目次

1.　緒言 7
1.1.　製剤に関する情報 7
1.2.　ポンペ病治療薬としてのシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の妥当性 9
1.3.　非臨床開発戦略 10
1.3.1.　薬理試験 10
1.3.2.　薬物動態試験 10
1.3.3.　毒性試験 10
2.　薬理試験 12
2.1.　効力を裏付ける試験 12
2.1.1.　シパグルコシダーゼ アルファの細胞内取込み 12
2.1.2.　ミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの in vitro 血中安定化 12
2.1.3.　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用によるグリコーゲン減少作用 13
2.1.4.　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による筋病変の改善 13
2.1.5.　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による筋機能の改善 14
2.1.6.　各バッチのシパグルコシダーゼ アルファの in vivo 有効性 15
2.2.　副次的薬理試験 15
2.3.　安全性薬理試験 15
2.4.　薬力学的薬物相互作用試験 15
3.　薬物動態試験 16
3.1.　分析法 16
3.2.　吸収 16
3.3.　分布 17
3.4.　代謝 17
3.5.　排泄 18
3.6.　薬物動態学的薬物相互作用 18
4.　毒性試験 19
4.1.　単回投与毒性試験 20
4.2.　反復投与毒性試験 20
4.3.　遺伝毒性 20
4.4.　がん原性 21
4.5.　生殖発生毒性試験 21

4.5.1.　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 21
4.5.2.　胚・胎児発生に関する試験 21
4.5.3.　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 23
4.6.　局所刺激性試験 23
4.7.　その他の毒性試験 23
5.　総括及び結論 24
6.　参考文献 31

表目次

表 2.4- 1　シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与のための毒性試験プログラム 19

表 2.4- 2　反復投与毒性試験の NOAEL におけるシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比 25

表 2.4- 3　反復投与毒性試験の NOAEL におけるミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比 26

表 2.4- 4　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比 27

表 2.4- 5　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比 28

表 2.4- 6　胚・胎児発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比 29

表 2.4- 7　胚・胎児発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比 29

図目次

図 2.4- 1　　シパグルコシダーゼ アルファのアミノ酸配列 8

図 2.4- 2　　ミグルスタットの化学構造 9

略語及び用語の説明

略語及び用語	日本語	英語
ADA	抗薬物抗体	anti-drug antibody
ALGLU	アルグルコシダーゼ アルファ	alglucosidase alfa
ATB200	シパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）	cipaglucosidase alfa (genetical recombination)
AUC	血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve
bis-M6P	ビスマンノース-6-リン酸	bis-phosphorylated high mannose 6-phosphate
CI-MPR	カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体	cation-independent mannose 6-phosphate receptor
C_{max}	最高血漿中濃度	maximum observed concentration
CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
DPH	ジフェンヒドラミン塩酸塩	diphenhydramine hydrochloride
EB	エンジニアリングバッチ	engineering batch
ERT	酵素補充療法	enzyme replacement therapy
Gaa	マウス酸性 α-グルコシダーゼをコードする遺伝子	gene encoding mouse acid α-glucosidase
GAA	酸性 α-グルコシダーゼ	acid α-glucosidase
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準	Good Laboratory Practice
GMP	医薬品の製造管理及び品質管理の基準	Good Manufacturing Practice
ICH	医薬品規制調和国際会議	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
KO	ノックアウト	knock-out
LAMP1	－	lysosome-associated membrane protein 1
LC3	－	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析	liquid chromatography with tandem mass spectrometry
LLOQ	定量下限	lower limit of quantification
M6P	マンノース-6-リン酸	mannose 6-phosphate
mTOR	－	mammalian target of rapamycin
MTD	最大耐量	maximal tolerated dose
NOAEL	無毒性量	no observed adverse effect level
NZW	ニュージーランド白色	New Zealand White
p62	セクエストソーム-1	sequestosome-1
PK	薬物動態	pharmacokinetic
rhGAA	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ	recombinant human acid α-glucosidase
$t_{1/2}$	消失半減期	elimination half-life

略語及び用語	日本語	英語
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
WT	野生型	wild type

1.　緒言

1.1.　製剤に関する情報

ポンペ病は、ライソゾーム内のグリコーゲンの分解に関与する酵素、酸性 α-グルコシダーゼ（GAA）をコードする遺伝子の突然変異によって引き起こされるまれな常染色体劣性遺伝性疾患である。この酵素活性の欠乏により、ライソゾーム内にグリコーゲンが蓄積し、特に心臓、骨格筋及び肝臓において細胞機能の破壊が進行する。

現時点で既承認の治療法は、遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ（rhGAA）を用いた酵素補充療法（ERT）であり、体外から酵素を供給することにより酵素活性の欠乏を補う。日本ではポンペ病患者を対象として、2007 年 4 月 18 日にアルグルコシダーゼ アルファ（販売名：マイオザイム®点滴静注用 50mg、ALGLU）が承認され、2021 年 9 月 27 日にアバルグルコシダーゼ アルファ（販売名：ネクスビアザイム®点滴静注用 100mg）が新たな酵素製剤として承認された。

ALGLU を用いた治療では、治療開始初期の筋機能、運動機能及び呼吸機能は改善されるが、その後、これらの機能は緩やかに低下する。ALGLU に対する抵抗性の最も重要な要因は、非効率的な筋肉組織への取込みであると考えられており（Kohler et al. 2018）、筋肉への標的指向性が改善された新たな ERT に対するアンメットメディカルニーズが存在する。

シパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）（ATB200）（以下、シパグルコシダーゼ アルファ）は、ポンペ病に対する次世代酵素製剤として開発された新規 rhGAA である。シパグルコシダーゼ アルファの作用機序は ALGLU と同じであるが、翻訳後の *N*-結合型糖鎖構造が異なる。具体的には、シパグルコシダーゼ アルファは、可溶性ライソゾーム酵素を識別して GAA をライソゾームに送達するための天然構造であるマンノース-6-リン酸（M6P）を ALGLU よりも多く含む。特に、シパグルコシダーゼ アルファには 2 箇所がリン酸化されたビスマンノース-6-リン酸（bis-M6P）を有する糖鎖が付加されている点は重要である。bis-M6P 含有糖鎖は、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CI-MPR）への結合親和性が全ての既知の糖鎖の中で最も高い。この特殊な糖鎖付加により細胞表面の CI-MPR に対する結合親和性が大幅に上昇し、特に投与後の酵素濃度が低い骨格筋で、rhGAA の細胞内取込み及びライソゾームへの送達が改善される（Tong and Kornfeld 1989）。その結果、シパグルコシダーゼ アルファを投与したポンペ病動物モデルでは、同一条件下で投与した ALGLU と比較して、筋組織での細胞内取込みが著しく改善され、グリコーゲン減少作用が増強される（2.1.3 項）。

シパグルコシダーゼ アルファのアミノ酸配列は、野生型（WT）ヒト GAA の 57～952 番目のアミノ酸残基に相当し（図 2.4- 1）、分子量は約 110 kDa である。シグナルペプチド及び前駆体ペプチドに相当する最初の 56 残基は、WT ヒト GAA の内因性細胞内タンパク質分解プロセシングにより除去される。

