.7　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】 18
2.8　イムノアッセイによるイヌ血漿中の抗オンキャスパー抗体の定性測定法【CTD 4.2.2.1.7_Study #15-8467 - Report NP39157】 18
2.9　酵素活性アッセイによるイヌ血漿中の抗オンキャスパー中和抗体検出法【CTD 4.2.2.1.8_Study #15-8468 - Report NP39181】 19
3.　吸収 19
3.1　非免疫及び免疫化したマウスにおける血漿中アスパラギナーゼ濃度［1］ 19
3.2　マウスにおける PEG-L-アスパラギナーゼの血中循環寿命【CTD 4.2.2.2.4_Study #7 – Report NP39223】 21
3.3　マウスにおける i.m.投与の PEG-L アスパラギナーゼ及びネイティブ L-アスパラギナーゼの血中循環寿命【CTD 4.2.2.2.2_Study #53 – Report NP39224】 22
3.4　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【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 - Report NP39226】 24
3.5　ウサギにおける血漿中のアスパラギナーゼ濃度［8］ 26
3.6　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【CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 - Report NP39178】 28
3.7　サルにおける血漿中のアスパラギナーゼ濃度［4］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】 30
3.8　ラットにおける [redacted]及び [redacted]（オンキャスパー）の単回 i.v.投与による比較 PK/PD 及び毒性試験【CTD 4.2.3.1.2_Study #824-015 – Report NP39217】 33
3.9　ビーグル犬における [redacted]及び[redacted]（オンキャスパー）の単回 i.v.投与による比較 PK/PD 及び毒性試験【CTD 4.2.3.1.3_Study #824-016 – Report NP39211】 35
3.10　ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼの反復 i.m.投与毒性試験【CTD 4.2.3.2.4_Study #3 – Report NP39218】 36
3.11イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼの毒性【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a - Report NP39220、CTD 4.2.3.2.6_Study 4b - Report NP39221 - 4.2.3.2.6】 37
3.12　イヌにおけるオンキャスパー 2 剤形の単回及 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】 39
4.　分布 44
5.　代謝 45

6.　排泄 45
7.　薬物動態学的薬物相互作用 45
8.　その他の薬物動態試験 45
8.1　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［6］ 45
9.　考察及び結論 48
9.1　PK データの要約 48
9.2　考察及び結論 51
10.　参考文献 53

表目次

表 1.2:1　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薬物動態及びトキシコキネテティクス試験の一覧 11
表 1.3:1　オンキャスパー凍結乾燥剤を用いた PK 試験の一覧 13
表 2.1:1　非臨床 PK／トキシコキネティクス試験で使用されたアスパラギナーゼ活性定量法の一覧 15
表 3.2:1　PEG-L-アスパラギナーゼ（260 IU/kg）単回 i.v.、i.p.又は i.m.投与マウスにおける PK パラメーター 22
表 3.3:1　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（400 IU/kg）単回 i.m.投与マウスにおける薬物動態パラメーター 24
表 3.4:1　PEG-L-アスパラギナーゼ（26、87 及び 260 IU/kg）単回 i.v.又は i.m.投与のラットにおける PK パラメーター（平均 ± SD） 25
表 3.4:2　PEG-L-アスパラギナーゼ（26、87 及び 260 IU/kg）単回 i.v.又は i.m.投与のラットにおける最高血中濃度到達時間（t_{max}）、最大薬理効果（E_{max}）及び血漿中アスパラギンの回復時間（平均 ± SD） 25
表 3.5:1　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（40 IU/kg）の単回 i.v.投与ラットにおけるアスパラギナーゼ活性の PK パラメーター 27
表 3.6:1　イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ単回 i.v.又は i.m.投与後の PK パラメーター（平均 ± SD） 29
表 3.6:2　イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ単回 i.v.又は i.m.投与後の最高血中濃度到達時間（t_{max}）及び血漿中アスパラギンの回復時間（平均 ± SD） 29
表 3.7:1　ネイティブ L-アスパラギナーゼ 2 バッチから製造した PEG-L-アスパラギナーゼのサル単回 i.m.投与（2500 IU/m^2、208 IU/kg）後の PK パラメーター（平均 ± SD） 31
表 3.8:1　ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性の PK パラメーター（平均 ± SD） 33
表 3.9:1　イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性の PK パラメーター（平均 ± SD） 35
表 3.10:1 ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼ連日 i.m.投与中の血漿中のアスパラギナーゼ活性（平均 ± SD） 37
表 3.11:1 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ 200 IU/kg 投与後のアスパラギナーゼ活性量【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a - Report NP39220】 38
表 3.11:2 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ 1200 IU/kg 投与後の血漿中の L-アスパラギナーゼ活性量【CTD 4.2.3.2.6_ Study #4b - Report NP39221】 38
表 3.12:1 Study 15-3297 の試験デザイン 39
表 3.12:2 2 剤形の単回投与及び 36 日間反復投与における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}522}$（平均 ± SD） 40
表 3.12:3 2 剤形における性別ごとの PK パラメーターの比率 42
表 3.12:4 各群の平均 PK データ（Study 15-3297 - NP39227） 42
表 3.12:5 2 剤形の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}552}$ と幾何平均比の両側 90%信頼区間 44
表 8.1:1　ALL 患者における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ の観察値及び予測値の中央値 47
表 8.1:2　イヌにおける PK データを適用した PK モデルのシミュレーション 47
表 9.1:1　げっ歯類における PEG-L-アスパラギナーゼの PK 及びトキシトキネティクス試験の要約表 49
表 9.1:2　非げっ歯類における PEG-L-アスパラギナーゼの PK 及びトキシコキネティクス試験の要約表 50

図目次

図 3.1:1　非免疫マウスに対する 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（5 IU/例）の i.p.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性 20
図 3.1:2　免疫化マウスに対する 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（5 IU/例）の i.p.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性 20
図 3.2:1　PEG-L-アスパラギナーゼ（260 IU/kg）単回 i.v.、i.p.又は i.m.投与マウスにおける血漿中アスパラギナーゼ活性 22
図 3.3:1　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 400 IU/kg 単回 i.m.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性 24
図 3.4:1　PEG-L-アスパラギナーゼ（26、87 及び 260 IU/kg）単回 i.v.又は i.m.投与のラットにおける血漿中の平均アスパラギナーゼ活性（左）及びアスパラギン濃度対時間曲線（右） 26
図 3.5:1　ネイティブ L-アスパラギナーゼ又は PEG-L-アスパラギナーゼ投与後のアスパラギナーゼ活性及びアスパラギン濃度 28
図 3.6:1　イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ単回 i.v.又は i.m.投与後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性（左）及びアスパラギン濃度（右）対時間曲線 30
図 3.7:1　ネイティブ L-アスパラギナーゼ 2 バッチから製造した PEG-L-アスパラギナーゼのサル単回 i.m.投与（2500 IU/m^2、208 IU/kg）後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイル 32
図 3.8:1　ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイル（直線及び片対数プロット） 34
図 3.9:1　イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイル（直線及び片対数プロット） 36
図 3.12:1 2 剤形の単回投与及び 36 日間反復 i.v.投与におけるアスパラギナーゼの平均 C_{max} 及び平均 $AUC_{0\text{-}552}$ 41
図 3.12:2 イヌにおける 500 IU/kg BW 単回又は反復 i.v.投与後のアスパラギナーゼの平均血漿中濃度 43
図 8.1:1　2 剤形のアスパラギナーゼの観察値及び予測活性のプロット 48

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）
AUC	Area Under the Curve	血中濃度－時間曲線下面積
AUC_{INF}	Area Under the Plasma concentration versus time Curve from 0 to infinity	血中濃度－時間曲線下面積（0～無限大）
AUC_{last}	Area Under the Plasma concentration versus time Curve from 0 to last blood sampling	血中濃度－時間曲線下面積（0～最終定量可能時点）
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia	急性リンパ性白血病
AST	Aspartate Amino Transferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血中濃度
CL	Total Clearance	総クリアランス
CL/F	Total Clearance for extravascular administration	血管外投与後の総クリアランス
CFR	Code of Federal Regulations	連邦規則集
CSF	Cerebrospinal Fluid	脳脊髄液
Da	Dalton	ダルトン
DONV	5-diazo-4-oxo-L-norvaline	5-ジアゾ-4-オキソ-L-ノルバリン
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酵素結合免疫吸着測定法
E_{max}	Maximum effect level	最大薬理効果
F	Absolute Bioavailability	絶対的バイオアベイラビリティー
[redacted]		
GLP	Good Laboratory Practice	優良試験所規範医薬品の安全性試験の実施に関する基準
GOT	see AST	AST 参照
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
i m.	Intramuscular	筋肉内
i.p.	Intraperitoneal	腹腔内
IU	International Unit	国際単位
i.v.	Intravenous	静脈内
MDH	Malic dehydrogenase	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ
mPEG	Monomethoxypolyethylene Glycol	モノメトキシポリエチレングリコール
MPS	Mononuclear Phagocyte System	単核貪食細胞系
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	タンデム質量分析計
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
PBS	Phosphate Buffer Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PD	Pharmacodynamics	薬力学
PEG	Polyethylene Glycol	ポリエチレングリコール
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
RES	Reticuloendothelial System	細胞内皮系
SD	Standard Deviation	標準偏差
$t_{1/2}$	Apparent elimination half-life	見かけの消失半減期
T_{max}	Time to achieve C_{max}	最高血中濃度到達時間
V_{max}	Enzyme Maximum Rate	最大反応速度

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.　まとめ

1.1　PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014）

PEG-L-アスパラギナーゼ（Oncaspar［オンキャスパー］、S95014；国際一般名 pegasparagase；別名 [redacted]）は、ポリエチレングリコール（PEG）を結合させた *E. coli* L-アスパラギナーゼ（タイプ EC-2）である。*E. coli* L-アスパラギナーゼは 4 つの同一サブユニットから構成されるホモ四量体であり、四量体で 1 つの活性部位を有する。分子量約 5000 Da のモノメトキシポリエチレングリコール（mPEG）が、スクリンイミジルコハク酸リンカーを介して L-アスパラギナーゼの N 末端ロイシン及びリジン残基に共有結合する。

当初、オンキャスパー（S95014_[redacted]）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 mL/5mL（750 U/mL）を含む等張滅菌溶液の単回使用バイアルの液剤で市販された【CTD 3.2.S.2.6_DTC_S095014_PA_R_FAB_52212_EN_1.0、CTD 3.2.P.2.3_DTC_S095014_PF_R_FOR_55418_EN_1.0】。有効期間が 8 カ月であったことから、安定性改善を目的として有効期間が 36 カ月の凍結乾燥剤のオンキャスパーが開発された。液剤（S95014_[redacted]）を用いて行った非臨床試験を 1.2 項に、凍結乾燥剤（S95014_[redacted]）の開発を支持する追加の非臨床情報を 1.3 項及び 8.1 項に示し、9 項で結論を総括した。液剤に関する情報及び分析学的同等性を CTD 3.2.S.2.6_DTC_S095014_PA_R_FAB_52212_EN_1.0 及び CTD_3.2.P.2.3, DTC_S095014_PF_R_FOR_55418_EN_1.0 に示す。オンキャスパー（S95014）は、5.2 mL の注射用水に溶解することで PEG-L-アスパラギナーゼ 750 U/mL PBS となる凍結乾燥剤（3750 U/バイアル）で供給される予定である。

1.2　PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014_[redacted]；液剤）

PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014）と新規の PEG 複合体を比較する目的で、GLP 非準拠の薬物動態（PK）及び薬力学（PD）試験 2 試験【CTD 4.2.2.2.1_#04-2861 – Report NP39226、CTD 4.2.2.2.3_#04-3082 – Report NP39178】、GLP 準拠の毒性及びトキシコキネティクス試験 2 試験【CTD 4.2.3.1.2_#824-015 – Report NP39217、CTD 4.2.3.1.3 #824-016 – Report NP39211】を行った。本項では、最近の非臨床試験の基準に従って実施した試験について、後ほど考察する。

アカゲザルにおける PK 試験［4］及び CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179 では[redacted]から入手したネイティブ 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併用したが、それ以外はすべて[redacted]から入手したネイティブ 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使用した。

PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブアスパラギナーゼの PK は、試料中のアスパラギナーゼタンパク質を直接定量する代替法として、37°C で行った結合酵素アッセイを用いて試験した。

薬力学的エンドポイントは、血漿中を循環する L-アスパラギンの枯渇であった。血漿中の L-アスパラギン量は、結合酵素アッセイ又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のいずれかによって評価した。いくつかの試験では、L-アスパラギン定量法と同じ方法を用いて、試料中の L-アスパラギン酸又は L-グルタミン量を定量した。

また、体循環している抗 PEG-L-アスパラギナーゼ又は抗ネイティブ L-アスパラギナーゼ抗体の検出及び免疫原性の定量には、ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）を用いた。

PK 解析には大半の試験でコンパートメント法を、毒性試験【CTD 4.2.3.1.2_#824-015 - Report NP39217（ラット）、CTD 4.2.3.1.3_#824-016 – Report NP39211（イヌ）】でのみノンコンパートメント法を用いた。

PEG-L-アスパラギナーゼの PK 又はトキシコキネティクスは、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルで筋肉内（i.m.）、静脈内（i.v.）、腹腔内（i.p.）単回投与後に、ラット（i.m.）及びイヌ（i.m.及び i.v.）で反復投与後に調査した。これらの動物種は、PEG-L-アスパラギナーゼの薬理又は毒性試験のいずれかで使用されたものであった。

PK、PD 及びトキシコキネティクス試験及びそれらの試験の GLP 準拠／非準拠の一覧を表 1.2:1 に示した。すべての試験は、CHMP/ICH/2887/99 revision 1 safety guideline に従って行われた。

本品が酵素と PEG の結合体であることから予想された通り、PEG-L-アスパラギナーゼはネイティブ L-アスパラギナーゼと比較して、体循環の延長が認められた。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、ウサギで約 5.6 日であり、ネイティブ L-アスパラギナーゼの半減期はマウスで約 0.21～0.24 日、ウサギで約 0.8 日であったことから、それぞれの種で延長が認められた［1］【CTD 4.2.2.2.2_Study #53 – Report NP39224［8］】。

PEG-L-アスパラギナーゼで免疫化したマウスにおける $t_{1/2}$ は 3.5 日であったことから、免疫化は PEG-L-アスパラギナーゼのクリアランスに影響はなかった。対照的に、ネイティブ L-アスパラギナーゼで免疫化したマウスでは、ネイティブ L-アスパラギナーゼは直ちにクリアランスされた［1］。

i.m.投与における絶対的バイオアベイラビリティーは、マウスにおいて 76.2%【CTD 4.2.2.2.4_Study #7 – Report NP39223】、ラットにおいて約 43.0%～61.0%【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 – Report NP39226】、イヌにおいて 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 の範囲で直線的かつ用量依存的であり、i.m.投与ラットにおいては 26～260 IU/kg の範囲で直線的かつ用量依存的であった【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】。

血漿中のアスパラギナーゼ活性は、すべての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（$t_{1/2}$）は、マウス及びラットにおいて約 3～3.5 日、ウサギにおいて 5.6 日、イヌ及びサルにおいて 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、少なくともラット及びイヌにおいては用量に依存せず、PEG-L-アスパラギナーゼの PK は試験した動物種及び用量範囲において直線性を示した。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。

分子量約 300 kDa の PEG 複合体であることから予想された通り、ラット及びイヌで算出された分布容積がそれぞれの種の全血中濃度/血漿中濃度（B/P）比に近かったことから、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行っていないが、サルの血液脳脊髄液（CSF）関門を通過しなかったことが報告されている一方で［1］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】、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、胎盤関門を通過して拡散する低い潜在性が認められた［2］。

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 i.m.反復投与したラットの血漿中に用量依存的に蓄積した【CTD 4.2.3.2.4_Study #3 – Report NP39218】。反対に、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、血漿中のアスパラギナーゼ活性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】。

PEG-L-アスパラギナーゼの作用機序から、すべての試験された種（ラット、イヌ、ウサギ、サル）において PEG-L-アスパラギナーゼ投与後、L-アスパラギンの血漿中濃度は定量下限値未満まで急速に低下し、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は L-アスパラギンは枯渇したままであろう。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-アスパラギナーゼによる完全枯渇のカットオフ値と考えられる【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 – Report NP39226、CTD 4.2.3.1.2_Study #824-15 – Report NP39217［8］、CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 – Report NP39178、CTD 4.2.3.1.3 Study_#824-16 – Report NP39211［4］、CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】。PEG-L-アスパラギナーゼを i.m 投与したサルにおいてみられた CSF 中の L-アスパラギンの短時間かつより急速な枯渇は、全身の L-アスパラギンが枯渇した結果と考えられる［4］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study– Report NP39179】。

反対に、ラットとイヌにおいては PEG-L-アスパラギナーゼの単回投与後に L-グルタミンの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、L-アスパラギン枯渇は用量依存的であり、PK/PD における強い相関とよく一致して、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判明した。

表 1.2:1 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薬物動態及びトキシコキネテティクス試験の一覧

