目次

1　まとめ 8

2　分析法 11

2.1　シパグルコシダーゼ アルファ 13

2.1.1　酵素活性アッセイを用いたラット及びサル血漿中 GAA 活性分析法バリデーション試験 13

2.1.2　酵素活性アッセイを用いたウサギ血漿中 GAA 活性分析法バリデーション試験 13

2.1.3　LC-MS/MS 法を用いたラット血漿中シパグルコシダーゼ アルファ分析法バリデーション試験 14

2.1.4　LC-MS/MS 法を用いたウサギ血漿中シパグルコシダーゼ アルファ分析法バリデーション試験 14

2.1.5　LC-MS/MS 法を用いたサル血漿中シパグルコシダーゼ アルファ分析法バリデーション試験 15

2.1.6　MSD アッセイを用いたラット血漿中 ADA 分析法バリデーション試験 15

2.1.7　MSD アッセイを用いたサル血漿中 ADA 分析法バリデーション試験 15

2.2　ミグルスタット 16

2.2.1　LC-MS/MS 法を用いたラット血漿中ミグルスタット分析法バリデーション試験 16

2.2.2　LC-MS/MS 法を用いたウサギ血漿中ミグルスタット分析法バリデーション試験 16

2.2.3　LC-MS/MS 法を用いたサル血漿中ミグルスタット分析法バリデーション試験 16

3　吸収 17

3.1　シパグルコシダーゼ アルファ 17

3.1.1　ラット単回投与毒性試験 17

3.1.2　サル単回投与毒性試験 17

3.1.3　ラット 26 週間反復投与毒性試験 17

3.1.4　サル 26 週間反復投与毒性試験 18

3.1.5　[redacted] L スケールのエンジニアリングバッチを用いたマウス薬物動態試験 19

3.1.6　[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチを用いたマウス及びラット薬物動態試験 20

3.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット 24

3.2.1　ミグルスタットに対するシパグルコシダーゼ アルファ併用の影響を評価したマウス薬物動態試験 24

3.2.2　シパグルコシダーゼ アルファに対するミグルスタット塩酸塩併用の影響を評価したマウス及びラット薬物動態試験 27

3.2.3　シパグルコシダーゼ アルファに対するミグルスタット塩酸塩併用の影響を評価したマウス薬物動態試験 34

3.2.4　室温で 4 時間静置し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塩酸塩との併用で急速静脈内投与後のマウス薬物動態試験 37

3.2.5　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で急速静脈内投与後のマウス薬物動態及び薬理試験 38
3.2.6　サル 13 週間反復投与毒性試験 44
3.2.7　ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 45
3.2.8　ラット胚・胎児発生用量設定試験 46
3.2.9　ラット胚・胎児発生に関する試験 46
3.2.10　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験 46
3.2.11　ウサギ胚・胎児発生用量設定試験 47
3.2.12　ウサギ胚・胎児発生に関する試験 47
4　分布 49
4.1　シパグルコシダーゼ アルファ 49
4.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット 49
5　代謝 50
5.1　シパグルコシダーゼ アルファ 50
5.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット 50
6　排泄 51
6.1　シパグルコシダーゼアルファ 51
6.2　シパグルコシダーゼアルファ／ミグルスタット 51
7　薬物動態学的薬物相互作用 52
8　その他の薬物動態試験 53
9　考察及び結論 54
10　参考文献 55

表目次

表 2.6.4 - 1　分析法バリデーション試験の一覧 12

表 2.6.4 - 2　321 試験の試験デザイン 19

表 2.6.4 - 3　379 試験の試験デザイン 21

表 2.6.4 - 4　380 試験の試験デザイン 23

表 2.6.4 - 5　300 試験の試験デザイン 24

表 2.6.4 - 6　338 試験の試験デザイン 26

表 2.6.4 - 7　302 試験の試験デザイン 28

表 2.6.4 - 8　297 試験の試験デザイン 32

表 2.6.4 - 9　304 試験の試験デザイン 33

表 2.6.4 - 10　報告書番号 RRB200-024 の試験デザイン 35

表 2.6.4 - 11　413 試験の試験デザイン 37

表 2.6.4 - 12　報告書番号 RRB200-066 の試験デザイン 39

表 2.6.4 - 13　シパグルコシダーゼ アルファの $t_{1/2}$ 40

表 2.6.4 - 14　ミグルスタットの $t_{1/2}$ 41

図目次

図 2.6.4 - 1　マウスにシパグルコシダーゼアルファ（EB1 及び EB2）を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 20

図 2.6.4 - 2　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を急速静脈内投与後の血漿 GAA 活性 22

図 2.6.4 - 3　ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を 1 時間かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 23

図 2.6.4 - 4　マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後の血漿中ミグルスタット濃度 25

図 2.6.4 - 5　マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後の大腿四頭筋中ミグルスタット濃度 25

図 2.6.4 - 6　マウスにミグルスタット塩酸塩単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与後の血漿中ミグルスタット濃度 27

図 2.6.4 - 7　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を 30 分かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 29

図 2.6.4 - 8　マウス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で 30 分かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 30

図 2.6.4 - 9　マウス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、若しくは ALGLU 単独を 30 分かけて静脈内投与後の組織中 GAA 活性 31

図 2.6.4 - 10　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 33

図 2.6.4 - 11　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で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 34

図 2.6.4 - 12　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 36

図 2.6.4 - 13　マウス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で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性 36

図 2.6.4 - 14　マウスに室温で 4 時間静置したシパグルコシダーゼ アルファ単独又は
ミグルスタット塩酸塩との併用で急速静脈内投与後の血漿 GAA 活性.....38

図 2.6.4 - 15　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の GAA 活性.....40

図 2.6.4 - 16　マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後のミグルスタット濃度 41

図 2.6.4 - 17　心臓、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋での GAA 活性.....43

図 2.6.4 - 18　心臓、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋でのグリコーゲン量 44

略語及び用語の説明

略語及び用語	日本語	英語
4-MU	4-メチルウンベリフェロン	4-methylumbelliferone
4-MU-α-Glc	4-メチルウンベリフェリル-α-D-グルコピラノシド	4-methylumbelliferyl-α-D-glucopyranoside
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
$AUC_{0\text{-}5h}$	0 時間から投与 5 時間後までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 5 hours postdose
$AUC_{0\text{-}24h}$	0 時間から投与 24 時間後までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose
$AUC_{0\text{-}26h}$	0 時間から投与 26 時間後までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 26 hours postdose
$AUC_{0\text{-}t}$	0 時間から濃度測定可能な最終時点までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration
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
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
IS	内標準物質	internal standard
KO	ノックアウト	knock-out
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
M6P	マンノース-6 リン酸	mannose 6-phosphate
MSD	-	meso scale discovery
NZW	ニュージーランド白色	New Zealand White
PK	薬物動態	pharmacokinetic

略語及び用語	日本語	英語
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
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
t_{max}	最高濃度到達時間	time to reach the maximum observed concentration
WT	野生型	wild type

1　まとめ

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 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。

他の rhGAA 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）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。また、ミグルスタットはニーマン・ピック病 C 型の治療薬として国内で 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。

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）プロファイルを、マウス酸性 α-グルコシダーゼをコードする遺伝子（*Gaa*）を欠失することによりポンペ病の表現型を再現した *Gaa* ノックアウト（KO）マウス、野生型（WT）マウス及び Sprague Dawley ラットを用いた PK 試験、並びに Sprague Dawley ラット、ニュージーランド白色（NZW）ウサギ及びカニクイザルを用いたトキシコキネティクス（TK）試験で検討した。

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 アルファの最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度 - 時間曲線下面積（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。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（3.2.2 項）。*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（3.2.5 項）。

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、遊離体換算）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（3.2.1 項）。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（3.2.5 項）。

Gaa KO マウス及び Sprague Dawley 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（3.2.2 項及び 3.2.3 項）。また、*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（3.2.5 項）。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（3.2.6 項）。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（3.1.5 項及び 3.1.6 項）。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（3.2.4 項）。

以上の結果は、ポンペ病患者を治療するための次世代 ERT であ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開発を支持するものである。

2　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）及び液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）法用いて評価された。一方で、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。シパグルコシダーゼ アルファの分析法は、2 種類の方法（酵素活性アッセイ及び LC-MS/MS 法）でバリデートされた。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開発された。また、毒性試験でのラット及びサルにおける抗シパグルコシダーゼ アルファ抗体（抗薬物抗体、ADA）の分析法もバリデートされた。バリデートされた分析法の一覧を表 2.6.4 - 1 に示し、以下に簡潔に要約する。

表 2.6.4 - 1　　分析法バリデーション試験の一覧

分析法	分析対象物質	動物種／系統	試験施設	バリデーション 報告書番号	分析法が用いられた報告書番号
酵素活性 アッセイ	シパグルコシダーゼ アルファ	Sprague Dawley ラット及びカニクイザル血漿	[redacted]	4000041	[redacted].423.08、8371929、8371930、[redacted].423.07、[redacted].423.10
酵素活性 アッセイ	シパグルコシダーゼ アルファ	NZW ウサギ血漿	[redacted]	3800505	8371928、8371931
LC-MS/MS 法	シパグルコシダーゼ アルファ	Sprague Dawley ラット血漿	[redacted]	[redacted]-NL-SML-1589	[redacted].423.08、8371927、8371929、8371930、8371932
LC-MS/MS 法	シパグルコシダーゼ アルファ	NZW ウサギ血漿	[redacted]	[redacted]-NL-SML-1977	8371928、8371931
LC-MS/MS 法	シパグルコシダーゼ アルファ	カニクイザル血漿	[redacted]	[redacted]-NL-SML-1590	[redacted].423.07、[redacted].423.10
MSD アッセイ	ADA	Sprague Dawley ラット血漿	[redacted]	14BAS0469	[redacted].423.08
MSD アッセイ	ADA	カニクイザル血漿	[redacted]	14BAS0470	[redacted].423.07、[redacted].423.10
LC-MS/MS 法	ミグルスタット	Sprague Dawley ラット血漿	[redacted]	17147	8371927、8371930、8371932
LC-MS/MS 法	ミグルスタット	NZW ウサギ血漿	[redacted]	17148	8371931
LC-MS/MS 法	ミグルスタット	カニクイザル血漿	[redacted]	15021	[redacted].423.10

ADA = 抗薬物抗体（抗シパグルコシダーゼ アルファ抗体）；[redacted] = [redacted]；LC-MS/MS = 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析；MSD = meso scale discovery；NZW = ニュージーランド白色

2.1　シパグルコシダーゼ アルファ

2.1.1　酵素活性アッセイを用いたラット及びサル血漿中 GAA 活性分析法バリデーション試験

報告書番号：4000041、添付資料番号：4.2.2.1.1
報告書番号：3800521、添付資料番号：4.2.2.1.2

毒性試験での血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度を定量するため、ラット及びサル血漿中 GAA 活性を測定する分析法を GLP 準拠下でバリデートした（4000041 試験）。GAA 活性は、合成基質である 4-メチルウンベリフェリル-α-D-グルコピラノシド（4-MU-α-Glc）を用いて測定した。4-MU-α-Glc は rhGAA によって加水分解され、蛍光基質である 4-メチルウンベリフェロン（4-MU）を生成する。本法では蛍光測定法によって 4-MU を定量した。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.1 に示す。

4-MU の定量範囲は 50～30000 nmol/L であった。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度は 50、150、5000 及び 20000 nmol/L で評価され、いずれも基準を満たしていた。本法はいずれの種でも選択的であり、希釈妥当性は 100～6000000 倍で示された。未希釈及び希釈されたラット血漿中では 4℃でそれぞれ 24 時間及び 44 時間 48 分安定であった。また、-80℃で 157 日間安定であった。未希釈及び希釈されたサル血漿中では 4℃でそれぞれ 8 時間及び 24 時間 19 分安定であった。また、-80℃で 135 日間安定であった。いずれの種でも 4 回の凍結融解（-80℃）まで安定であった。

バリデーション試験においてラット及びサル血漿中のシパグルコシダーゼアルファ比活性はそれぞれ 456.92 及び 452.69 μmol/mg/hr と算出され、反復投与毒性試験ではこれら比活性を用いて各試料について測定した活性（nmol/mL/hr）からシパグルコシダーゼ アルファ濃度（μg/mL）を算出した。ただし、ラット血漿中比活性は別試験で 491.38 μmol/mg/hr に更新され（3800521 試験）、胚・胎児発生試験ではこの値が用いられた。

2.1.2　酵素活性アッセイを用いたウサギ血漿中 GAA 活性分析法バリデーション試験

報告書番号：3800505、添付資料番号：4.2.2.1.3
報告書番号：3800517、添付資料番号：4.2.2.1.4

本法は 2.1.1 項の分析法と同様である。生殖発生毒性試験でのウサギ血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度を定量するため、本法を GLP 準拠下でバリデートした（3800505 試験）。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.2 に示す。

4-MU の定量範囲は 50～30000 nmol/L であった。陽性対照（0.3 及び 8 ng/mL）での分析単位内及び分析単位間の真度及び精度はいずれも基準を満たしていた。本法はウサギ血漿中で選択的であり、希釈妥当性は 100～1000000 倍で示された。未希釈及び希釈されたウサギ血漿中では 4℃でそれぞれ 8 時間 2 分及び 24 時間 10 分安定であった。また、未希釈のウサギ血漿中では-80℃で 184 日間、4 回の凍結融解（-80℃）まで安定であった。

ウサギ血漿中のシパグルコシダーゼアルファ比活性は別試験（3800517 試験）で評価され、512.43 µmol/mg/hr であった。生殖発生毒性試験ではこの値を用いて各試料について測定した活性（nmol/mL/hr）からシパグルコシダーゼ アルファ濃度（µg/mL）を算出した。

2.1.3　LC-MS/MS 法を用いたラット血漿中シパグルコシダーゼ アルファ分析法バリデーション試験

報告書番号：[redacted]-NL-SML-1589、添付資料番号：4.2.2.1.5

毒性試験でのラット血漿中シパグルコシダーゼ アルファを定量するため、LC-MS/MS 法を用いた分析法を GLP 準拠下でバリデートした。シパグルコシダーゼ アルファは前処理（除タンパク）の過程でトリプシンによって複数のペプチドに分解されるが、幾つかのペプチドのアミノ酸配列はシパグルコシダーゼ アルファ特異的であるため、これらをシパグルコシダーゼ アルファを定量するための signature peptide として用いることができる。本法では 2 つの signature peptide［T50（アミノ酸配列：VTSEGAGLQLQK）及び T09（アミノ酸配列：TTPTFFPK）］を測定し、内標準物質（IS）として両ペプチドの安定同位体（VTSEGAGLQLQK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$ 及び TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$）を用いた。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.3 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの定量範囲は 0.5～500 µg/mL であった。真度、精度及び選択性は基準を満たした。希釈妥当性は 10 倍まで示された。ラット血漿中では室温で 24 時間、-20℃及び-70℃で 211 日間、凍結融解（-20℃及び-70℃）は 5 回まで安定であった。

2.1.4　LC-MS/MS 法を用いたウサギ血漿中シパグルコシダーゼ アルファ分析法バリデーション試験

報告書番号：[redacted]-NL-SML-1977、添付資料番号：4.2.2.1.6

生殖発生毒性試験でのウサギ血漿中シパグルコシダーゼ アルファを定量するため、LC-MS/MS 法を用いた分析法を GLP 準拠下でバリデートした。本法では 2.1.3 項の分析法と同じ signature peptide 及び IS を用いた。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.4 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの定量範囲は 0.5～500 µg/mL であった。真度、精度及び選択性は基準を満たした。希釈妥当性は 20 倍まで示された。ウサギ血漿中では室温で 25 時間、-20℃で Protein LoBind チューブ保存では 128 日間、-70℃で Protein LoBind チューブ保存では 148 日間、-20℃及び-70℃でポリプロピレンチューブ保存では 148 日間、凍結融解（-20℃及び-70℃）は 5 回まで安定であった。

2.1.5　LC-MS/MS 法を用いたサル血漿中シパグルコシダーゼ アルファ分析法バリデーション試験

報告書番号：[redacted]-NL-SML-1590、添付資料番号：4.2.2.1.7

反復投与毒性試験でのサル血漿中シパグルコシダーゼ アルファを定量するため、LC-MS/MS 法を用いた分析法を GLP 準拠下でバリデートした。本法では 2.1.3 項の分析法と同じ signature peptide 及び IS を用いた。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.5 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの定量範囲は 0.5～500 µg/mL であった。真度、精度及び選択性は基準を満たした。希釈妥当性は 10 倍まで示された。サル血漿中では室温で 24 時間、-20℃及び-70℃で 185 日間、凍結融解（-20℃及び-70℃）は 5 回まで安定であった。

2.1.6　MSD アッセイを用いたラット血漿中 ADA 分析法バリデーション試験

報告書番号：14BAS0469、添付資料番号：4.2.2.1.8

ラット血漿中 ADA の検出のため、meso scale discovery（MSD）アッセイをバリデートした。ADA はビオチン化シパグルコシダーゼ アルファ及びルテニウム標識シパグルコシダーゼ アルファに捕捉され、これらと複合体を形成すると、ストレプトアビジン固相化 MSD プレート上で 620 nm の波長で検出される。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.6 に示す。

バリデーションで用いられた Low Positive Control 及び High Positive Control はそれぞれ 250 ng/mL 及び 20 µg/mL であった。本法の選択性及び Dilutional Linearity はバリデートされた。感度は 9.44 ng/mL、Confirmatory Assay のカットポイントは 15.8%であり、この値を超える場合に ADA 陽性とした。ラット血漿中では室温で 24 時間、2℃～8℃で 1 週間、-20℃及び-70℃で 9 ヵ月間、凍結融解（-20℃及び-70℃）は 6 回まで安定であった。

2.1.7　MSD アッセイを用いたサル血漿中 ADA 分析法バリデーション試験

報告書番号：14BAS0470、添付資料番号：4.2.2.1.9

2.1.6 項の分析法と同様に、サル血漿中 ADA の検出のため、MSD アッセイをバリデートした。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2A.7 に示す。

Low Positive Control 及び High Positive Control はそれぞれ 250 ng/mL 及び 20 µg/mL であった。本法の選択性及び Dilutional Linearity はバリデートされた。感度は 8.08 ng/mL、Confirmatory Assay のカットポイントは 12.5%であった。サル血漿中では室温及び 2℃～8℃で 24 時間、-20℃及び-70℃で 9 ヵ月間、凍結融解（-20℃及び-70℃）は 6 回まで安定であった。

2.2　ミグルスタット

2.2.1　　LC-MS/MS 法を用いたラット血漿中ミグルスタット分析法バリデーション試験

報告書番号：17147、添付資料番号：4.2.2.1.10

生殖発生毒性試験でのラット血漿中ミグルスタットを定量するため、LC-MS/MS 法を用いた分析法を GLP 準拠下でバリデートした。本法では IS として安定同位体（AT2221-d_9）を用い、固相抽出法により前処理した。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2B.1 に示す。

ミグルスタットの定量範囲は 0.5～500 ng/mL であった。真度、精度及び選択性は基準を満たした。希釈妥当性は 10 及び 100 倍で示された。ラット血漿中では室温で 24 時間、約-70℃で 176 日間、凍結融解（約-70℃）は 4 回まで安定であった。

2.2.2　　LC-MS/MS 法を用いたウサギ血漿中ミグルスタット分析法バリデーション試験

報告書番号：17148、添付資料番号：4.2.2.1.11

生殖発生毒性試験でのウサギ血漿中ミグルスタットを定量するため、先に記載した分析法と同様に LC-MS/MS 法を用いた分析法を GLP 準拠下でバリデートした。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2B.2 に示す。