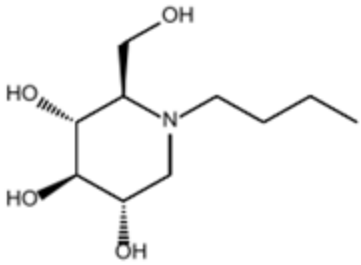
図 2.4- 1　　シパグルコシダーゼ アルファのアミノ酸配列



The amino acid sequence begins at the N-terminus of the cipaglucosidase alfa investigational product. Amino acid numbering starts from the primary transcription product (position 57).
Note: The first (#1) amino acid corresponds to the fifty-seventh (#57) amino acid of the native sequence.
Source: JAN Notification 09 March 2023

rhGAA を含む全てのライソゾーム酵素と同様に、シパグルコシダーゼ アルファは中性 pH で不安定であり、静脈内投与後に循環血中で変性／不活性化されやすい。ミグルスタット（AT2221）（図 2.4- 2）は、低分子型酵素安定化剤として機能し、血中で rhGAA と結合し、その不活性化を抑制する。ミグルスタットは、中性 pH でシパグルコシダーゼ アルファを安定化させて筋肉及びライソゾームへの送達を確実にするため、シパグルコシダーゼ アルファと併用投与する経口剤として開発された。ミグルスタットは、現在多くの国々でゴーシェ病 1 型及び／又はニーマン・ピック病 C 型の治療薬として販売名 Zavesca®で承認されている。国内では、ミグルスタットはニーマン・ピック病 C 型の治療薬として 2012 年 3 月 30 日に製造販売承認されたブレーザベス®カプセルの有効成分であり、再審査期間（10 年）が 2022 年 3 月 29 日に終了している。本申請と同時申請するミグルスタットの申請区分は（4）新効能医薬品、（6）新用量医薬品、（8 の 2）剤形追加に係る医薬品（再審査期間中でないもの）である。

図 2.4- 2　　ミグルスタットの化学構造



Miglustat
N-butyl-deoxynojirimycin

1.2. ポンペ病治療薬としてのシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の妥当性

ALGLU に対する抵抗性の最も重要な要因は、非効率的な筋肉組織への取込みであると考えられている（Kohler et al. 2018）。シパグルコシダーゼ アルファの作用機序は ALGLU と同じであるが、翻訳後の *N*-結合型糖鎖構造が異なる。第一に、シパグルコシダーゼ アルファのアミノ酸配列は WT GAA のコンセンサス配列と同一であるが、ALGLU は 3 個のアミノ酸が異なっている。これらのアミノ酸配列の違いは rhGAA の酵素特性に影響しない。第二に、シパグルコシダーゼ アルファは、M6P 及び bis-M6P を ALGLU よりも多く含む。

次世代 rhGAA の開発に際し、シパグルコシダーゼ アルファが ALGLU と比較して優位な点は、以下のとおりである（Module 2.6.2, Section 2.1.1.1）。

- シパグルコシダーゼ アルファの bis-M6P 含量が非常に高いこと
- シパグルコシダーゼ アルファの CI-MPR に対する結合親和性が非常に高いこと（同一の酵素濃度下で CI-MPR との結合率は ALGLU が約 27%のみであるのに対し、シパグルコシダーゼ アルファは約 95%と著しく高い）
- シパグルコシダーゼ アルファは細胞内により効率的に取り込まれること
- 投与後のライソゾーム中の酵素濃度がより高いこと

rhGAA を含むライソゾーム酵素は、ライソゾーム内酸性 pH で最も安定である。rhGAA は静脈内投与中に血液の中性 pH に曝されると、ライソゾーム送達前に活性が著しく失われ（血中で 4 時間後には約 70%低下）（Module 2.6.2, Section 2.2.1.1; Khanna et al. 2012）、ポンペ病患者で十分な効果が得られない可能性がある。このため、酵素安定化剤であるミグルスタットにより中性 pH でシパグルコシダーゼ アルファを安定化させ（Module 2.6.2, Section 2.2.1.1）、筋肉及びライソゾームへの活性酵素の送達を促進させる目的で、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法を開発した。

1.3. 非臨床開発戦略

1.3.1. 薬理試験

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による作用機序及び有効性を裏付けるため、in vitro 及び in vivo 試験を実施した。In vitro 試験では、シパグルコシダーゼ アルファの CI-MPR 結合親和性及び細胞内取込みを ALGLU のそれと比較した。また、中性 pH 緩衝液及びヒト血液中でのミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの安定化作用を検討する in vitro 試験を実施した。In vivo 試験では、確立したポンペ病モデルであるマウス酸性 α-グルコシダーゼをコードする遺伝子（*Gaa*）を欠損したノックアウト（KO）マウス（Raben et al. 2005）を用いて、骨格筋ライソゾームへの成熟型 GAA 取込み、筋肉中グリコーゲン量、疾患関連組織マーカー及び筋機能を評価し、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用効果を確認した。また *Gaa* KO マウスを用いた in vivo 試験で、シパグルコシダーゼ アルファの研究グレードバッチの有効性（グリコーゲン減少作用）をエンジニアリングバッチ（EB）及び／又は医薬品の製造管理及び品質管理の基準（GMP）バッチと比較した。

安全性薬理試験では、シパグルコシダーゼ アルファの中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を、ラット及びサル 26 週間反復投与試験の一部として評価した。また、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を、サル 13 週間反復投与毒性試験の一部として評価した。

1.3.2. 薬物動態試験

シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタットとの併用投与での吸収及び組織内分布は、げっ歯類（WT マウス、*Gaa* KO マウス及び Sprague Dawley ラット）を用いて評価した。また、ミグルスタットの吸収及び組織内分布もげっ歯類（WT マウス及び *Gaa* KO マウス）を用いて評価した。シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの薬物動態（PK）は、それぞれ適格な酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）及び液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて評価された。

毒性試験でのトキシコキネティクス（TK）プロファイルは、Sprague Dawley ラット（一般毒性試験及び生殖発生毒性試験）、ニュージーランド白色（NZW）ウサギ（生殖発生毒性試験）及びカニクイザル（一般毒性試験）を用いて評価した。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用の単回投与毒性試験を除き、毒性試験でのシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの TK プロファイルは、フルバリデートされた分析法を用いて評価された。

1.3.3. 毒性試験

Sprague Dawley ラット及びカニクイザルは、ALGLU の開発及び承認申請に使用されており、rhGAA の非臨床試験に適切な動物種として確立されていた。したがって、シパグルコシダーゼ アルファの毒性試験にも、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを使用した。ヒト GAA に対するカニクイザル及びラット GAA の一次アミノ酸配列の相同性は、それぞれ 95.69%及び 82.33%であった（Module 2.6.6, 付表 1）。ラット GAA に対するヒト GAA の相同性は低く、ラッ

トへの rhGAA の高用量投与により過敏症／アナフィラキシー反応が引き起こされるため、ラットの試験ではヒトタンパク質に対する潜在的アナフィラキシー及び／又は過敏症反応を防止するためにジフェンヒドラミン塩酸塩（DPH）を前投与した。

医薬品規制調和国際会議（ICH）M3（R2）及び S6（R1）に従い、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いてシパグルコシダーゼ アルファの単回及び 26 週間反復投与毒性試験を実施した。26 週間投与試験では、両試験ともシパグルコシダーゼ アルファを隔週静脈内投与し、4 週間の回復期間を設けた。シパグルコシダーゼ アルファの用量は、*Gaa* KO マウスにおける有効性、ラット及びカニクイザルの単回投与毒性試験の TK データを考慮して設定した。高用量は ICH S6（R1）に基づき、反復投与後の曝露量が臨床での曝露量の 10 倍程度に達することを目標として設定した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による毒性を、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で検討した。さらに、シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるラット受胎能及び着床までの初期胚発生、ラット及びウサギ胚・胎児発生並びにラット出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。その他の試験として、溶血性及び凝集能を in vitro で検討した。

重要な試験は、全て GLP に従って実施した。

2.　薬理試験

2.1.　効力を裏付ける試験

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による作用機序及び有効性を裏付けるため、in vitro 及び in vivo 試験を実施した。一連の試験結果は、ポンペ病の次世代治療薬としてのシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の開発を支持するものであった。

2.1.1.　シパグルコシダーゼ アルファの細胞内取込み

M6P、特に bis-M6P 含量の高い rhGAA を産生する新規の細胞株及び製造工程を用いて、シパグルコシダーゼ アルファを製造した。シパグルコシダーゼ アルファのように bis-M6P 含有 *N*-結合型糖鎖を含むライソゾーム酵素は、CI-MPR への結合親和性が高く（Tong and Kornfeld 1989）、標的細胞での rhGAA の細胞内取込み及びライソゾームへの送達が促進される（Chavez et al. 2007; Zhou et al. 2011）。シパグルコシダーゼ アルファは、ALGLU よりも CI-MPR に対して高い結合親和性を示した（Module 2.6.2, Section 2.1.1.1）。bis-M6P 含量の高い糖鎖付加により、シパグルコシダーゼ アルファは ALGLU よりも効率的にラット筋芽細胞及びポンペ病患者由来線維芽細胞内に取り込まれた（Module 2.6.2, Section 2.1.1.2）。