Study Type: Analytical and validation studies										
Biological matrix	**Study Type**		**Analytes**	**Analytical Method**		**Year**	**GLP**		**Study code**	
Rat plasma	Validation of an enzyme activity assay for the determination of Oncaspar (PEG-L-asparaginase) in sodium heparinized rat plasma		PEG-L-asparaginase activity	Coupled enzyme assay		20[redacted]	Yes		#06-8473 – NP39151 4.2.2.1.1	
Dog plasma	Validation of an enzyme activity assay for the determination of Oncaspar (PEG-L-asparaginase) in sodium heparinized dog plasma		PEG-L-asparaginase activity	Coupled enzyme assay		20[redacted]	Yes		#06-8481- NP39147 4.2.2.1.2	
Rat and dog plasma	Validation of a liquid chromatographic method with MS/MS detection for the determination of L-asparagine and L-glutamine in dog and rat plasma		L-asparagine and L-glutamine	HPLC-MS/MS		20[redacted]	Yes		#06-8938- NP39158 4.2.2.1.3	
Study Type: Pharmacokinetics and PK/PD studies										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses**	**Route**	**Duration of dosing**	**Year**	**GLP**	**PD**	**Study code**	**Paper**
Non immunised and immunised BDF1 mice Male	12/group	PEG-L-asparaginase L-asparaginase	5 IU/mouse ≈250 IU/kg	i.p.	Single dose	1984	No	No	None	(Abuchowski, 1984) [PE0150533] [1]
Swiss-Webster mice Female	15/group	PEG-L-asparaginase	260 IU/kg	i.p i.v. i.m.	Single dose	1983	No	No	Study #7 – NP39223 4.2.2.2.4	(Viau, 1986) [PE0151470] [14]
Study Type: Pharmacokinetics and PK/PD studies										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses**	**Route**	**Duration of dosing**	**Year**	**GLP**	**PD**	**Study code**	**Paper**
Sprague-Dawley rats Female	10/group	PEG-L-asparaginase	26, 87 and 260 UI/kg	i.v. i.m.	Single dose	20[redacted]	No	Yes	Study #04-2861 (AD04008) - NP39226 4.2.2.2.1	None

表 1.2:1 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薬物動態及びトキシコキネテティクス試験の一覧（続き）

Study Type: Analytical and validation studies										
Biological matrix	**Study Type**		**Analytes**	**Analytical Method**		**Year**	**GLP**	**PD**	**Study code**	**Study code**
New Zealand white rabbits Male	2/group	PEG-L-asparaginase L-asparaginase	40 IU/kg 40 IU/kg	i.v.	Single dose	NA	No	Yes	None	(Ho, 1988) [PE0151770] [8]
Beagle dogs Female	6/group	PEG-L-asparaginase	26, 87 and 260 UI/kg	i.v. i.m.	Single dose	20[redacted]	No	Yes	Study #04-3082 (AD04009)-NP39178 4.2.2.2.3	None
Rhesus monkeys Male	3/group	PEG-L-asparaginase[a] PEG-L-asparaginase[b]	2,500 IU/m2 (≈ 208 IU/kg)	i.m.	Single dose	NA	No	Yes	NIH Study – NP39179 4.2.2.2.6	(Berg, 1993) [PE0150557] [4]
Study Type: Toxicokinetic studies										
Species, strain and sex	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses**	**Route**	**Duration of dosing**	**Year**	**GLP**	**PD**	**Study code**	**Paper**
Sprague Dawley rats Male and female	8/sex/group	PEG-L-asparaginase	0, 100 and 500 IU/kg	i.v.	Single dose	20[redacted]	Yes	Yes	Study #824-015 – NP39217-4.2.3.1.2	None
Beagle dogs Male and female	4/sex/group	PEG-L-asparaginase	0, 100 and 500 IU/kg	i.v.	Single dose	20[redacted]	Yes	Yes	Study #824-016 – NP39211 - 4.2.3.1.3	None
Wistar rats Female	3/group	PEG-L-asparaginase	100, 200 and 400 IU/kg	i.m.	5 times a week for 4 weeks	1983	No	No	Study #3 – NP39218 4.2.3.2.4	(Viau, 1986) [PE0151470] [14]
Beagle dogs Male and female	1/sex/group	PEG-L-asparaginase	200 and 1,200 IU/kg	i.m. i.v.	once a week for 2 weeks	1983	No	No	Studies #4a - NP39220 - 4.2.3.2.3, #4b - NP39221 - 4.2.3.2.6	(Viau, 1986) [PE0151470] [14] (McEwen, 1987) [PE150565] [11]

PD：Pharmacodynamic assessment

NA：not available

a　PEG-L-asparaginase by native asparaginase from [redacted]

b　PEG-L-asparaginase by native asparaginase from [redacted]

1.3　PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー、S95014_[redacted]；凍結乾燥剤）

凍結乾燥剤開発の主な目的は、医薬品の有用性を確保するために、安定性を改善（有効期間 36 カ月）した液剤と同等の医薬品を創製することであった。分析による同等性の解析結果から、凍結乾燥工程及び剤形変更は、オンキャスパーの同一性、活性強度、品質及び純度に影響がないことが証明された【CTD 3.2.S.2.6_DTC_S095014_PA_R_FAB_52212_EN_1.0、CTD_3.2.P.2.3, DTC_S095014_PF_R_FOR_55418_EN_1.0】。

イヌ（500 IU/kg 投与）において、PD の追加評価及び抗薬物抗体プロファイリングを含む両剤形の PK を比較する試験を行った。この試験分析を支持するために、LC/MS-MS によるイヌ血漿中の L-アスパラギン測定法の部分バリデーションを行った。その結果、両剤形の最高血中濃度（C_{max}）及び血中濃度－時間曲線化面積（0～552 時間）（$AUC_{0\text{-}552}$）が幾何平均比の両側 90%信頼区間 0.8～1.25 の範囲にあったことから、両剤形は生物学的に同等であった。両剤はいずれの用量においても PK、PD、抗薬物抗体が同等であり、顕著な差異は認められなかった。

表 1.3:1 オンキャスパー凍結乾燥剤を用いた PK 試験の一覧

Study Type: Analytical and validation studies						
Biological matrix	**Study Type**	**Analytes**	**Analytical Method**	**Year**	**GLP**	**Study code**
Dog Plasma	Partial Validation of an LC-MS/MS Bioanalytical Method for the Analysis of L-Asparagine in Dog Plasma	L-Asparagine	Liquid Chromatographic Method with Tandem Mass Spectrometric Detection	20[redacted]	No	#15-8758 NP 39150 4.2.2.1.6

Study Type: Pharmacokinetics and PK/PD studies									
Species	**Number of animals**	**Test Item**	**Doses**	**Route**	**Duration of dosing**	**Year**	**GLP**	**PD**	**Study code**
Beagle dog	5/sex/group	Oncaspar liquid, Oncaspar lyophilized	500 IU/kg BW	i.v.	once, or on on Days 1, 15, 22, and 29 and 36	20[redacted]	No	Yes	#15-3297 NP39227 4.2.2.2.8

2.　分析法

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 PK では、試料中の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の測定を行った。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アッセイで評価した。

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 PD 効果のバイオマーカーとして、投与後に採取した循環血中の L-アスパラギン枯渇を定量した。L-アスパラギン酸又はグルタミンの定量は限られた試験でのみ行った。アミノ酸量は、結合酵素アッセイ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 を用いて測定した。採血中及び採血後に起こり得る *ex-vivo* での L-アスパラギン加水分解を避けるため、採取した生物試料中の L-アスパラギン活性を停止させるために数種類の温度条件又は阻害剤を用いた。

最終的に、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能を定量する目的で、循環血中の抗アスパラギナーゼ抗体は ELISA で検出した。

2.1　PEG-L-アスパラギナーゼの活性定量法

37°C の結合酵素反応によって起きる NADH 酸化の線形速度を 340 nm で分光学的に測定することで、試料（主に血漿）中のアスパラギナーゼ活性を定量した。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グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）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（MDH）によってリンゴ酸と NAD になることから、NADH は NAD に酸化される。アッセイの原理を以下に示す。

$$\text{L-asparagine} \xrightarrow{L\text{-}asparaginase} \text{L-aspartate} + NH_3$$

$$\text{L-aspartate} + \alpha\text{-ketoglutarate} \xrightarrow{GOT} \text{oxalacetate} + \text{L-glutamate}$$

$$\text{oxalacetate} + \text{NADH} \xrightarrow{MDH} \text{malate} + \text{NAD}$$

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は数年間にわたって実質的に同様であり、本法は最初に Cooney［7］が発表し、その後 Jayaram［9］が標準化した。最終的に本法は 2007 年に完全にバリデーションされた【CTD 4.2.2.1.1_Study #06-8473 – Report NP39151（ラット）、CTD 4.2.2.1.2_Study #06-8481 – Report NP39147（イヌ）】。非臨床 PK 及び／又はトキシコキネティクス試験で使用したアスパラギナーゼ活性定量法を表 2.1:1 に示す。

表 2.1:1 非臨床 PK／トキシコキネティクス試験で使用されたアスパラギナーゼ活性定量法の一覧

Species	Test Item	Year	Study code	Paper	L-asparaginase activity method reference
Mouse	PEG-L-Asparaginase	1983	Study #7 – NP39223 - 4.2.2.2.4	(Viau, 1986) [PE0151470] ［14］	Not available (presumably (Jayaram, 1974) [PE151459] ［9］)
Rat	PEG-L-Asparaginase	1983	Study #3 – NP39218 - 4.2.3.2.4	(Viau, 1986) [PE151470] ［14］	Not available (presumably (Jayaram, 1974) [PE151459] ［9］)
Dog	PEG-L-Asparaginase	1983	Studies #4a – NP39220 - 4.2.3.2.3, #4b - NP39221 - 4.2.3.2.6	(Viau, 1986) [PE151470] ［14］	Not available (presumably (Jayaram, 1974) [PE151459] ［9)］)
Mouse	PEG-L-asparaginase L-asparaginase	1984	None	(Abuchowski, 1984) [PE0150533] ［1］	(Jayaram, 1974) [PE151459] ［9］
Mouse	PEG-L-asparaginase L-asparaginase	19[redacted]	Study #53 – NP39224 - 4.2.2.2.2	None	Not available (presumably [redacted] SOP ver 1)[a]
Rabbit	PEG-L-asparaginase L-asparaginase	Not applicable	None	(Ho, 1988) [PE0151770] ［8］	(Cooney, 1970) [PE0151454] ［7］ modified according to (Ho, 1988) [PE151770] ［8］
Rat	PEG-L-Asparaginase	20[redacted]	Study #04-2861 – NP39226 - 4.2.2.2.1	None	[redacted] Method Appendix A of Appendix D of the study report
Dog	PEG-L-Asparaginase	20[redacted]	Study #04-3082 – NP39178 - 4.2.2.2.3	None	[redacted] Method Appendix A of Appendix F of the study report
Monkey	PEG-L-Asparaginase	Not applicable	NIH study – NP39179 - 4.2.2.2.6	(Berg, 1993) [PE0150557] ［4］	(Cooney, 1970) [PE0151454] ［7］ modified according (Berg, 1993) [PE0150557] ［4］
Rat	PEG-L-Asparaginase	20[redacted]	Study #824-015 – NP39217 - 4.2.3.1.2	None	Method validation study report 06-8473 - NP39151 - 4.2.2.1.1
Dog	PEG-L-Asparaginase	20[redacted]	Study #824-016 – NP39211- 4.2.3.1.3	None	Method validation study report 06-8481 - NP39147 - 4.2.2.1.2

a　手順書（SOP）第 2 版を CTD 4.2.2.1 Analytical and Validation Reports に示す。

2.2　結合酵素アッセイによるラット血漿中のオンキャスパー（PEG-L-アスパラギナーゼ）定量法のバリデーション結果【CTD 4.2.2.1.1_Study #06-8473 –Report NP39151】

本法は Jayaram の方法［9］と本質的に同じである。定量用又は校正用及び品質管理用のラット血漿試料 20 µL、2 検体を 96 ウェルプレートに移し、各ウェルに 10 mM L-アスパラギン、

0.22 IU/mL MDH、0.6 mM α-ケトグルタル酸、0.36 IU/mL GOT を含むトリス塩酸緩衝液、pH 8.45±0.05、20%グリセロールの酵素混合液 180 µL を添加した。その後ただちに SPECTRAmax 341PC 384 マイクロプレートリーダーを用いて、反応速度を 10 秒間隔で 30 分間測定した（37°C、340 nm）。測定データを、横軸を log 濃度、縦軸を最大反応速度（V_{max}）とした 4 パラメーターカーブフィッティングで分析した。本法のバリデーション結果を CTD 2.6.5 薬物動態試験概要表【CTD 2.6.5.2.1】に示す。

2.3　結合酵素アッセイによるヘパリン化イヌ血漿中のオンキャスパー（PEG-L-アスパラギナーゼ）定量法のバリデーション【CTD 4.2.2.1.2_Study #06-8481- Report NP39147】

本法は Jayaram の方法［9］と本質的に同じである。定量用又は校正用及び品質管理用のイヌ血漿試料 20 µL 2 検体を 96 ウェルプレートに移し、各ウェルに 10 mM L-アスパラギン、0.22 IU/mL MDH、0.6 mM α-ケトグルタル酸、0.36 IU/mL GOT を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液、pH 8.45±0.05、20%グリセロールの酵素混合液 180 µL を添加した。その後ただちに SPECTRAmax 341PC 384 マイクロプレートリーダーを用いて、反応速度を 10 秒間隔で 30 分間測定した（37°C、340 nm）。

反応時間に対する NADH の 340 nm における吸光度（mA）での減少をプロットした。SoftMax PRO（vA.6 Enterprise）data reduction software を用いてそれぞれの反応から傾き（V_{max}）を算出し、アスパラギナーゼ活性（V_{max}）と関連づけた。測定データを、横軸を log 濃度、縦軸を V_{max} とする 4 パラメーターカーブフィッティングで分析した。本法のバリデーション結果を CTD 2.6.5 薬物動態試験概要表【CTD 2.6.5.2.2】に示す。

2.4　L-アスパラギン及び他アミノ酸の定量法

PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼ投与後の試験動物における循環血中の L－アスパラギン枯渇を評価するために、結合酵素アッセイ若しくは蛍光検出器又は MS/MS を組み合わせた HPLC を用いて、試料（主に血漿）中の L-アスパラギン、L-アスパラギン酸又は L-グルタミンを定量した。

ウサギを用いた試験で、Ho［8］は結合酵素アッセイで血漿中の L-アスパラギン及び L-アスパラギン酸を定量した。採血中及び採血後の L-アスパラギン加水分解を避けるために、アスパラギナーゼ活性を停止させる目的で、血漿に氷冷した 10%トリクロロ酢酸を添加して除タンパクした。遠心分離後、上清を pH 7.0 に中和し、L-アスパラギン又は L-アスパラギン酸を定量に供した。L－アスパラギン及び L-アスパラギン酸定量法の原理は、前述した定量法と本質的に同じであった。

第一段階で L-アスパラギン酸は α-ケトグルタル酸、GOT 及び NADH の存在下でオキサロ酢酸に変換され、第二段階でオキサロ酢酸は MDH によってリンゴ酸に変換され、最終段階で L-アスパラギンは 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た。酵素反応は 37°C で行った［7］。

National Institute of Health で行われた試験【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】［4］において、血漿及び CSF 中の L-アスパラギン濃度を、オルトフタルジアルデヒドによるプレカラム誘導体化後に定量した。限外濾過した血漿又は CSF 試料を誘導体化試薬と 1：1 で希釈し 30 秒間混合した後に HPLC に添加し、励起波長 340 nm、カットオフ波長 440 nm で検出した。Dynamax Microsorb Type O 4.6×100 mm をカラムに用いて 3 段階のグラジエント溶出を行った（移動相：0.025 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 7.2／メタノール／テトラヒドロフラン［95：4.5：0.5 v/v］及び 100%メタノール）。定量限界は血漿で 2 µM、CSF で 0.25 µM であった。

ex-vivo での L-アスパラギン加水分解を避けるため、サルの全血試料に L-アスパラギナーゼ阻害剤である 5-ジアゾ-4-オキソ-L-ノルバリン（DONV）を終濃度 46 mM になるように添加した。校正曲線用の試料である正常血漿及び CSF は、L-アスパラギナーゼ 1 IU/mL 存在下で 37°C で 1 時間インキュベートして内因性 L-アスパラギンを枯渇した後、酵素を除去するために Centrifree micropreparation filter を用いて遠心分離した。遠心分離前に L-アスパラギン枯渇血漿に 0.5 M DONV を 100 µL/mL 添加し血漿標準品とした。

ラット試験【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 – Report NP39226】及びイヌ試験【CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 – Report NP39178】において、血漿中の L-アスパラギン濃度を、[redacted]（[redacted]）を用いた[redacted]後に HPLC で定量した（方法は Appendix D［04-2861 Study report］の Appendix B 及び Appendix F［04-3082 Study report］の Appendix B に記載）。メタノール／アセトニトリル（50：50）を用いて L-アスパラギンを血漿から抽出し、遠心分離後の上清を HPLC バイアルに移し、50 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH 7.8 及び[redacted]溶液を添加後に室温で 30 分間インキュベートすることで[redacted]を調製した後、試料を HPLC に添加した。Phenomenex Synergi Max-RP、4 µm、4.6×150 mm をカラムに用いてグラジエント溶出（移動相：20 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH 6.5／メタノール［70：30 (v/v)］；20 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH 6.5／メタノール／アセトニトリル［20：55：25 (v/v)］を行い、励起波長[redacted]、発光波長[redacted]（ゲイン 10）で検出した。