ミグルスタットの定量範囲は 0.5～500 ng/mL であった。真度、精度及び選択性は基準を満たした。希釈妥当性は 10 及び 100 倍で示された。ウサギ血漿中では室温で 18 時間、約-70℃で 180 日間、凍結融解（約-70℃）は 4 回まで安定であった。

2.2.3　　LC-MS/MS 法を用いたサル血漿中ミグルスタット分析法バリデーション試験

報告書番号：15021、添付資料番号：4.2.2.1.12

反復投与毒性試験でのサル血漿中ミグルスタットを定量するため、先に記載した分析法と同様に LC-MS/MS 法を用いた分析法を GLP 準拠下でバリデートした。バリデーション試験結果の詳細は Module 2.6.5, Section 2B.3 に示す。

ミグルスタットの定量範囲は 0.5～500 ng/mL であった。真度、精度及び選択性は基準を満たした。希釈妥当性は 10～200 倍で示された。サル血漿中では室温で約 21 時間、-70℃で 70 日間、凍結融解（-70℃）は 5 回まで安定であった。

3　吸収

3.1　シパグルコシダーゼ アルファ

3.1.1　　ラット単回投与毒性試験

報告書番号：283-0011-TX、添付資料番号：4.2.3.1.1

ラット単回投与毒性試験の一環として、雌 Sprague Dawley ラットに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 分間かけて単回静脈内投与し、TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は酵素活性アッセイにて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 2.1.1 及び Module 2.6.5, Section 3A.1 に示す。

検討した用量範囲で C_{max} は用量比例的に増加した一方、0 時間から投与 24 時間後までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）の増加率は用量比をやや上回り、これは初期消失相の $t_{1/2}$ が用量依存的に増加することに因る可能性が考えられた。

3.1.2　　サル単回投与毒性試験

報告書番号：283-0012-TX、添付資料番号：4.2.3.1.2

サル単回投与毒性試験の一環として、雌カニクイザルに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 時間かけて単回静脈内投与し、TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は酵素活性アッセイにて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 2.1.2 及び Module 2.6.5, Section 3A.2 に示す。

検討した用量範囲で C_{max} 及び 0 時間から投与 26 時間後までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}26h}$）ともに増加率は用量比を上回り、これは初期消失相の $t_{1/2}$ が用量依存的に増加することに因る可能性が考えられた。

3.1.3　　ラット 26 週間反復投与毒性試験

報告書番号：[redacted].423.08、添付資料番号：4.2.3.2.1

ラット 26 週間反復投与毒性試験の一環として、雌雄 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファを 30、70 及び 200 mg/kg の用量で 10 分間かけて隔週で 13 回反復静脈内投与し、Day 1、Day 85 及び Day 169 の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は酵素活性アッセイ及び LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 3.1.1 及び Module 2.6.5, Section 4A.1 に示す。なお、シパグルコシダーゼ アルファ濃度は雌と比較して雄で若干高かったが（2 倍以内）、各投与量での反復投与の影響は雌雄で同様であったため、雌雄併合値の TK パラメータで考察した。また、Day 1 の投与前並びに Day 92、Day 183 及び Day 211 の血漿中 ADA を MSD アッセイで測定した。

LC-MS/MS 法にて測定した血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度及び TK パラメータは 2 つの signature peptide で類似していた。しかしながら、酵素活性アッセイを用いて算出された 0 時間から濃度測定可能な最終時点までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC_{0-t}）は LC-MS/MS 法を用いて算出された値と比較して低く、この差の原因として、LC-MS/MS 法では活性を有しないタンパク質も測定したためと考えられた。分析法に関わらず、全身曝露量は検討した用量範囲で用量依存的に増加した。隔週で反復投与しても蓄積性はほとんど認められず、C_{max} 及び AUC_{0-t} の蓄積率は概して 2 以内であった。

Day 1 の投与前ではシパグルコシダーゼ アルファ投与群での ADA の発現率は 57%～87%であったものの、いずれの試料の力価も非常に低く、ADA 陽性の結果に意味はないと考えられた。Day 92、Day 183 及び Day 211 ではシパグルコシダーゼ アルファ投与群の全例で ADA 陽性であった。Day 92、Day 183 及び Day 211 での中和抗体の発現率は、30 mg/kg 群でそれぞれ 96.6%、94.7%及び 90.0%、70 mg/kg 群でそれぞれ 96.7%、80.0%及び 100%、200 mg/kg 群でそれぞれ 44.8%、65.0%及び 75.0%であった。また、用量依存的に力価が増加する傾向は認められなかった。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 への影響は認められないことが示唆された。

3.1.4　サル 26 週間反復投与毒性試験

報告書番号：[redacted].423.07、添付資料番号：4.2.3.2.2

サル 26 週間反復投与毒性試験の一環として、雌雄カニクイザルにシパグルコシダーゼ アルファを 30、60 及び 200 mg/kg の用量で 2 時間かけて隔週で 13 回反復静脈内投与し、Day 1、Day 85 及び Day 169 の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は酵素活性アッセイ及び LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 3.1.2 及び Module 2.6.5, Section 4A.2 に示す。概してシパグルコシダーゼ アルファ濃度はいずれの分析法においても雌雄で同程度、若しくは雌と比較して雄で若干高いのみであったため（2 倍以内）、雌雄併合値の TK パラメータで考察した。また、馴化期間中、Day 85、Day 92、Day 169 及び Day 211 の血漿中 ADA を MSD アッセイで測定した。

LC-MS/MS 法にて測定した血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度及び TK パラメータは 2 つの signature peptide で類似していた。しかしながら、酵素活性アッセイを用いて算出された C_{max} 及び AUC_{0-t} は LC-MS/MS 法を用いて算出された値と比較して低く、反復投与後（Day 85 及び Day 169）で特に顕著であった。この差の原因として、LC-MS/MS 法では活性を有しないタンパク質も測定したためと考えられた。分析法に関わらず、全身曝露量は検討した用量範囲で用量依存的に増加した。隔週で反復投与しても蓄積性はほとんど認められず、C_{max} 及び AUC_{0-t} の蓄積率は概して 2 以内であった。

馴化期間中ではシパグルコシダーゼ アルファ投与群での ADA の発現率は 8%～42%であったものの、いずれの試料の力価も非常に低く、ADA 陽性の結果に意味はないと考えられた。Day 85、Day 92、Day 169 及び Day 211 では、シパグルコシダーゼ アルファ投与群の毒性評価動物の全例で ADA 陽性であった。Day 85、Day 92、Day 169 及び Day 211 での中和抗体の発現率は、

30 mg/kg 群でそれぞれ 58%、67%、67%及び 75%、60 mg/kg 群でそれぞれ 8%、17%、25%及び 50%、200 mg/kg 群でそれぞれ 8%、0%、17%及び 0%であった。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 への明らかな影響は認められなかった。

3.1.5　[redacted] L スケールのエンジニアリングバッチを用いたマウス薬物動態試験

報告書番号：RRB200-016、添付資料番号：4.2.1.1.4

大規模な 2 つのエンジニアリングバッチ（バッチ番号 EB1 及び EB2、いずれも [redacted] L スケール）を製造し、*Gaa* KO マウスを用いてそれらの PK 及び薬効を比較した。

本試験は以下に示す 2 つのパートより構成される。本項では 321 試験のみ示し、335 試験は Module 2.6.2, Section 2.1.2.1 に示す。

- *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（EB1 及び EB2）を急速静脈内投与後の PK 比較（321 試験）
- *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（EB1 及び EB2）を急速静脈内投与後の薬効比較（335 試験）

321 試験では雄 *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 10 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 2 及び Module 2.6.5, Section 3A.3 に示す。

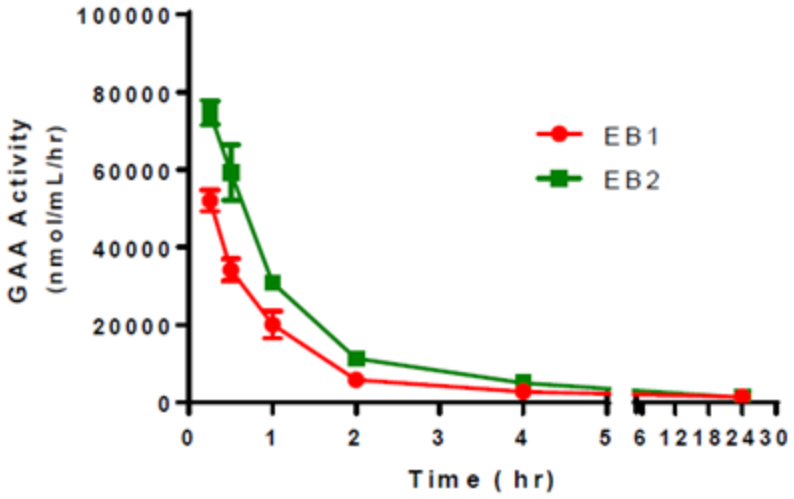
表 2.6.4 - 2　　321 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article (mg/kg)	Plasma Sampling Time Points
1	5M	untreated	0
2	5M	cipaglucosidase alfa EB1 (10)	15, and 30 min, 1, 2, and 4 h, and 24 h
3	5M	cipaglucosidase alfa EB2 (10)	

Abbreviations: EB = engineering batch; h = hours; M = male; min = minutes

シパグルコシダーゼ アルファ（EB1 及び EB2）を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 1 に示す。EB1 及び EB2 の PK プロファイルに若干の違いが認められ、$t_{1/2}$ はそれぞれ 0.50 時間及び 0.60 時間であった。小規模の研究グレードでのシパグルコシダーゼアルファを 10 mg/kg で急速静脈内投与時の $t_{1/2}$ は 0.66 時間であったため（Module 2.6.5, Section 3B.2）、EB2 の $t_{1/2}$ は研究グレードのバッチと類似しており、EB1 は EB2 又は研究グレードのバッチよりも血漿中からの消失が速いことが示唆された。

図 2.6.4 - 1　　マウスにシパグルコシダーゼアルファ（EB1 及び EB2）を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: EB = engineering batch; GAA = acid α-glucosidase; hr = hour; SEM = standard error of the mean
Each time point represents the mean ± SEM of 4-5 mice/group.
Source: Study Report No. RRB200-016, Figure 1

3.1.6　[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチを用いたマウス及びラット薬物動態試験

報告書番号：RRB200-037、添付資料番号：4.2.2.2.1

更なる臨床開発［第 3 相試験（ATB200-03 試験）］及び市販後の製造工程の妥当性を裏付けるため、小規模（[redacted] L）及び大規模（[redacted] L）スケールの様々なバッチを製造し、それらの同等性／同質性を検証する非臨床試験を実施した。本試験は以下に示す 3 つのパートより構成される。本項では 379 試験及び 380 試験について示す。

- *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を急速静脈内投与後の PK（379 試験）
- Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を 1 時間かけて静脈内投与後の PK（380 試験）
- *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を急速静脈内投与後の疾患関連組織での薬効（378 試験）

3.1.6.1　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を急速静脈内投与後の薬物動態

379 試験では雄 *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 10 mg/kg の用量で急速静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 3 及び Module 2.6.5, Section 3A.4 に示す。

表 2.6.4 - 3　　379 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article (mg/kg) and Batches	Dosing Regimen	Plasma Collection Post-Administration
1	5M	vehicle[a]	Single dose	N/A[b]
2	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L EB1		10, 30, and 90 min; 3 and 5 h (submandibular bleeding), and 24 h (terminal sacrifice)
3	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L EB2		
4	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L PR1		
5	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L EB2-Sublot1		
6	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L GMP4		

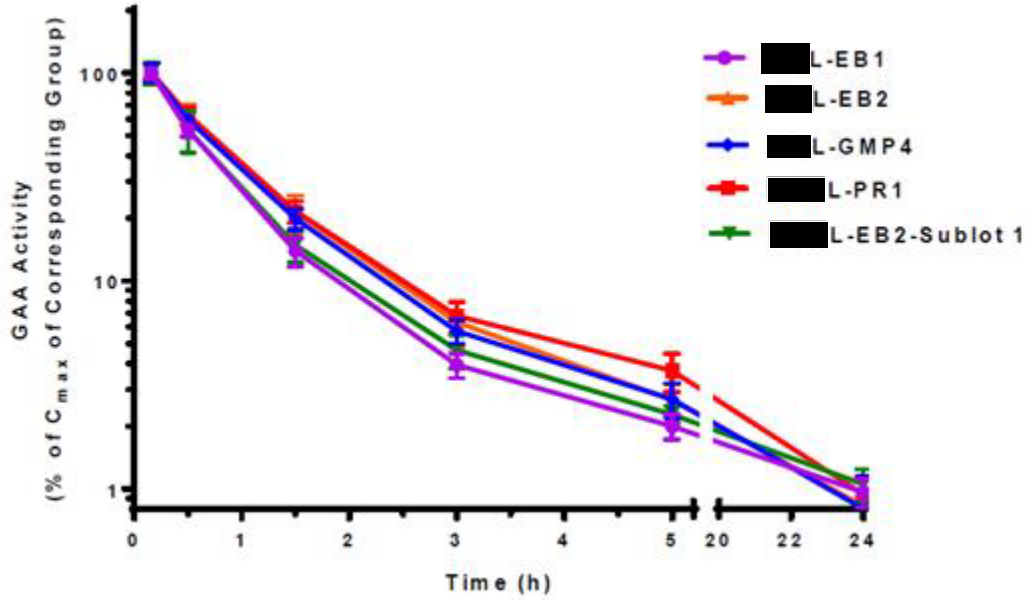
Abbreviations: EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; GMP = Good Manufacturing Practice; h = hours; IV = intravenous; KO = knock-out; M = male; min = minutes; N/A = not applicable; PR = practice run

a　Vehicle for IV administration was 25 mmol/L sodium citrate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, pH 6.0.

b　Plasma samples were collected from vehicle injected mice for baseline control.

シパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 2 に示す。スケールアップ前（[redacted]L-EB1、[redacted]L-EB2、[redacted]-GMP4）及びスケールアップ後（[redacted]L-PR1 及び [redacted]L-EB2-Sublot1）にかかわらず、全てのバッチで PK プロファイルは類似していた。$t_{1/2}$ は 0.59 時間から 0.74 時間の範囲で、[redacted] 及び [redacted] L スケールでの平均値はそれぞれ 0.65 時間及び 0.70 時間であった。

図 2.6.4 - 2　　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を急速静脈内投与後の血漿 GAA 活性



Abbreviations: EB = engineering batch; GAA = acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; h = hour; PR = practice run; SD = standard deviation
Each time point represents the mean ± SD of 5 mice/group.
Source: Study Report No. RRB200-037, Figure 1

3.1.6.2　　ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を 1 時間かけて静脈内投与後の薬物動態

380 試験では雄 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファを 10 mg/kg の用量で 1 時間かけて単回静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。頸静脈カニュレーションを投与部位と採血部位の二箇所に施し、臨床での持続注入に類似させた状態での PK を評価した。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 4 及び Module 2.6.5, Section 3A.4 に示す。

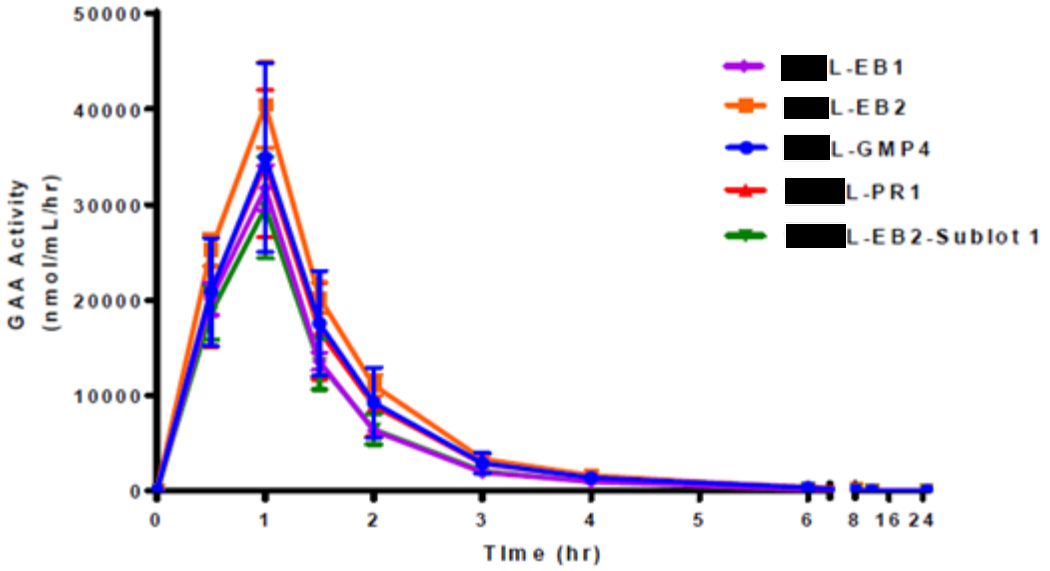
表 2.6.4 - 4　　380 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article (mg/kg) and Batches	Dosing Regimen	Plasma Collection Time Point
1	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L EB1	Single 1-h infusion via jugular vein cannula	Pre-infusion, and 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 25 (terminal sacrifice) h post start or infusion
2	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L EB2		
3	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L PR1		
4	5M	cipaglucosidase alfa (10) - [redacted] L EB2-Sublot1		
5	5M	cipaglucosidase alfa (10) [redacted] L - GMP4		
6	4M	untreated	N/A	N/A[a]

Abbreviations: EB = engineering batch; GMP = Good Manufacturing Practice; h = hours; M = male; min = minutes; N/A = not applicable; PR = practice run
a　Plasma samples were collected from untreated rats for baseline control.