Gaa KO マウスの大腿四頭筋で、シパグルコシダーゼ アルファのライソゾームに対する標的指向性は ALGLU よりも良好であることを示す直接的エビデンスが得られた（Module 2.6.2, Section 2.2.2.3）。また、シパグルコシダーゼ アルファ投与群では、ミグルスタット併用の有無に関わらず、*Gaa* KO マウスの疾患関連組織中 GAA 活性は ALGLU 投与群よりも増加し、筋肉内グリコーゲン量は ALGLU 投与群よりも減少した（Module 2.6.2, Sections 2.2.2.1 and 2.2.2.2）。

2.1.2.　ミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの in vitro 血中安定化

rhGAA を含む全てのライソゾーム酵素と同様に、シパグルコシダーゼ アルファはライソゾーム内の酸性 pH で最も安定であり、中性 pH では不安定である。ヒト血中でシパグルコシダーゼ アルファを 37℃で 4 時間インキュベーションした結果、活性は約 70%低下した（Module 2.6.2, Section 2.2.1.2）。この結果から、シパグルコシダーゼ アルファは 4 時間の静脈内投与中に酵素活性が失われ、患者で十分な効果が得られないことが示唆される。併用したミグルスタットはシパグルコシダーゼ アルファに結合して、血中安定性を向上させた（Module 2.6.2, Section 2.2.1.1）。具体的には、ポンペ病患者で観察される最高血漿中濃度（C_{max}）と同程度である 17 µmol/L のミグルスタットを併用した場合、シパグルコシダーゼ アルファの活性低下は約 30%に留まり、ミグルスタットを併用しない場合（約 70%低下）と比較して活性低下の程度は小さかった。以上の結果から、ミグルスタットは、循環血中のシパグルコシダーゼ アルファがライソゾームへ送達される間の活性低下を抑制することが示された。

また、ミグルスタット単独投与による *Gaa* KO マウスに対する作用も評価した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.6）。ミグルスタット単独投与はグリコーゲン減少作用を示さず、疾患関連組織マーカー［lysosome-associated membrane protein 1（LAMP1）、microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3（LC3）II 及びジスフェルリン］を変化させなかったことから、ミグルスタット併用によ

るシパグルコシダーゼ アルファの活性促進効果は、シパグルコシダーゼ アルファの活性保持のみによることが示された。

2.1.3. シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用によるグリコーゲン減少作用

M6P 含量が高いシパグルコシダーゼ アルファは、ALGLU と比較して in vivo でのライソゾーム標的指向性が向上し、グリコーゲン減少作用が増強された（Module 2.6.2, Sections 2.2.2.1 and 2.2.2.2）。疾患関連筋組織でのグリコーゲン減少作用は、生化学的及び組織学的解析での相関が認められた（Module 2.6.2, Section 2.2.2）。

シパグルコシダーゼ アルファ 10 及び 20 mg/kg の隔週投与は、ALGLU 20 mg/kg（現在の標準治療の臨床用量）よりも *Gaa* KO マウス骨格筋でのグリコーゲン量を減少させた。シパグルコシダーゼ アルファ 10 mg/kg の血漿中 GAA 活性［血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）］は ALGLU 20 mg/kg の 1/6 倍であったにも関わらず（Module 2.6.5, Section 3B.2）、グリコーゲン減少作用の増強が認められたことから、シパグルコシダーゼ アルファによる有効性改善がさらに裏付けられた。

各用量のミグルスタットの併用によりシパグルコシダーゼ アルファのグリコーゲン減少作用は増強し（Module 2.6.2, Sections 2.2.2.1 and 2.2.2.2）、シパグルコシダーゼ アルファ単独又は ALGLU 単独と比較して、シパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）とミグルスタット（10 mg/kg）の併用で最適かつ最大のグリコーゲン減少作用を示した（Module 2.6.2, Sections 2.2.2.1, 2.2.2.2, and 2.2.2.4）。ALGLU で同程度のグリコーゲン減少作用を得るには、より高用量（100 mg/kg）が必要であると報告されている（Hawes et al. 2007）。また、臨床使用を想定した rhGAA 4 時間静脈内投与の模倣投与条件でも、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用は、ALGLU 単独及びシパグルコシダーゼ アルファ単独よりも高い有効性を示した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.8）。シパグルコシダーゼ アルファ単独では 4 時間静脈内投与で in vivo 活性が低下する可能性があるが（Module 2.6.2, Section 2.2.1.2）、本試験結果から、ミグルスタットの併用によりその有効性が維持されることが示唆された。

2.1.4. シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による筋病変の改善

ポンペ病の表現型の別の特徴として、オートファジー障害に起因する細胞内小胞コンパートメントの蓄積が挙げられる。そこで、オートファジーの重要な 2 つのマーカーに対するシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与の影響を *Gaa* KO マウスで評価した。

グリコーゲン減少作用（2.1.3 項）と同様に、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により、大部分の筋線維でのライソゾーム関連マーカー（LAMP1 陽性小胞）の発現量と発現パターンは WT マウスと同様になり（Module 2.6.2, Sections 2.2.2.4, 2.2.2.5, 2.2.2.6, and 2.2.2.7）、オートファジー関連マーカー［LC3 II 及びセクエストソーム-1（p62）］は有意に減少した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.4）。これは、ポンペ病で障害されたオートファジーを回復させることができるという最初のエビデンスである（Xu et al. 2019）。現時点で、ALGLU を長期投与したポンペ病患者や *Gaa* KO マウスの骨格筋で、グリコーゲン蓄積が除去された筋線維やライソゾーム拡張が少ない筋線維であっても、既存のオートファジーが減少あるいは回復したという報告

はない（Prater et al. 2013; Raben et al. 2003）。オートファジー障害は、ポンペ病患者の ERT 効果に悪影響を与える可能性があるため（Fukuda et al. 2006; Raben et al. 2007）、これらの結果は、ALGLU と比較したシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の優位性を支持するものである。

さらに、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタットの併用投与（隔週 2 回）により、*Gaa* KO マウスでのジスフェルリン細胞内蓄積も減少した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.6）。現時点でポンペ病の病態におけるジスフェルリンの正確な役割は明らかになっていないが、これまでに得られているデータから、多くの筋ジストロフィー及びミオパチーでジスフェルリンの発現レベル及び／又は発現パターンの変化が認められており、ジスフェルリンの筋機能への関与が示唆されている（Gallardo et al. 2011; Tagawa et al. 2003）。

興味深い点として、シパグルコシダーゼ アルファは、ALGLU とは異なり（Hawes et al. 2007; Raben et al. 2003; Raben et al. 2005; Thurberg et al. 2006）、ヒラメ筋のような I 型及び II 型線維をどちらも含む骨格筋に対してもポンペ病の表現型を改善し、ALUGLU と比べてより広範囲の線維型に対して有効性を示した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.4）。また、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によりアデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ（AMPK）活性の低下及び mammalian target of rapamycin（mTOR）シグナル伝達の部分的な回復、すなわちオートファジーの負の制御因子の低下がウエスタンブロット解析で認められた（Module 2.6.2, Section 2.2.2.5）。

以上より、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は、ポンペ病の病態を多方面から改善又又は抑制することから、ALGLU と比較して治療上のベネフィットをもたらすことが示された。

2.1.5.　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による筋機能の改善

Gaa KO マウス筋機能を握力及びワイヤーハング試験（Aartsma-Rus and van Putten 2014; Zhu et al. 2009）を用いて月 1 回 6 か月間評価した。*Gaa* KO マウスに、ALGLU（20 mg/kg）単独若しくはミグルスタット（10 mg/kg、経口投与）の併用、又はシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）単独若しくはミグルスタット（10 mg/kg、経口投与）の併用で、隔週計 12 回静脈内投与した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.7）。