最終的に、最近のラット【CTD 4.2.3.1.2_#824-15 – Report NP39217】及びイヌ【CTD 4.2.3.1.3_#824-16 – Report NP39211】における毒性試験のために、HPLC-MS/MS を用いた L-アスパラギン及び L-グルタミン定量法は完全にバリデーションされた。バリデーション結果を次項に示す。

2.5　LC-MS/MS によるイヌ及びラット血漿中の L-アスパラギン及び L-グルタミン定量法のバリデーション【CTD 4.2.2.1.3_Study #06-8938 – Report NP39158】

血漿中に内因性 L-アスパラギン及び L-グルタミンが存在することから、イヌ及びラットの血漿を L-アスパラギナーゼで枯渇し Seraprep（3.4% w/v スルホサリチル酸）で除タンパクした後に、ヘパリンナトリウムを添加してバリデーション試験のマトリックスとした。[redacted]及び[redacted]標識 L-アスパラギン、[redacted]及び[redacted]標識 L-グルタミンを内部標準として使用した。あらかじめ 1：1 に

なるように Seraprep を加えた枯渇血漿に内部標準液を添加後、0.1%ギ酸／アセトニトリルで除タンパクし、遠心分離後に HPLC に添加した。Waters Nova-Pak Silica、4 μ、3.9×150 mm をカラムに用いてグラジエント溶出（移動相：0.1%ギ酸／水；0.1%ギ酸／アセトニトリル）を行った。本法は、U.S.Food and Drug Administration（FDA）のガイドラインに従ってバリデーションされた。結果を 2.6.5 薬物動態試験概要表【CTD 2.6.5.2.3】に示す。

2.6　抗 PEG-L-アスパラギナーゼ又は抗ネイティブ L-アスパラギナーゼ抗体定量法

マウス及びラットを用いた試験において、Abuchowski［1］はマウス血漿を試料としたオクタロニー二重免疫拡散法［12］及びウサギ抗血清を試料とした ELISA 変法［15］を用いて、PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼに対する特異的抗体を定量した。

ネイティブ L-アスパラギナーゼと PEG-L-アスパラギナーゼの免疫特性の比較評価を目的とした CTD 4.2.3.7.2.1_Study #29 - Report NP39219【2.6.6 毒性試験の概要文 8.1 項参照】において、マウス血漿中を循環する抗 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、[redacted]が発行した ELISA の手順書【CTD 4.2.2.1_Analytical Methods and Validation Reports-ELISA method – Report NP39180 - 4.2.2.1.5】に従い西洋ワサビペルオキシダーゼを用いた ELISA で定量した。

凍結乾燥剤の製造ライン拡大のために行った次項以降の分析法及びバリケーション結果を CTD 4.2.2.1 に示す。

2.7　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）の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。本法はすでに試験報告書【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。部分バリデーションには、イヌ血漿のブランク試料選択、キャリーオーバー、定量下限（LLOQ）／感度、被験物質及び内部標準の干渉、溶血、HPLC の再現性、マトリックス効果の違い及び抽出物の安定性評価も含めた。

結論として、LC-MS/MS によるイヌ血漿中の L-アスパラギン定量法の部分バリデーションは成功した。

2.8　イムノアッセイによるイヌ血漿中の抗オンキャスパー抗体の定性測定法【CTD 4.2.2.1.7_Study #15-8467 - Report NP39157】

本試験の目的は、イヌ血漿中の抗オンキャスパー抗体の定性的測定法をバリデーションすることであった。本法は、[redacted]が開発した直接 ELISA 法に基づいている。重要なパラメーターとして事前に設定した判定基準（スクリーニングカットポイントの決定、陽性対照曲線の特

性評価、相対感度、精度、選択性、薬剤耐性及び特異性、測定値の再現性、イヌ免疫グロブリンの検出及び陽性対照の安定性）の性能を検証した。

2.9 酵素活性アッセイによるイヌ血漿中の抗オンキャスパー中和抗体検出法【CTD 4.2.2.1.8_Study #15-8468 - Report NP39181】

本試験の目的は、酵素結合活性アッセイに用いるヘパリンナトリウムを添加したイヌ血漿中の抗オンキャスパー中和抗体の定性的測定法をバリデーションすることであった。本法は、[redacted]が開発しバリデーションした method [redacted]をバックボーンとして、[redacted]が開発した。重要なパラメーターとして事前に設定した判定基準（阻害カットポイント、中和抗体標準曲線の特性評価、品質管理試料濃度と範囲の確立、精度、熱不活化、薬剤耐性及び希釈による反応性）の性能を検証した。この中和抗体検出法では、酵素活性法 [redacted]に基づいて、前処理後の試料中に残存する酵素活性を測定している。

3. 吸収

3.1 非免疫及び免疫化したマウスにおける血漿中アスパラギナーゼ濃度［1］

目的

本試験は、mPEG 修飾が L-アスパラギナーゼのクリアランスに及ぼす影響を非免疫及び免疫化したマウスで評価する予備的試験で、GLP 非準拠で行われた。結果を参考文献から要約した［1］。

方法

雄 BDF1 マウス（体重 20 g）12 例に完全アジュバントと混合した PEG-L-アスパラギナーゼ 0.3 mg（約 38 IU/例）を 10 日おきに 3 回 i.p.投与した。3 回目の投与後に 2 週間の間隔をあけて PEG-L-アスパラギナーゼ 5 IU/例（約 250 IU/kg）を i.p.投与し、投与後 6 日まで血漿中の L-アスパラナーゼ濃度を測定した。対照群には、同じ条件でマウス 12 例にネイティブ L-アスパラギナーゼを免疫し、最終的にネイティブ L-アスパラギナーゼ 5 IU/例を投与した。血液試料を眼窩上採血で採取し（4 例/測定時点）、結合酵素アッセイ［9］で血漿中の L-アスパラギナーゼ活性を定量した。

結果及び結論

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非免疫マウスにおける L-アスパラギナーゼ活性の血漿中濃度対時間曲線を図 3.1:1 に示した。非免疫マウスにおけるネイティブ L-アスパラギナーゼの血漿中半減期が 5 時間（0.21 日）であったのに対して、PEG-L-アスパラギナーゼでは 3.75 日であったことから、PEG 修飾によって半減期が顕著に延長した。PEG-L-アスパラギナーゼで免疫化したマウスでは、半減期が 3.5 日であったことから、PEG-L-アスパラギナーゼのクリアランスに影響はみられなかった一方で、ネイティブ L-アスパラギナーゼ

で免疫化したマウスでは、ネイティブ L-アスパラギナーゼが投与後直ちにクリアランスされた。（図 3.1:2）。

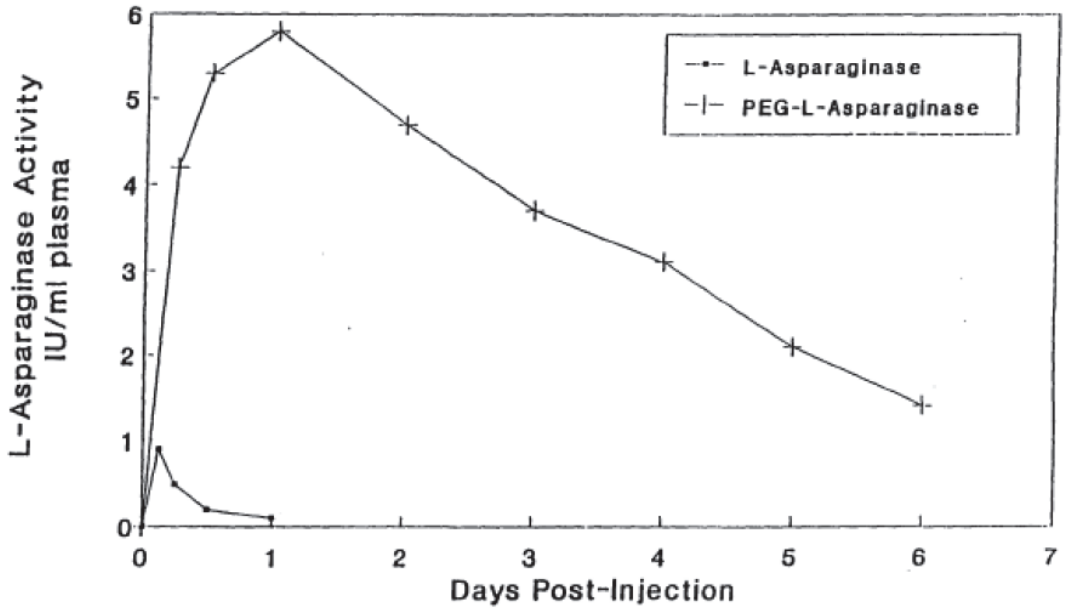


図 3.1:1 非免疫マウスに対する PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼ（5 IU/例）の i.p.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性

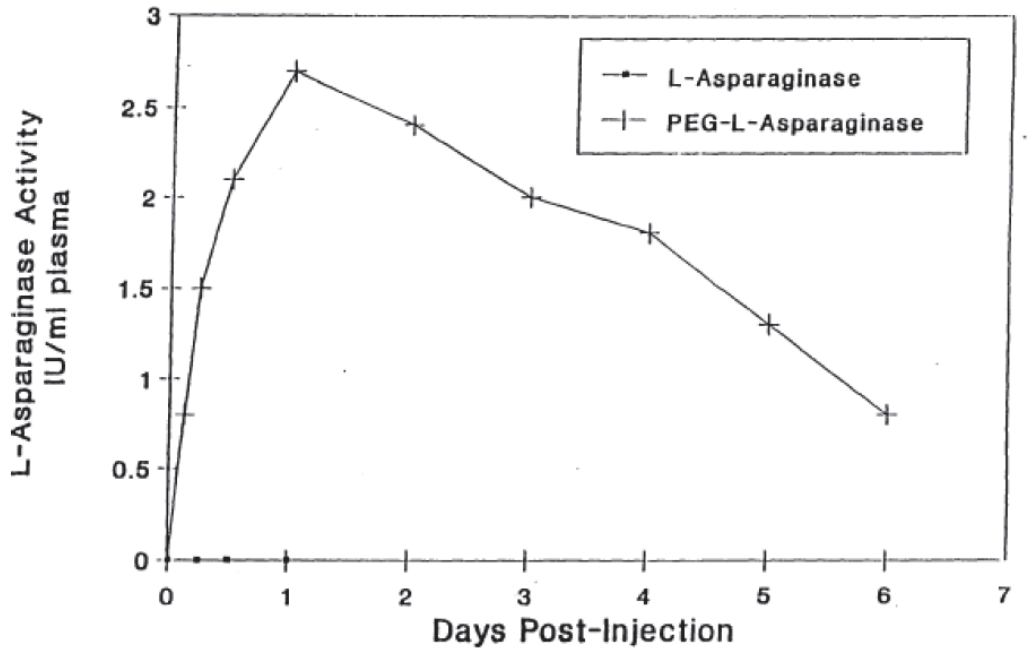


図 3.1:2 免疫化マウスに対する PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼ（5 IU/例）の i.p.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性

3.2　マウスにおける PEG-L-アスパラギナーゼの血中循環寿命【CTD 4.2.2.2.4_Study #7 – Report NP39223】

目的

本試験の目的は、PEG-L-アスパラギナーゼを i.p.、i.v.又は i.m.投与したマウスで血漿中アスパラギナーゼ活性対時間曲線を比較することであった。本試験は連邦規則集（CFR）Title 21、part 58 の GLP 規制に従って行われた。結果を参考文献から要約した［14］。

方法

雌 Swiss-Webster マウス各 15 例（体重 38～40 g）に PEG-L-アスパラギナーゼ（ロット番号：[redacted]）260 IU/kg を投与した。

15 mice were injected i.p.
15 mice were injected i.v.
15 mice were injected i.m.

血漿中の L-アスパラギナーゼ活性定量に供する血液試料は、投与 1、2、3、4、6、7、8、9、10、13 日後に各群 5 例から眼窩上採血で採取した。試験報告書発行後に試験データの PK 解析を行った。各投与経路で得られたデータに 1-コンパートメントモデルをフィッティングして血中濃度時間－曲線下面積（AUC）及び $t_{1/2}$ を算出した。

結果

マウスにおける血漿中アスパラギナーゼ活性推移の平均を図 3.2:1、PK パラメーターを表 3.2:1 に示す。

同用量の PEG-L-アスパラギナーゼを i.v.又は i.p.投与した場合、血漿中のアスパラギナーゼ活性はほぼ同じであったが、i.m.投与ではわずかに低い値を示した。その結果、PEG-L-アスパラギナーゼの絶対的バイオアベイラビリティー（F）は、i.p.投与が 93.8%、i.m.投与が 76.2%であった。すべての投与経路で血漿中のアスパラギナーゼ活性は徐々に減少したものの、投与 13 日後まで検出可能であり、$t_{1/2}$ は約 2.22～2.38 日であった。

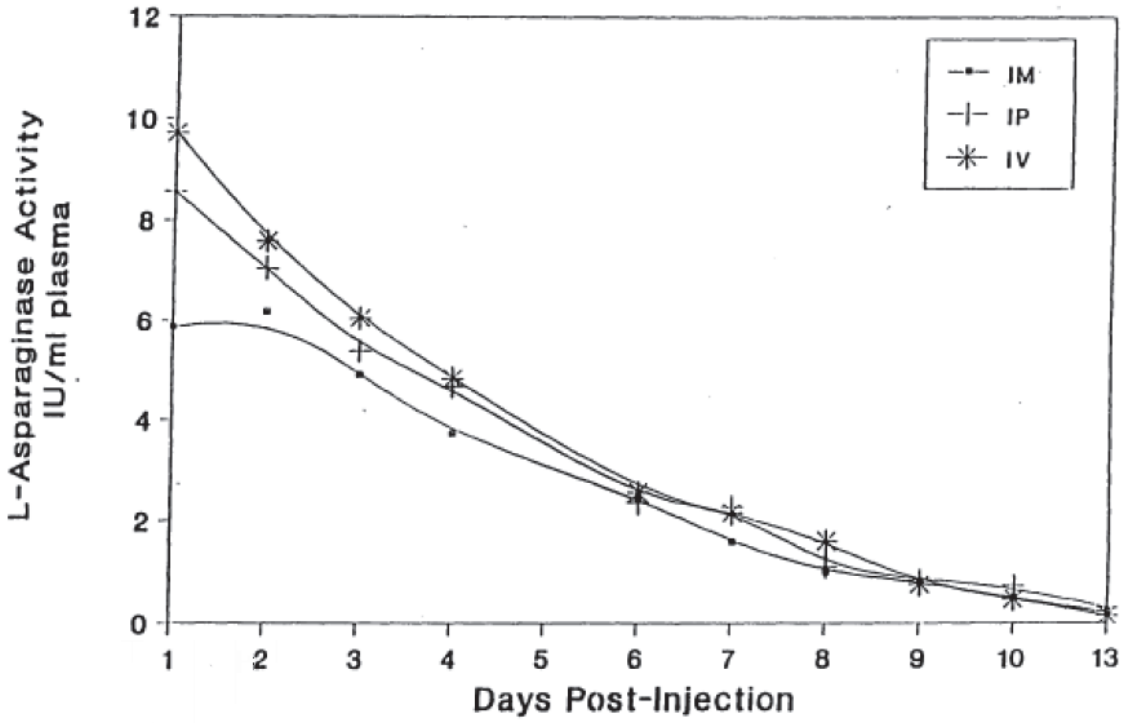


図 3.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（260 IU/kg）単回 i.v.、i.p.又は i.m.投与マウスにおける血漿中アスパラギナーゼ活性

表 3.2:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（260 IU/kg）単回 i.v.、i.p.又は i.m.投与マウスにおける PK パラメーター

ROUTE	AUC (IU*day/mL)	F (%)	$t_{1/2}$ (day)
i.v.	42.70	100	2.23
i.p.	40.07	93.8	2.38
i m.	32.54	76.2	2.22

結論

PEG-L-アスパラギナーゼの全身曝露は、i.p 及び i.v.投与マウスが同等で、i.m.投与マウスがわずかに低かったものの、$t_{1/2}$ は試験したすべての投与経路で同じであった。

3.3　マウスにおける i.m.投与の PEG-L アスパラギナーゼ及びネイティブ L-アスパラギナーゼの血中循環寿命【CTD 4.2.2.2.2_Study #53 – Report NP39224】

目的

本試験の目的は、PEG-L-アスパラギナーゼ及びネイティブ L-アスパラギナーゼを i.m 投与したマウスで PK を比較することであった。本試験は CFR Title 21、part 58 の GLP 規制に従って行われた。

方法

雌 Swiss-Webster マウス各 12 例（体重約 25 g）に PEG-L-アスパラギナーゼ（Lot 番号：[redacted]）又はネイティブ L-アスパラギナーゼを 1 例あたり 10 IU（400 IU/kg）の用量で単回 i.m. 投与した。

12 mice were injected with 10 IU/mouse of PEG-L-asparaginase
12 mice were injected with 10 IU/mouse of native asparaginase