シパグルコシダーゼ アルファを 1 時間かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 3 に示す。PK プロファイルは小規模（[redacted] L）及び大規模（[redacted] L）スケールで類似していた。$t_{1/2}$ はバッチ間で非常に類似しており（0.54 時間から 0.59 時間の範囲）、AUC 及び C_{max} もバッチ間で顕著な差は認められなかった。以上より、[redacted] 及び [redacted] L スケールのシパグルコシダーゼ アルファの PK は類似していることが示された。

図 2.6.4 - 3　　ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（[redacted] 及び [redacted] L スケールの様々なバッチ）を 1 時間かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: EB = engineering batch; GAA = acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; hr = hour; PR = practice run; SD = standard deviation
Each rat was corrected with its baseline activity (pre-infusion) and the activities over baseline were used for the PK plotting.
Each time point represents the mean ± SD of 5 rats/group.
Source: Study Report No. RRB200-037, Figure 2

3.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

3.2.1　ミグルスタットに対するシパグルコシダーゼ アルファ併用の影響を評価したマウス薬物動態試験

報告書番号：RRB200-007、添付資料番号：4.2.2.2.2

本試験は以下に示す 2 つのパートより構成される。

- WT マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後の PK（300 試験）
- *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファの併用下でミグルスタット塩酸塩を経口投与後の PK（338 試験）

3.2.1.1　マウスにミグルスタットを経口投与後の薬物動態

300 試験では雄 WT マウスにミグルスタット塩酸塩を 1、3、10 及び 30 mg/kg（遊離体換算）の用量で単回経口投与し、PK プロファイルを検討した。また、薬理試験（Module 2.6.2, Section 2.2.2.1）において代表的な疾患関連組織として評価された大腿四頭筋への分布を 10 及び 30 mg/kg 群（遊離体換算）で評価した。血漿中及び大腿四頭筋中ミグルスタット濃度は LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 5 及び Module 2.6.5, Section 3B.1 に示す。

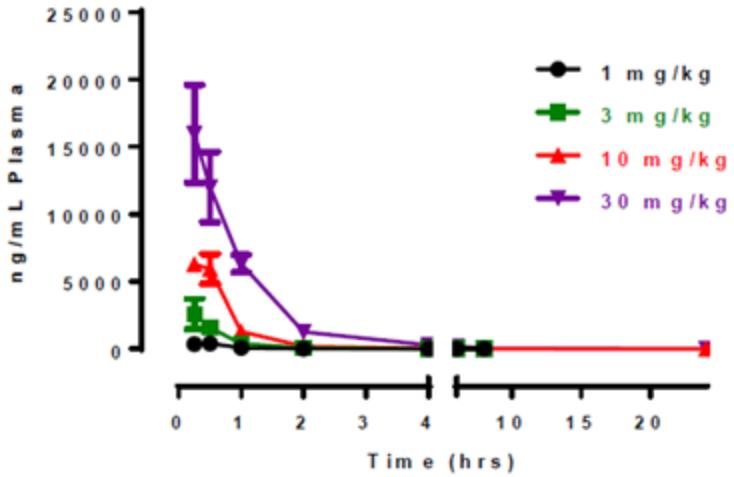
表 2.6.4 - 5　　300 試験の試験デザイン

Dose Group[a]	**No. of Animals per Group and Sex**	**Miglustat (mg/kg)**	**Plasma and Tissue Sampling Time Points (Post Dosing)**
1	5M	0	0
2-13	5M	1	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 hr, and 7, and 14 days
14-25	5M	3	
26-37	5M	10	
38-49	5M	30	

Abbreviations: hr = hours; M = male
a　One group of animals per sampling time point

ミグルスタット塩酸塩を経口投与後の血漿中ミグルスタット濃度を図 2.6.4 - 4 に示す。ミグルスタットは速やかに C_{max} に達し、最高濃度到達時間（t_{max}）は 0.3～0.4 時間であった。また、C_{max} 及び AUC は用量依存的に増加した。

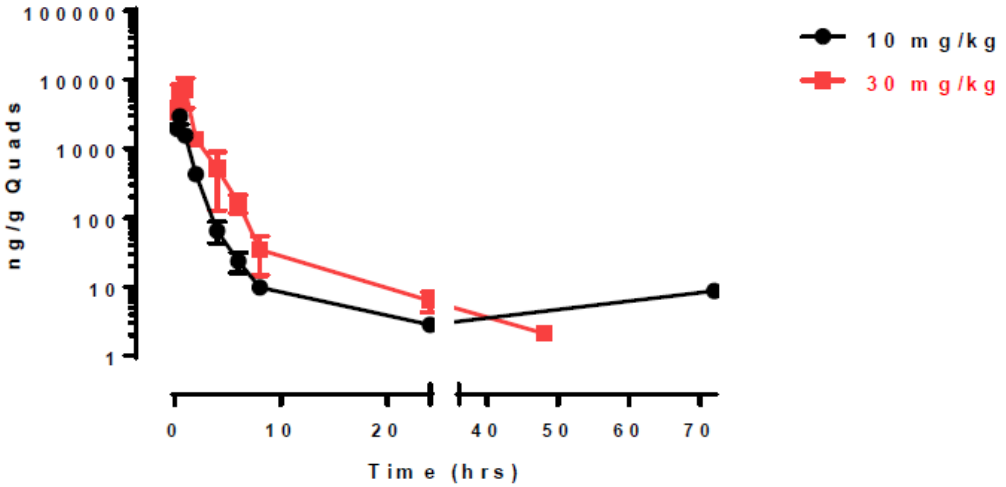
図 2.6.4 - 4　　マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後の血漿中ミグルスタット濃度



Abbreviations: hrs = hours; SEM = standard error of the mean
Each point in the graph represents the mean ± SEM from 5 mice.
Source: Study Report No. RRB200-007, Figure 1

ミグルスタット塩酸塩を経口投与後の大腿四頭筋中ミグルスタット濃度を図 2.6.4 - 5 に示す。ミグルスタットは速やかに C_{max} に達し、t_{max} は 10 及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 0.45 時間及び 0.90 時間であった。$t_{1/2}$ は 10 及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 1.4 時間及び 1.2 時間であり、血漿中濃度の $t_{1/2}$（0.2～0.5 時間）よりも長かった。以上より、ミグルスタットは大腿四頭筋に良好に分布することが明らかとなった。

図 2.6.4 - 5　　マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後の大腿四頭筋中ミグルスタット濃度



Abbreviations: hrs = hours; SEM = standard error of the mean
Each point in the graph represents the mean ± SEM from 5 mice.
Source: Study Report No. RRB200-007, Figure 2

3.2.1.2　マウスにシパグルコシダーゼ アルファの併用下でミグルスタット塩酸塩を経口投与後の薬物動態

338 試験ではシパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg の併用下で雄 *Gaa* KO マウスにミグルスタット塩酸塩を 10 及び 30 mg（遊離体換算）の用量で経口投与し、PK プロファイルを検討した。血漿中ミグルスタット濃度は LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 6 及び Module 2.6.5, Section 3B.1 に示す。

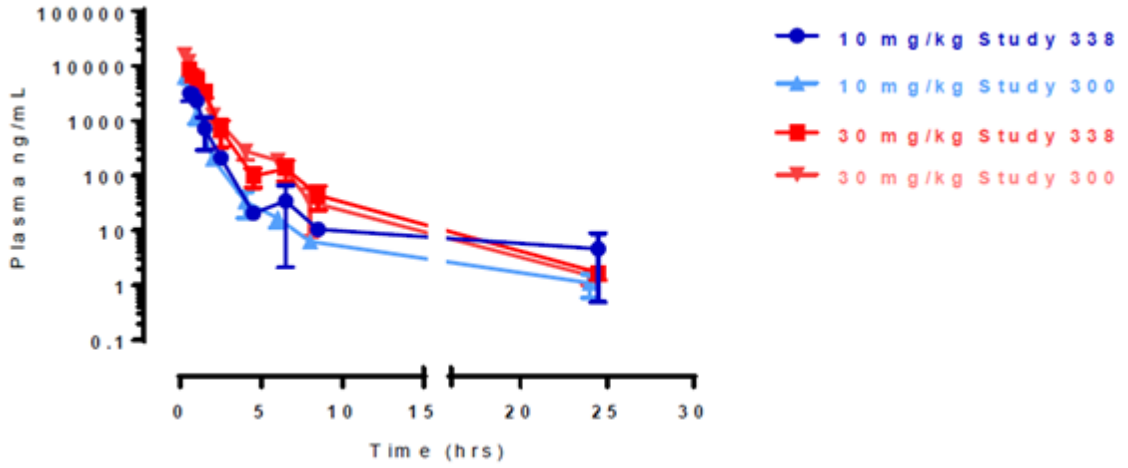
表 2.6.4 - 6　　338 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals per Group and Sex	Miglustat (mg/kg)	Cipaglucosidase Alfa (mg/kg)	Blood Collection Time Points (Post Final Dose)
1	4M	N/A	vehicle	1 day
2	4M	N/A	20	5 min, 1 and 6 h, 1 day
3	4M	N/A	20	15 min, 2 h, 8 h, 3 days
4	4M	N/A	20	30 min, 4 h, 7 days
5	4M	10	20	5 min, 1 h, 6 h, 1 day
6	4M	10	20	15 min, 2 h, 8 h, 3 days
7	4M	10	20	30 min, 4 h, 7 days
8	4M	30	20	5 min, 1 h, 6 h, 1 day
9	4M	30	20	15 min, 2 h, 8 h, 3 days
10	4M	30	20	30 min, 4 h, 7 days

Abbreviations: h = hours; M = male; min = minutes; N/A = not applicable

ミグルスタット塩酸塩単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与後の血漿中ミグルスタット濃度を図 2.6.4 - 6 に示す。300 試験と 388 試験でミグルスタットの AUC 及び $t_{1/2}$ は同程度であったことから、シパグルコシダーゼ アルファの併用はミグルスタットの PK に顕著な影響を及ぼさないことが示唆された。なお、両試験で採血時点の起点が異なっていたため C_{max} 及び t_{max} は比較しなかった。

図 2.6.4 - 6　　マウスにミグルスタット塩酸塩単独又はシパグルコシダーゼ アルファとの併用投与後の血漿中ミグルスタット濃度



Abbreviations: hrs = hours; SEM = standard error of the mean
Each point in the graph represents the mean ± SEM from 4 mice.
Source: Study Report No. RRB200-007, Figure 3

3.2.2　シパグルコシダーゼ アルファに対するミグルスタット塩酸塩併用の影響を評価したマウス及びラット薬物動態試験

報告書番号：RRB200-003、添付資料番号：4.2.2.2.3

本試験は以下に示す 3 つのパートより構成される。

- *Gaa* KO マウス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で 30 分かけて静脈内投与後の PK（302 試験）
- *Gaa* KO 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の PK（297 試験）
- Sprague Dawley 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で急速静脈内投与後の PK（304 試験）

3.2.2.1　マウス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で 30 分かけて静脈内投与後の薬物動態

302 試験では雄 *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 5、10 及び 20 mg/kg、又は対照物質として ALGLU を 20 mg/kg（臨床投与量）の用量で 30 分間かけて単回静脈内投与し、PK プロファイル及び疾患に関連する標的組織（大腿四頭筋、上腕三頭筋及び心臓）への分布を検討した。また、シパグルコシダーゼ アルファ投与（20 mg/kg）の 30 分前にミグルスタット塩酸塩を 10 mg/kg（遊離体換算）の用量で経口投与する群も設定した。血漿中及び組織中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 7 及び Module 2.6.5, Section 3B.2 に示す。

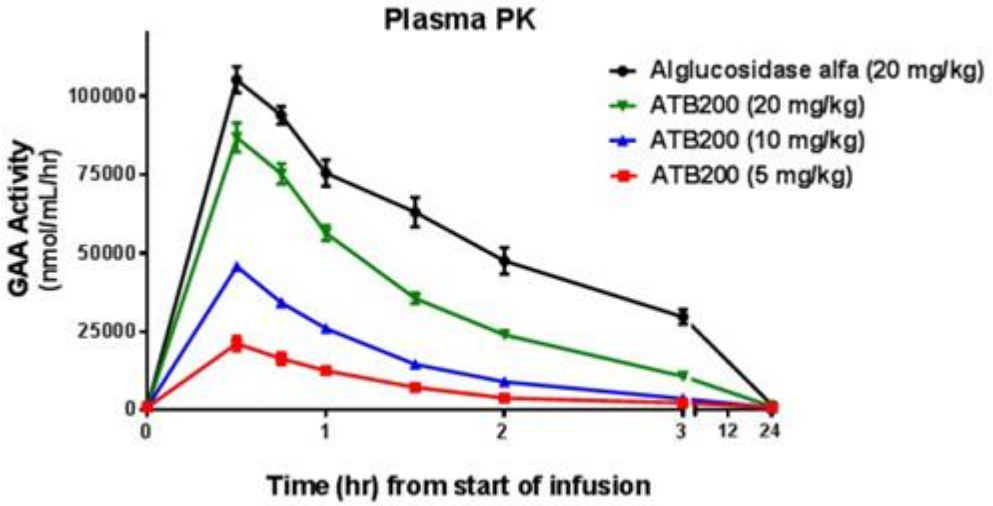
表 2.6.4 - 7　　302 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article	Dose (mg/kg)	Miglustat Oral Pretreatment (mg/kg)	Plasma Sampling Time Points	Tissue Collection Time Point
1	5M	alglucosidase alfa	20	N/A	30 and 45 min, 1, 1.5, 2, 3, and 24 hr	Quadriceps, triceps, and heart 24 hr
2	5M	cipaglucosidase alfa	5	N/A		
3	5M	cipaglucosidase alfa	10	N/A		
4	5M	cipaglucosidase alfa	20	N/A		
5	5M	cipaglucosidase alfa	20	10		
6	5M	untreated	N/A	N/A	After completion of other treatments, Group 6 controls were sacrificed, and plasma and tissues were collected for baseline control	

Abbreviations: hr = hours; M = male; min = minutes; N/A = not applicable

シパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を 30 分かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 7 に示す。血漿中 GAA 活性は 30 分（投与終了時点）で C_{max} を示し、その後に低下した。シパグルコシダーゼ アルファ投与時の C_{max} 及び AUC は用量依存的に増加し、$t_{1/2}$ は検討した用量間で概ね同程度であった。ALGLU（20 mg/kg）投与時と比較して、シパグルコシダーゼアルファ（20 mg/kg）投与時の血漿からの消失は速く（$t_{1/2}$ はそれぞれ 1.32 及び 0.79 時間）、AUC は約 50%低くなった。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。

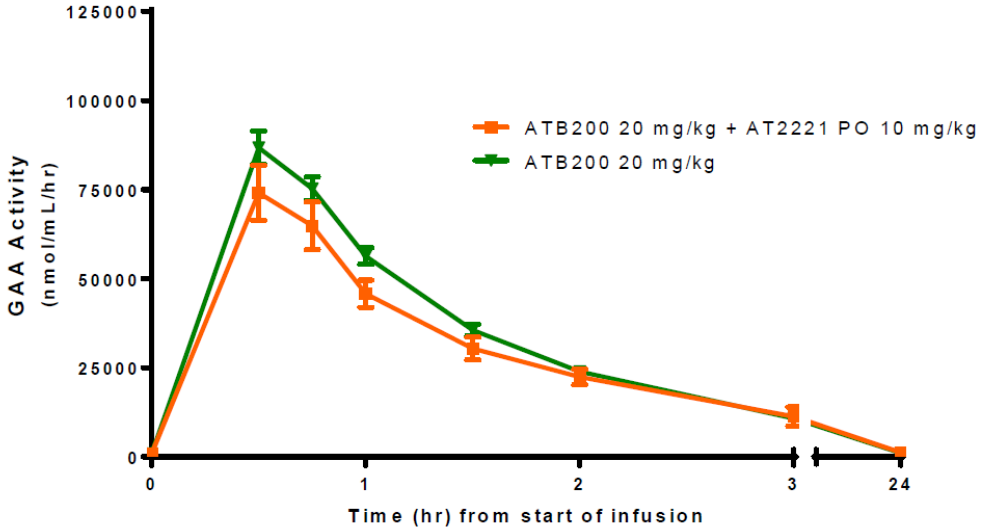
図 2.6.4 - 7　　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を 30 分かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: ATB200 = cipaglucosidase alfa; GAA = acid α-glucosidase; hr = hour; SEM = standard error of the mean
Graph represents mean ± SEM (error bar).
Source: Study Report No. RRB200-003, Figure 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塩酸塩との併用で 30 分かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 8 に示す。ミグルスタット塩酸塩との併用投与では、同用量のシパグルコシダーゼ アルファ単独投与と比較して血漿中 GAA 活性及びその PK パラメータに顕著な差は認められなかった。ミグルスタット塩酸塩併用の明らかな影響が認められなかった理由として、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とマウス血漿中でのミグルスタット（10 mg/kg）の $t_{1/2}$ が 0.4 時間（Module 2.6.5, Section 3B.1）と短かったことが考えられた。

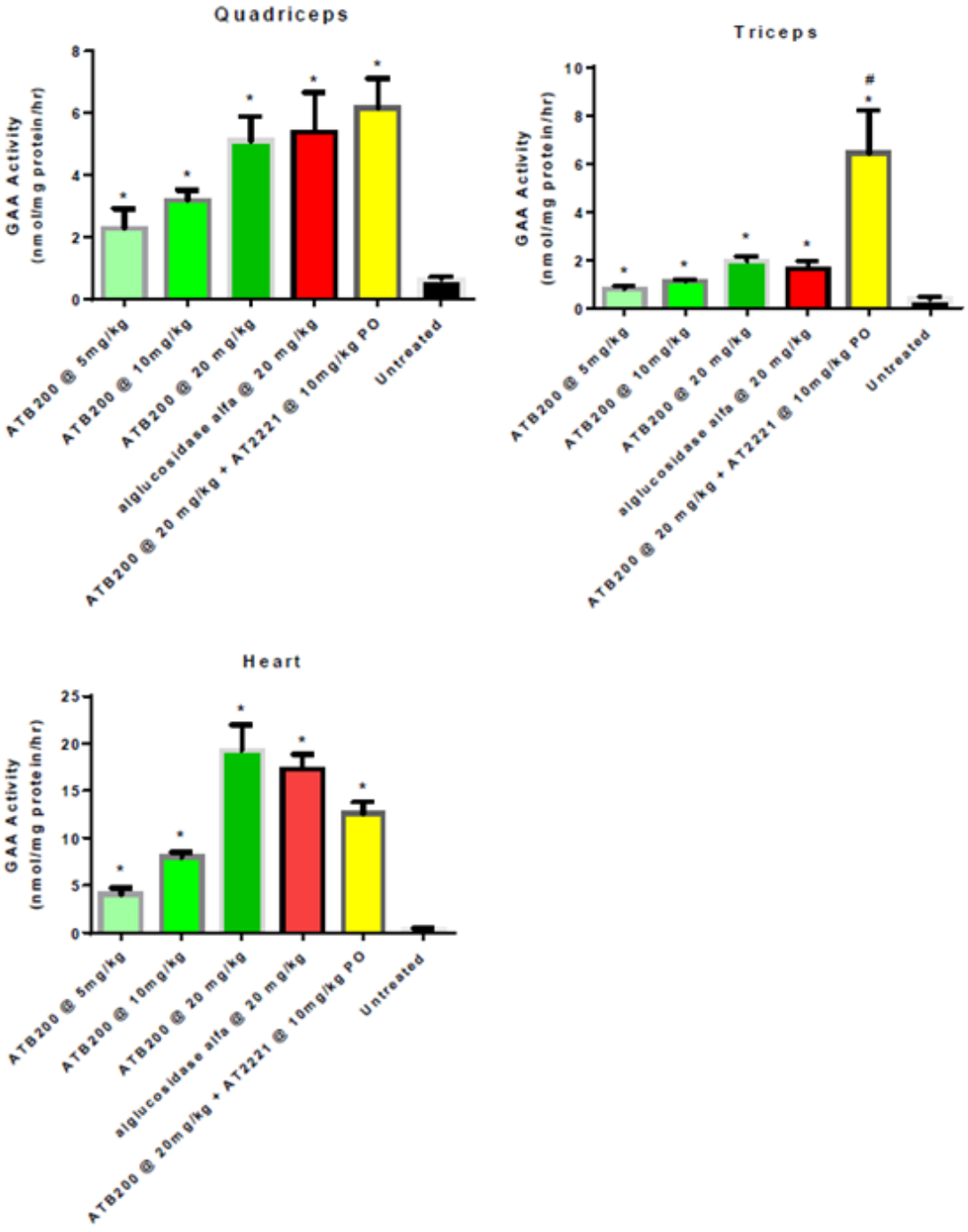
図 2.6.4 - 8　　マウスにシパグルコシダーゼアルファ単独又はミグルスタット塩酸塩との併用で 30 分かけて静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; hr = hour; SEM = standard error of the mean
Graph represents mean ± SEM (error bars).
Source: Study Report No. RRB200-003, Figure 2