WT マウスと比較して、*Gaa* KO マウスの溶媒投与群の筋機能は加齢に伴い悪化した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の握力は、ALGLU 又はシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群と比較して有意に改善した。これらの筋機能の改善は筋組織中グリコーゲン減少作用と相関していた（Module 2.6.2, Section 2.2.2.7）。ワイヤーハング試験でもシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用による効果は全ての測定時点で観察された。これらの筋機能の改善は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用で認められた生化学的及び組織学的解析結果と一致しており、シパグルコシダーゼ アルファは、ALGLU と比較してポンペ病の表現型を改善する効果が高いことが示された。

2.1.6.　各バッチのシパグルコシダーゼ アルファの in vivo 有効性

シパグルコシダーゼ アルファの proof of concept／in vivo 有効性は、*Gaa* KO マウスを用いて、スモールスケールで製造したリサーチグレードのバッチを隔週 2、4 又は 6 回投与することにより評価した（Module 2.6.2, Sections 2.2.2.1 and 2.2.2.2）。

シパグルコシダーゼ アルファの非臨床開発において、重要な特性（高含量の bis-M6P 及びシアル酸）を有する製剤をその後の非臨床及び臨床試験に供するため、製造工程を最適化及びスケールアップした。

ラージスケールで製造したシパグルコシダーゼ アルファの 2 つの EB（EB1 及び EB2）の特性を明らかにするため、広範な in vitro 解析を実施した。EB2 は、EB1 で同定された問題を解決するために最適化した条件で製造された。これまで使用したリサーチグレードのバッチと比較して、EB1 のシアル酸含量は低かったが、EB2 では同程度であった。*Gaa* KO マウスに EB1 又は EB2（10 及び 20mg/kg）を隔週計 2 回投与後、疾患関連組織で用量依存的なグリコーゲン減少作用が認められ、いずれのバッチでも ALGLU（20 mg/kg）と比較して有意な作用を示した（Module 2.6.2, Section 2.1.2.1）。EB2 の骨格筋及び心臓でのグリコーゲン減少作用は EB1 よりも強く、EB2 は EB1 よりも高い有効性を一貫して示した。このように EB1 と EB2 の in vivo 有効性に明らかな違いが認められたのは、EB1 のシアル酸含量が EB2 よりも少なく、循環血中からのクリアランスが速くなったためではないかと考えられる（Module 2.6.4, Section 3.1.6）。

次に、EB2（原薬）と GMP バッチ（GMP4、製剤）の有効性を比較するため、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタットの併用で *Gaa* KO マウスに隔週 2 回静脈内投与した（Module 2.6.2, Section 2.2.2.6）。いずれのバッチでも、グリコーゲン減少作用、GAA 活性及びポンペ病疾患関連組織マーカー（LAMP1、LC3 II 及びジスフェルリン）に対する作用は、同程度であった。

2.2.　副次的薬理試験

シパグルコシダーゼ アルファの副次的薬理試験は、単独又はミグルスタットとの併用投与のいずれでも実施していない。

2.3.　安全性薬理試験

シパグルコシダーゼ アルファの安全性薬理パラメータは、ラット及びカニクイザルを用いた GLP 毒性試験の一部として評価され（Module 2.6.6, Sections 3.1.1, 3.1.2, and 3.2.1）、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用投与による中枢神経系、心血管系又は呼吸系に対する影響はいずれも認められなかった。

2.4.　薬力学的薬物相互作用試験

シパグルコシダーゼ アルファの薬力学的薬物相互作用試験は、単独又はミグルスタットとの併用投与のいずれでも実施していない。

3.　薬物動態試験

3.1.　分析法

マウス及びラットにおけるシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの PK プロファイルは、それぞれ適格な酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）及び LC-MS/MS 法を用いて評価された。一方で、GLP 非適用の単回投与毒性試験を除き、毒性試験でのシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの TK プロファイルは、フルバリデートされた分析法を用いて評価された。

当初、ラット、ウサギ及びサル血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度測定では、定量下限（LLOQ）が 50 nmol/L である酵素活性アッセイをバリデートし、GAA 活性を測定することにより評価された（Module 2.6.4, Sections 2.1.1 and 2.1.2）。その後、酵素活性アッセイでは、試料中のシパグルコシダーゼ アルファ活性を競合的に阻害するミグルスタット（C_{max}：14 µmol/L）によって影響を受ける可能性があったため、酵素活性に依存しない LC-MS/MS 法を用いてシパグルコシダーゼ アルファに特異的なペプチド断片を測定する定量法が補完的なアプローチとしてバリデートされた。いずれの動物種でも LC-MS/MS 法の LLOQ は 0.5 µg/mL であった（Module 2.6.4, Sections 2.1.3, 2.1.4, and 2.1.5）。

また、ラット、ウサギ及びサル血漿中ミグルスタット濃度測定では、LLOQ が 0.5 ng/mL である LC-MS/MS 法がバリデートされた（Module 2.6.4, Sections 2.2.1, 2.2.2, and 2.2.3）。

さらに、シパグルコシダーゼ アルファの免疫原性評価の一部として、ラット及びサル血漿中の抗シパグルコシダーゼ アルファ抗体［抗薬物抗体（ADA）］の検出のため、meso scale discovery アッセイがバリデートされた（Module 2.6.4, Sections 2.1.6 and 2.1.7）。Low Positive Control 及び High Positive Control は両種ともに 0.25 及び 20 µg/mL、ラット及びサルでの Confirmatory Assay のカットポイントはそれぞれ 15.8%及び 12.5%であった。

3.2.　吸収

Gaa KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 30 分かけて静脈内投与後、検討した用量範囲（5～20 mg/kg）でシパグルコシダーゼ アルファの C_{max} 及び AUC は用量依存的に増加し、消失半減期（$t_{1/2}$）は概ね同程度（0.61～0.79 時間）であった。また、*Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を 20 mg/kg の用量で 30 分間かけて静脈内投与後、ALGLU 投与時と比較してシパグルコシダーゼ アルファ投与時の AUC は約 50%低かった（Module 2.6.4, Section 3.2.2.1）。これは ALGLU と比較してシパグルコシダーゼ アルファでは CI-MPR に対する親和性が高く（Module 2.6.2, Section 2.1.1.1）、シパグルコシダーゼ アルファが循環血中から疾患関連組織により速やかに移行するためと考えられる。なお、検討された動物種（ラット及びサル）において、ADA 又は中和抗体によるシパグルコシダーゼ アルファの TK の明らかな影響は認められなかった。

WT マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後、検討した用量範囲（1～30 mg/kg）でミグルスタットの C_{max} 及び AUC は用量依存的に増加した。$t_{1/2}$ は 0.2～0.5 時間と短かった（Module 2.6.4, Section 3.2.1.1）。

Gaa KO マウス及びラットにシパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット塩酸塩との併用投与後、ミグルスタット塩酸塩との併用投与によってシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量が増加する傾向が認められた（Module 2.6.4, Sections 3.2.2 and 3.2.3）。カニクイザルではミグルスタットとの併用投与による影響がより顕著であり、シパグルコシダーゼ アルファの AUC は約 2 倍に増加した（Module 2.6.4, Section 3.2.6）。この理由として、げっ歯類と比較してサルではミグルスタットの $t_{1/2}$ が約 7.4～8.2 時間と長いためと考えられた（Module 2.6.5, Section 4B.1）。

その他に、シパグルコシダーゼ アルファ製造工程の変更に伴いバッチ間の類似性を評価する PK 試験を実施した結果、研究グレード、[redacted] 及び [redacted]L スケール間で差は認められなかった（Module 2.6.4, Sections 3.1.5 and 3.1.6）。また、臨床での投与条件（4 時間静脈内投与）を模倣するために室温で 4 時間静置したシパグルコシダーゼ アルファを投与したときの PK を評価した。その結果、室温で 4 時間静置してもミグルスタット塩酸塩との併用投与によってシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量が増加する傾向が認められた（Module 2.6.4, Section 3.2.4）。