血漿中の L-アスパラギナーゼ活性定量に供する血液試料は、投与 2、6、24 及び時間後、その後は毎日 8 日後まで各群 4 例から眼窩上採血で採取した。試験報告書発行後、試験データの PK 解析を行った。PEG-L-アスパラギナーゼ及びネイティブ L-アスパラギナーゼで得られたデータに 1-コンパートメントモデルをフィッティングして AUC 及び $t_{1/2}$ を算出した。

結果

マウスにおける血漿中アスパラギナーゼ活性対時間曲線を図 3.3:1、PK パラメーターを表 3.3:1 に示す。

血漿中のアスパラギナーゼ活性は、ネイティブ L-アスパラギナーゼ投与マウスでは投与後 24 時間でごくわずかまで低下した一方、PEG-L-アスパラギナーゼ投与マウスでは投与後 8 日経過しても十分量であった。$t_{1/2}$ は、ネイティブ L-アスパラギナーゼが 0.24 日であるのに対し、PEG-L-アスパラギナーゼが 3.05 日であり、半減期の顕著な延長がみられた。

アスパラギナーゼ活性の AUC は PEG-L-アスパラギナーゼの方が顕著に高く、C_{max} も PEG-L-アスパラギナーゼ投与マウスが 6.6 IU/mL、ネイティブ L-アスパラギナーゼ投与マウスが C1.8 IU/mL であったことから、前者の方が顕著に高かった。

結論

L-アスパラギナーゼを PEG 修飾することで全身曝露が増加し、その結果、クリアランスが減少した。

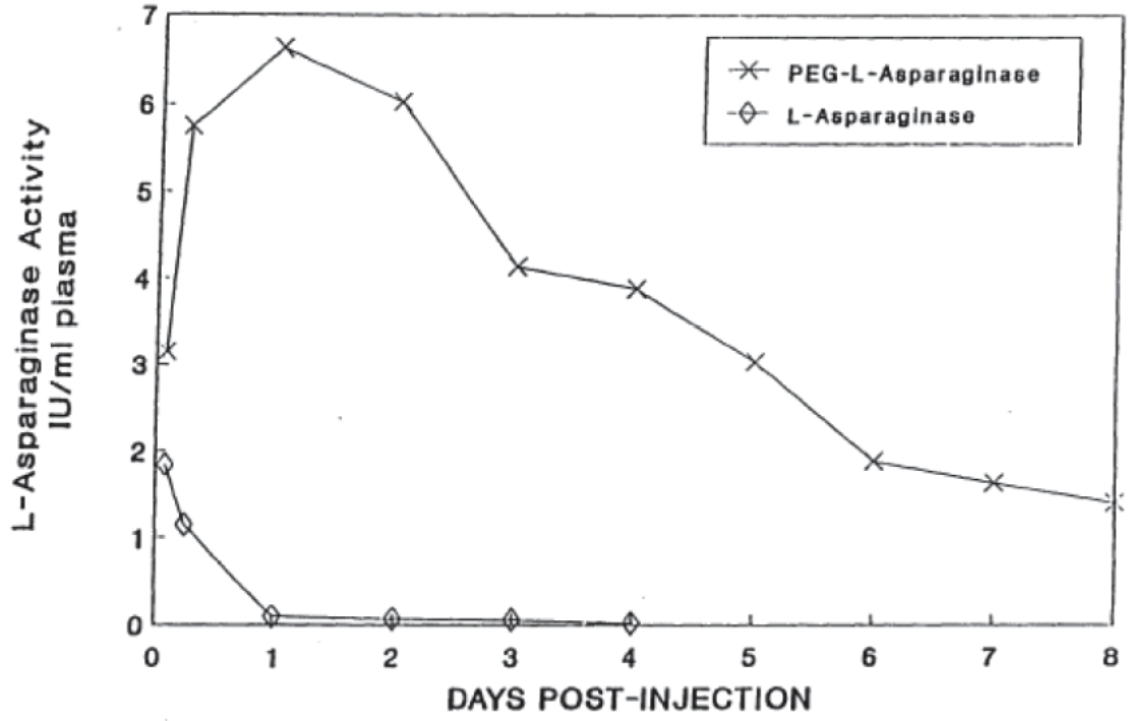


図 3.3:1 PEG-L-アスパラギナーゼ又はネイティブ L-アスパラギナーゼ 400 IU/kg 単回 i.m.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性

表 3.3:1 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（400 IU/kg）単回 i.m.投与マウスにおける薬物動態パラメーター

ROUTE	AUC (IU*day/mL)	$t_{1/2}$ (day)
PEG-L-asparaginase	36.85	3.05
L-asparaginase	0.81	0.24

3.4　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【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 - Report NP39226】

目的

本試験の目的は、[redacted]（[redacted]及び[redacted]）及び PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー）の血漿 PK/PD プロファイルの特徴づけ及び比較、さらに i.m.投与におけるバイオアベイラビリティーの評価であった。本項では PEG-L-アスパラギナーゼに関連する結果のみ記載した。

方法

ラットに PEG-L-アスパラギナーゼを単回投与し、PK/PD プロファイルを調査した。雌 Sprague-Dawley ラット（10 例/群）に PEG-L-アスパラギナーゼを 26、87 及び 260 IU/kg の用量で単回 i.v.

又は i.m.投与した。投与後 20 日までの間に 14 測定時点から採血し、発色基質を用いた結合酵素アッセイで血漿中のアスパラギナーゼ活性を定量し、HPLC で血漿中のアスパラギンを定量した。

i.m.投与では、個々のデータに一次消失を用いた 1-コンパートメント吸収モデル、i.v.投与では、個々の血漿データに一次消失を用いた 1-コンパートメントモデルをフィッティングして PK 解析を行った。PD は群ごとにプールした血漿をノンコンパートモデルで解析した。

結果

PK 及び PD パラメーターを表 3.4:1 及び表 3.4:2 に、単回 i.v.又は i.m.投与ラットにおける血漿中の平均アスパラギナーゼ活性及びアスパラギン濃度対時間曲線を図 3.4:1 に示した。

表 3.4:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（26、87 及び 260 IU/kg）単回 i.v.又は i.m.投与のラットにおける PK パラメーター（平均 ± SD）

Parameter	Units	Dose (UI/kg) i.v.			Dose (UI/kg) i m.		
		26	87	260	26	87	260
T_{max}	(h)	-	-	-	37.1 ± 7.6	35.4 ± 5.9	34.9 ± 8.8
C_{max}	(UI/mL)	0.74 ± 0.24	1.99 ± 0.28	5.18 ± 0.51	0.20 ± 0.05	0.81 ± 0.05	1.97 ± 0.24
AUC_{INF}	(h*UI/mL)	55.5 ± 13.6	186 ± 128	502 ± 140	23.9 ± 7.5	103 ± 8.0	306 ± 50
F	(%)	100	100	100	43.0 ± 13.6	55.1 ± 4.3	61.0 ± 9.9
$t_{1/2}$	(h)	55.4 ± 19.3	65.8 ± 12.1	67.3 ± 16.7	47.2 ± 14.5	56.6 ± 8.4	79.3 ± 17.7
Vss	(mL/kg)	39.3 ±17.7	44.6 ± 6.6	50.6 ± 5.1	-	-	-
CL	(mL/h/kg)	0.49 ± 0.09	0.48 ± 0.08	0.56 ± 0.16	-	-	-

表 3.4:2 PEG-L-アスパラギナーゼ（26、87 及び 260 IU/kg）単回 i.v.又は i.m.投与のラットにおける最高血中濃度到達時間（t_{max}）、最大薬理効果（E_{max}）及び血漿中アスパラギンの回復時間（平均 ± SD）

Parameter	Units	Dose (UI/kg) i.v.			Dose (UI/kg) i m.		
		26	87	260	26	87	260
T_{max}	(h)	0.17-1	< 0.17	< 0.17	1-6	0.17-1	1-6
E_{max}[a]	(μM)	65.9 ±13.9	61.8 ± 11.2	59.19 ± 8.0	57.0 ± 6.9	55.3 ±5.0	54.6 ±11.7
Time to recovery	(days)	15-17	> 20	> 20	6-8	> 20	> 20

a　Total asparagine decrease from baseline

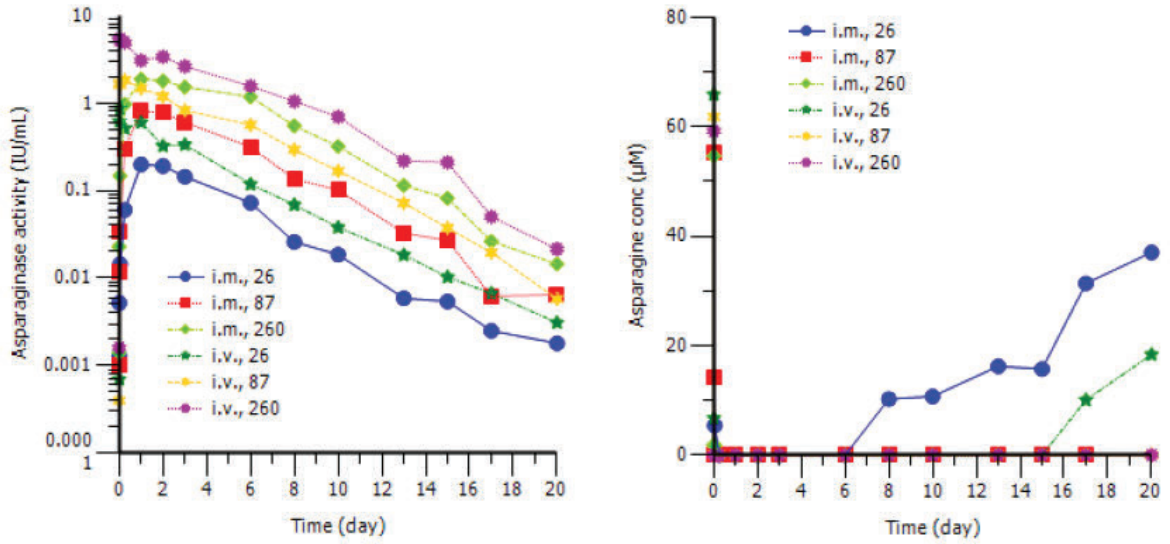


図 3.4:1 PEG-L-アスパラギナーゼ（26、87 及び 260 IU/kg）単回 i.v.又は i.m.投与のラットにおける血漿中の平均アスパラギナーゼ活性（左）及びアスパラギン濃度対時間曲線（右）

結論

PEG-L-アスパラギナーゼを i.v.及び i.m.投与したラットにおいて、C_{max} 及び AUC は投与用量の増加に比例して増加した。10 倍の用量範囲で、C_{max} は i.v.投与で 7.0 倍、i.m.投与で 9.9 倍であり、血中濃度－時間曲線下面積（0～無限大）（AUC_{INF}）は i.v.投与で 9.0 倍、i.m.投与で 12.8 倍であった。i.v.投与のラットでは $t_{1/2}$ 又は CL に用量依存性は認められなかったが、i.m.投与のラットでは $t_{1/2}$ 及び F が用量依存的であるようにみえた。

i.v.投与では、血漿中のアスパラギン濃度は高用量及び中用量で初回投与後 10 分以内、低用量投与で初回投与後 1 時間以内に検出限界以下まで減少した。アスパラギン濃度は、高用量投与群では試験期間中は枯渇状態で、中用量投与群では 20 日まで回復せず、低用量投与群では 17 日から回復が始まり 20 日で投与前の 30%まで回復した。

i.m.投与では、血漿中のアスパラギン濃度は全用量で投与後 6 時間以内に検出限界以下まで減少した。アスパラギン濃度は、高用量投与群では試験期間中は枯渇状態で、中用量投与群では 20 日まで回復せず、低用量投与群では 8 日から回復が始まり 20 日で投与前の 70%まで回復した。

3.5　ウサギにおける血漿中のアスパラギナーゼ濃度［8］

目的

本試験の目的は、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いずれかを単回投与したウサギでアスパラギナーゼ活性及び L-アスパラギン濃度を比較することであった。本試験は GLP 非準拠で行われ、結果を参考文献から要約した［8］。

方法

雄ニュージーランドホワイトウサギ 4 例（体重 2.9 ± 0.1 kg）のうち各 2 例に、ネイティブ L-アスパラギナーゼ又は PEG-L-アスパラギナーゼを 40 IU/kg の用量で単回 i.v.投与した。血漿中の L-アスパラギナーゼ活性及び L-アスパラギン定量のため、ネイティブ L-アスパラギナーゼ投与例から 32 日間、PEG-L アスパラギナーゼ投与例から 45 日間、定期的に耳介静脈からヘパリン血を採取し、分光光度アッセイ［7］で血漿中のアスパラギナーゼ及び L-アスパラギンを定量した。血漿データに一次指数関数曲線をフィッティングして、AUC を台形法で算出した。

結果

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単回 i.v.投与したラットにおける PK パラメーターを表 3.5:1 に示す。

表 3.5:1 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（40 IU/kg）の単回 i.v.投与ラットにおけるアスパラギナーゼ活性の PK パラメーター

Test item	Rabbit	AUC (IU*h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	CL (mL/day/kg)
L-asparaginase	1	10.5	20	98.4
	2	11.5	19	92.1
PEG-L-asparaginase	3	362.3	161	2.8
	4	317.3	126	2.8

ネイティブ L-アスパラギナーゼ投与ウサギでは、血漿中 L-アスパラギナーゼ活性が急激に低下し、投与 4 日後でかろうじて測定可能であった。同時に投与 10 分後で定量下限以下に低下した血漿中のアスパラギン濃度は 3 日から増加し始め、6 日には標準のレベルに戻った（図 3.5:1）。

対照的に PEG-L-アスパラギナーゼ投与ウサギでは、血漿中 L-アスパラギナーゼ活性の $t_{1/2}$ は 144 時間で 27 日まで検出可能であり、血漿中アスパラギン濃度も 27 日まで低値を維持した（図 3.5:1）。

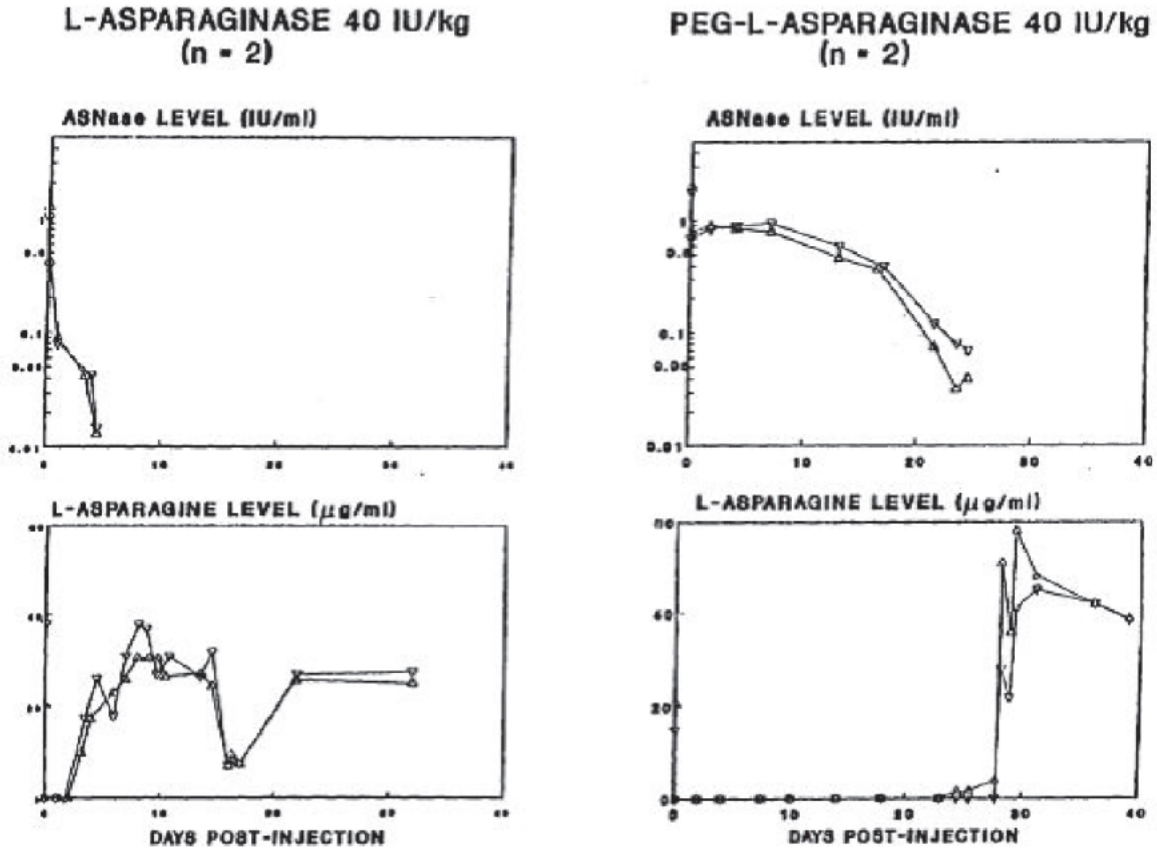


図 3.5:1 ネイティブ L-アスパラギナーゼ又は PEG-L-アスパラギナーゼ投与後のアスパラギナーゼ活性及びアスパラギン濃度

結論

mPEG による L-アスパラギナーゼの修飾は、ネイティブ L-アスパラギナーゼと比較して $t_{1/2}$ を顕著に延長し、血漿中アスパラギン濃度の枯渇も顕著に維持した。