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、若しくは ALGLU 単独を 30 分かけて静脈内投与後の組織中 GAA 活性を図 2.6.4 - 9 に示す。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群では、検討した組織（大腿四頭筋、上腕三頭筋及び心臓）で GAA 活性の用量依存的な増加が認められた。また、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（20 mg/kg）では、ALGLU 投与群（20 mg/kg）と比較して、血漿中 GAA 活性の $t_{1/2}$ は短く AUC は低値を示したものの、組織中 GAA 活性は同程度であった。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（20/10 mg/kg）によって、大腿四頭筋及び上腕三頭筋では GAA 活性が増加したが、心臓ではそのような傾向は認められなかった。

図 2.6.4 - 9　　マウス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、若しくは ALGLU 単独を 30 分かけて静脈内投与後の組織中 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; GAA = acid α-glucosidase
Statistical comparisons are made against the untreated control (black bar) and the alglucosidase alfa group (red bar) using 2-sided t-tests and the significance was indicated on top of each bar (*: $p < 0.05$ against untreated; #: $p < 0.05$ against alglucosidase alfa).
Source: Study Report No. RRB200-003, Figure 3

3.2.2.2　　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の薬物動態

297 試験では雄 *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 5、10 及び 20 mg/kg、又は対照物質として ALGLU を 20 mg/kg の用量で急速静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 8 及び Module 2.6.5, Section 3B.2 に示す。

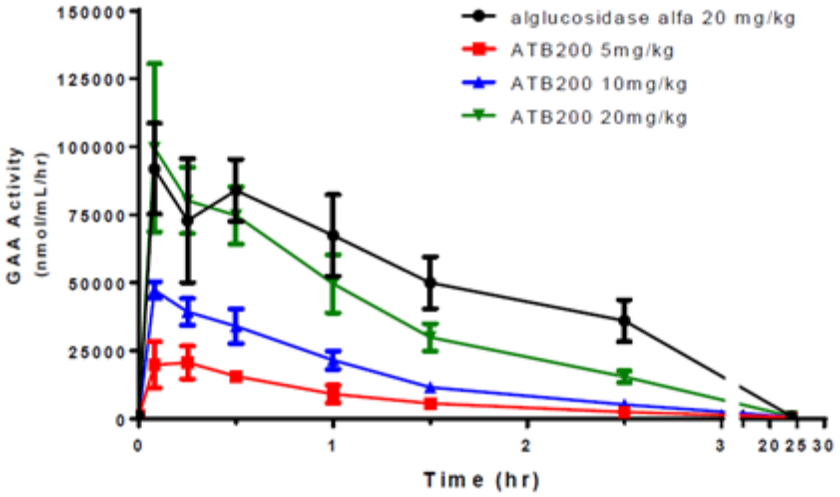
表 2.6.4 - 8　　297 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article	Dose (mg/kg)	Plasma Sampling Time Points
1	5M	alglucosidase alfa	20	Pre-dose, 5, 15, and 30 min, 1, 1.5, 2.5, and 24 hr
2	5M	cipaglucosidase alfa	5	
3	5M	cipaglucosidase alfa	10	
4	5M	cipaglucosidase alfa	20	
5	5M	N/A	N/A	After completion of other treatments, Group 5 controls were sacrificed, and plasma and tissues were collected for baseline control

Abbreviations hr = hours; M = male; min = minutes; N/A = not applicable

シパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 10 に示す。302 試験と同様に、シパグルコシダーゼ アルファ投与時の C_{max} 及び AUC は用量依存的に増加し、$t_{1/2}$ は検討した用量間で概ね同程度であった。また、ALGLU（20 mg/kg）投与時と比較して、シパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）投与時の血漿からの消失は速かったため（$t_{1/2}$ はそれぞれ 1.42 及び 0.79 時間）、AUC は約 50%低くなった。

図 2.6.4 - 10　　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: ATB200 = cipaglucosidase alfa; hr = hour; SEM = standard error of the mean
Graph represents mean ± SEM (error bar).
Source: Study Report No. RRB200-003, Figure 4

3.2.2.3　　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で急速静脈内投与後の薬物動態

304 試験では雄 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファを 5、10 及び 20 mg/kg の用量で急速静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。また、シパグルコシダーゼ アルファ投与（20 mg/kg）の 30 分前にミグルスタット塩酸塩を 10 mg/kg（遊離体換算）の用量で経口投与する群も設定した。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 9 及び Module 2.6.5, Section 3B.2 に示す。

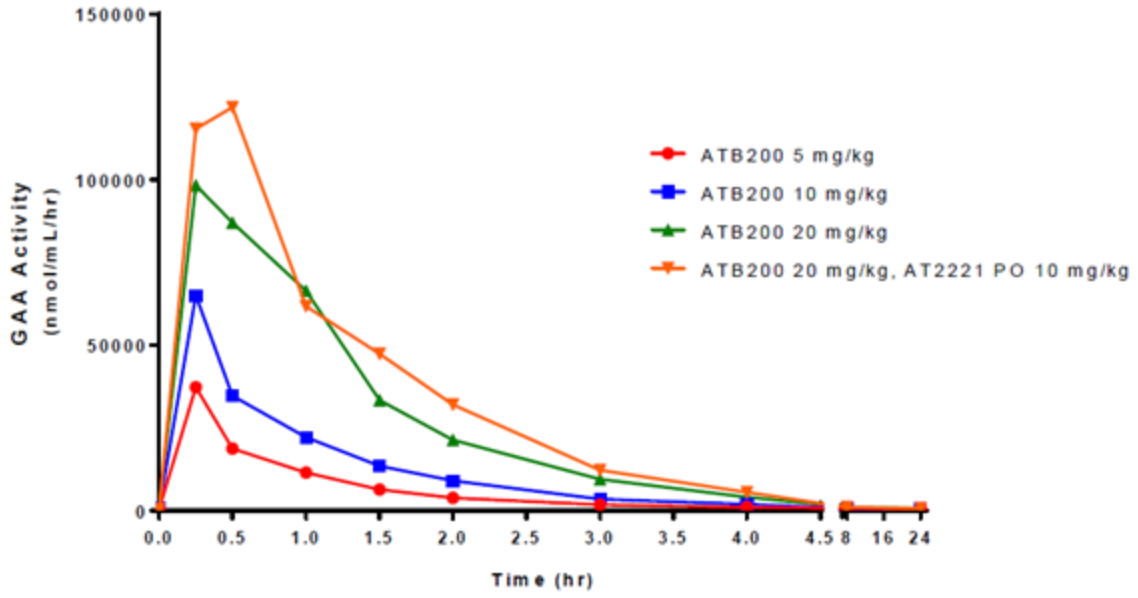
表 2.6.4 - 9　　304 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article	Dose (mg/kg)	Miglustat Oral Pretreatment (mg/kg)	Plasma Sampling Time Points
1	3M	Vehicle[a]	N/A	N/A	End of the Study
2	4M	cipaglucosidase alfa	5	N/A	Pre-dose, 15, and 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8, and 24 hr
3	4M	cipaglucosidase alfa	10	N/A	
4	4M	cipaglucosidase alfa	20	N/A	
5	4M	cipaglucosidase alfa	20	10	

Abbreviations: hr = hours; M = male, min = minutes; N/A = Not applicable
a　Vehicle: 50 mmol/L sodium phosphate, 100 mmol/L sodium chloride, 2% (w/v) mannitol, 0.02% (v/v) polyorbate 80, pH 6.0

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で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 11 に示す。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与時の C_{max} 及び AUC は用量依存的に増加し、$t_{1/2}$ は検討した用量間で概ね同程度であった。ミグルスタット塩酸塩との併用投与では、同用量のシパグルコシダーゼ アルファ単独投与と比較して $t_{1/2}$ が延長し（それぞれ 0.87 及び 0.77 時間）、C_{max} 及び AUC が約 20%増加した。

図 2.6.4 - 11　　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で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; GAA = acid α-glucosidase; hr = hour
Source: Study Report No. RRB200-003, Figure 5

3.2.3　シパグルコシダーゼ アルファに対するミグルスタット塩酸塩併用の影響を評価したマウス薬物動態試験

報告書番号：RRB200-024、添付資料番号：4.2.2.2.4

雄 *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファを 5、10、20 及び 100 mg/kg、又は対照物質として ALGLU を 20 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。また、シパグルコシダーゼ アルファ投与の 30 分前にミグルスタット塩酸塩を 10 及び 30 mg/kg（遊離体換算）の用量で経口投与する群も設定した。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 10 及び Module 2.6.5, Section 3B.3 に示す。

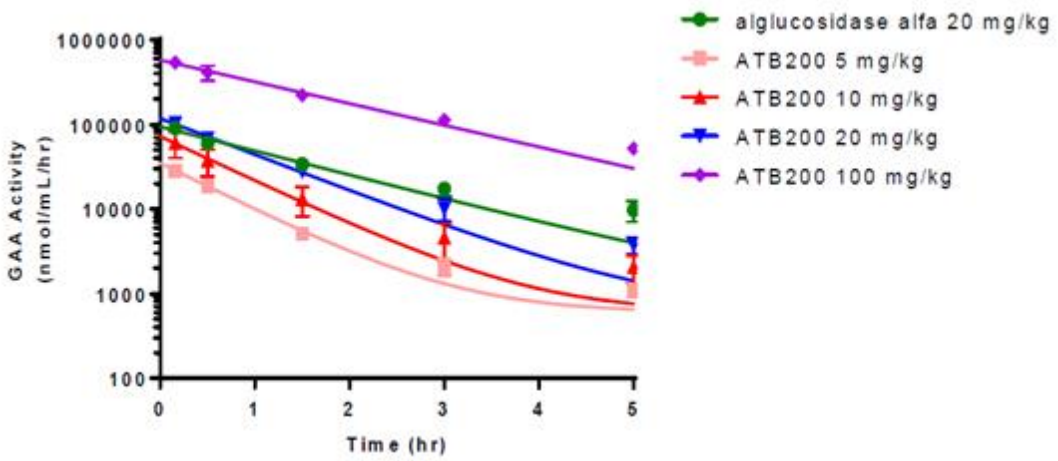
表 2.6.4 - 10　　報告書番号 RRB200-024 の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article (mg/kg)	Miglustat (mg/kg)	Plasma Collection Time Points
1	5M	vehicle[a]	N/A	Immediately after IV administration
2	5M	alglucosidase alfa (20)	N/A	10 and 30 min, 1.5, 3, and 5 hr post IV administration
3	5M	cipaglucosidase alfa (5)	N/A	
4	5M	cipaglucosidase alfa (10)	N/A	
5	5M	cipaglucosidase alfa (20)	N/A	
6	5M	cipaglucosidase alfa (100)	N/A	
7	5M	cipaglucosidase alfa (20) + miglustat (10) (Co-formulation; exploratory group)[b]		
8	5M	cipaglucosidase alfa (5)	10	
9	5M	cipaglucosidase alfa (10)	10	
10	5M	cipaglucosidase alfa (20)	10	
11	5M	cipaglucosidase alfa (5)	30	
12	5M	cipaglucosidase alfa (10)	30	
13	5M	cipaglucosidase alfa (20)	30	

Abbreviations: hr = hours; IV = intravenous; M = male; min = minutes; N/A = not applicable
a　Formulation buffer: 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride, final pH 6.0
b　No discussion in this document

シパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 12 に示す。RRB200-003 試験（3.2.2 項）と同様に、ALGLU 投与時と比較してシパグルコシダーゼ アルファ単独投与時の $t_{1/2}$ は短かった。シパグルコシダーゼ アルファを 100 mg/kg で単独投与時の $t_{1/2}$ は 1.1 時間で、より低用量での値と比べて長く、消失過程での飽和の可能性が示唆された。また、5～20 mg/kg の用量範囲で 0 時間から投与 5 時間後までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}5h}$）は概して用量比例的に増加した一方、20～100 mg/kg では用量比を上回る増加を示し、これは $t_{1/2}$ の延長に因るものと考えられた。

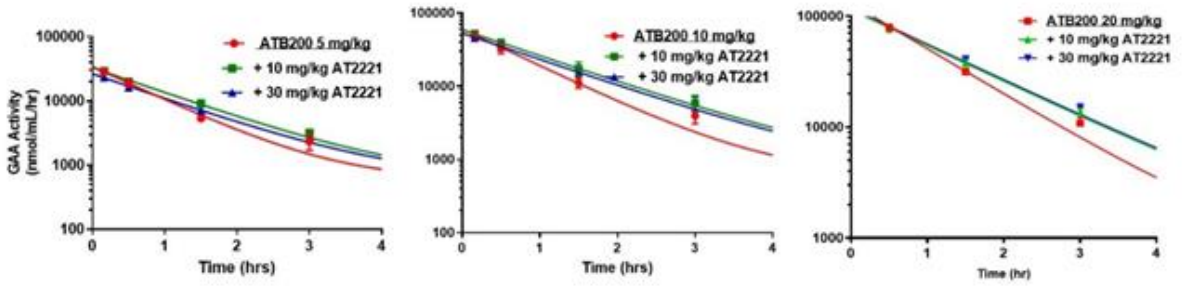
図 2.6.4 - 12　　マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又は ALGLU を急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: ATB200 = cipaglucosidase alfa; hr = hour; SD = standard deviation
Each time point represents the mean ± SD of 5 mice/group.
Source: Study Report No. RRB200-024, Figure 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塩酸塩との併用で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 13 に示す。ミグルスタット塩酸塩との併用投与によって、$t_{1/2}$ の延長及び曝露量の増加が認められた。ミグルスタット塩酸塩の影響は、その投与量（10 及び 30 mg/kg）にかかわらず同程度であった一方、シパグルコシダーゼ アルファ 20 mg/kg 投与群（$t_{1/2}$ が約 21%延長）と比較して 5 及び 10 mg/kg 投与群でより顕著であった（$t_{1/2}$ がそれぞれ約 47%及び 37%延長）。

図 2.6.4 - 13　　マウス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で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat. ATB200 = cipaglucosidase alfa; hrs = hours; SD = standard deviation
Each point represents the mean ± SD of 5 mice/group.
Source: Revised from Study Report No. RRB200-024, Figure 2

3.2.4　室温で 4 時間静置し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塩酸塩との併用で急速静脈内投与後のマウス薬物動態試験

報告書番号：RRB200-056、添付資料番号：4.2.1.1.16

本試験では臨床での投与条件に模して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で *Gaa* KO マウスに静脈内投与し、PK 及び薬効を評価した。本試験は以下に示す 2 つのパートより構成される。本項では 413 試験のみ示し、408 試験は Module 2.6.2, Section 2.2.2.8 に示す。

- *Gaa* KO マウス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で静脈内投与後の PK（413 試験）
- *Gaa* KO マウス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で静脈内投与後の薬効（408 試験）

ポンペ病患者に対する臨床での点滴静脈内投与を模すため、シパグルコシダーゼ アルファ投与液を室温で 4 時間（臨床で予定されている投与時間）静置した後、雄 *Gaa* KO マウスに 20 mg/kg の用量で急速静脈内投与し、PK プロファイルを検討した。また、シパグルコシダーゼ アルファ投与（20 mg/kg）の 30 分前にミグルスタット塩酸塩を 10 mg/kg（遊離体換算）の用量で経口投与する群も設定した。*Gaa* KO マウスではベースライン時に GAA 活性が認められないため、対照として無処置群は設定しなかった。血漿中 GAA 活性は酵素活性アッセイ（Khanna et al. 2012）にて測定した。試験デザイン及び PK パラメータの詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 11 及び Module 2.6.5, Section 3B.4 に示す。

表 2.6.4 - 11　　413 試験の試験デザイン

Dose Group	No. of Animals and Sex	Test Article (mg/kg)	Plasma Collection Time Points
1	7M	cipaglucosidase alfa (20)[a]	20 min and 1, 3 and 5 hr post-injections
2	7M	cipaglucosidase alfa (20)[a] + miglustat (10)[b]	

Abbreviations: hr = hours; IV = intravenous; M = male; min = minutes

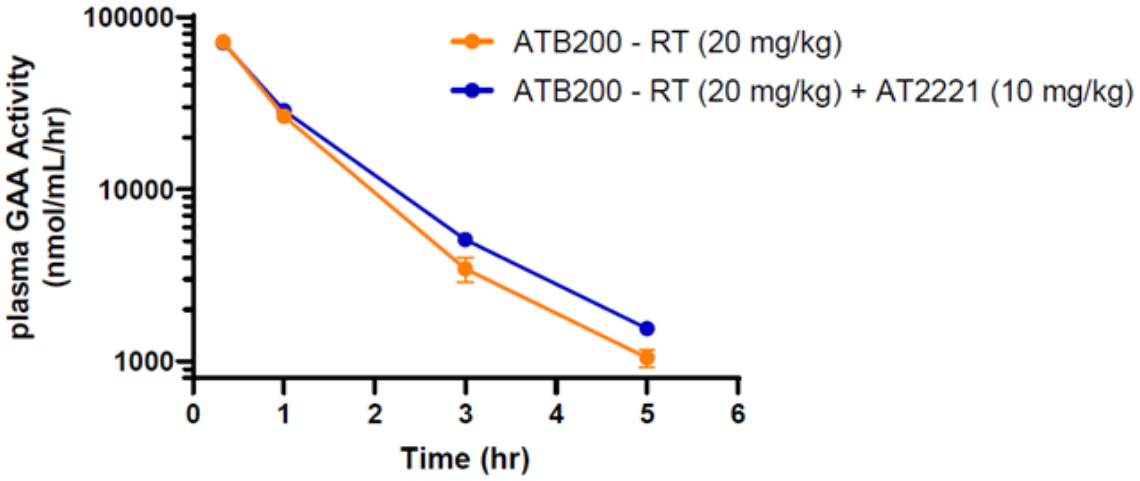
a　Enzyme dosing solutions were prepared from reconstituted vials of drug product, incubated for 4 hours at room temperature, and stored at -80°C until the day of administration. Dosing solutions were then thawed on ice and administered.

b　Miglustat was administered orally, 30 minutes prior to IV of cipaglucosidase alfa.