3.3. 分布

Gaa KO マウス及び WT マウスにシパグルコシダーゼ アルファを急速静脈内投与後、血漿中での $t_{1/2}$ は 0.6 時間である一方、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋での $t_{1/2}$ は 58.1～87.3 時間と長かった。また、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット塩酸塩併用投与によって大腿四頭筋及び腓腹筋では GAA 活性が増加する傾向が認められた（Module 2.6.4, Section 3.2.5）。

WT マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後、ミグルスタットは速やかに吸収されて上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋に分布したことから、シパグルコシダーゼ アルファに対して安定化作用を発揮するする可能性が確認された。また、ミグルスタットの血漿中での $t_{1/2}$ は 1.0 時間、筋肉中での $t_{1/2}$ は 1.5～1.9 時間であり、速やかに筋肉から消失することが示された（Module 2.6.4, Section 3.2.5）。

3.4. 代謝

シパグルコシダーゼ アルファは遺伝子組換えタンパク質であるため、主に肝臓でペプチド及びアミノ酸に加水分解され、シトクロム P450（CYP）は関与しないと予想される。したがって、シパグルコシダーゼ アルファの代謝試験は実施していない。

また、ミグルスタットの代謝は極めてわずか又は全く認められておらず（ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.4 薬物動態試験の概要文）、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によって各薬剤の代謝に影響を及ぼす可能性はないと予想される。したがって、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与時の代謝試験も実施していない。

3.5. 排泄

シパグルコシダーゼ アルファは遺伝子組換えタンパク質であるため、主に肝臓でペプチド及びアミノ酸に加水分解された後、細胞内に取り込まれ再利用されると予想される。したがって、シパグルコシダーゼ アルファの排泄試験は実施していない。

また、ミグルスタットは主に未変化体のまま尿中に排泄され（ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.4 薬物動態試験の概要文）、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によって各薬剤の排泄に影響を及ぼす可能性はないと予想される。したがって、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与時の排泄試験も実施していない。

3.6. 薬物動態学的薬物相互作用

酵素であるシパグルコシダーゼ アルファが CYP 及びトランスポーターを介した薬物相互作用に関与する可能性は低いと考えられるため、薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

4.　毒性試験

シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与のために実施された毒性試験プログラムを表 2.4- 1 に示す。

表 2.4- 1　　シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与のための毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	試験系	被験物質（投与経路）	報告書番号	GLP 適否
単回投与毒性試験				
	Sprague Dawley ラット	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）	283-0011-TX	非適用
	カニクイザル	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）	283-0012-TX	非適用
反復投与毒性試験				
26 週間	Sprague Dawley ラット	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）	[redacted].423.08	適用 [a]
26 週間	カニクイザル	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）	[redacted].423.07	適用 [a]
13 週間	カニクイザル	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	[redacted].423.10	適用 [a]
生殖発生毒性試験				
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	Sprague Dawley ラット	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	8371927	適用
胚・胎児発生用量設定試験	Sprague Dawley ラット	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	8371929	非適用
胚・胎児発生に関する試験	Sprague Dawley ラット	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	8371930	適用
胚・胎児発生用量設定試験	NZW ウサギ	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	8371928	非適用
胚・胎児発生に関する試験	NZW ウサギ	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	8371931	適用
出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験	Sprague Dawley ラット	シパグルコシダーゼ アルファ（静脈内）／ミグルスタット（経口）	8371932	適用
その他の毒性試験				
溶血性	ヒト全血	シパグルコシダーゼ アルファ（in vitro）	0725XA132.001	適用
凝集能	ヒト血漿及び血清	シパグルコシダーゼ アルファ（in vitro）	0726XA132.001	適用

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；NZW = ニュージーランド白色
a　　中和抗体測定を除き GLP に準拠して実施した。

4.1. 単回投与毒性試験

ラット及びカニクイザルを用いて静脈内投与（予定臨床投与経路）によるシパグルコシダーゼ アルファの GLP 非適用単回投与毒性試験を実施した。これら初期の試験には雌を選択した。

ラットの試験では、シパグルコシダーゼ アルファを 10、20、50、100 及び 200 mg/kg の用量で 10 分間かけて静脈内投与し、7 日間にわたり毒性を検討した（Module 2.6.6, Section 2.1.1）。

明らかな毒性所見が認められなかったことから、本試験の最大耐量（MTD）は、最高用量である 200 mg/kg であった。

カニクイザルの試験では、シパグルコシダーゼ アルファを 10、20、50、100 及び 200 mg/kg の用量で 2 時間かけて静脈内投与し、7 日間にわたり毒性を検討した（Module 2.6.6, Section 2.1.2）。

明らかな毒性所見が認められなかったことから、本試験の MTD は、最高用量である 200 mg/kg であった。

4.2. 反復投与毒性試験

ポンペ病患者に対して予定されている臨床での投与方法を考慮し、ラット及びカニクイザルを用いて、シパグルコシダーゼ アルファ単独及び／又はミグルスタットとの併用投与による反復投与毒性試験を実施した。

ラット及びサルを用いた 26 週間反復投与毒性試験では、シパグルコシダーゼ アルファ 30、70 及び 200 mg/kg をそれぞれ 10 分間及び 2 時間かけて静脈内隔週投与した（Module 2.6.6, Sections 3.1.1 and 3.1.2）。

さらに、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法を支持するため、カニクイザルを用いて、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による 13 週間反復投与毒性試験を実施した。シパグルコシダーゼ アルファは 50 又は 100 mg/kg の用量で 2 時間かけて静脈内隔週投与し、ミグルスタットはシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に 25 又は 175 mg/kg の用量で経口投与した（Module 2.6.6, Section 3.2.1）。

これらの試験では、投与に関連した明らかな毒性所見は認められなかった。

ラット及びカニクイザルの 26 週間反復投与毒性試験におけるシパグルコシダーゼ アルファの無毒性量（NOAEL）はいずれも試験した最高用量の 200 mg/kg であった。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験のシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は、ミグルスタット併用の有無にかかわらず試験した最高用量である 100 mg/kg であった。また、本試験におけるミグルスタットの NOAEL は、シパグルコシダーゼ アルファ併用の有無にかかわらず、試験した最高用量である 175 mg/kg であった。

4.3. 遺伝毒性

シパグルコシダーゼ アルファは遺伝子組換えタンパク質であり、遺伝毒性を示さないと予想される。ICH S6（R1）に従い、シパグルコシダーゼ アルファの遺伝毒性試験は実施しなかった。

4.4. がん原性

ICH S6（R1）に従い、シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用のいずれについてもがん原性試験は実施しなかった。シパグルコシダーゼ アルファは ERT に使用される遺伝子組換えタンパク質であり、発がん性を示さないと予想される。

ミグルスタットのがん原性試験（マウス及びラット）は実施されており（ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文）、観察された腫瘍がヒトにおいて発生する可能性は低いと判断されている（ブレーザベス®カプセル 100mg 審査報告書）。以上より、併用投与によるがん原性の懸念は示唆されない。

4.5. 生殖発生毒性試験

4.5.1. 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

ラットにシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用投与し、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験を実施した（Module 2.6.6, Section 6.1.1）。シパグルコシダーゼ アルファは 70、150 及び 400 mg/kg の用量で、雌雄ラットに交配前から剖検（雄）又は着床（雌）まで隔日静脈内投与した。ミグルスタットは 60 mg/kg の用量でシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）併用投与群の雌に、ヒト以外の動物種に遺伝子組換えヒト酵素を反復投与したことによるアナフィラキシー様反応（Khanna et al. 2012）に起因するシパグルコシダーゼ アルファ投与に関連した死亡が認められた。ミグルスタット（60 mg/kg）単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）併用投与群の雌で、ミグルスタットに関連すると考えられる着床前胚損失率の増加が認められた。シパグルコシダーゼ アルファの雄親動物及び雌親動物の一般毒性並びに受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL はいずれも 400 mg/kg であった。ミグルスタットの雄親動物及び雌親動物の一般毒性に関する NOAEL はいずれも 60 mg/kg、受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL は 60 mg/kg 未満であった。