3.6　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【CTD 4.2.2.2.3_Study #04-3082 - Report NP39178】

目的

本試験の目的は、[redacted]（[redacted]及び[redacted]）及び PEG-L-アスパラギナーゼ（オンキャスパー）の血漿 PK/PD プロファイルの特徴づけ及び比較、さらに i.m.投与のバイオアベイラビリティーの評価であった。本項では PEG-L-アスパラギナーゼに関連する結果のみ記載した。

方法

イヌに PEG-L-アスパラギナーゼを単回投与し PK/PD プロファイルを調査した。雌ビーグル犬に PEG-L-アスパラギナーゼを 26、87 及び 260 IU/kg（3 例/用量/投与経路）の用量で i.v.ボーラス又は i.m.投与した。

発色基質を用いた結合酵素アッセイで血漿中のアスパラギナーゼ活性を定量し、HPLC で血漿中のアスパラギンを定量した。

i.m.投与では、個々のデータに一次消失を用いた 1-コンパートメント吸収モデル、i.v.投与では、個々の血漿データに一次消失を用いた 1-コンパートメントモデルをフィッティングして PK 解析を行った。PD は群ごとにプールした血漿をノンコンパートモデルで解析した。

結果

PK 及び PD パラメーターをそれぞれ表 3.6:1 及び表 3.6:2 に、単回 i.v.又は i.m.投与時の平均血漿中アスパラギナーゼ活性及びアスパラギン濃度対時間曲線を図 3.6:1 に示した。

表 3.6:1 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ単回 i.v.又は i.m.投与後の PK パラメーター（平均 ± SD）

Parameter	Units	Dose (IU/kg) i.v.			Dose (IU/kg) i m.		
		26	87	260	26	87	260
t_{max}	(h)	-	-	-	12.0 ± 5.1	6.5 ± 5.7	17.2 ± 7.9
C_{max}	(UI/mL)	0.66 ± 0.02	1.88 ± 0.27	4.64 ± 0.09	0.53 ± 0.07	1.41 ± 0.16	4.45 ± 0.52
AUC_{INF}	(h*UI/mL)	104 ± 9	461 ± 22	1026 ± 168	118 ± 6	442 ± 78	1106 ± 112
F	(%)	100	100	100	114 ± 5	96 ± 17	108 ± 11
$t_{1/2}$	(h)	109 ± 11	172 ± 15	154 ± 28	148 ± 13	211 ± 19	161 ± 1
Vss	(mL/kg)	39.5 ± 1.4	46.8 ± 6.2	56.0 ± 1.1	-	-	-
CL	(mL/h/kg)	0.25 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.26 ± 0.04	-	-	-

表 3.6:2 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ単回 i.v.又は i.m.投与後の最高血中濃度到達時間（t_{max}）及び血漿中アスパラギンの回復時間（平均 ± SD）

Parameter	Units	Dose (IU/kg) i.v.			Dose (IU/kg) i m.		
		26	87	260	26	87	260
t_{max}	(h)	< 0.17	< 0.17	< 0.17	< 0.17	< 0.17	< 0.17
Time to recovery	(days)	14 - 17	> 23	20 - 23	20 - 23	14 - 17	> 23

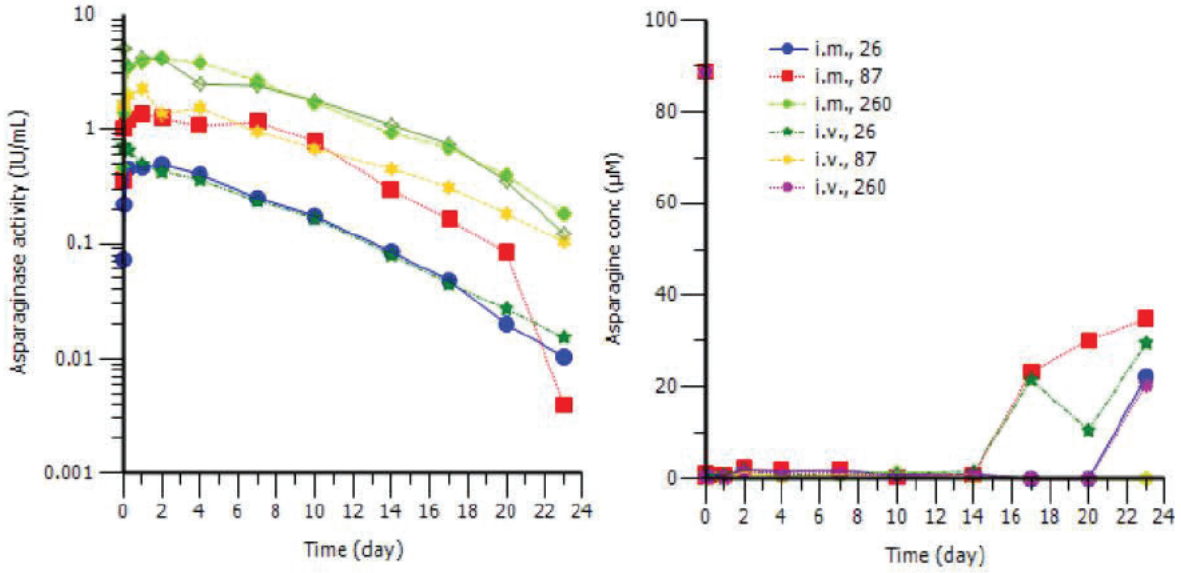


図 3.6:1 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ単回 i.v.又は i.m.投与後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性（左）及びアスパラギン濃度（右）対時間曲線

結論

PEG-L-アスパラギナーゼの i.v.及び i.m 投与後、C_{max} 及び AUC_{INF} は投与用量の増加に比例して増加した。10 倍の用量範囲で、C_{max} は i.v.投与で 7.0 倍、i.m.投与で 8.4 倍、AUC は i.v.投与で 9.9 倍、i.m.投与で 9.4 倍であった。i.m.投与におけるバイオアベイラビリティーは用量に関係なくほぼ 100%であった。i.v 及び i.m 投与のいずれにおいても、$t_{1/2}$ 又は CL に用量依存性はみられなかった。

PEG-L-アスパラギナーゼの i.v.及び i.m.投与後、血漿中のアスパラギン濃度は初回投与後 10 分以内に検出不可能なレベルに減少した。i.v.投与後、アスパラギン濃度は低用量投与群で 17 日、高用量投与群で 23 日まで回復しなかったが、中用量投与群では 23 日でも検出不可能なままであった。i.m.投与後、アスパラギン濃度は中用量投与群で 17 日、低用量投与群で 23 日まで回復しなかったが、高用量投与群では 23 日でも検出不可能なままであった。i.v.投与ではアスパラギンの回復が中用量投与群より高用量投与群で速かったことから、PD データと PK データの間に十分な相関は認められなかった。アスパラギン濃度が血漿中のアスパラギナーゼ濃度を反映していない可能性があるが、血漿試料の取り扱いミス、ラベルミスの可能性も排除できない。

3.7　サルにおける血漿中のアスパラギナーゼ濃度［4］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】

本試験の目的は、[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た PEG-L-アスパラギナーゼの PK を比較することであった。結果を参考文献から要約した［4］。

方法

雄成熟アカゲザル 6 例（体重 5.6～10.3 kg）を 2 群（3 例／群）に分け、各例に PEG-L-アスパラギナーゼ 2500 IU/m^2（≈208 IU/kg）を i.m.投与し、投与前及び投与後 25 日まで血液及び CSF を採取した。

[redacted]から入手したバッチ[redacted]及び[redacted]から入手したバッチ[redacted]のネイティブ L-アスパラギナーゼを本試験に用いた。

血漿中のアスパラギナーゼ活性は酵素反応速度アッセイ（定量限界 0.1 IU/mL）を用いて測定し、CSF 中のアスパラギナーゼ活性は Cooney ら［7］による酵素反応速度アッセイ変法（定量限界 0.01 IU/mL）を用いて測定した。血漿中及び CSF 中のアスパラギン濃度は HPLC と蛍光検出器で測定した（定量限界：血漿 2.0 μM、CSF 0.8 μM）。

結果

2 種類のネイティブ酵素から製造した PEG-L-アスパラギナーゼ活性の濃度対時間曲線を図 3.7:1、PK パラメーターを表 3.7:1 に示す。

表 3.7:1 ネイティブ L-アスパラギナーゼ 2 バッチから製造した PEG-L-アスパラギナーゼのサル単回 i.m.投与（2500 IU/m^2、208 IU/kg）後の PK パラメーター（平均 ± SD）

Parameter	Units	Batch [redacted]	Batch [redacted]
AUC_{INF}	(d*UI/mL)	53 ± 9.8	51 ± 11
$t_{1/2}$	(d)	5.5 ± 0.6	6.7 ± 0.6
CL/F	(mL/d/m^2)	48.0 ± 8.2	50.3 ± 10.7

d：days; (data source [4])

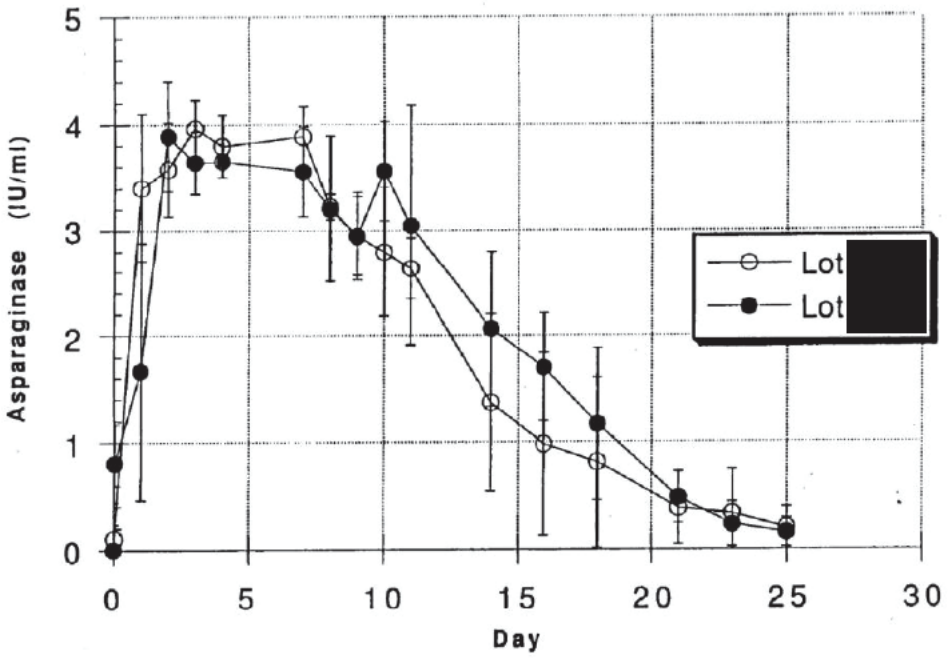


図 3.7:1 ネイティブ L-アスパラギナーゼ 2 バッチから製造した PEG-L-アスパラギナーゼのサル単回 i.m.投与（2500 IU/m²、208 IU/kg）後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイル

両原薬ともに PEG-L-アスパラギナーゼを i.m.投与した後の血漿中のアスパラギナーゼ活性はプラトーに達し（約 4 IU/mL）、5 日超にわたってプラトーを維持した。その後、血漿中の濃度は一次指数関数的に減衰し、$t_{1/2}$ は約 5.5～6.7 日であった。また、AUC 及び CL は両バッチで同等であり、アスパラギナーゼ活性は全例の CSF 中から検出できなかった。

血漿中のアスパラギンは投与後 24 時間までに検出できず、6 例中 4 例では 25 日の観察期間中に検出できなかった。2 例では、血漿中のアスパラギナーゼ活性が 0.1 IU/mL 以下に低下した際に、血漿中のアスパラギンが検出可能となった。

CSF 中のアスパラギンは 5 例で投与後 48 時間までに検出されず（<0.25 μM）、2 例を除く全例で少なくとも 10 日間は検出されなかった。

結論

PEG-L-アスパラギナーゼの最高濃度、CL 又は AUC について、2 バッチ間に見かけ上の差異は認められなかった。さらに、血漿中及び CSF 中の L-アスパラギン枯渇においても 2 バッチ間に見かけ上の差異は認められなかった。血漿中の L-アスパラギンは、PEG-L-アスパラギナーゼ 2500 IU/m² の i.m.投与後 14～25 日は検出できず、CSF の L-アスパラギン枯渇はより短期間で、より変動的であった。

3.8　ラットにおける[redacted]及び[redacted]（オンキャスパー）の単回 i.v.投与による比較 PK/PD 及び毒性試験【CTD 4.2.3.1.2_Study #824-015 – Report NP39217】

目的

本試験の目的は、ラットに[redacted]及び対照薬として[redacted]（オンキャスパー）を i.v.投与し、投与後 14 日の観察期間で潜在的毒性及び PK/PD プロファイルを評価することであった。本試験は CFR Title 21、part 58 の GLP 規制に従って行われた。本項では PEG-L-アスパラギナーゼに関連する結果のみ記載した。

方法

雌雄 CD［Crl:CD(SD)］ラット各 8 例からなる 2 群に、それぞれ PEG-L-アスパラギナーゼを 100 及び 500 IU/kg の用量で投与した。雌雄各 8 例からなる 1 群を対象群として、同様にビヒクル（50 mM PBS、pH7.3）を投与した。PEG-L-アスパラギナーゼ及びビヒクル 1 mL/kg を約 30 秒かけて i.v.投与した。

投与後 336 時間までの事前に決定した時点で全例から血液を採取し、血漿中のアスパラギナーゼ活性定量（PK）、L-アスパラギン及び L-グルタミン濃度定量（PD）に供した。

ラット血漿中のアスパラギナーゼ活性はバリデーションされた酵素アッセイ法【CTD 4.2.2.1.1_Study #06-8473 – Report NP39151】で、L-アスパラギン及び L-グルタミンはバリデーションされた LC-MS/MS 法【CTD 4.2.2.1.3_Study #06-8938 – Report NP39158】で測定し、各例の血漿データをノンコンパートメントモデルで解析した。

結果及び結論

PEG-L-アスパラギナーゼ 100 及び 500 IU/kg を単回 i.v.投与した後の血漿中のアスパラギナーゼ活性は、100 IU/kg を投与した雌 4 例を除き投与後 336 時間（投与後 14 日）まで定量可能であった。平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイルを図 3.8:1 に、アスパラギナーゼ活性の PK パラメーターを表 3.8:1 に示す。

表 3.8:1 ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性の PK パラメーター（平均 ± SD）

Dose (IU/kg)	Gender	AUC_{last} (IU*h/mL)	C_{max} (IU/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)
100	Female	93.5 ± 46.1	0.974 ± 0.480	15.9 ± 11.3	79.5 ± 16.1
	Male	163 ± 22.7	1.36 ± 0.289	10.7 ± 11.3	68.1 ± 6.47
500	Female	720 ± 199	5.91 ± 2.510	15.2 ± 12.2	77.6 ± 12.2
	Male	726 ± 188	6.03 ± 1.890	12.1 ± 12.7	74.9 ± 10.7

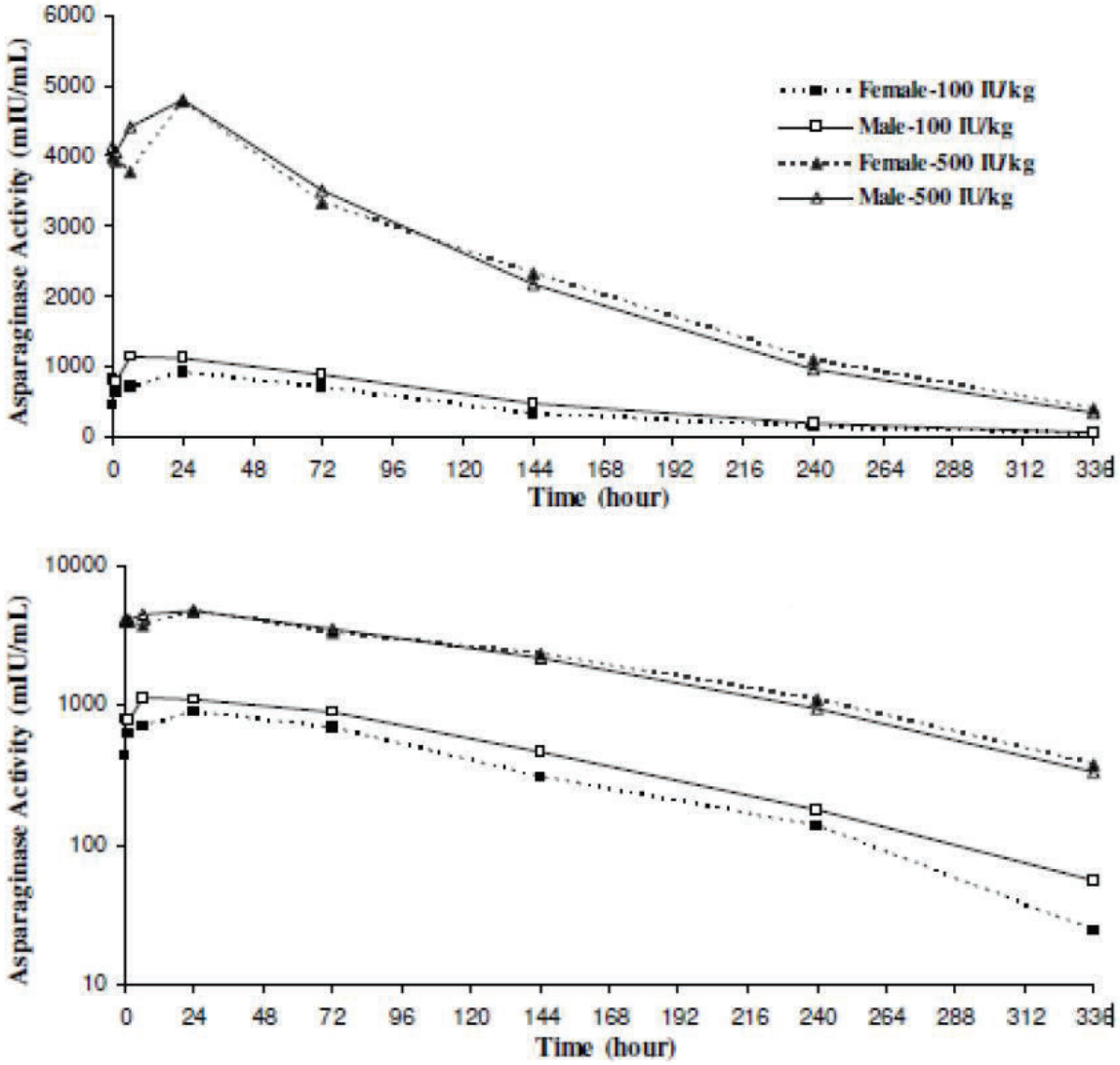


図 3.8:1 ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイル（直線及び片対数プロット）

血中濃度－時間曲線下面積（0～最終定量可能時点）(AUC_{last})及び C_{max} が投与量にほぼ比例していたことを除けば、ラットの全身曝露は用量増加に伴い増加した。PEG-L-アスパラギナーゼの投与量を 5 倍に増加した結果、アスパラギナーゼ活性の AUC_{last} 及び C_{max} は雌でそれぞれ 8 及び 6 倍、雄でそれぞれ 4 及び 4 倍に増加した。