室温で 4 時間静置し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で急速静脈内投与後の血漿中 GAA 活性を図 2.6.4 - 14 に示す。臨床での投与を模した条件下において、ミグルスタットとの併用投与では、同用量のシパグルコシダーゼ アルファ単独投与と比較して $t_{1/2}$ が延長し（それぞれ 0.5 及び 0.4 時間）、AUC が増加した（それぞれ 74 及び 67 x10^3 nmol 4-MU/mL/hr· hr）。この知見は、ミグルスタット併用下で血中の GAA 活性がより良好に持続するという in vitro 試験結果と一致するものである（Module 2.6.2, Section 2.2.1.2）。また、薬理試験（408 試験）でも PK と同様の傾向が認められ、ミグルスタットとの併用投与によって、4 時間

室温静置したシパグルコシダーゼの静脈内投与でシパグルコシダーゼ アルファの有効性が維持されることが示唆された。

図 2.6.4 - 14　　マウスに室温で 4 時間静置し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塩酸塩との併用で急速静脈内投与後の血漿 GAA 活性



Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; GAA = acid α-glucosidase; hr = hour; SEM = standard error of the mean
Data represent mean ± SEM, n=7 animals/group.
Source: Study Report No. RRB200-056, Figure 1

3.2.5　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で急速静脈内投与後のマウス薬物動態及び薬理試験

報告書番号：RRB200-066、添付資料番号：4.2.1.1.1

本試験は以下に示す 3 つのパートより構成される。

- WT マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後の PK（169 試験）
- *Gaa* KO マウスにシパグルコシダーゼ アルファ又はミグルスタット塩酸塩を単独、若しくはミグルスタット塩酸塩との併用投与後の PK 及び薬効（338 試験）
- *Gaa* KO マウス及び WT マウスにシパグルコシダーゼ アルファを隔週で急速静脈内投与後の PK（359 試験）

169 試験では雄 WT マウスにミグルスタット塩酸塩を 100 mg/kg（遊離体換算）の用量で経口投与した。

338 試験では雄 *Gaa* KO マウスにミグルスタット塩酸塩（10 mg/kg、遊離体換算）又はシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）を単独、若しくはシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（20/10 mg/kg）を併用投与した。

359 試験では雄 *Gaa* KO マウス及び雄 WT マウスにシパグルコシダーゼ アルファ（20 mg/kg）を隔週で急速静脈内投与した。

試験デザイン及び各時点の濃度の詳細はそれぞれ表 2.6.4 - 12 及び Module 2.6.5, Section 3B.5 に示す。

表 2.6.4 - 12　　報告書番号 RRB200-066 の試験デザイン

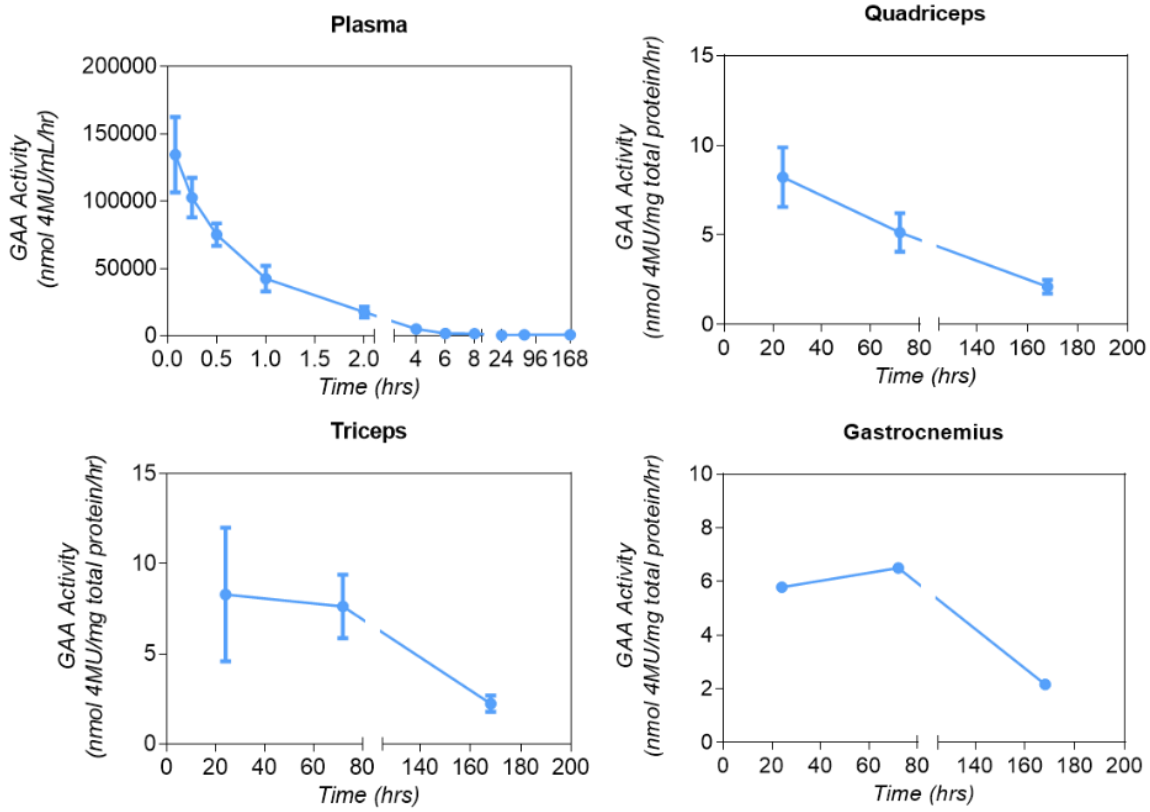
	Study 169	**Study 338**	**Study 359**
Species	*Mus musculus*	*Mus musculus*	*Mus musculus*
Strain	Wild-type C57BL/6	*Gaa*-KO mixed B6/129	Wild-type and *Gaa*-KO 129/SvEv
Sex	Male	Male	Male
Age	8 weeks	14-16 weeks	15-19 weeks
N	48	40	8 wild-type 56 *Gaa*-KO
Body weight	20-30 g	30-35 g	~30 g
Supplier	Taconic Farms (Hudson, NY)	Amicus Therapeutics	Taconic Farms (Hudson, NY)

Abbreviations: *Gaa* = gene encoding acid mouse α-glucosidase; KO = knock-out; N = number
Source: Study Report No. RRB200-066

3.2.5.1　　シパグルコシダーゼアルファ及びミグルスタットの半減期

359 試験では血漿、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋でのシパグルコシダーゼ アルファの $t_{1/2}$ を評価するため、GAA 酵素活性アッセイを用いてシパグルコシダーゼ アルファ濃度を定量した（図 2.6.4 - 15 及び表 2.6.4 - 13）。血漿中での $t_{1/2}$ は 0.6 時間である一方、筋肉中での $t_{1/2}$ は 58.1～87.3 時間と長かった。

図 2.6.4 - 15　　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の GAA 活性



Abbreviations: 4MU = 4-methylumbelliferone; GAA = acid α-glucosidase; hrs = hours
Note: Pharmacokinetics of cipaglucosidase alfa in plasma and tissues of treated mice. Enzymatic activity was used as a readout for cipaglucosidase alfa levels over time. Plasma was collected at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 72 and 168 hours, and tissues were harvested at 24, 72, and 168 hours post 20 mg/kg cipaglucosidase alfa administration. Datapoints were fitted to the One Phase Decay equation on Prism to estimate the half-life of cipaglucosidase alfa.
Source: Study Report No. RRB200-066, Figure 2

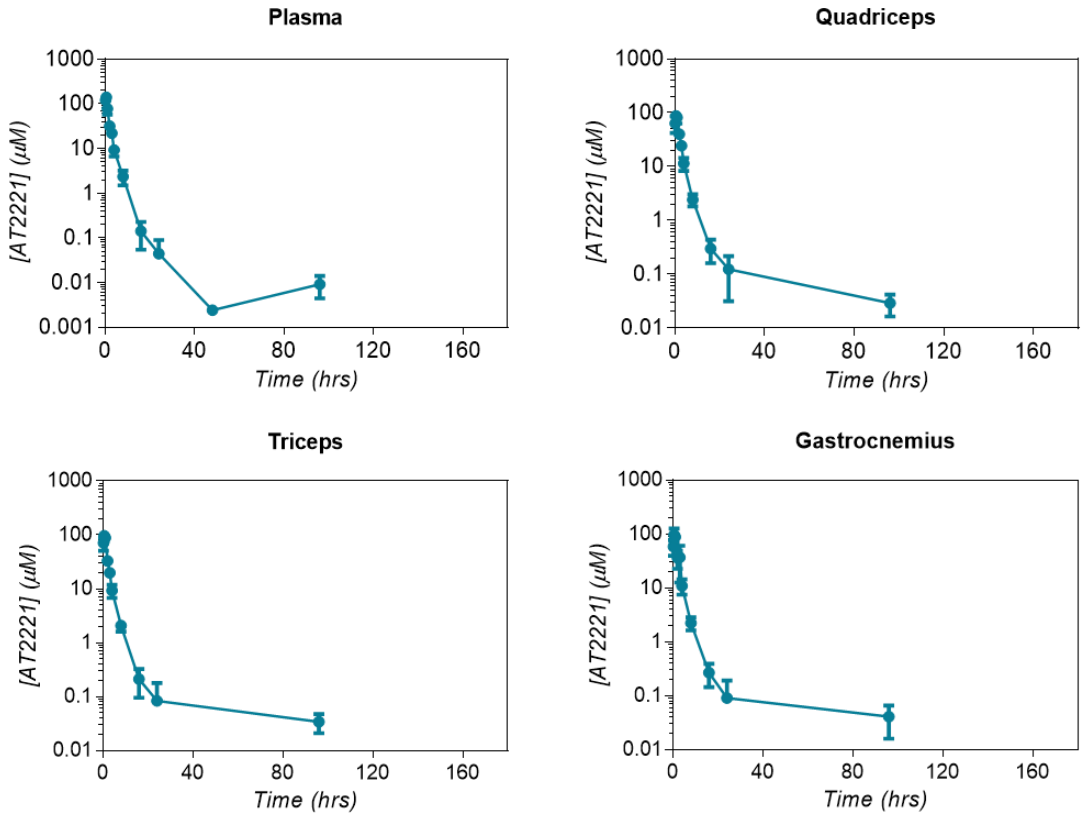
表 2.6.4 - 13　　シパグルコシダーゼ アルファの $t_{1/2}$

Tissue	**Cipaglucosidase Alfa $t_{1/2}$**	
	Cipaglucosidase Alfa $t_{1/2}$ (hrs)	**Cipaglucosidase Alfa 95% CI (hrs)**
Plasma	0.6	0.5 to 0.7
Quadriceps	58.1	39.1 to 90.0
Triceps	87.3	42.3 to 272.2
Gastrocnemius	68.8	19.9 to 5288.0

Abbreviations: CI = confidence interval; hrs = hours; $t_{1/2}$ = elimination half-life
Source: Study Report No. RRB200-066, Table 4

169 試験では血漿、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋でのミグルスタットの $t_{1/2}$ を評価するため、LC-MS/MS 法を用いてミグルスタット濃度を定量した（図 2.6.4 - 16 及び表 2.6.4 - 14）。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 時間であった。

図 2.6.4 - 16　　マウスにミグルスタット塩酸塩を経口投与後のミグルスタット濃度



Abbreviations: AT2221 = miglustat; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; hrs = hours
Note: Pharmacokinetics in plasma and tissues of mice treated with 100 mg/kg miglustat. LC-MS/MS was used to measure miglustat levels over time. Tissues were harvested at 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 16, 24 and 96 hours post-miglustat administration. Datapoints were fitted to the One Phase Decay equation on Prism to estimate the half-life of miglustat.
Source: Study Report No. RRB200-066, Figure 1

表 2.6.4 - 14　　ミグルスタットの $t_{1/2}$

Tissue	**Miglustat $t_{1/2}$**	
	Miglustat $t_{1/2}$ (hrs)	**Miglustat 95% CI (hrs)**
Plasma	1.0	0.8 to 1.0
Quadriceps	1.8	1.4 to 2.6
Triceps	1.5	1.1 to 2.1
Gastrocnemius	1.9	1.3 to 3.0

Abbreviations: CI = confidence interval; hrs = hours; $t_{1/2}$ = elimination half-life
Source: Study Report No. RRB200-066, Table 3

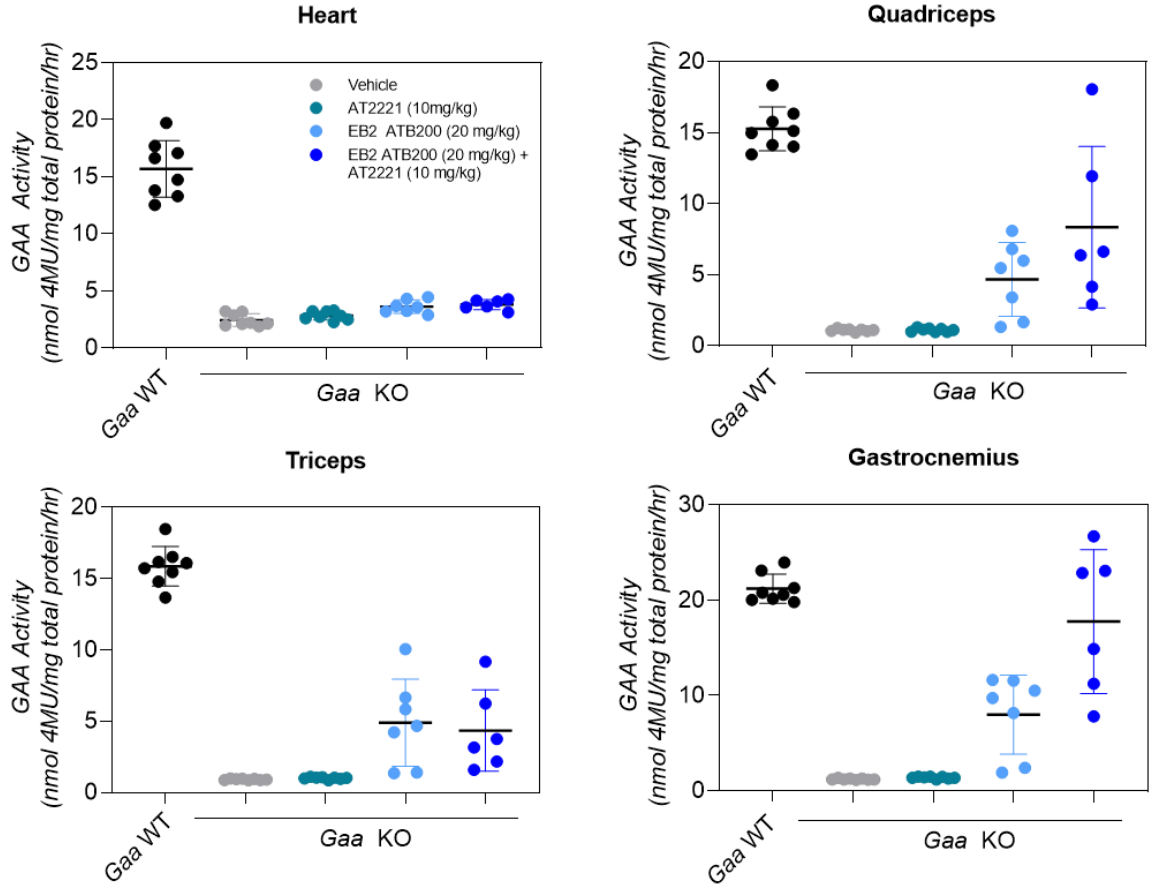
以上より、血漿中での $t_{1/2}$ はシパグルコシダーゼ アルファとミグルスタットで同程度であったにもかかわらず、筋肉中での $t_{1/2}$ はミグルスタットと比較してシパグルコシダーゼ アルファの方が顕著に長かった。したがって、シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットを併用投与

したとき、ミグルスタットの消失後もシパグルコシダーゼ アルファは筋肉中に存在して活性を有すると考えられた。

3.2.5.2　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で急速静脈内投与後の GAA 活性及びグリコーゲン減少

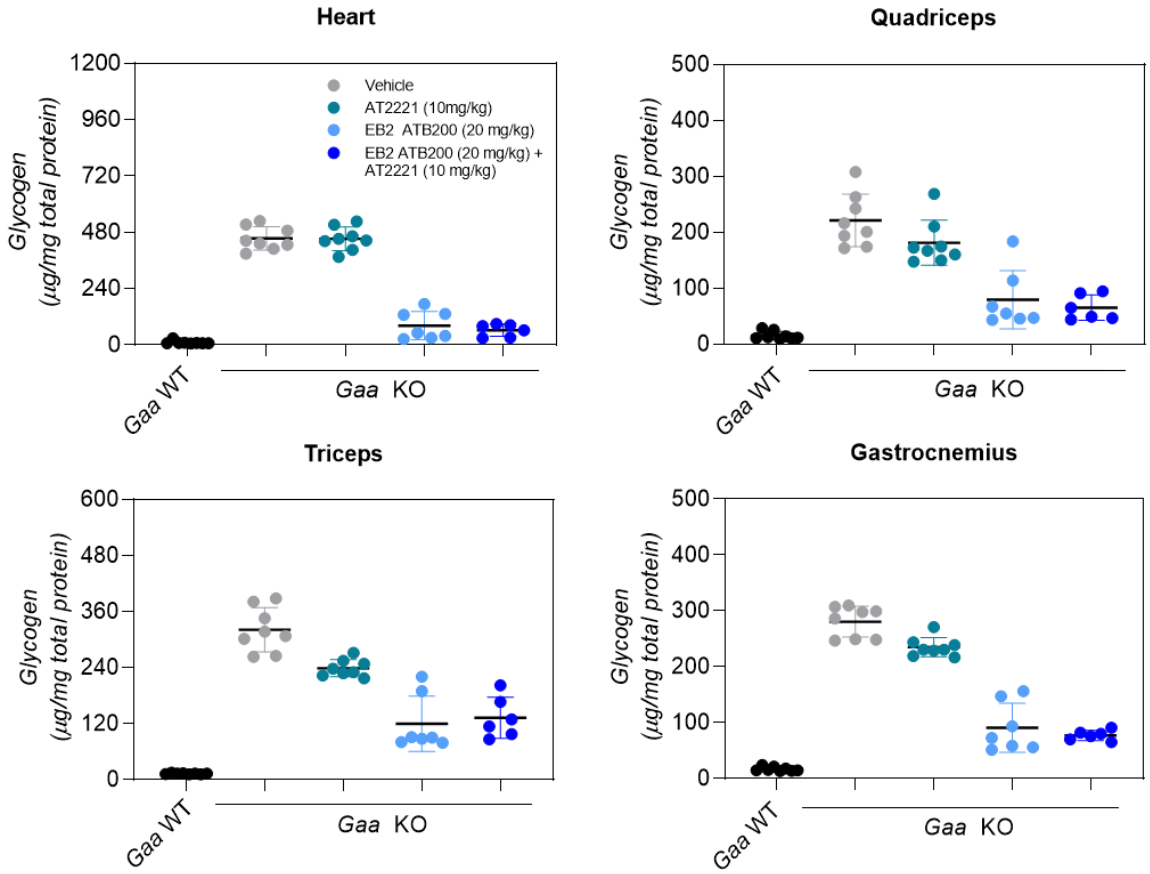
338 試験では心臓、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋での酵素活性及び蓄積グリコーゲンの減少を評価するため、GAA 活性及び組織中グリコーゲンを定量した。ミグルスタット塩酸塩との併用投与後の GAA 活性をシパグルコシダーゼ アルファ又はミグルスタット塩酸塩単独投与時と比較したとき、心臓及び上腕三頭筋では同程度であった一方、大腿四頭筋及び腓腹筋では増加する傾向が認められた（図 2.6.4 - 17）。また、ミグルスタット塩酸塩との併用投与後の組織中グリコーゲン量をシパグルコシダーゼ アルファ単独投与時と比較したとき、いずれの組織でも同程度であった（図 2.6.4 - 18）。

図 2.6.4 - 17　　心臓、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋での GAA 活性



Abbreviations: 4MU = 4-methylumbelliferone; AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; IV = intravenous; KO = knock-out; WT = wild type
Note: GAA activity in the tissues of *Gaa*-KO mice treated with vehicle, miglustat alone at 10 mg/kg, cipaglucosidase alfa alone at 20 mg/kg, or miglustat + cipaglucosidase alfa at 10 mg/kg and 20 mg/kg respectively. GAA activity in untreated WT animals is also shown. Co-administration with miglustat at a 10 mg/kg dose 30 minutes prior to IV infusion of cipaglucosidase alfa does not lead to inhibition of GAA activity in the heart and triceps and leads to increased activity in the quadriceps and gastrocnemius.
Source: Study Report No. RRB200-066, Figure 3