4.5.2. 胚・胎児発生に関する試験

4.5.2.1. 胚・胎児発生用量設定試験

ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生用量設定試験を実施した（ラット：Module 2.6.6, Section 6.1.2.1、ウサギ：Module 2.6.6, Section 6.1.2.3）。

妊娠ラット又はウサギの器官形成期（ラット：妊娠 6～18 日、ウサギ：妊娠 7～19 日）にシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用し、隔日静脈内投与した。

シパグルコシダーゼ アルファ（30、70 及び 150 mg/kg）を 10 分間かけて静脈内投与し、ミグルスタット（ラット：12.5 mg/kg、ウサギ：25 mg/kg）はシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。ラット用量設定試験では、高用量の 150 mg/kg 投与での血漿中濃度が予

想される臨床曝露量の 10 倍に達しなかったため、300 及び 600 mg/kg のシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群を追加した。

シパグルコシダーゼ アルファに関連した影響が、ラットの試験のみで観察された。シパグルコシダーゼ アルファを投与した母動物の一般状態観察に神経学的影響が認められた。これらの所見は、ヒト以外の動物種にヒト酵素を投与したことにより生じる有害な免疫反応と考えられ、シパグルコシダーゼ アルファの直接的な毒性ではないと考えられた。

4.5.2.2. ラットにおける胚・胎児発生に関する試験

用量設定試験の結果に基づき、ラットを用いたシパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタットとの併用投与による胚・胎児発生に関する試験を実施した（Module 2.6.6, Section 6.1.2.2）。

シパグルコシダーゼ アルファは 70、150 及び 400 mg/kg の用量で、妊娠 6～18 日に隔日で 10 分間かけて静脈内投与した。ミグルスタットは 60 mg/kg の用量でシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。

試験した最高用量である 400 mg/kg までの用量で、シパグルコシダーゼ アルファに直接起因すると考えられる明らかな母動物毒性及び胚・胎児毒性は認められなかった。母動物及び胚・胎児発生に対するシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は単独及びミグルスタットとの併用でいずれも 400 mg/kg であった。

4.5.2.3. ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

用量設定試験の結果に基づき、ウサギを用いたシパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタットとの併用投与による胚・胎児発生に関する試験を実施した（Module 2.6.6, Section 6.1.2.4）。

シパグルコシダーゼ アルファは 30、70 及び 175 mg/kg の用量で、妊娠 7～19 日に隔日で 10 分間かけて静脈内投与した。ミグルスタットは 25 mg/kg の用量でシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。

母動物にミグルスタットに関連した体重増加抑制及び摂餌量低下が認められた。さらに、175/25 mg/kg のシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の胎児において、対照群と比較して有意な心血管系奇形の発現頻度増加が認められた。奇形を有する胎児数は、総発現頻度及び個々の発現頻度の両方がシパグルコシダーゼ アルファ単独群及びミグルスタット単独投与群と比較してシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群で高かったことから、これらの所見は併用投与に起因すると考えられた。ミグルスタット単独群と比較して、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の母動物で妊娠 17～21 日に摂餌量低下がみられたことから、観察された胎児所見は母動物毒性による可能性が示唆された。

母動物毒性及び胚・胎児毒性に対する NOAEL は、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与でいずれも 175 mg/kg（最高用量）、ミグルスタット単独投与でそれぞれ 25 mg/kg 未満及び 25 mg/kg と考えられた。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与における NOAEL は、本試験では 1 用量のみの検討であったため、算出できなかった。

4.5.3.　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ラットにシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用投与し、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した（Module 2.6.6, Section 6.1.3）。シパグルコシダーゼ アルファは 70、150 及び 400 mg/kg の用量で妊娠 6 日～授乳 19 日まで隔日で静脈内投与した。ミグルスタットは 60 mg/kg の用量でシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）併用投与群の一般状態観察で異常歩行及び活動性低下が認められ、途中死亡の増加及び同腹児全死亡が観察された。同腹児全死亡の軽度増加は、母動物の哺育放棄と考えられ、母動物の死亡数増加及び活動性低下並びに剖検時に胃に乳汁が認められなかった児の発現頻度の軽度増加と一致した。母動物の所見は、被験物質の直接作用ではなく、拘束ストレスの増加又は異種タンパク質投与に対する有害な免疫反応に起因した。同群では、軽度かつ一過性の有害でない児動物体重の低値も観察された。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与では 400 mg/kg まで母動物毒性は認められず、いずれの群においても出生前及び出生後の発生に対する有害な影響は認められなかった。

これらの所見より、母動物並びに出生前及び出生後の発生に対するシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は単独及びミグルスタット（60 mg/kg）との併用投与のいずれも 400 mg/kg であった。ミグルスタットの NOAEL は単独及びシパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg）との併用投与のいずれも 60 mg/kg であった。

4.6.　局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施しなかった。ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験における投与部位の検査（剖検及び病理組織学的検査）では、毒性所見は観察されなかった（4.2 項）。

4.7.　その他の毒性試験

ヒト血液を用いたシパグルコシダーゼ アルファの in vitro 溶血性及び凝集能試験を実施した（Module 2.6.6, Sections 8.1 and 8.2）。試験した最高濃度 1000 µg/mL まで溶血又は凝集は認められなかった。試験した最高濃度 1000 µg/mL は、ヒトでの C_{max}（294 µg/mL：ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく母集団 PK 解析、Module 2.7.2, Section 3.5）の約 3.4 倍であった。

5.　総括及び結論

非臨床開発プログラムで実施した一連の薬理試験結果から、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用は、ALGLU と比較してポンペ病の疾患表現型に対して優れた in vivo 有効性を示すことが確認された。

シパグルコシダーゼ アルファは ALGLU よりも多くの M6P を含み、ライソゾーム標的指向性及び疾患関連骨格筋への送達が改善された。シパグルコシダーゼ アルファのライソゾーム標的指向性の改善により、骨格筋でのグリコーゲン減少作用が増強し、*Gaa* KO マウスのポンペ病の表現型が改善された。予定されている臨床投与経路である隔週静脈内投与により、シパグルコシダーゼ アルファは ALGLU よりも優れた有効性を示した。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によりオートファジー障害が回復したが、同所見が ALGLU を用いた長期 ERT では観察されていないことは重要な点である（Prater et al. 2013; Raben et al. 2003）。今回、ポンペ病で障害されたオートファジーを回復させることができるという最初のエビデンスが得られた（Xu et al. 2019）。オートファジー障害は、ポンペ病患者の ERT 効果に悪影響を与える可能性があるため（Fukuda et al. 2006; Raben et al. 2007）、これらの結果は、ALGLU と比較してシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の優位性を支持するものである。

循環血中の中性 pH で、ミグルスタットはシパグルコシダーゼ アルファの活性低下を抑制する酵素安定化剤として作用する。げっ歯類ではミグルスタットの併用によってシパグルコシダーゼ アルファの PK は改善されたが、統計学的に有意な影響は認められなかった。この理由として、各群 5 例と少ないためデータのばらつきが大きかったこと及びマウス血漿中でのミグルスタットの $t_{1/2}$ が短かったことが考えられた。循環血中のシパグルコシダーゼ アルファに対するミグルスタットの安定化効果は、よりヒトに近い動物モデルであるカニクイザルでより良く評価された。サル血漿中ではミグルスタットの $t_{1/2}$ が長く、シパグルコシダーゼ アルファに対して安定化効果を示す可能性が高かった。ミグルスタットによるシパグルコシダーゼ アルファの PK の改善により、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は、同用量のシパグルコシダーゼ アルファ単独及び ALGLU よりも優れたグリコーゲン減少作用を示した。

異なるバッチのシパグルコシダーゼ アルファを用いた薬理及び PK 試験を実施し、同様の有効性及び PK プロファイルが確認された。これらの結果は、重要な糖鎖構造を有するシパグルコシダーゼ アルファの GMP 製造工程は実生産規模まで問題なくスケールアップされたことを示している。