PEG-L-アスパラギナーゼに対する全身曝露は 100 IU/kg の用量では雄の方が高かったが、500 IU/kg の用量では雌雄でほぼ等しかった。PEG-L-アスパラギナーゼ投与後の血漿中の L-アスパラギン濃度は、試料を採取した 14 日間にわたってほぼ全例で定量限界以下であった。

血漿中の L-グルタミン濃度はあらゆる時点で枯渇されず、PEG-L-アスパラギナーゼによって投与後 244 及び 336 時間の時点で増加しているようにみられた。

3.9　ビーグル犬における[redacted]及び[redacted]（オンキャスパー）の単回 i.v.投与による比較 PK/PD 及び毒性試験【CTD 4.2.3.1.3_Study #824-016 – Report NP39211】

目的

本試験の目的は、[redacted]及び対照薬として[redacted]（オンキャスパー）をビーグル犬に単回 i.v.投与し、投与後 14 日間の観察期間で潜在的毒性及び PK/PD プロファイルを評価することであった。本試験は CFR Title 21、part 58 の GLP 規制に従って行われた。本項では PEG-L-アスパラギナーゼに関連する結果のみ記載した。

方法

雌雄ビーグル犬各 4 例からなる 2 群に、それぞれ PEG-L-アスパラギナーゼを 100 及び 500 IU/kg の用量で投与した。雌雄各 4 例からなる 1 群を対象群として、同様にビヒクル（50 mM PBS、pH7.3）を投与した。PEG-L アスパラギナーゼ及びビヒクル 0.75 mL/kg を 3 分間隔で i.v.投与した。

投与前及び投与後 336 時間までの事前に決定した時点で全例から血液を採取し、血漿中のアスパラギナーゼ活性定量（PK）、L-アスパラギン及び L-グルタミン濃度定量（PD）に供した。

イヌ血漿中のアスパラギナーゼ活性はバリデーションされた酵素アッセイ法【CTD 4.2.2.1.2_Study #06-8481 - Report NP39147】で、L-アスパラギン及び L-グルタミンはバリデーションされた LC-MS/MS 法【CTD 4.2.2.1.3_Study #06-8938 - Report NP39158】で測定し、各例の血漿データをノンコンパートメントモデルで解析した。

結果及び結論

PEG-L-アスパラギナーゼ 100 及び 500 IU/kg を単回 i.v.投与した後の血漿中のアスパラギナーゼ活性は、10 日間まで確認したが 14 日間では確認できなかった 1 例を除き、投与後 14 日まで定量可能であった。本例はオンキャスパー 500 IU/kg を投与した雌で、血漿中のアスパラギナーゼ活性の欠乏は、血漿中のアスパラギン量の有意な回復と相関していた。それ以外の全例では、血漿中のアスパラギナーゼ量は L-グルタミン濃度に影響がなかった一方で、L-アスパラギンが検出以下の濃度であったことと相関していた。イヌにおける平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイルを図 3.9:1 に、アスパラギナーゼ活性の PK パラメーターを表 3.9:1 に示す。

表 3.9:1 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の血漿中アスパラギナーゼ活性の PK パラメーター（平均 ± SD）

Dose (IU/kg)	Gender	AUC_{last} (IU*h/mL)	C_{max} (IU/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)
100	Female	418 ± 70.7	2.12 ± 0.248	18.3 ± 35.8	184 ± 74.7
	Male	360 ± 65.0	1.66 ± 0.352	1.83 ± 2.81	206 ± 78.5
500	Female	1,660 ± 361	8.48 ± 1.27	36.3 ± 41.2	139 ± 67.9
	Male	2,230 ± 165	11.4 ± 3.66	30.3 ± 59.8	281 ± 123[a]

a　N=4 (male dog 117 excluded because of not reliable estimation of terminal elimination rate constant)

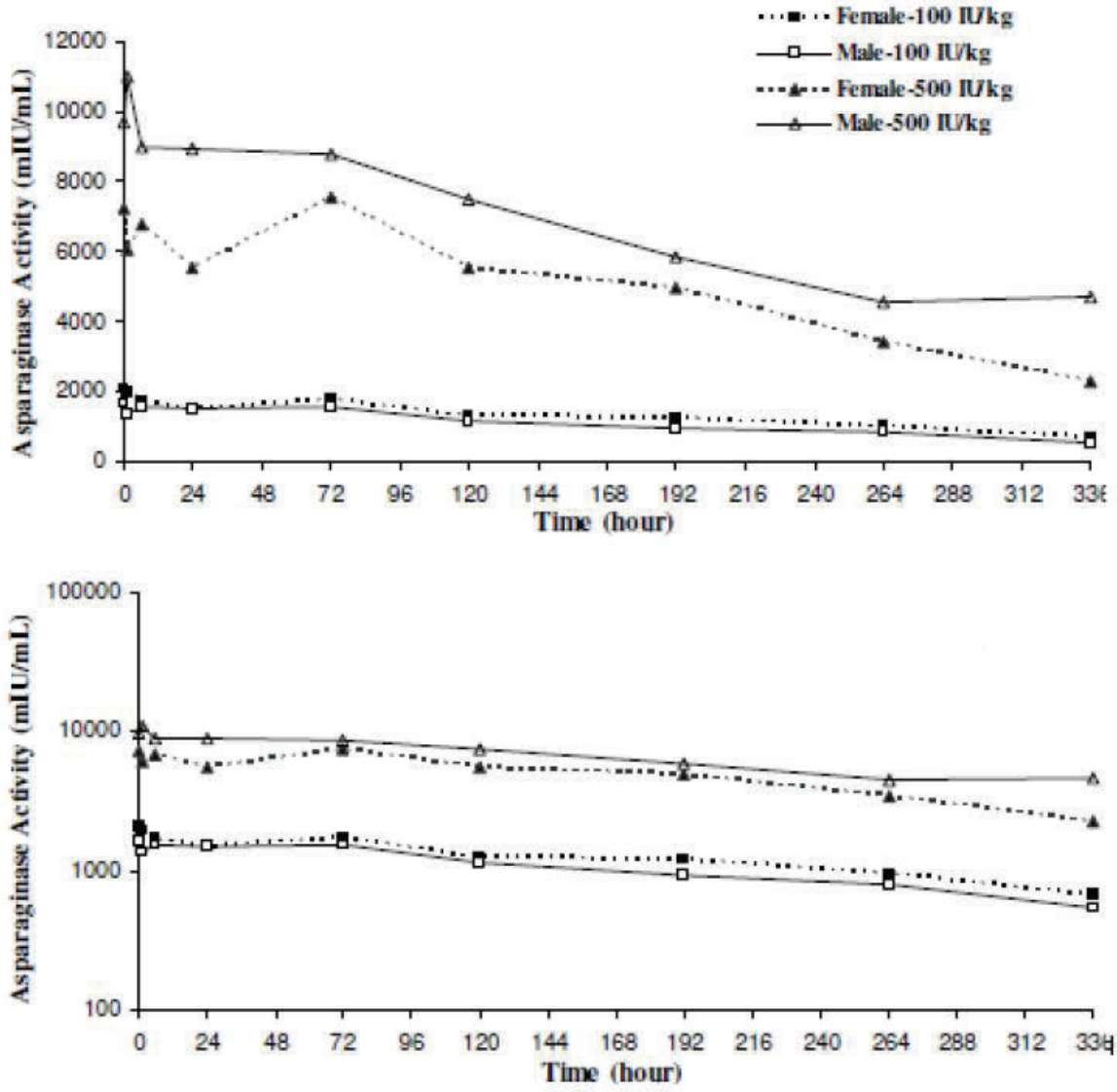


図 3.9:1 イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ（100 及び 500 IU/kg）単回 i.v.投与後の平均血漿中アスパラギナーゼ活性対時間プロファイル（直線及び片対数プロット）

AUC_{last} 及び C_{max} の増加は、雄の 500 IU/kg 投与群の C_{max} を除き、ほぼ用量に比例した（±30%）。100 及び 500 IU/kg 投与群を比較した場合、AUC_{last} 及び C_{max} は雌でいずれも 4 倍、雄でそれぞれ 6 及び 7 倍であった。

PEG-L-アスパラギナーゼ 100 IU/kg を i.v.投与した後のアスパラギナーゼ活性に対する全身曝露は、雌雄間でほぼ等しかった（±30%）が、500 IU/kg では雄がわずかに大きかった。

3.10　ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼの反復 i.m.投与毒性試験【CTD 4.2.3.2.4_Study #3 – Report NP39218】

目的

本試験の目的は、ラットに PEG-L-アスパラギナーゼを反復 i.m.投与における亜急性毒性の影響を判定し、反復 i.m.投与後の血漿中のアスパラギナーゼ活性を評価することであった。本試験は CFR Title 21、part 58 の GLP 規制に従って行われた。結果を参考文献から要約した［14］。

方法

雌 Wistar ラット各 8 例（180～190 g）に、それぞれ PEG-L-アスパラギナーゼを 100、200 又は 400 IU/kg の用量で 1 週間あたり 5 回 i.m.投与した。アスパラギナーゼ活性を定量するための試料を、各群 3 例の尾静脈から、初回投与 24 時間後から 2 週間後までの各日の投与前に採取した。

結果及び結論

PEG-L-アスパラギナーゼを反復 i.m.投与した後のラットの血漿中のアルパラギナーゼ活性を表 3.10:1 に示す。

表 3.10:1　　ラットにおける PEG-L-アスパラギナーゼ連日 i.m.投与中の血漿中のアスパラギナーゼ活性（平均 ± SD）

Dose	Plasma asparaginase activity (IU/mL)				
(IU/kg)	PID 1	PID 7	PID 8	PID 9	PID 11
100	1.21 ± 0.17	2.09 ± 0.81	3.16 ± 0.32	3.89 ± 1.04	5.15 ± 0.48
200	2.08 ± 0.32	4.50 ± 0.23	6.15 ± 0.73	6.65 ± 1.05	7.46 ± 1.59
400	5.94 ± 0.85	12.53 ± 2.47	16.46 ± 2.36	20.52 ± 0.11	20.51 ± 0.32

PID： post-injection day; (data source ［14］)

3.11　イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼの毒性【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a - Report NP39220、CTD 4.2.3.2.6_Study 4b - Report NP39221 - 4.2.3.2.6】

本試験の目的は、イヌに 2 用量の PEG-L-アスパラギナーゼを i.v.又は i.m.投与し毒性の影響を判定すること、さらに、血漿中の PEG-L-アスパラギナーゼ定量に供する血液を採取することであった。本試験は CFR Title 21、part 58 の GLP 規制に従って行われた。結果を参考文献から要約した［11,14］。

方法

ビーグル犬 4 例（6.8～8.1 kg）に PEG-L-アスパラギナーゼ（バッチ番号 [redacted] 及び [redacted]）を 200 IU/kg の用量で 1 週間に 1 回、2 週間続けて投与した。雌雄各 1 例に橈側皮静脈から i.v.、他の各 1 例に臀部から i.m.投与した【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a - Report NP39220】。同様に、6 週間後に PEG-L-アスパラギナーゼを 1200 IU/kg の用量で 1 週間に 1 回、2 週間続けて同じ投与経路で投与した【CTD 4.2.3.2.6_Study #4b - Report NP39221】。血漿中の PEG-L-アスパラギナーゼ活性が検出できなくなる（2 回目の投与後約 4 週間）まで、活性を定期的に定量した。

結果及び結論

PEG-L-アスパラギナーゼ 200 IU/kg を投与した場合、血漿中の PEG-L-アスパラギナーゼ量は、i.v.及び i.m.投与例で同等で、2 回目の投与後 3~4 週間にわたって循環血から活性が検出可能であった（表 3.11:1）。1200 IU/kg を投与した場合、初回投与後 5 日間は血漿中のアスパラギナーゼ量が全例においてほぼ同じであった。しかしながら、i.m.投与した雌雄各 1 例において、投与後 7 日の血漿中のアスパラギナーゼ活性が非常に低い濃度まで低下した。アスパラギナーゼ活性は、2 回目の 1200 IU/kg の投与後 3～4 週間以内に血漿中から消失した（表 3.11:2）。大きな性差は認めなかった。

表 3.11:1イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ 200 IU/kg 投与後のアスパラギナーゼ活性量【CTD 4.2.3.2.3_Study #4a - Report NP39220】

Route of administration	**i.v.**		**i m.**	
Dog # (sex)	**245984 (M)**	**245038 (F)**	**245062 (M)**	**244783 (F)**
Time after 1st dose (1 dec-82)	(IU/mL)		(IU/mL)	
24 h	5.00	4.34	3.58	4.94
2 day	4.79	3.79	4.23	4.46
6 day	1.90	0.10	0.29	2.40
Time after 2nd dose (8 dec 82)	(IU/mL)		(IU/mL)	
12 day	3.92	3.19	3.34	3.19
20 day	0.99	1.15	1.79	0.02
28 day	nd	0.29	0.43	nd

nd：not detectable

表 3.11:2イヌにおける PEG-L-アスパラギナーゼ 1200 IU/kg 投与後の血漿中の L-アスパラギナーゼ活性量【CTD 4.2.3.2.6_ Study #4b - Report NP39221】

Route of administration	**i.v.**		**i.m.**	
Dog # (sex)	**245984 (M)**	**245038 (F)**	**245062 (M)**	**244783 (F)**
Time after 1st dose (26 jan 83)	(IU/mL)		(IU/mL)	
24 h	26.04	18.54	20.84	24.17
48 h	30.84	28.12	28.75	23.34
5 day	27.08	24.17	23.75	20.42
7 day	16.46	16.67	0.25	0.19
Time after 2nd dose (2 feb 83)	(IU/mL)		(IU/mL)	
24 h	35.42	34.58	21.87	17.71
48 h	30.84	42.92	9.79	19.17
6 day	6.46	25.83	0.34	0.51
8 day	2.42	17.50	0.10	0.76
14 day	0.09	10.50	0.03	0.46
3 week	0.12	2.50	nd	0.07
4 week	nd	0.37	nd	nd
5 week	-	nd	-	nd

nd：not detectable

3.12　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】

本試験の目的は、ビーグル犬に液剤及び凍結乾燥剤の 2 剤形を単回（投与日：1 日目）又は 4 週間反復（投与日：1、15、22、29 及び 36 日目）i.v.ボーラス投与した後の PK、PD 及び抗薬剤抗体の同等性を検証することであった。本試験は GLP 規制に従って行われた。本項では PK データの概要を示し、抗薬物抗体に関するデータは 2.6.6.8　その他の毒性試験に、PD については 2.6.2.2.6　Oncaspar 凍結乾燥剤の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 同等性試験に示す。本試験は表 3.12:1 に示した 4 群で行った。

表 3.12:1　　Study 15-3297 の試験デザイン

Group	Treatment and frequency of dose	Dose (IU/kg BW)	Male	Female
1	Oncaspar liquid single dose	500	5	6
2	Oncaspar liquid Repeat-dose	500	5	5
3	Oncaspar lyophilized single dose	500	5	5
4	Oncaspar lyophilized Repeat-dose	500	6	5

ビーグル犬（雌雄各 5 例/群）に液剤又は凍結乾燥剤の溶解液を 500 IU/kg 体重（0.667 mL/kg 体重）の用量で i.v.投与した。Group 1 及び 3 にはそれぞれ液剤及び凍結乾燥剤の溶解液を単回投与し、同様に Group 2 及び 4 にはそれぞれ反復投与した。