図 2.6.4 - 18　　心臓、上腕三頭筋、大腿四頭筋及び腓腹筋でのグリコーゲン量



Abbreviations: ATB200 = cipaglucosidase alfa; AT2221 = miglustat; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase; GAA = acid α-glucosidase; hrs = hours; KO = knock-out; WT = wild type
Note: Glycogen levels in quadriceps of *Gaa*-KO mice treated with a vehicle, miglustat alone at 10 mg/kg, cipaglucosidase alfa alone at 20 mg/kg, or miglustat + cipaglucosidase alfa at 10 mg/kg and 20 mg/kg respectively. Glycogen levels in untreated WT animals are also shown. Glycogen reduction achieved in the tissues of animals treated with cipaglucosidase alfa alone is comparable to those to which cipaglucosidase alfa was co-administered with miglustat.
Source: Study Report No. RRB200-066, Figure 4

3.2.6　　サル 13 週間反復投与毒性試験

報告書番号：[redacted].423.10、添付資料番号：4.2.3.2.3

サル 13 週間反復投与毒性試験の一環として、雌雄カニクイザルにシパグルコシダーゼ アルファ（100 mg/kg）又はミグルスタット（175 mg/kg）を単独、若しくはシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（50/25、100/175 mg/kg）を併用して隔週で 7 回反復静脈内投与し、Day 1 及び Day 85 の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は酵素活性アッセイ及び LC-MS/MS 法にて測定した。一方、血漿中ミグルスタット濃度は LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 3.2.1 及び Module 2.6.5, Section 4B.1 に示す。シパグルコシダーゼ アルファ濃度はいずれの分析法においても雌雄で同程度、ミグルスタット濃度も雌雄で同程度であったため、雌雄併合値の TK パラメータで考察した。また、MSD アッセイを用いて Day 1、Day 85 及び Day 99 の血漿中 ADA を測定した。

LC-MS/MS 法にて測定した血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度及び TK パラメータは、いずれの日でも 2 つの signature peptide で類似していた。しかしながら、酵素活性アッセイを用いて算出された TK パラメータ（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は比較的低く、この差の原因として、LC-MS/MS 法では活性を有しないタンパク質も測定したためと考えられた。隔週で反復投与しても蓄積性はほとんど認められなかった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群では、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群と比較してクリアランスが低下し、AUC が約 2 倍に増加した。

隔週で反復投与してもミグルスタットの曝露量に蓄積性はほとんど認められなかった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群（100/175 mg/kg）とミグルスタット単独投与群（175 mg/kg）の曝露量は同程度であり、併用投与はミグルスタットの曝露量に影響を及ぼさないことが示された。

Day 85 及び Day 99 では、シパグルコシダーゼ アルファ投与群の全例で ADA 陽性であった。また、投与量の増加に伴い力価が上昇する傾向は認められなかった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群（50/25 mg/kg）では、Day 85 及び Day 99 ともに 8 匹中 5 匹で中和抗体陽性であった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群（100/175 mg/kg）では、Day 85 及び Day 99 でそれぞれ 8 匹中 2 匹及び 8 匹中 4 匹が中和抗体陽性であった。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（100 mg/kg）では、Day 85 及び Day 99 でそれぞれ 8 匹中 2 匹及び 8 匹中 3 匹が中和抗体陽性であった。曝露量に顕著な個体間差は認められず、反復投与による変動はみられなかったため、ADA 及び中和抗体による TK の顕著な変動はないと考えられた。

3.2.7　ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

報告書番号：8371927、添付資料番号：4.2.3.5.1.1

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の一環として、雌雄 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg）又はミグルスタット（60 mg/kg）を単独、若しくはシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（400/60 mg/kg）を併用で交配前から剖検前まで（雄）又は妊娠初期まで（雌）隔日投与し、Day 1、妊娠 7 日（雌）及び Day 28（雄）の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット濃度はいずれも LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 6.1.1 及び Module 2.6.5, Section 4B.2 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットともに曝露量の性差は 2 倍未満であり、反復投与後の蓄積性は認められなかった。ミグルスタットとの併用投与によって、シパグルコシダーゼ アルファの曝露量に影響はみられなかった一方、ミグルスタットの曝露量は雌雄ともに約 3～5 倍に増加した。

3.2.8　　ラット胚・胎児発生用量設定試験

報告書番号：8371929、添付資料番号：4.2.3.5.2.1

ラット胚・胎児発生用量設定試験の一環として、妊娠 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（30、70、150、300 及び 600 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（150/12.5 mg/kg）を併用で器官形成期（妊娠 6～18 日）に隔日投与し、妊娠 18 日の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は LC-MS/MS 法にて測定した。ただし、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（300 及び 600 mg/kg）での血漿中濃度は適格な LC-MS/MS 法にて T09（アミノ酸配列：TTPTFFPK）のみ測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 6.1.2.1 及び Module 2.6.5, Section 4B.3 に示す。

検討した用量範囲で C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ ともに増加率は用量比を上回った。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（150 mg/kg）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（150/12.5 mg/kg）の曝露量はわずかに低く、その差は 2 倍未満であった。

3.2.9　　ラット胚・胎児発生に関する試験

報告書番号：8371930、添付資料番号：4.2.3.5.2.2

ラット胚・胎児発生に関する試験の一環として、妊娠 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファ（70、150 及び 400 mg/kg）又はミグルスタット（60 mg/kg）を単独、若しくはシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（400/60 mg/kg）を併用で器官形成期（妊娠 6～18 日）に隔日投与し、妊娠 6 及び 18 日の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット濃度はいずれも LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 6.1.2.2 及び Module 2.6.5, Section 4B.4 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの曝露量は用量依存的に増加した。妊娠 18 日の $AUC_{0\text{-}24h}$ の増加率が用量比を上回ったことを除き、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の増加率は用量比例的であった。また、反復投与後の蓄積性は認められなかった。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（400 mg/kg）と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（400/60 mg/kg）で曝露量に顕著な差は認められなかった

一方、ミグルスタットの曝露量でも反復投与後の蓄積性は認められなかった。ミグルスタット単独投与群（60 mg/kg）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（400/60 mg/kg）の曝露量は高く、その差は 2～4 倍であった。

3.2.10　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

報告書番号：8371932、添付資料番号：4.2.3.5.3.1

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験の一環として、妊娠 Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（400/60 mg/kg）を併用で授

乳 1 日から授乳 13 日まで隔日投与し、授乳 13 日の 1 時点（シパグルコシダーゼ アルファ投与 2.5 時間後／ミグルスタット投与 3 時間後）の TK を検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット濃度はいずれも LC-MS/MS 法にて測定した。また、乳汁中シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット濃度はいずれも適格な LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び濃度の詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 6.1.3 及び Module 2.6.5, Section 4B.5 に示す。

無処置群ではシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットともに血漿及び乳汁中濃度は定量下限未満であった。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は、乳汁中濃度の約 26～27 倍であった。また、乳汁中ミグルスタット濃度は血漿中濃度の約 1.7 倍であったことから、乳汁中への移行が示唆された。

3.2.11　ウサギ胚・胎児発生用量設定試験

報告書番号：8371928、添付資料番号：4.2.3.5.2.3

ウサギ胚・胎児発生用量設定試験の一環として、妊娠 NZW ウサギにシパグルコシダーゼ アルファ（30、70 及び 150 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（150/25 mg/kg）を併用で器官形成期（妊娠 7～19 日）に隔日投与し、妊娠 19 日の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ濃度は LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 6.1.2.3 及び Module 2.6.5, Section 4B.6 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの曝露量は用量依存的に増加した。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（150/25 mg/kg）とシパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（150 mg/kg）の曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は同程度であった。

3.2.12　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

報告書番号：8371931、添付資料番号：4.2.3.5.2.4

ウサギ胚・胎児発生に関する試験の一環として、妊娠 NZW ウサギにシパグルコシダーゼ アルファ（30、70 及び 175 mg/kg）又はミグルスタット（25 mg/kg）を単独、若しくはシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット（175/25 mg/kg）を併用で器官形成期（妊娠 7～19 日）に隔日投与し、妊娠 7 及び 19 日の TK プロファイルを検討した。血漿中シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット濃度はいずれも LC-MS/MS 法にて測定した。試験デザイン及び TK パラメータの詳細はそれぞれ Module 2.6.6, Section 6.1.2.4 及び Module 2.6.5, Section 4B.7 に示す。

シパグルコシダーゼ アルファの曝露量は用量依存的に増加した。また、反復投与後の蓄積性は認められなかった。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（175 mg/kg）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（175/25 mg/kg）の曝露量は高かったが、その差は 2 倍未満であった。

ミグルスタットの曝露量でも反復投与後の蓄積性は認められなかった。ミグルスタット単独投与群（25 mg/kg）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（175/25 mg/kg）の曝露量は高かったが、その差は 2 倍未満であった。

4　分布

4.1　シパグルコシダーゼ アルファ

マウスにシパグルコシダーゼ アルファ投与時の組織分布を検討した結果は 3.2.5.1 項に要約した。

4.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

マウス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時のシパグルコシダーゼ アルファの組織分布に及ぼすミグルスタットの効果を評価した結果を 3.2.2.1 項及び 3.2.5.2 項に要約した。

5　代謝

5.1　シパグルコシダーゼ アルファ

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。

5.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

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は実施していない。

6　排泄

6.1　シパグルコシダーゼアルファ

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。

6.2　シパグルコシダーゼアルファ／ミグルスタット

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は実施していない。

7　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。

8　その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

9　考察及び結論

シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの PK プロファイルを、*Gaa* KO マウス、WT マウス及び Sprague Dawley ラットを用いた PK 試験、並びに Sprague Dawley ラット、NZW ウサギ及びカニクイザルを用いた TK 試験で検討した。

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、$t_{1/2}$ は概ね同程度であった。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 アルファ投与時の血漿からの消失は速く、AUC は約 50%低かった。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（3.2.2 項）。*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（3.2.5 項）。

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、遊離体換算）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（3.2.1 項）。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（3.2.5 項）。

Gaa KO マウス及び Sprague Dawley 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（3.2.2 項及び 3.2.3 項）。また、*Gaa* KO マウス及び WT マウスにシパグルコシダーゼ アルファを静脈内投与後、ミグルスタット塩酸塩との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（3.2.5 項）。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。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（3.1.5 項及び 3.1.6 項）。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（3.2.4 項）。

以上の結果は、ポンペ病患者を治療するための次世代 ERT であ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製造販売承認申請を支持するものである。

10　参考文献

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.

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.

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

目次

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 2
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 7
2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与 21
2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与 36
2.6.5.5 薬物動態試験：分布 66
2.6.5.6 薬物動態試験：たん白結合 66
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 66
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 66
2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：*In Vivo* 66
2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：*In Vitro* 66
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 66
2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 67
2.6.5.13 薬物動態試験：排泄 67
2.6.5.14 薬物動態試験：排泄：胆汁中 67
2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用 67
2.6.5.16 薬物動態試験：その他 67

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

2.6.5.1A シパグルコシダーゼ アルファ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Absorption					
TK profile after single dose of cipaglucosidase alfa	SD rats	IV (10 min infusion)	[redacted], China	283-0011-TX	4.2.3.1.1
TK profile after single dose of cipaglucosidase alfa	Cynomolgus monkeys	IV (2 hour infusion)	[redacted], China	283-0012-TX	4.2.3.1.2
TK profile after repeat dose of cipaglucosidase alfa	SD rats	IV (10 min infusion), 26 weeks (once every other, 13 doses)	[redacted], USA	[redacted].423.08	4.2.3.2.1
TK profile after repeat dose of cipaglucosidase alfa	Cynomolgus monkeys	IV (2 hour infusion), 26 weeks (once every other, 13 doses)	[redacted], USA	[redacted].423.07	4.2.3.2.2
PK profile after single dose of two large-scale engineering (EB1 and EB2) [redacted]L cipaglucosidase alfa batches	*Gaa* KO mice	IV bolus	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-016	4.2.1.1.4
PK profile after single dose of small- ([redacted]L) and large- ([redacted]L) cipaglucosidase alfa batches	Study No. 379: *Gaa* KO mice Study No. 380: SD rats	Study No. 379: IV bolus Study No. 380: IV (1 hour infusion)	Study No. 379: [redacted], USA Study No. 380: Amicus Therapeutics, USA	RRB200-037	4.2.2.2.1
Distribution					
N/A					
Metabolism					
N/A					
Excretion					
N/A					

2.6.5.1A　　シパグルコシダーゼ アルファ（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Pharmacokinetic Drug Interactions					
N/A					
Other					
N/A					

Abbreviations: *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; IV = intravenous; KO = knock-out; N/A = not applicable; PK = pharmacokinetic, PO = *per os*; SD = Sprague-Dawley; TK = toxicokinetics

2.6.5.1B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
Absorption					
PK profile after single dose of miglustat	Study No. 300: WT mice Study No. 338: *Gaa* KO mice	Study No. 300: miglustat: PO Study No. 338: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-007	4.2.2.2.2
PK profile after single dose of cipaglucosidase alfa +/- miglustat	Study No. 302 and No. 297: *Gaa* KO mice Study No. 304: SD rats	Study No. 302: cipaglucosidase alfa: IV (30 min infusion), miglustat: PO Study No. 297: cipaglucosidase alfa: IV bolus Study No. 304: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	Study No. 302: [redacted], USA Study No. 297: [redacted], USA Study No. 304: Amicus Therapeutics, USA	RRB200-003	4.2.2.2.3
PK profile after single dose of EB2 cipaglucosidase alfa batch ([redacted]L) +/- miglustat	*Gaa* KO mice	cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-024	4.2.2.2.4
PK profile of cipaglucosidase alfa +/- miglustat in clinical scenario condition	*Gaa* KO mice	cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-056	4.2.1.1.16

2.6.5.1B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
PK profile after single dose of cipaglucosidase alfa +/- miglustat	Study No. 169: WT mice Study No. 338: *Gaa* KO mice Study No. 359: WT mice and *Gaa* KO mice	Study No. 169: miglustat: PO Study No. 338: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO Study No. 359: cipaglucosidase alfa: IV bolus	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-066	4.2.1.1.1
TK profile after repeat dose of cipaglucosidase alfa +/- miglustat	Cynomolgus monkeys	cipaglucosidase alfa: IV (2 hours infusion), 13 weeks (once every other, 7 doses) miglustat: PO	[redacted], USA	[redacted].423.10	4.2.3.2.3
TK profile from fertility and early embryonic development study	SD rats	cipaglucosidase alfa: IV (10 min infusion) miglustat: PO	[redacted], USA	8371927	4.2.3.5.1.1
TK profile from dose-range finding for embryo-fetal development study	SD rats	cipaglucosidase alfa: IV (10 min infusion) miglustat: PO	[redacted], USA	8371929	4.2.3.5.2.1
TK profile from embryo-fetal development study	SD rats	cipaglucosidase alfa: IV (10 min infusion) miglustat: PO	[redacted], USA	8371930	4.2.3.5.2.2
TK profile from prenatal and postnatal development including maternal function study	SD rats	cipaglucosidase alfa: IV (10 min infusion) miglustat: PO	[redacted], USA	8371932	4.2.3.5.3.1
TK profile from dose-range finding for embryo-fetal development study	NZW rabbits	cipaglucosidase alfa: IV (10 min infusion) miglustat: PO	[redacted], USA	8371928	4.2.3.5.2.3

2.6.5.1B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in CTD
TK profile from embryo-fetal development study	NZW rabbits	cipaglucosidase alfa: IV (10 min infusion) miglustat: PO	[redacted], USA	8371931	4.2.3.5.2.4
Distribution					
Tissue uptake after single dose of cipaglucosidase alfa +/- miglustat	Study No. 302: *Gaa* KO mice	Study No. 302: cipaglucosidase alfa: IV (30 min infusion), miglustat: PO	Study No. 302: [redacted], USA	RRB200-003	4.2.2.2.3
Tissue uptake after single dose of cipaglucosidase alfa +/- miglustat	Study No. 169: WT mice Study No. 338: *Gaa* KO mice Study No. 359: WT mice and *Gaa* KO mice	Study No. 169: miglustat: PO Study No. 338: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO Study No. 359: cipaglucosidase alfa: IV bolus	Amicus Therapeutics, USA	RRB200-066	4.2.1.1.1
Metabolism					
N/A					
Excretion					
N/A					
Pharmacokinetic Drug Interactions					
N/A					
Other					
N/A					

Abbreviations: *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; IV = intravenous; KO = knock-out; N/A = not applicable; PK = pharmacokinetic, PO = *per os*; SD = Sprague-Dawley; TK = toxicokinetics; WT = wild type

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

2.6.5.2A シパグルコシダーゼ アルファ

2.6.5.2A.1 ラット及びサル血漿中 GAA 活性

Report Number: 4000041			**Location: 4.2.2.1.1**		**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte	Parameters	Results	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Rat	Plasma (K_2EDTA)	Enzymatic activity assay	Spectrophotometer	4-MU	Calibration range [a]	50 to 30000 nmol/L, $R^2 \geq 0.999$	
					Intra-assay [a]	Conc. (nmol/L)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						50	10.4 to 19.4	84.7 to 91.1
						150	3.2 to 6.6	91.5 to 93.7
						5000	0.8 to 1.5	101.2 to 103.6
						20000	0.8 to 2.9	93.9 to 98.1
					Inter-assay [a]	Conc. (nmol/L)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						50	3.6	87.7
						150	1.2	92.8
						5000	1.2	102.2
						20000	2.4	96.5
					Dilution integrity	100 to 6000000-fold		
					Short term stability	44 hours and 48 minutes (diluted sample) and 24 hours (undiluted sample) at 4°C		
					Freeze-thaw matrix stability	4 freeze-thaw cycles at -80°C		

2.6.5.2A.1　　ラット及びサル血漿中 GAA 活性（続き）

Report Number: 4000041		**Location: 4.2.2.1.1**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**	
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte	Parameters	Results
Species	Matrix (Anticoagulant)					
Rat	Plasma (K_2EDTA)	Enzymatic activity assay	Spectrophotometer	4-MU	Long term stability	157 days at -80°C
					Stock stability	24 days at -80°C
Monkey	Plasma (K_2EDTA)	Enzymatic activity assay	Spectrophotometer	4-MU	Dilution integrity	100 to 6000000-fold
					Short term stability	24 hours and 19 minutes (diluted sample) and 8 hours (undiluted sample) at 4°C
					Freeze-thaw matrix stability	4 freeze-thaw cycles at -80°C
					Long term stability	135 days at -80°C
					Stock stability	25 days at -80°C

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; R^2 = coefficient of determination
a　　Evaluated in dilution buffer, not plasma sample.

2.6.5.2A.2 ウサギ血漿中 GAA 活性

Report Number: 3800505		**Location: 4.2.2.1.3**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte	Parameters	Results	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Rabbit	Plasma (K_2EDTA)	Enzymatic activity assay	Spectrophotometer	4-MU	Calibration range [a]	50 to 30000 nmol/L, $R^2 \geq 0.999$	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						0.3	1.7 to 19.7	87.6 to 111.8
						8	1.0 to 2.0	84.0 to 109.9
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						0.3	10.1	99.8
						8	14.1	95.0
					Dilution integrity	100 to 1000000-fold		
					Short term stability	8 hours and 2 minutes (diluted sample) and 24 hours and 10 minutes (undiluted sample) at 4°C		
					Freeze-thaw matrix stability	4 freeze-thaw cycles at -80°C		
					Long term stability	184 days at -80°C		

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; R^2 = coefficient of determination
a Evaluated in dilution buffer, not plasma sample.