全ての薬理試験結果及び PK/TK プロファイルに基づき、ポンペ病患者を対象とした非盲検第 1/2 相試験（ATB200-02 試験）では、シパグルコシダーゼ アルファの投与量として 20 mg/kg を選択した。これは現在の ALGLU の臨床用量と同じである。また、*Gaa* KO マウスのポンペ病表現型を改善するシパグルコシダーゼ アルファに併用するミグルスタットの至適用量は、260 mg（約 10 mg/kg）と判断された。

ラット及びカニクイザルを用いた安全性薬理評価で、シパグルコシダーゼ アルファ単独又はミグルスタット併用投与に関連した中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する影響はいずれも認められなかった。

反復投与毒性試験は、予定されている臨床投与法（静脈内隔週投与）を考慮して、ラット及びカニクイザルを用いて実施した。

反復投与毒性試験の NOAEL におけるシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの曝露量（C_{max} 及び AUC）及び臨床曝露量［母集団 PK 解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量］より算出した曝露量比をそれぞれ表 2.4- 2 及び表 2.4- 3 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの 26 週間反復投与毒性試験では、ラット及びカニクイザルへの静脈内隔週投与による明らかな毒性所見は認められなかった。いずれの動物種も NOAEL は試験した最高用量である 200 mg/kg であった。NOAEL でのラット及びカニクイザルにおけるシパグルコシダーゼ アルファの曝露量は臨床曝露量のそれぞれ 15 倍及び 18 倍であった。

シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるカニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、併用投与に関連した明らかな毒性所見は認められなかった。NOAEL［シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（100/175 mg/kg）併用投与］でのシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの曝露量は、臨床曝露量のそれぞれ 10 及び 11 倍であった。

表 2.4- 2　反復投与毒性試験の NOAEL におけるシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study	**Animal Exposure of Cipaglucosidase Alfa at NOAEL on Day 169 (26-week study)/ 85 (13-week study)**	**Cipaglucosidase Alfa Margin of Exposure at the NOAEL[a]**
26-Week Rat Study (NOAEL = 200 mg/kg)	C_{max} = 5490 µg/mL[b]	19
	AUC_{0-t} = 21150 µg·h/mL[b]	15
26-Week Monkey Study (NOAEL = 200 mg/kg)	C_{max} = 4205 µg/mL[c]	14
	AUC_{0-t} = 25000 µg·h/mL[c]	18
13-Week Monkey Co-Administration Study (NOAEL = 100 mg/kg for Cipaglucosidase Alfa and 175 mg/kg for Miglustat)	C_{max} = 2270 µg/mL[d]	8
	AUC_{0-t} = 13850 µg·h/mL [d]	10

Abbreviations: AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; AUC_{0-t} = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; NOAEL = no observed adverse effect level; PK = pharmacokinetics

a　Based on data from population PK clinical study (based on Study ATB200-02 and Study ATB200-03, Module 2.7.2, Section 3.5), with C_{max} of 294 µg/mL and AUC_{0-inf} of 1419 µg·h/mL (geometric mean of the treatment group 20 mg/kg cipaglucosidase alfa + 260 mg miglustat)

b　C_{max} (total protein) = 5450 (TTPTFFPK) and 5530 (VTSEGAGLQLQK) µg/mL; AUC_{0-t} (total protein) = 21300 (TTPTFFPK) and 21000 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

c　C_{max} (total protein) = 4200 (TTPTFFPK) and 4210 (VTSEGAGLQLQK) µg/mL; AUC_{0-t} (total protein) = 25100 (TTPTFFPK) and 24900 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

d　Values of C_{max} and AUC_{0-t} for cipaglucosidase alfa when co-administered with miglustat

表 2.4- 3　　反復投与毒性試験の NOAEL におけるミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study	**Animal Exposure of Miglustat at NOAEL on Day 85**	**Miglustat Margin of Exposure at the NOAEL[a]**
13-week Monkey Co-administration Study (NOAEL = 100 mg/kg for cipaglucosidase alfa and 175 mg/kg for miglustat)	C_{max} = 22000 ng/mL[b]	9
	AUC_{0-t} = 216000 ng·h/mL[b]	11

Abbreviations: AUC_{0-t} = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; NOAEL = no observed adverse effect level; PK = pharmacokinetics; QOW = every other week

a　Miglustat human AUC_{0-t} of 20216 ng·h/mL and C_{max} of 2341 ng/mL at 260 mg QOW from population PK clinical study (based on Study ATB200-02 and Study ATB200-03, Module 2.7.2, Section 3.5).

b　Values of C_{max} and AUC_{0-t} for miglustat when co-administered with cipaglucosidase alfa

ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験の結果、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与で観察された受胎能、胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生への影響は、主にミグルスタット及び／又は異種タンパク質投与による有害な免疫反応に関連すると考えられた。

ラット受胎能及び初期胚発生試験のシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの曝露量及び母集団 PK 解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量より算出した曝露量比をそれぞれ表 2.4- 4 及び表 2.4- 5 に示した。

本試験のシパグルコシダーゼ アルファ曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、シパグルコシダーゼ アルファの単独（400 mg/kg）又はミグルスタットとの併用投与で 27 倍以上、ミグルスタット曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、ミグルスタット単独（60 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与で 1.4 倍以上であった。

また、臨床試験は隔週投与であったのに対し、生殖発生毒性試験は隔日投与であったことから、投与頻度の差異を考慮したときの曝露量比（累積曝露量比）を算出した。シパグルコシダーゼ アルファ単独（400 mg/kg）又はミグルスタットとの併用投与でのシパグルコシダーゼ アルファの累積曝露量比は 188 倍以上、ミグルスタット単独（60 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与でのミグルスタットの累積曝露量比は 9.6 倍以上であった。

ミグルスタットは動物試験において、雄性生殖器及びその機能への影響が認められている（ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文）が、本試験ではシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与において、ヒト曝露量の 4.7 倍（累積曝露量比で 33 倍）に当たるミグルスタット曝露量まで雄性生殖能への影響はみられなかった。

表 2.4- 4　　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study		**Exposure of Cipaglucosidase Alfa**	**Cipaglucosidase Alfa Margin of Exposure** [a]
Male (on Day28)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	NOAEL = 400 mg/kg for cipaglucosidase alfa	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 55100 µg·h/mL [b]	39 (272) [f]
	NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 62950 µg·h/mL [c]	44 (311) [f]
Female (on GD 7)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	NOAEL = 400 mg/kg for cipaglucosidase alfa	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 38400 µg·h/mL [d]	27 (189) [f]
	NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 38050 µg·h/mL [e]	27 (188) [f]

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; GD = gestation day; NOAEL = no observed adverse effect level; PK = pharmacokinetics

a　Based on data from population PK clinical study (based on Study ATB200-02 and ATB200-03, Module 2.7.2, Section 3.5) with $AUC_{0\text{-}inf}$ of 1419 µg·h/mL (geometric mean of the treatment group 20 mg/kg cipaglucosidase alfa + 260 mg miglustat)

b　$AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 55200 (TTPTFFPK) and 55000 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

c　$AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 63000 (TTPTFFPK) and 62900 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

d　$AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 38700 (TTPTFFPK) and 38100 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

e　$AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 37900 (TTPTFFPK) and 38200 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

f　The value in the parentheses shows margin of exposure values based on cumulative exposure over a 14-day period (7 doses, every other day) in nonclinical reproductive studies corresponding to the clinical exposure (every other week).

表 2.4- 5　　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study		Exposure of Miglustat	Miglustat Margin of Exposure [a]
Male (on Day28)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	NOAEL = 60 mg/kg for miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 27600 ng·h/mL	1.4 (9.6) [b]
	NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 96000 ng·h/mL	4.7 (33) [b]
Female (on GD 7)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	LOAEL = 60 mg/kg for miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 31400 ng·h/mL	1.6 (11) [b]
	LOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 87600 ng·h/mL	4.3 (30) [b]

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; GD = gestation day; LOAEL = lowest observed adverse effect level; NOAEL = no observed adverse effect level; PK = pharmacokinetics

a　Based on data from population PK clinical study (based on Study ATB200-02 and ATB200-03, Module 2.7.2, Section 3.5), Miglustat human $AUC_{0\text{-}t}$ (where t is the last measurable time point, 24h) reference value at 260 mg once every other week = 20216 ng·h/mL.

b　The value in the parentheses shows margin of exposure values based on cumulative exposure over a 14-day period (7 doses, every other day) in nonclinical reproductive studies corresponding to the clinical exposure (every other week).

ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験におけるシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの曝露量及び臨床曝露量［母集団 PK 解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量］より算出した曝露量比をそれぞれ表 2.4- 6 及び表 2.4- 7 に示した。

ラット胚・胎児発生に関する試験におけるシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL（400 mg/kg）での曝露量比は、単独及びミグルスタットとの併用投与でそれぞれ 19 及び 20 倍（累積曝露量比はそれぞれ 134 及び 142 倍）であった。ミグルスタットの NOAEL（60 mg/kg）での曝露量比は、単独及びシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与でそれぞれ 2 及び 4 倍（累積曝露量比はそれぞれ 14 及び 29 倍）であった。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与時の NOAEL は 175 mg/kg であったが、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与については、1 用量（175/25 mg/kg）しか検討しておらず、当該用量で心血管系奇形が誘発されたため、NOAEL は算出できなかった。本試験におけるシパグルコシダーゼ アルファの曝露量比は、NOAEL（175 mg/kg）でのシパグルコシダーゼ アルファ単独投与で 8 倍（累積曝露量比で 57 倍）、最小毒性量（175/25 mg/kg）でのミグルスタットとの併用投与で 16 倍（累積曝露量比で 111 倍）であった。また、ミグルスタット曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、最小毒性量での 25 mg/kg のミグルスタット単独投与時で 2 倍（累積曝露量比で 14 倍）、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（175/25 mg/kg）併用投与時では 3 倍（累積曝露量比で 23 倍）であった。

表 2.4- 6 胚・胎児発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study		**Female Exposure of Cipaglucosidase Alfa on GD 18 (Rats)/ GD 19 (Rabbits)**	**Cipaglucosidase Alfa Margin of Exposure [a]**
Embryo-Fetal Development Study in Rats	Maternal and developmental NOAEL = 400 mg/kg for cipaglucosidase alfa	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 27100 µg·h/mL [b]	19 (134) [f]
	Maternal and developmental NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 28850 µg·h/mL [c]	20 (142) [f]
Embryo-Fetal Development Study in Rabbits	Maternal and developmental NOAEL = 175 mg/kg for cipaglucosidase alfa	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 11550 µg·h/mL [d]	8 (57) [f]
	LOAEL = 175/25 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 22550 µg·h/mL [e]	16 (111) [f]

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; GD = gestation day; LOAEL = lowest observed adverse effect level; NOAEL = no observed adverse effect level; PK = pharmacokinetics

a Based on data from population PK clinical study (based on Study ATB200-02 and ATB200-03, Module 2.7.2, Section 3.5) with $AUC_{0\text{-}inf}$ of 1419 µg·h/mL (geometric mean of the treatment group 20 mg/kg cipaglucosidase alfa + 260 mg miglustat)

b $AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 27300 (TTPTFFPK) and 26900 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

c $AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 28700 (TTPTFFPK) and 29000 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

d $AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 11500 (TTPTFFPK) and 11600 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

e $AUC_{0\text{-}24h}$ (total protein) = 22700 (TTPTFFPK) and 22400 (VTSEGAGLQLQK) µg·h/mL

f The value in the parentheses shows margin of exposure values based on cumulative exposure over a 14-day period (7 doses, every other day) in nonclinical reproductive studies corresponding to the clinical exposure (every other week).

表 2.4- 7 胚・胎児発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study		**Female Exposure of Miglustat at GD 18 (Rats)/ GD 19 (Rabbits)**	**Miglustat Margin of Exposure [a]**
Embryo-Fetal Development Study in Rats	Maternal and developmental NOAEL = 60 mg/kg for miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$: 41100 ng·h/mL	2 (14) [b]
	Maternal and developmental NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$: 84300 ng·h/mL	4 (29) [b]
Embryo-Fetal Development Study in Rabbits	LOAEL = 25 mg/kg for miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$: 39100 ng·h/mL	2 (14) [b]
	LOAEL = 175/25 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$: 66100 ng·h/mL	3 (23) [b]

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; GD = gestation day; LOAEL = lowest observed adverse effect level; NOAEL = no observed adverse effect level

a Miglustat human $AUC_{0\text{-}t}$ (where t is the last measurable time point, 24h) reference value at 260 mg once every other week = 20216 ng·h/mL.

b The value in the parentheses shows margin of exposure values based on cumulative exposure over a 14-day period (7 doses, every other day) in nonclinical reproductive studies corresponding to the clinical exposure (every other week).

結論として、一連の非臨床試験結果から、ポンペ病の次世代治療薬として、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の非臨床安全性及び有効性が裏付けられた。

6. 参考文献

Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the mdx mouse model. J Vis Exp. 2014(85):e51303.

Chavez CA, Bohnsack RN, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, Dahms NM. Domain 5 of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor preferentially binds phosphodiesters (mannose 6-phosphate N-acetylglucosamine ester). Biochemistry. 2007;46(44):12604-17.

Fukuda T, Ahearn M, Roberts A, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, et al. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. Mol Ther. 2006;14(6):831-9.

Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gonzalez-Quereda L, Flix B, et al. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. PLoS One. 2011;6(12):e29061.

Hawes ML, Kennedy W, O'Callaghan MW, Thurberg BL. Differential muscular glycogen clearance after enzyme replacement therapy in a mouse model of Pompe disease. Mol Genet Metab. 2007;91(4):343-51.

Khanna R, Flanagan JJ, Feng J, Soska R, Frascella M, Pellegrino LJ, et al. The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α-glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease. PLoS One. 2012;7(7):e40776.

Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. Neurotherapeutics. 2018;15(4):928-42.

Prater SN, Patel TT, Buckley AF, Mandel H, Vlodavski E, Banugaria SG, et al. Skeletal muscle pathology of infantile Pompe disease during long-term enzyme replacement therapy. Orphanet J Rare Dis. 2013;8(1):90.

Raben N, Danon M, Gilbert A, Dwivedi S, Collins B, Thurberg B, et al. Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease. Mol Genet Metab. 2003;80(1-2):159-69.

Raben N, Fukuda T, Gilbert AL, de Jong D, Thurberg BL, Mattaliano RJ, et al. Replacing acid alpha-glucosidase in Pompe disease: recombinant and transgenic enzymes are equipotent, but neither completely clears glycogen from type II muscle fibers. Mol Ther. 2005;11(1):48-56.

Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SK, Roberts A, et al. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand. Autophagy. 2007;3(6):546-52.

Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, et al. Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. J Neurol Sci. 2003;211(1-2):23-8.

Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. Lab Invest. 2006;86(12):1208-20.

Tong PY, Kornfeld S. Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. J Biol Chem. 1989;264(14):7970-5.

Xu S, Lun Y, Frascella M, Garcia A, Soska R, Nair A, et al. Improved efficacy of a next-generation ERT in murine Pompe disease. JCI Insight. 2019;4(5):e125358.

Zhou Q, Stefano JE, Harrahy J, Finn P, Avila L, Kyazike J, et al. Strategies for neoglycan conjugation to human acid α-glucosidase. Bioconjug Chem. 2011;22(4):741-51.

Zhu Y, Jiang JL, Gumlaw NK, Zhang J, Bercury SD, Ziegler RJ, et al. Glycoengineered acid alpha-glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of Pompe disease. Mol Ther. 2009;17(6):954-63.

ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.4 薬物動態試験の概要文. 2012. https://www.pmda.go.jp/drugs/2012/P201200038/100888000_22400AMX00659_I100_1.pdf

ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文. 2012. https://www.pmda.go.jp/files/common/js/pdfjs/web/viewer.html?file=/drugs/2012/P201200038/100888000_22400AMX00659_J100_1.pdf

ブレーザベス®カプセル 100mg 審査報告書. 2012. https://www.pmda.go.jp/drugs/2012/P201200038/100888000_22400AMX00659000_A100_1.pdf