Group 4 の雄 1 例及び Group 1 の雌 1 例の合計 2 例が、初回投与日から約 1 週間後の同じ日に死亡した。剖検の結果から、両例ともに、他の若齢イヌで報告されているのと同じ突然かつ重度の呼吸器感染症が死因であった。詳細な調査を行ったが、被験薬剤との関連性は認められなかった。さらに、他の個体において試験期間中の体調悪化のエビデンスが認めることはできなかったことから、両死亡例は剤形には関連しないと考えられた。

両死亡例の代わりにナイーブ動物 2 例を追加し、試験を継続した。

投与後 1、15、22、29 及び 36 日に反復投与し、投与後 1 及び 36 日に血液を採取し、PK 及び PD を解析した。また、22 及び 36 日に採取した全例の血液を抗薬物抗体解析に用いた。評価した他のパラメーターは、生存率、臨床観察、体重、摂餌量、呼吸数、体温、血液学、血液凝固及び血液化学であった。体重、摂餌量、血液学、血液凝固及び血液化学において被験薬剤に関連した有害作用は認められず、また被験薬剤に関連した臨床所見も認められなかった。

2 剤形の単回投与及び 36 日間反復投与における平均 C_{max} 及び投与後 0～552 時間の平均 AUC（$AUC_{0\text{-}552}$）を表 3.12:2 及び図 3.12:1 に示した。

表 3.12:2　　2 剤形の単回投与及び 36 日間反復投与における C_{max} 及び AUC_{0-522}（平均 ± SD）

Formulation (500 IU/kg BW)	C_{max} (mIU/mL) (SD)				AUC_{0-552} (mIU.h/mL) (SD)			
	Day 1		Day 36		Day 1		Day 36	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Liquid	10700	9450	20200	19000	3250000	2660000	4660000	4470000
[a]	(1600)	(610)	(2700)	(2200)	(370000)	(140000)	(690000)	(670000)
Lyophilized	9580	9250	17800	17200	2700000	2520000	4170000	4530000
[a]	(540)	(840)	(1400)	(1800)	(190000)	(220000)	(1120000)	(320000)

a　Standards Deviations (SD)

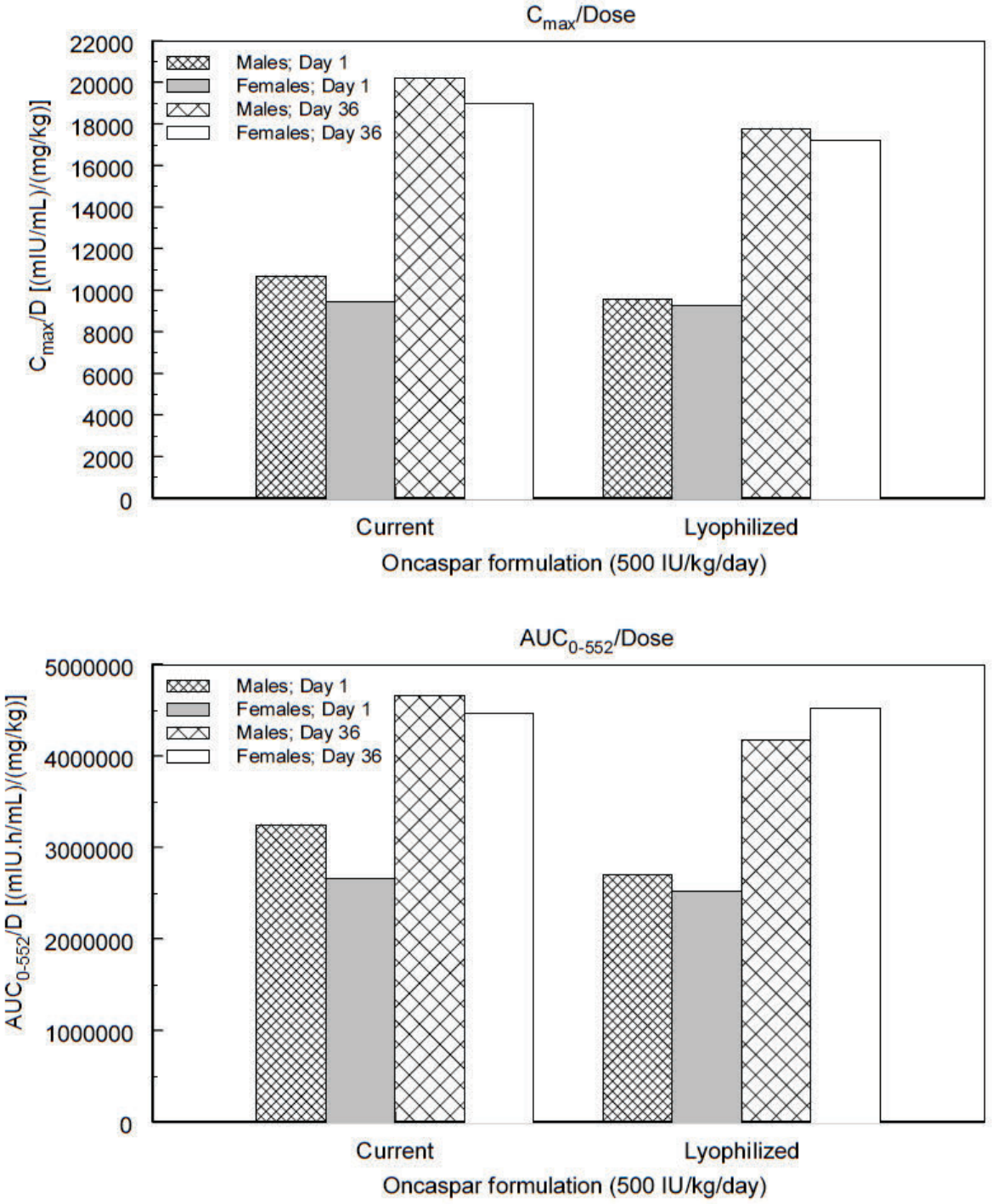


図 3.12:1　　2 剤形の単回投与及び 36 日間反復 i.v.投与におけるアスパラギナーゼの平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-552}

液剤のアスパラギナーゼの平均 C_{max}、平均血漿中アスパラギナーゼ濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-552}）に対する凍結乾燥剤における同パラメーターの比率を性別ごとに表 3.12:3 に示す。

表 3.12:3　　2 剤形における性別ごとの PK パラメーターの比率

Formulation (500 IU/kg BW)	Dose level ratio	C_{max} ratio				AUC_{0-552} ratio			
		Day 1		Day 36		Day 1		Day 36	
		Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Liquid	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lyophilized	1	0.90	0.98	0.88	0.91	0.83	0.95	0.89	1.0

アスパラギナーゼに対する全身曝露の C_{max} 及び AUC_{0-552} は、単回投与（Day 1）及び 36 日間反復投与（Day 36）で両剤形で同等であった。AUC_{0-552} では剤形による有意な差異は認められなかったが、C_{max} は凍結乾燥剤が液剤よりわずかに低かった（8%）。投与方法及び投与経路（i.v. ボーラス投与）を考慮すると、動物実験における技術的限界内であると考えられた。さらに、イヌ PK のモデリングとシミュレーションは、ヒトにおける液剤と非常に類似した AUC 及び C_{max} を示した［8.1 項］。

総じてアスパラギナーゼに対する全身暴露の C_{max} 及び AUC_{0-552} は雌雄間で類似しており、性別間の統計学的有意差は認められなかった。

36 日間反復投与（Day 36）後の C_{max} 及び AUC_{0-552} は単回投与（Day 1）よりも高く、両者間に統計学的有意差が認められた（$p<0.001$）。様々な個体の AUC_{0-552} に基づいて算出した平均蓄積率は 1 より大きかったことから、反復 i.v.投与後にアスパラギナーゼの蓄積が起こったことを示した。

全例でアスパラギナーゼの終末相半減期を適切に推定することはできなかったものの 46.3～232 時間と推定され、用量及び性別に依存していないようであった。

単回及び 36 日間反復投与における各群の雌雄を合算した平均 C_{max} 及び平均 AUC_{0-552} を表 3.12:4 及び図 3.12:2 に示す。

表 3.12:4　　各群の平均 PK データ（Study 15-3297 - NP39227）

Formulation (500 IU/kg BW)		Group mean C_{max} (mIU/mL)		Group mean AUC_{0-552} (mIU h/mL)	
		Day 1	Day 36	Day 1	Day 36
Oncaspar liquid	Geomean	9947	19440	2929202	4514287
	Mean	10018	19580	2953000	4561000
	SD	1300	2404	405245	648322
Oncaspar lyophilized	Geomean	9393	17416	2603255	4258048
	Mean	9416	17480	2611000	4350000
	SD	688	1555	214758	797663

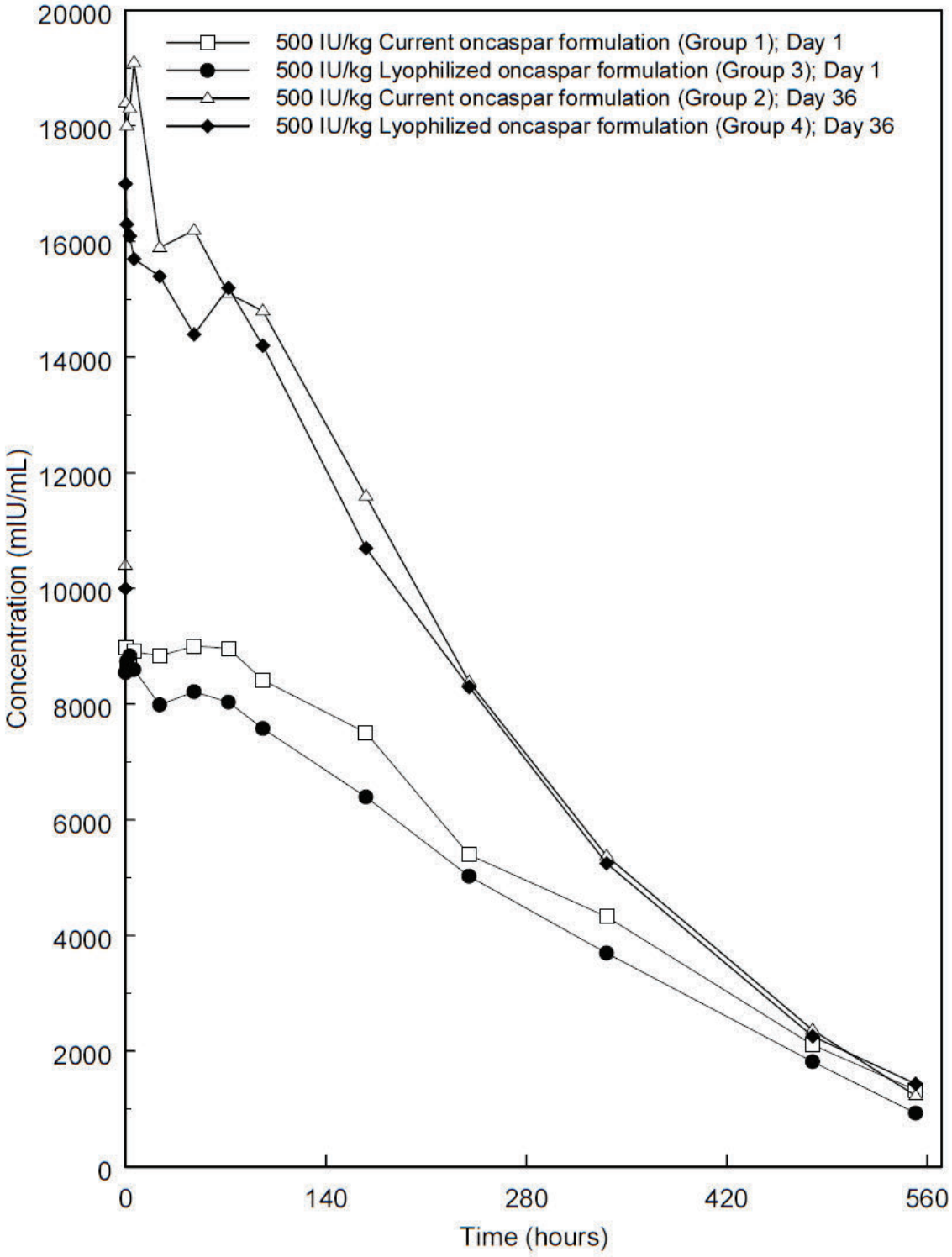


図 3.12:2　　イヌにおける 500 IU/kg BW 単回又は反復 i.v.投与後のアスパラギナーゼの平均血漿中濃度

2 剤形の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}552}$ を分析し、対応する幾何平均比の両側 90%信頼区間を表 3.12:5 に要約する。

表 3.12:5　2 剤形の C_{max} 及び AUC_{0-552} と幾何平均比の両側 90%信頼区間

Parameter	Table of Formulation means (back-transformed - mIU/mL)		90% Confidence interval of mean ratio (Lyophilized /Liquid)		
	Lyophilized	Liquid	Lower	Ratio	Upper
C_{max}	12 790	13 943	0.867	0.917	0.970
AUC_{0-552}	3 329 382	3 636 380	0.841	0.916	0.996

C_{max} は信頼区間が 0.867～0.970、AUC_{0-552} は信頼区間が 0.841～0.996 であり、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（0.8～1.25）に完全に収まったことから、2 剤形の C_{max} 及び AUC_{0-553} は生物学的同等であることが示された。

アスパラギナーゼに対する全身曝露は 2 剤形で同等で、反復投与の雌雄でアスパラギナーゼの蓄積が認められた。アスパラギンは 41 例全例で 336 時間まで、41 例中 40 例で 552 時間まで完全に抑制された。

要約として、2 剤形を 500 IU/kg BW の用量で投与した場合に注目すべき剤形間の差異は認められず、PK、PD 及び抗薬物抗体プロファイルは 2 剤形で同等であった。

4.　分布

ラットに PEG-L-アスパラギナーゼを単回 i.v.投与した後の定常状態における分布容積（Vss）は 26～260 IU/kg の用量で約 39～51 mL/kg【CTD 4.2.2.2.1_Study #04-2861 - Report NP39226】、100～500 IU/kg の用量で約 63～98 mL/kg【CTD 4.2.3.1.2_Study #824-015 - Report NP39217】であった。Vss の差異は PK プロファイルの評価に用いられた方法の違い（コンパートメント解析とノンコンパートメント解析）に由来する可能性がある。

逆にイヌに 26～500 IU/kg の用量を単回 i.v.投与した後の Vss は、PEG-L-アスララギナーゼの PK プロファイルの評価に用いられた方法と関係なく約 39.5～57.5 kg/mL であった。

ラット及びイヌにおいて算出された Vss は、それぞれの生物の血漿量/血液量と一致したことから、PEG-L-アスパラギナーゼが体循環外に分布する傾向が低いことが示されている。

PEG-L-アスパラギナーゼの組織分布について、PEG-L-アスパラギナーゼを i.m.投与［4］【CTD 4.2.2.2.6_NIH Study – Report NP39179】及びネイティブ L-アスパラギナーゼを i.v.投与［13］したアカゲザルの CSF 中に検出できなかったことから、両剤形ともに CSF 関門を通過しないことが示されている。

一方で、Adamson［2］は妊娠 8 日目に L-アスパラギナーゼを i.v.投与した妊娠ウサギの黄嚢液中から L-アスパラギナーゼ活性を確認した。投与後 2 時間の時点で卵黄嚢液中のアスパラギナーゼ活性は母体血漿に対して約 10%であったが、投与後 8 時間で L-アスパラギナーゼ活性は母体血漿に対して約 27%に増加したことから、最低でもネイティブ L-アスパラギナーゼは胎盤関門を通過することが示されている。

PEG-L-アスパラギナーゼが胎盤関門を通過する可能性があるが、PEG 化は体組織や生物学的関門を通過する高分子の移動を妨げることが報告されている［5］。

5.　代謝

化合物の性質及びその代謝に関する情報が限定されていることから、PEG-L-アスパラギナーゼの代謝及び排泄は 6 項でまとめて考察する。

6.　排泄

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、主に肝臓取り込み、タンパク質分解、免疫系によるクリアランス等の複数経路で体から排泄されることが報告されている［5］。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（RES）としても知られている単核食細胞系（MPS）による高分子取り込みの最初のステップである血流中のオプソニン化を回避することによって、体内のタンパク質薬の滞留時間を延長する最も成功した技術の 1 つであることはよく知られており、結果として、RES 及び免疫系が仲介するクリアランスを減少させる［5,10］。

ヒト試料の血清及び尿 ELISA の結果から、PEG-L-アスパラギナーゼの活性及びタンパク質が尿排泄以外でクリアランスされることが示唆されている［3］。可能性がある機構の 1 つとして、タンパク質分解及び／又は腎臓以外の臓器による除去も含まれる。Asselin ら［3］は、L-アスパラギナーゼは肝臓で代謝され胆汁中に排泄されるか、又は RES によって血漿から濾過される可能性を示唆したが、以前の試験報告書ではこれに該当しない可能性があることが示唆された。

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。実際に、ヒトにおける排泄バランス試験では i.v.投与後 12 時間のうちに 86%の PEG 1000 及び 96%の PEG 6000 が尿中に排泄され、未変化体の胆汁排泄は主要ではないと考えられている［16］。