2.6.5.2A.3　　ラット血漿中シパグルコシダーゼ アルファ

Report Number: [redacted]-NL-SML-1589		**Location: 4.2.2.1.5**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Signature peptides (IS)	Parameters	Results [a]	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Rat	Plasma (K_2EDTA)	Protein precipitation followed by pellet digestion	LC-MS/MS	VTSEGAGLQLQK (VTSEGAGLQLQK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Calibration range	0.5 to 500 µg/mL, R≥ 0.9985	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	5.3 to 5.6	-4.5 to 5.7
						1.5	1.4 to 4.3	0.4 to 3.4
						25	0.8 to 2.8	3.1 to 4.7
						400	0.9 to 4.2	2.8 to 8.4
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	7.1	0.6
						1.5	3.6	1.4
						25	1.9	4.1
						400	3.6	5.3
				TTPTFFPK (TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Calibration range	0.5 to 500 µg/mL, R≥ 0.9976	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	2.4 to 4.3	-3.3 to -0.3
						1.5	1.3 to 3.2	0.4 to 4.5
						25	1.9 to 2.1	3.3 to 4.9
						400	0.9 to 4.3	0.4 to 5.5

2.6.5.2A.3 ラット血漿中シパグルコシダーゼ アルファ（続き）

Report Number: [redacted]-NL-SML-1589		**Location: 4.2.2.1.5**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Signature peptides (IS)	Parameters	Results [a]		
Species	Matrix (Anticoagulant)							
Rat	Plasma (K_2EDTA)	Protein precipitation followed by pellet digestion	LC-MS/MS	TTPTFFPK (TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	3.6	-1.6
						1.5	3.0	2.5
						25	2.0	4.0
						400	3.5	3.1
				Both peptides	Dilution	10-fold		
					Stock Stability	24 hours at room temperature		
					Autosampler Stability	93 hours at 10°C in processed sample		
					Reinjection Reproducibility	147 hours at 10°C in processed sample		
					Plasma Stability	24 hours at room temperature and 211 days at -20°C and at -70°C		
					Freeze/thaw Stability	5 cycles at -20°C and at -70°C		
					Stability in Whole Blood	23 hours at 0°C, room temperature and 37°C		

Abbreviations: CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; IS = internal standard; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; R = correlation coefficient
VTSEGAGLQLQK = signature peptide 1 (T50); TTPTFFPK = signature peptide 2 (T09)
a Cipaglucosidase Alfa concentrations are indicated.

2.6.5.2A.4　　ウサギ血漿中シパグルコシダーゼ アルファ

Report Number: [redacted]-NL-SML-1977		**Location: 4.2.2.1.6**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Signature peptides (IS)	Parameters	Results [a]	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Rabbit	Plasma (EDTA)	Protein precipitation followed by pellet digestion	LC-MS/MS	VTSEGAGLQLQK (VTSEGAGLQLQK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Calibration range	0.5 to 500 µg/mL, R≥ 0.9939	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	7.0 to 11.1	-10.6 to 5.6
						1.5	5.2 to 15.2	-7.3 to -4.2
						25	3.6 to 5.2	-10.5 to -7.9
						400	2.2 to 6.9	-5.9 to 4.4
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	12.4	-4.1
						1.5	9.8	-5.3
						25	4.3	-8.8
						400	6.8	-1.1
				TTPTFFPK (TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Calibration range	0.5 to 500 µg/mL, R≥ 0.9923		
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	2.9 to 6.6	-8.8 to -5.2
						1.5	4.9 to 8.8	-12.3 to -3.6
						25	3.9 to 6.0	-11.3 to -6.5
						400	2.9 to 7.7	-4.4 to 4.0

2.6.5.2A.4 ウサギ血漿中シパグルコシダーゼ アルファ（続き）

Report Number: [redacted]-NL-SML-1977		**Location: 4.2.2.1.6**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Signature peptides (IS)	Parameters	Results [a]		
Species	Matrix (Anticoagulant)							
Rabbit	Plasma (EDTA)	Protein precipitation followed by pellet digestion	LC-MS/MS	TTPTFFPK (TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	5.3	-7.0
						1.5	7.9	-7.2
						25	5.1	-9.0
						400	6.5	-1.0
				Both peptides	Dilution	20-fold		
					Stock Stability	24 hours at room temperature and 56 days at -70°C		
					Autosampler Stability	124 hours at 10°C in processed sample		
					Reinjection Reproducibility	104 hours at 10°C in processed sample		
					Plasma Stability	25 hours at room temperature, 128 days in protein LoBind tubes at -20°C, 148 days in protein LoBind tubes at -70°C, 148 days in polypropylene tubes at -20°C and at -70°C		
					Freeze/thaw Stability	5 cycles at -20°C and at -70°C		
					Stability in Whole Blood	2 hours at 0°C and at room temperature		

Abbreviations: CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; IS = internal standard; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; R = correlation coefficient
VTSEGAGLQLQK = signature peptide 1 (T50); TTPTFFPK = signature peptide 2 (T09)
a Cipaglucosidase Alfa concentrations are indicated.

2.6.5.2A.5　　サル血漿中シパグルコシダーゼ アルファ

Report Number: [redacted]-NL-SML-1590		**Location: 4.2.2.1.7**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Signature peptides (IS)	Parameters	Results [a]	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Monkey	Plasma (K_2EDTA)	Protein precipitation followed by pellet digestion	LC-MS/MS	VTSEGAGLQLQK (VTSEGAGLQLQK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Calibration range	0.5 to 500 µg/mL, R≥ 0.9992	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	3.6 to 6.1	-5.7 to 6.9
						1.5	2.0 to 6.5	1.0 to 2.1
						25	1.1 to 2.2	1.7 to 3.0
						400	0.9 to 4.1	0.3 to 6.7
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	7.8	0.1
						1.5	4.1	1.4
						25	1.7	2.5
						400	4.1	3.3
				TTPTFFPK (TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Calibration range	0.5 to 500 µg/mL, R≥ 0.9995	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	3.1 to 5.0	1.7 to 9.2
						1.5	2.3 to 3.2	2.3 to 5.1
						25	1.4 to 2.4	1.1 to 2.7
						400	1.6 to 4.5	-1.2 to 4.5

2.6.5.2A.5 サル血漿中シパグルコシダーゼ アルファ（続き）

Report Number: [redacted]-NL-SML-1590		**Location: 4.2.2.1.7**			**Test article: Cipaglucosidase Alfa**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Signature peptides (IS)	Parameters	Results [a]		
Species	Matrix (Anticoagulant)							
Monkey	Plasma (K_2EDTA)	Protein precipitation followed by pellet digestion	LC-MS/MS	TTPTFFPK (TTPTFFPK-$^{13}C_6$-$^{15}N_2$)	Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Bias (%)
						0.5	5.1	5.4
						1.5	3.0	3.4
						25	1.9	2.1
						400	3.9	1.7
				Both peptides	Dilution	10-fold		
					Stock Stability	24 hours at room temperature 16 days at -70°C		
					Autosampler Stability	169 hours at 10°C in processed sample		
					Reinjection Reproducibility	154 hours at 10°C in processed sample		
					Plasma Stability	24 hours at room temperature 185 days at -20°C and at -70°C		
					Freeze/thaw Stability	5 cycles at -20°C and at -70°C		
					Stability in Whole Blood	23 hours at 0°C, room temperature and 37°C		

Abbreviations: CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; IS = internal standard; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; R = correlation coefficient
VTSEGAGLQLQK = signature peptide 1 (T50); TTPTFFPK = signature peptide 2 (T09)
a Cipaglucosidase Alfa concentrations are indicated.

2.6.5.2A.6　　ラット血漿中抗シパグルコシダーゼ アルファ抗体

Report Number: 14BAS0469		**Location: 4.2.2.1.8**			**Test article: anti-Cipaglucosidase Alfa antibodies**	
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte	Parameters	Results
Species	Matrix (Anticoagulant)					
Rat	Plasma (K_2EDTA)	MSD bridging assay	ECL	Anti-cipaglucosidase alfa antibodies	Assay sensitivity	9.44 ng/mL
					Intra-assay precision (%)	NC: 0.7 to 17.4
						HPC/NC $_{mean}$ ratio: 0.4 to 8.7
						LPC/NC $_{mean}$ ratio: 0.1 to 5.4
						% inhibition of confirmatory QC: 0.2 to 6.5
					Inter-assay precision (%)	NC: 21.1
						HPC/NC $_{mean}$ ratio: 21.1
						LPC/NC $_{mean}$ ratio: 14.4
						% inhibition of confirmatory QC: 3.8
					Stability	at least 24 hours at room temperature. at least 1 week at 2-8°C. at least 6 Freeze/Thaw cycles at nominal -20°C and nominal -70°C. at least 9 months at nominal -20°C and nominal -70°C.

Abbreviations: ECL = electrochemiluminescence; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; HPC = high positive control; LPC = low positive control; MSD = meso scale discovery; NC = negative control; QC = quality control

2.6.5.2A.7　　サル血漿中抗シパグルコシダーゼ アルファ抗体

Report Number: 14BAS0470		**Location: 4.2.2.1.9**			**Test article: anti-Cipaglucosidase Alfa antibodies**	
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte	Parameters	Results
Species	Matrix (Anticoagulant)					
Monkey	Plasma (K_2EDTA)	MSD bridging assay	ECL	Anti-cipaglucosidase alfa antibodies	Assay sensitivity	8.08 ng/mL
					Intra-assay precision (%)	NC: 0.0 to 9.8
						HPC/NC $_{mean}$ ratio: 0.1 to 7.0
						LPC/NC $_{mean}$ ratio: 0.5 to 4.8
						% inhibition of confirmatory QC: 0.0 to 3.0
					Inter-assay precision (%)	NC: 10.8
						HPC/NC $_{mean}$ ratio: 8.5
						LPC/NC $_{mean}$ ratio: 5.6
						% inhibition of confirmatory QC: 2.6
					Stability	at least 24 hours at room temperature. at least 24 hours at 2-8°C. at least 6 Freeze/Thaw cycles at nominal -20°C and nominal -70°C. at least 9 months at nominal -20°C and nominal -70°C.

Abbreviations: ECL = electrochemiluminescence; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; HPC = high positive control; LPC = low positive control; MSD = meso scale discovery; NC = negative control; QC = quality control

2.6.5.2B ミグルスタット

2.6.5.2B.1 ラット血漿中ミグルスタット

Report Number: 17147		**Location: 4.2.2.1.10**			**Test article: Miglustat**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte (IS)	Parameters	Results	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Rat	Plasma (K_2EDTA)	Solid phase extraction	LC-MS/MS	Miglustat (Miglustat - d_9)	Calibration range	0.5 to 500 ng/mL, R^2 = 0.9969	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%RE)
						0.5	7.49 to 10.21	-4.80 to -1.20
						1.5	2.24 to 5.42	-4.00 to 7.33
						30	1.59 to 9.76	-3.00 to 4.67
						400	1.39 to 3.19	-9.50 to 1.00
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						0.5	8.70	-3.20
						1.5	6.73	0.00
						30	6.85	0.67
						400	5.34	-3.50
					Matrix Freeze/Thaw Stability	4 Cycles at -70ºC		
					Matrix Bench-Top Stability	24 hours at Room Temperature		
					Matrix Long-Term Storage Stability	176 Days at -70ºC		
					Dilution Integrity	10 to 100-fold		

Abbreviations: CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; IS = internal standard; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; R^2 = coefficient of determination; RE = relative error

2.6.5.2B.2　　ウサギ血漿中ミグルスタット

Report Number: 17148			**Location: 4.2.2.1.11**		**Test article: Miglustat**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte (IS)	Parameters	Results	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Rabbit	Plasma (K_2EDTA)	Solid phase extraction	LC-MS/MS	Miglustat (Miglustat - d_9)	Calibration range	0.5 to 500 ng/mL, R^2 = 0.9973	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%RE)
						0.5	6.32 to 13.51	-10.60 to 0.60
						1.5	1.92 to 5.93	-5.33 to 5.33
						30	1.81 to 4.69	0.00 to 6.00
						400	2.46 to 6.35	-4.75 to -0.25
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						0.5	11.35	-6.40
						1.5	6.46	0.67
						30	4.47	3.00
						400	4.73	-2.25
					Matrix Freeze/Thaw Stability	4 Cycles at -70ºC		
					Matrix Bench-Top Stability	18 hours at Room Temperature		
					Matrix Long-Term Storage Stability	180 Days at -70ºC		
					Dilution Integrity	10 to 100-fold		

Abbreviations: CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; IS = internal standard; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; R^2 = coefficient of determination; RE = relative error

2.6.5.2B.3　　サル血漿中ミグルスタット

Report Number: 15021			**Location: 4.2.2.1.12**		**Test article: Miglustat**		
Sample		Sample Preparation	Analytical Method	Analyte (IS)	Parameters	Results	
Species	Matrix (Anticoagulant)						
Monkey	Plasma (K_2EDTA)	Solid phase extraction	LC-MS/MS	Miglustat (Miglustat - d_9)	Calibration range	0.5 to 500 ng/mL, R^2 = 0.9991	
					Intra-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%RE)
						0.5	2.84 to 9.60	-1.40 to 4.80
						1.5	2.31 to 3.22	-0.67 to -3.33
						30	1.23 to 1.66	-2.67 to 7.33
						400	1.23 to 3.27	-2.00 to 1.50
					Inter-assay	Conc. (ng/mL)	Precision (%CV)	Accuracy (%)
						0.5	5.60	1.00
						1.5	3.17	1.33
						30	4.29	0.33
						400	2.70	-1.00
					Matrix Freeze/Thaw Stability	5 Cycles at -70ºC		
					Matrix Bench-Top Stability	~21 hours at Room Temperature		
					Matrix Long-Term Storage Stability	70 Days at -70ºC		
					Dilution Integrity	10 to 200-fold		

Abbreviations: CV = coefficient of variation; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; IS = internal standard; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; R^2 = coefficient of determination; RE = relative error

2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与

2.6.5.3A シパグルコシダーゼ アルファ

2.6.5.3A.1 ラット単回投与毒性試験

Report Number: 283-0011-TX	**Location: 4.2.3.1.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa**
Species	SD rats		
Gender (M/F)/Number of Animals:	Female/19 per group		
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting		
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6 containing 2.92 mg/mL sodium chloride, 20 mg/mL mannitol and 0.5 mg/mL polysorbate 80		
Method of Administration:	IV 10 min infusion		
Sample:	Plasma		
Analyte:	4-MU		
Assay:	Enzyme activity method		
Time Points:	0 (predose), 0.166 (end of infusion), 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, and 24 hours post-dose (from the start of infusion)		
Dose (mg/kg):	**PK Parameters [a]**		
	C_{max} (µg/mL)	**$t_{1/2}$ [b] (hr)**	**AUC_{0-24h} (µg· hr/mL)**
10	231	0.5	238
20	505	0.6	514
50	1260	0.7	1520
100	2470	0.9	3740
200	4940	1.2	9360

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC_{0-24h} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life

[a] Data were determined using a validated WinNonlin program (Pharsight, Version 6.2.1).

[b] "Time range" was selected when setting the Lambda Z calculation method and time ranges were selected manually from 0.166 to 2 hours post dosing. This represents the initial (α-phase) half-life of the enzyme.

2.6.5.3A.2　　サル単回投与毒性試験

Report Number: 283-0012-TX	**Location: 4.2.3.1.2**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa**
Species	Cynomolgus monkeys	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Female/2 per group	
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting	
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6 containing 2.92 mg/mL sodium chloride, 20 mg/mL mannitol and 0.5 mg/mL polysorbate 80	
Method of Administration:	IV 2 hours infusion	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU	
Assay:	Enzyme activity method	
Time Points:	1, 2, 2.25, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 12, and 26 hours post-dose (from the start of infusion)	

2.6.5.3A.2 サル単回投与毒性試験（続き）

Report Number: 283-0012-TX	Location: 4.2.3.1.2	Test Article: Cipaglucosidase Alfa			
Dose (mg/kg):	**PK Parameters [a]**				
	C_{max} (µg/mL)	**t_{max} (hr)**	**AUC_{0-26h} (µg· hr/mL)**	**AUC_{0-t} (µg· hr/mL)**	**AUC_{0-inf} (µg· hr/mL)**
10	91.7	2.0	192	191	192
20	242	2.0	575	572	574
50	728	2.1	2030	2030	2030
100	1880	2.0	5340	5320	5320
200	3520	2.1	11400	11400	11400
Dose (mg/kg):	**$t_{1/2\alpha}$ [b] (hr)**	**$t_{1/2\beta}$ [c] (hr)**	**CL_T (mL/hr)**	**Vz (mL)**	**Vss (mL)**
10	0.5	1.0	157	239	161
20	0.8	0.9	116	145	146
50	1.1	0.9	81.2	111	118
100	1.1	0.9	61.4	84.4	107
200	1.4	1.5	57.7	119	116

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC_{0-26h} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 26 hours postdose; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to infinity; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration; CL_T = total body clearance; C_{max} = maximum observed concentrations; IV = intravenous; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2\alpha}$ = alpha half-life, early distribution terminal elimination phase; $t_{1/2\beta}$ = beta half-life, terminal phase half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration; Vss = volume of distribution at steady state; Vz = volume of distribution base on the terminal phase

[a] Data were determined using a validated WinNonlin program (Pharsight, Version 6.2.1).

[b] $t_{1/2\alpha}$ was calculated using time range model (from 2 hours to 4 hours).

[c] $t_{1/2\beta}$ was calculated using best fit model.