7.　薬物動態学的薬物相互作用

薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は行っていない。

8.　その他の薬物動態試験

8.1　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［6］

ネイティブ *E. coli* アスパラギナーゼを PEG 化したオンキャスパー液剤は抗腫瘍併用療法剤の 1 つであり、急性リンパ性白血病（ALL）における基礎治療となっている。アスパラギナーゼ療法の目的はアスパラギンを完全に枯渇することであり、製剤の有効期間を延長するために、オンキャスパー凍結乾燥剤が開発された。

この解析の目的は、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 患者における凍結乾燥製剤の投薬をサポートするために使用される。

イヌに 2 つの剤形を 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スケーリングを含んでいた。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が行われた。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。適格患者は、Calasparagase pegol（オンキャスパーと異なる PEG 化 L-アスパラギナーゼ複合体）群又はオンキャスパーと増強 Berlin-Frankfurt-Munster（BFM）型多剤化学療法の併用群に 2：1 の比率でランダム化された。DFCI-11-001 試験（ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01574274）は、Dana-Farber Cancer Institute（DFCI）ALL コンソーシアムの治療バックボーンで治療された 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 Calasparagase 投与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。初期データから、アスパラギナーゼの活性時間プロファイルは、典型的な非線形（すなわち飽和可能）を示すことが明らかとなった。その結果、線形及び非線形（V_{max}/Km）排泄の両方を有する 1-コンパートメントモデルが構築された。モデルは、概して臨床 PK プロファイルで観察される動態も反映していた。アロメトリー係数として、線形及び非線形 CL=0.75、分布容積（Vd）=1.0 を適用した。イヌのデータに基づいた最終母集団 PK モデルは、良好なフィッティングを示した。凍結乾燥剤は、イヌに液剤を投与した場合と比べて、統計学的有意な 7.4%大きい分布容積（V）と関連することが示唆された。

AALL07P4 試験及び DFCI-11-001 試験の ALL 患者において、オンキャスパー液剤を 1 回の導入用量 2500 IU/m^2 で投与後に測定されたアスパラギナーゼ活性のデータを用いて、イヌで構築した 1-コンパートメントモデルの外部バリデーションを行った。イヌの母集団 PK モデル（他のイヌの PK パラメーターに加えて、ALL 患者の体重の最低値及び最高値と関連した投与量を使用）のブートストラップ法（n=1000）の 95%信頼区間下限値である Vmax（4.96 IU/h）を用いて、アスパラギナーゼの活性時間プロファイルをシミュレーションした。モデルの予測性能を定量的に評価するため、観察及び予測された活動時間プロファイルに基づいて C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ を算出した。

ALL 患者における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ の観察値（Observed）及び予測値（Predicted）の中央値を表 8.1:1 に要約する。

表 8.1:1 ALL 患者における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ の観察値及び予測値の中央値

Study	Median C_{max} (IU/mL)			Median $AUC_{0\text{-}28days}$ (IU.day/mL)		
	Predicted	Observed	Percent Difference (%)	Predicted	Observed	Percent Difference (%)
AALL07P4	1.528	1.470	+3.9	8.184	14.953	-45.3
DFCI-11- 001	1.597	1.613	-1.0	8.976	17.574	-48.9

モデルから予測されたオンキャスパー液剤の初回投与の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}28days}$ の中央値と観察値の差異は、AALL07P4 試験でそれぞれ約 4%及び約-45%、DFCI-11-001 試験でそれぞれ約-1%と約-49%であった。

イヌに凍結乾燥剤（液剤より分布容積が 7.4%高い）を投与して収集したデータを適用して、PK モデルをシミュレーションした結果を表 8.1:2 に要約する。

表 8.1:2 イヌにおける PK データを適用した PK モデルのシミュレーション

Study	Median C_{max} (IU/mL)			Median $AUC_{0\text{-}28days}$ (IU.day/mL)		
	Lyophilized Formulation	Liquid Formulation	Percent Difference (%)	Lyophilized Formulation	Liquid Formulation	Percent Difference (%)
AALL07P4	1.423	1.528	-6.9	7.785	8.184	-4.9
DFCI-11- 001	1.488	1.597	-6.9	8.564	8.976	-4.6

両試験において凍結乾燥剤の初回 i.v.投与後のアスパラギナーゼの予測値中央値は、C_{max} が液剤の 7%以内、$AUC_{0\text{-}28day}$ が液剤の 5%以内と予想された。

2 剤形のアスパラギナーゼの予測活性のプロットを観測値とともに図 8.1:1 に示す。

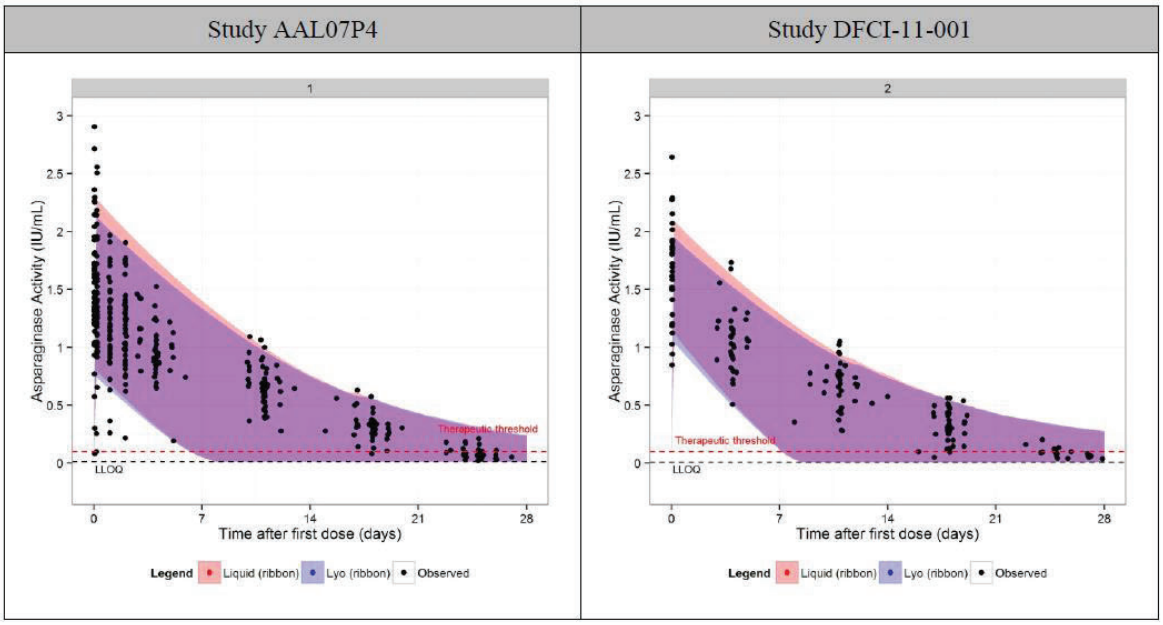


図 8.1:1　2 剤形のアスパラギナーゼの観察値及び予測活性のプロット

PK 解析から示唆されたとおり、母集団 PK モデルはアスパラギナーゼ活性を正確に予測した（重複領域；2.5～97.5 パーセンタイル）。

オンキャスパーの PD 評価は、ヒトとイヌでアスパラギン濃度のベースラインが同等であり、用量調節後は、両種でアスパラギン濃度がほぼ完全に抑制されていることを示唆した。イヌにおける凍結乾燥製剤の抗薬物抗体プロファイルは、凍結乾燥剤が液剤より劣る抗薬物抗体プロファイルを示さなかったことを示唆する。

ALL 患者の活動時間プロファイルを予測するために用いられたイヌの PK データから、凍結乾燥製剤と液剤の 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る。

9.　考察及び結論

9.1　PK データの要約

げっ歯類及び非げっ歯類における PEG-L-アスパラギナーゼの PK データの要約を表 9.1:1 及び表 9.1:2 に示す。

表 9.1:1 げっ歯類における PEG-L-アスパラギナーゼの PK 及びトキシトキネティクス試験の要約表

Parameter	**Units**	**(Abuchowski, 1984) [PE0150533] [1]**		**Study #7 – NP39223 - 4.2.2.2.4**			**Study #53 NP39224 4.2.2.2.2**	**Study #04-2861 - NP39226 - 4.2.2.2.1**						**Study #824-015 – NP39217 - 4.2.3.1.2**			
Species		BDF1 mouse		Swiss-Webster mouse			Swiss-Webster mouse	Sprague-Dawley rat						Sprague-Dawley rat			
N/dose		12 (M)		15 (F)			12 (F)	5 (F)						8 (M and F)			
PK		CA		CA			CA	CA						NCA			
Route		i.p.	i.p.[a]	i.v.	i.p.	i m.	i m.	i.v.			i m.			i.v.			
Dose	UI/kg	250	250	260	260	260	400	26	87	260	26	87	260	100 (F)	100 (M)	500 (F)	500 (M)
Dose	UI/m^2	750	750	780	780	780	1200	156	522	1560	156	522	1560	600	600	3000	3000
C_{max}	UI/mL	-	-	-	-	-	-	0.74	1.99	5.18	0.20	0.81	1.97	0.97	1.36	5.91	6.03
T_{max}	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.55	1.48	1.45	0.66	0.45	0.63	0.50
AUC_{last}	d*UI/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2244	3912	17280	17424
AUC_{INF}	d*UI/mL	-	-	42.70	40.07	32.54	36.85	1332	4464	12048	574	2472	7344	2952	4104	18672	18360
AUC/Dose	(d*UI/mL)/ (UI/kg)	-	-	0.16	0.15	0.13	0.09	51.2	51.3	46.3	22.1	28.4	28.2	29.5	41.0	37.3	36.7
$t_{1/2}$	D	3.75	3.50	2.23	2.38	2.22	3.05	2.31	2.74	2.80	1.97	2.36	3.30	3.31	2.84	3.23	3.12
Vss or Vz	mL/kg	-	-	-	-	-	-	39.3	44.6	50.6	-	-	-	97.60	63.4	83.30	77.60
CL	mL/d/kg	-	-	0.16	-	-	-	11.76	11.52	13.44	-	-	-	20.57	14.18	16.39	16.63
CL	mL/h/kg			0.01				0.49	0.48	0.56				0.86	0.59	0.68	0.69
F	%	-	-	100	93.8	76.2	-	100	100	100	43.0	55.1	61.0	100	100	100	100

a　Immunised mice
CA：compartmental analysis
NCA：non-compartmental analysis
M：male
F：Female

表 9.1:2 非げっ歯類における PEG-L-アスパラギナーゼの PK 及びトキシコキネティクス試験の要約表

Parameter	Units	(Ho, 1988) [PE0151770] [8]	Study #04-3082 - NP39178 - 4.2.2.2.3						Study #824-016 – NP39211 - 4.2.3.1.3				(Berg, 1993) [4] and NIH Study – NP39179 4.2.2.2.6	
Species		New Zealand rabbit	Beagle dog						Beagle dog				Rhesus monkey	
N/dose		2 (M)	6 (F)						4 (M and F)				3 (M)	
PK		CA	CA						NCA				CA	
Route		i.v.	i.v.			i m.			i.v.				i.m.[a]	i m.[b]
Dose	UI/kg	40	26	87	260	26	87	260	100 (F)	100 (M)	500 (F)	500 (M)[c]	208	208
Dose	UI/m^2	480	520	1740	5200	520	1740	5200	2000	2000	10000	10000	2500	2500
C_{max}	UI/mL	-	0.66	1.88	4.64	0.53	1.41	4.45	2.12	1.66	8.48	11.40	-	-
T_{max}	d	-	-	-	-	12.0	6.5	17.2	0.76	0.08	1.51	1.26	-	-
AUC_{last}	d*UI/mL	-	-	-	-	-	-	-	10,032	8,640	39,840	53,520	-	-
AUC_{INF}	d*UI/mL	8,155	2496	11064	24624	2832	10608	26544	14376	12648	53760	97200	53.0	51.0
AUC/Dose	(d*UI/mL)/(UI/kg)	204	96	127	95	109	122	102	144	126	108	194	0.3	0.2
$t_{1/2}$	D	5.98	4.54	7.17	6.42	6.17	8.79	6.71	7.67	8.58	5.79	11.71	5.50	6.67
Vss or Vz/F	mL/kg	-	39.5	46.8	56.0	-	-	-	48.1	56.7	51.8	50.1	-	-
CL or CL/F	mL/d/kg	2.80	6.00	4.56	6.24	-	-	-	4.08	4.70	6.00	3.14	3.92	4.08
CL or CL/F	mL/h/kg	0.12	0.25	0.19	0.26	-	-	-	0.17	0.20	0.25	0.13	0.16	0.17
F	%	100	100	100	100	114	96.0	108	100	100	100	100	-	-

a　Batch [redacted]

b　Batch [redacted]

c　one dog excluded from case sensitive parameter means (i.e. $t_{1/2}$, Vss or Vz, CL), because not reliable estimation of elimination rate constant

CA：compartmental analysis

NCA：non-compartmental analysis

M：male

F：Female

9.2　考察及び結論

過去 30 年間にわたって、PEG-L-アスパラギナーゼの PK 及び PD が非臨床試験種で調査された。血漿中のアスパラギナーゼ活性及び L アスパラギンの定量法及び PEG-L-アスパラギナーゼが投与された試験動物の生物学的マトリックスは時間の経過とともにわずかに変更されたが、試験動物における PK 及び PD データは試験を通して一貫していたことから、分析方法がバリデーションされたのは 2007 年であっても分析法が十分に堅牢であることが示された。

[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た PEG-L-アスパラギナーゼを用いたアカゲザルの試験［4］以外は、すべての非臨床試験で、[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た PEG-L-アスパラギナーゼが用いられた。これらの 2 種類の PEG-L-アスパラギナーゼはサルにおいて同等であることと認められた。

比較 PK 試験の結果、PEG-L-アスパラギナーゼで免疫化した試験動物においても、PEG-L-アスパラギナーゼはネイティブ L-アスパラギナーゼと比較して血漿中半減期の延長がみられた。

PEG-L アスパラギナーゼは、ネイティブ L-アスパラギーゼで免疫化したマウスの血漿中から速やかに除去されるネイティブ L-アスパラギナーゼと比較して、より長期間の血漿中のアスパラギン枯渇を誘導した。PEG-L-アスパラギナーゼの PK/PD も良好であった。反対に、ラット及びイヌにおいて PEG-L-アスパラギナーゼ投与後の L-グルタミン枯渇が観察さなかったことから、PEG-L-アスパラギナーゼの作用機序が高い特異性を有することが示された。

PEG-L-アスパラギナーゼの PK は、試験した用量範囲で線形を示し、$t_{1/2}$ が 3～6 日であったことからクリアランスが低いと特徴づけられた。また、試験動物種の血漿量/血液量と同じ順序で分布容積が小さかったことから、PEG-L-アスパラギナーゼの体循環外への分布は認められなかった。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、ウサギの胎盤関門を通過する低い潜在性がある。

イヌにおける PK 試験から、単回及び反復投与後のオンキャスパー（S95014_[redacted]及び S95014_[redacted]）の PK が 2 剤形で同等である強いエビデンスが示された。2 剤形は、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}553}$ が幾何平均比の両側 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、生物学的同等であることが示された。さらに PD においても明らかな差異は認められなかった。PK モデリング及びシミュレーションは、ALL 患者において凍結乾燥剤が液剤と非常に類似した曝露（C_{max} 及び AUC）をもたらすことが示唆される。

2 剤形を臨床使用における主要な投与経路である i.v.投与した比較 PK/PD 試験を行った（オンキャスパーは i.m.投与も適応である）。イヌに対して臨床的曝露量を含む複数用量を i.v.又は i.m.投与した PK/PD 試験【CTD 4.2.2.2.3_Study 04-3082 - Report NP39178】では、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 投与量に関係なく約 100%であることが示され、同等用量の i.v.投与でも同程度の血漿曝露（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$）及び消失半減期が認められた。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示されていることから、液剤（i.m.及び i.v.投与）と凍結乾燥剤（i.v.投与）を比較した比較 PK 試験で、両剤形がイヌにおいて同等の曝露を示すことが示唆された。凍結乾燥剤の溶解液がイヌに同等の曝露

を提供すると論理的に考えられることから、凍結乾燥剤の i.m.投与による非臨床 PK 試験は行わなかった。

PEG-L-アスパラギナーゼの代謝及び排泄に関して情報はほとんどないが、これらの情報から PEG-L-アスパラギナーゼは尿以外から排泄されることが示唆されている。タンパク質分解及び RES によって血漿からの除去される可能性があるが、肝臓を介した代謝、胆汁への排泄は含まれていなかった。

10. 参考文献

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

4) 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]

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

6) [redacted] [NP39450]

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

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

9) 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]

10) 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]

11) 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]

12) Ouchterlony O. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In D.M. Weir (Ed.), Handbook of Experimental Immunology, Oxford: Blackwell, 32.1 32.50, 1986 [PE0151482]

13) Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubiger DL, Wood JH, Poplack DG. L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. Cancer Res. 1981 Nov;41(11 Pt 1):4554-8 [PE0151465]

14) 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]

15) Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In N.R. Rose and H. Friedman (Eds.), Manual of Clinical Immunology, American Society for Microbiology, Washington, 359-71, 1980 [PE0151487]

16) Webster R, 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]