2.6.5.3A.3　　[redacted]L スケールのエンジニアリングバッチを用いたマウス薬物動態試験

Report Number: RRB200-016	**Location: 4.2.1.1.4**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa**
Species	*Gaa* KO mice	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/5 per group	
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting	
Vehicle/Formulation:	Liquid, 50 mmol/L sodium phosphate, 100 mmol/L sodium chloride, 2% (w/v) mannitol, 0.02% (v/v) polysorbate-80, pH 6.0	
Method of Administration:	IV bolus	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU	
Assay:	Enzyme activity assay	
Time Points:	15 and 30 min, 1, 2, 4 and 24 hours post infusion	
Dose (mg/kg) and Batch:	**PK Parameters [a]**	
	$t_{1/2}$ (hr)	
10; EB1	0.5	
10; EB2	0.6	

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; GAA = acid α-glucosidase; KO = knock-out; IV = intravenous; $t_{1/2}$ = elimination half-life; v/v = volume/volume; w/v = weight/volume

[a] Calculated using a one-phase decay model in GraphPad Prism

2.6.5.3A.4　　[redacted]及び[redacted]L スケールの様々なバッチを用いたマウス及びラット薬物動態試験

Report Number: RRB200-037	**Location: 4.2.2.2.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa**
Species	*Gaa* KO mice and SD rats		
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/5 animals per group		
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting		
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L sodium citrate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, pH 6.0		
Method of Administration:	IV bolus for mice, 1-hour IV infusion for rats		
Sample:	Plasma		
Analyte:	4-MU		
Assay:	Enzyme activity assay		
Time Points:	10, 30 and 90 min, 3-, 5- and 24- hour post injection for mice Pre infusion, and 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 25 hour after the start of infusion for rats		
Dose (mg/kg) and Batch:	**PK Parameters [a]**		
	***Gaa* KO Mice**	**SD Rats**	
	$t_{1/2}$ (hr)	**$t_{1/2}$ (hr)**	**AUC ($x10^4$ nmol/mL/hr· hr)**	**C_{max} ($x10^4$ nmol/mL/hr)**
10; [redacted]L-EB1 (DS)	0.59 ± 0.04	0.54 ± 0.02	4.0 ± 0.3	3.2 ± 0.2
10; [redacted]L-EB2 (DS)	0.71 ± 0.09	0.58 ± 0.02	5.6 ± 0.4	4.0 ± 0.4
10; [redacted]L-GMP4 (DP)	0.66 ± 0.05	0.58 ± 0.01	4.8 ± 1.5	3.5 ± 1.0
10; [redacted]L-PR1 (DS)	0.74 ± 0.09	0.59 ± 0.04	4.7 ± 1.3	3.4 ± 0.8
10; [redacted]L-EB2-Sublot1 (DS)	0.64 ± 0.04	0.57 ± 0.02	3.8 ± 0.7	3.00 ± 0.5

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximum observed concentration; DS = drug substance; DP = drug product; EB = engineering batch; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; GAA = acid α-glucosidase; GMP = Good Manufacturing Practice; KO = knock-out; IV = intravenous; PR = practice run; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life

[a] Analyzed in Phoenix WinNonLin using a non-compartment model, with the early time points (up to 3 hours) used for the alpha-phase $t_{1/2}$ calculation. The values reported represent the mean ± SD of 4-5 animals/group

2.6.5.3B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

2.6.5.3B.1　　マウス薬物動態試験

Report Number: RRB200-007	**Location: 4.2.2.2.2**	**Test Article: Miglustat+/-Cipaglucosidase Alfa**
Species	Study No. 300: WT mice Study No. 338: *Gaa* KO mice	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Study No. 300: Male/5 per group Study No. 338: Male/4 per group	
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting	
Vehicle/Formulation:	cipaglucosidase alfa: 50 mmol/L sodium phosphate, 100 mmol/L sodium chloride, 2% (w/v) mannitol, 0.02% (v/v) polysorbate-80, pH 6.0 miglustat: deionized water	
Method of Administration:	Study No. 300: miglustat: PO Study No. 338: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	
Sample:	Study No. 300: Plasma and quadriceps Study No. 338: Plasma	
Analyte:	miglustat	
Assay:	LC-MS/MS	
Time Points:	Study No. 300: Plasma: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 hours, and 7, and 14 days; Quadriceps: 5, 15 and 30 min, 1, 2, 4, 6, and 8 hours, 1, 3 and 7 days Study No. 338: 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 hours 1, 3, and 7 days	

2.6.5.3B.1 マウス薬物動態試験（続き）

Report Number: RRB200-007	Location: 4.2.2.2.2		Test Article: Miglustat+/-Cipaglucosidase Alfa	
Miglustat Dose (mg/kg):	**Mean of Calculated PK Parameters [a] (Study No. 300)**			
	t_{max} (hr)	**C_{max} (ng/mL)**	**AUC_{0-t} (ng· hr/mL)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Plasma				
1	0.4	430	322	0.2
3	0.3	2596	1553	0.3
10	0.35	6738	4700	0.4
30	0.3	16600	15095	0.5
Quadriceps				
10	0.45	3046	3373	1.4
30	0.90	8332	11310	1.2
Miglustat Dose (mg/kg):	**Mean of Calculated PK Parameters [a] (Study No. 338)**			
	t_{max} (hr)	**C_{max} (ng/mL)**	**AUC_{0-t} (ng· hr/mL)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Plasma				
10	N/A	N/A	3518	0.5
30	N/A	N/A	10938	0.6

Abbreviations: AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero to time t; C_{max} = maximum observed concentration; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; IV = intravenous; KO = knock-out; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; N/A = not applicable; PK = pharmacokinetic; PO = *per os*; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration; WT = wild type

[a] Data were analyzed using a non-compartmental analysis in WinNonlin® software and represent 5 mice/group (Study No. 300) or 4 mice/group (Study No. 338)

2.6.5.3B.2　　マウス及びラット薬物動態試験

Report Number: RRB200-003	**Location: 4.2.2.2.3**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	Study No. 302 and No. 297: *Gaa* KO mice Study No. 304: SD rats	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Study No. 302 and No. 297: Male/5 per group Study No. 304: Male/4 per group (3 for vehicle group)	
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting	
Vehicle/Formulation:	50 mmol/L sodium phosphate, 100 mmol/L sodium chloride, 2% (w/v) mannitol, 0.02% (v/v) polysorbate-80, pH 6.0	
Method of Administration:	Study No. 302: cipaglucosidase alfa: IV (30 min infusion), miglustat: PO Study No. 297: cipaglucosidase alfa: IV bolus Study No. 304: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	
Sample:	Study No. 302: Plasma, quadriceps, triceps, and heart Study No. 297 and No. 304: Plasma	
Analyte:	4-MU	
Assay:	Enzyme activity assay	
Times Points:	Study No. 302: Plasma; 30 and 45 min, 1, 1.5, 2, 3, and 24 hours post IV injection; Tissues: 24 hour post IV injection Study No. 297: Pre-dose, 5, 15 and 30 min, 1, 1.5, 2.5 and 24 hours post IV bolus Study No. 304: Pre-dose, 15 and 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 and 24 hours post IV bolus	

Mean of Calculated PK Parameters [a] (Study No. 302)

Plasma

Dose (mg/kg)	**$AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol/mL/hr· hr)**	**C_{max} (nmol/mL/hr)**	**t_{max} (hr)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Alglucosidase Alfa 20	480552	105543	0.5	1.32
Cipaglucosidase Alfa 5	34145	21165	0.5	0.62
Cipaglucosidase Alfa 10	74880	45721	0.5	0.61
Cipaglucosidase Alfa 20	215238	86805	0.5	0.79
Cipaglucosidase Alfa 20 + Miglustat 10	208866	74108	0.5	0.81

2.6.5.3B.2 マウス及びラット薬物動態試験（続き）

Report Number: RRB200-003	Location: 4.2.2.2.3		Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat
Mean of Concentrations (Study No. 302)			
Dose (mg/kg)	**Quadriceps**	**Triceps**	**Heart**
Untreated	0.63	0.36	0.40
Alglucosidase Alfa 20	5.41	1.63	17.28
Cipaglucosidase Alfa 5	2.27	0.78	4.07
Cipaglucosidase Alfa 10	3.19	1.10	8.01
Cipaglucosidase Alfa 20	5.1	1.96	19.31
Cipaglucosidase Alfa 20 + Miglustat 10	6.17	6.43	12.64
Mean of Calculated PK Parameters [a] (Study No. 297)			
Dose (mg/kg)	**$AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol/mL/hr· hr)**	**C_0 (nmol/mL/hr) [b]**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Alglucosidase Alfa 20	524219	112389	1.42
Cipaglucosidase Alfa 5	35150	27333	0.67
Cipaglucosidase Alfa 10	92535	55752	0.66
Cipaglucosidase Alfa 20	268276	124171	0.79
Mean of Calculated PK Parameters [a] (Study No. 304)			
Dose (mg/kg)	**$AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol/mL/hr· hr)**	**C_{max} (nmol/mL/hr)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Cipaglucosidase Alfa 5	32900	37249	0.64
Cipaglucosidase Alfa 10	64638	65056	0.52
Cipaglucosidase Alfa 20	148589	98341	0.77
Cipaglucosidase Alfa 20 + Miglustat 10	184453	121932	0.87

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; KO = knock-out; IV = intravenous; PO = *per os*; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration; v/v = volume/volume; WT = wild type; w/v = weight/volume

[a] Data were analyzed using a one-phase decay model in GraphPad Prism and represent 5 mice/group or 3-4 rats/group

[b] The C_0 value was extrapolated using 0.5 to 24 hours data points

2.6.5.3B.3　　マウス薬物動態試験

Report Number: RRB200-024	**Location: 4.2.2.2.4**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	*Gaa* KO mice	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/5 per group	
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting	
Vehicle/Formulation:	Liquid, 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride, final pH 6.0	
Method of Administration:	cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU	
Assay:	Enzyme activity assay	
Time Points:	10 and 30 min, 1.5, 3 and 5 hours post IV administration	

2.6.5.3B.3 マウス薬物動態試験（続き）

Report Number: RRB200-024	Location: 4.2.2.2.4	Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat
Mean of Calculated PK Parameters [a]		
Dose (mg/kg):	**$AUC_{0\text{-}5h}$ (nmol/mL/hr· hr)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Alglucosidase Alfa 20	159531	0.99
Cipaglucosidase Alfa 5	32639	0.55
Cipaglucosidase Alfa 5 + Miglustat 10	39496	0.82
Cipaglucosidase Alfa 5 + Miglustat 30	33027	0.81
Cipaglucosidase Alfa 10	58879	0.62
Cipaglucosidase Alfa 10 + Miglustat 10	74151	0.85
Cipaglucosidase Alfa 10 + Miglustat 30	67779	0.85
Cipaglucosidase Alfa 20	145493	0.73
Cipaglucosidase Alfa 20 + Miglustat 10	154777	0.93
Cipaglucosidase Alfa 20 + Miglustat 30	160148	0.97
Cipaglucosidase Alfa 100	1011901	1.1

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; $AUC_{0\text{-}5h}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 5 hours postdose; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; GAA = acid α-glucosidase; KO = knock-out; IV = intravenous; $t_{1/2}$ = elimination half-life

[a] Data were analyzed in Phoenix WinNonLin using a non-compartment model, and the early time points (up to 3 hours) were used for an α-phase half-life calculation. The values reported represent 5 mice/group (for AUC, the geometric mean is reported; for $t_{1/2}$, the mean is reported).

2.6.5.3B.4　　室温で 4 時間静置し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でのマウス薬物動態試験

Report Number: RRB200-056	**Location: 4.2.1.1.16**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	*Gaa* KO mice	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/7 per group	
Feeding Condition:	Not interrupted, no fasting	
Vehicle/Formulation:	Liquid, 25 mmol/L sodium phosphate buffer containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride. Final pH 6.0	
Method of Administration:	cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU	
Assay:	Enzyme activity assay	
Time Points:	20 min, 1, 3 and 5 hours post injection	
Mean of Calculated PK Parameters [a]		
Dose (mg/kg):	**$t_{1/2}$ (hr)**	**AUC (*10^3 nmol/mL/hr· hr)**
Cipaglucosidase Alfa 20	0.4	67
Cipaglucosidase Alfa 20 + Miglustat 10	0.5	74

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC = area under the concentration-time curve; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; GAA = acid α-glucosidase; KO = knock-out; IV = intravenous; $t_{1/2}$ = elimination half-life

[a] PK modeling was conducted using GraphPad Prism 7 and represents 7 mice/group.

2.6.5.3B.5　　マウス薬物動態及び薬理試験

Report Number: RRB200-066	**Location: 4.2.1.1.1**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	Study No. 169: WT mice Study No. 338: *Gaa* KO mice Study No. 359: WT mice and *Gaa* KO mice	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Study No. 169: Male/4 per time point Study No. 338: Male/8 per group Study No. 359: Male/4 per time point	
Feeding Condition:	Study No. 169 and 338: uninterrupted Study No. 359: uninterrupted, not fasted	
Vehicle/Formulation:	Study No. 169: miglustat, deionized water Study No. 338: cipaglucosidase alfa, 25 mmol/L sodium phosphate containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride, pH 6.0; miglustat, deionized water Study No. 359: cipaglucosidase alfa, 25 mmol/L sodium phosphate containing 20 mg/mL mannitol, 0.5 mg/mL polysorbate 80, and 2.92 mg/mL sodium chloride, pH 6.0	
Method of Administration:	Study No. 169: miglustat: PO Study No. 338: cipaglucosidase alfa: IV bolus, miglustat: PO Study No. 359: cipaglucosidase alfa: IV bolus	
Sample:	Study No. 169 and 359: Quadriceps, triceps, gastrocnemius, and plasma Study No. 338: Quadriceps, triceps, gastrocnemius, and heart	
Analyte:	Study No. 169: Miglustat Study No. 338: 4-MU and total protein Study No. 359: 4-MU	
Assay:	Study No. 169: LC-MS/MS Study No. 338: Enzyme activity assay and BCA Protein Assay Study No. 359: Enzyme activity assay	
Times Points:	Study No. 169: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 16, 24, and 96 hours Study No. 338: 5 min to 7 days post dose Study No. 359: Plasma: 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 72, and 168 hours. Quadriceps, triceps, gastrocnemius: 24, 72 and 168 hours.	

2.6.5.3B.5　　マウス薬物動態及び薬理試験（続き）

Report Number: RRB200-066	**Location: 4.2.1.1.1**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**		
Study No. 169: Miglustat (µmol/L)				
Timepoint post-injection (hours)	**Quadriceps**	**Triceps**	**Gastrocnemius**	**Plasma**
0.25	63.7	70.8	58.7	121.3
0.5	87.3	96.9	96.9	140.3
1	81.5	88.5	88.8	77.9
2	40.0	32.9	35.9	31.7
3	24.2	19.8	36.9	21.9
4	11.4	9.3	11.0	9.3
8	2.4	2.1	2.3	2.4
16	0.3	0.2	0.3	0.2
24	0.2	0.1	0.1	0.0
96	0.0	0.0	0.1	0.0
Study No. 338: 4-MU (nmol/mg total protein/hr)				
Treatment	**Quadriceps**	**Triceps**	**Gastrocnemius**	**Heart**
Vehicle	1.1	1.0	1.2	2.4
Miglustat (10 mg/kg)	1.1	1.0	1.4	2.8
Cipaglucosidase Alfa (20 mg/kg)	4.7	4.9	8.0	3.6
Cipaglucosidse Alfa (20 mg/kg) + Miglustat (10 mg/kg)	8.4	4.4	17.8	3.8
Wild-Type	15.3	15.9	21.3	15.7

2.6.5.3B.5　　マウス薬物動態及び薬理試験（続き）

Report Number: RRB200-066	**Location: 4.2.1.1.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**	
Study No. 338: Glycogen (µg/mg total protein)				
Treatment	**Quadriceps**	**Triceps**	**Gastrocnemius**	**Heart**
Vehicle	221.5	321.3	280.7	454.2
Miglustat (10 mg/kg)	181.7	238.9	235.1	452.8
Cipaglucosidase Alfa (20 mg/kg)	79.6	120.0	91.0	82.9
Cipaglucosidase Alfa (20 mg/kg) + Miglustat (10 mg/kg)	65.4	132.9	77.4	62.9
Wild-Type	15.7	13.1	17.2	10.5
Study No. 359: 4-MU (nmol/mg total protein/hr)				
Timepoint post-injection (hours)	**Quadriceps**	**Triceps**	**Gastrocnemius**	**Plasma**
0.08	-	-	-	134644.6
0.25	-	-	-	102778.2
0.5	-	-	-	75208.4
1	-	-	-	42584.1
2	-	-	-	17744.4
4	-	-	-	5324.1
6	-	-	-	1906.4
8	-	-	-	1700.3
24	8.2	8.3	5.8	639.6
72	5.2	7.6	6.5	986.6
168	2.1	2.3	2.2	894.6

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; *Gaa* = gene encoding mouse acid α-glucosidase enzyme; IV = intravenous; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; KO = knock-out; M = male

2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与

2.6.5.4A シパグルコシダーゼ アルファ

2.6.5.4A.1 ラット 26 週間反復投与毒性試験

Report Number: [redacted].423.08	**Location: 4.2.3.2.1**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa**
Species	SD rats	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Control group: Male/5 per group, Female/5 per group Test Article groups: Male/15 per group, Female/15 per group	
Feeding Condition:	Fasted	
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6 containing 2.92 mg/mL sodium chloride, 20 mg/mL mannitol and 0.5 mg/mL polysorbate 80	
Method of Administration:	IV 10 min infusion, 13 doses	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU and signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK)	
Assay:	Enzyme activity assay or LC-MS/MS	
Time Points:	Days 1, 43 [a], 85, and 169 at the following time points. Control group: Pre-dose and 15 minutes postdose Test Article groups: 15 and 60 minutes, 2, 4, 6, and 24 hours postdose In addition, blood samples were collected from all Tox animals at pre-dose on Day 169.	

2.6.5.4A.1 ラット 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.08	Location: 4.2.3.2.1		Test Article: Cipaglucosidase Alfa		
PK Parameters [b]:	**Day 1**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
30	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	582	585	557
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	801	805	668
	$t_{1/2\alpha}$	hr	0.793	0.789	0.642
	$t_{1/2\beta}$	hr	11.1	10.9	9.26
	CL_T	L/hr	0.007	0.007	0.009
70	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	1340	1340	1210
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	2350	2340	1740
	$t_{1/2\alpha}$	hr	0.891	0.894	0.773
	$t_{1/2\beta}$	hr	12.5	12.3	4.93
	CL_T	L/hr	0.006	0.006	0.009
200	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	4260	4300	4300
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	11200	11300	7120
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.14	1.13	0.911
	$t_{1/2\beta}$	hr	10.1	10.1	2.97
	CL_T	L/hr	0.003	0.003	0.006

2.6.5.4A.1 ラット 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.08		Location: 4.2.3.2.1			Test Article: Cipaglucosidase Alfa
PK Parameters [b]:	**Day 85**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**TTPTFFPK**	
30	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	749	751	642
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	1230	1230	982
	$t_{1/2\alpha}$	hr	0.994	0.983	0.923
	$t_{1/2\beta}$	hr	6.37	6.33	4.76
	CL_T	L/hr	0.010	0.010	0.013
70	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	1830	1830	1680
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	4400	4390	2910
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.40	1.39	1.11
	$t_{1/2\beta}$	hr	8.80	8.67	3.40
	CL_T	L/hr	0.006	0.006	0.010
200	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	5390	5470	4960
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	19800	19800	11000
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.73	1.69	1.21
	$t_{1/2\beta}$	hr	8.18	8.15	2.83
	CL_T	L/hr	0.004	0.004	0.007

2.6.5.4A.1 ラット 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.08	Location: 4.2.3.2.1		Test Article: Cipaglucosidase Alfa		
PK Parameters [b]:	**Day 169**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
30	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	672	666	608
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	1420	1400	1080
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.24	1.24	1.13
	$t_{1/2\beta}$	hr	7.25	7.12	4.12
	CL_T	L/hr	0.010	0.010	0.014
70	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	1730	1710	1480
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	5070	4930	2840
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.43	1.40	1.15
	$t_{1/2\beta}$	hr	10.1	9.94	3.46
	CL_T	L/hr	0.006	0.006	0.012
200	t_{max}	hr	0.250	0.250	0.250
	C_{max}	µg/mL	5450	5530	4840
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	21300	21000	10800
	$t_{1/2\alpha}$	hr	2.13	2.11	1.45
	$t_{1/2\beta}$	hr	7.59	7.45	2.73
	CL_T	L/hr	0.004	0.004	0.009

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration; CL_T = total clearance (based on $\lambda_{z\beta}$); C_{max} = maximal observed concentration; IV = intravenous; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2\alpha}$ = half-life based on the first three time points after C_{max}; $t_{1/2\beta}$ = terminal elimination half-life based on λ_z; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration

[a] Since this non-GLP analysis (Day 43) by Amicus was conducted for their internal purposes only as an opportunity to understand the GAA activity levels after administration of a high dose of cipaglucosidase alfa to rats, results of this assay were not included in the Final Report.

[b] Male and female data combined (overall effect of dose level and repeat dosing were consistent between sexes).

2.6.5.4A.2　　サル 26 週間反復投与毒性試験

Report Number: [redacted].423.07	**Location: 4.2.3.2.2**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa**
Species	Cynomolgus monkeys	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/6 per group, Female/6 per group	
Feeding Condition:	Fasted	
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6 containing 2.92 mg/mL sodium chloride, 20 mg/mL mannitol and 0.5 mg/mL polysorbate 80	
Method of Administration:	IV 2 hour infusion, 13 doses	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU and signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK)	
Assay:	Enzyme activity assay or LC-MS/MS	
Time Points:	Days 1, 85, and 169 at the following time points. Pre-dose and 1, 2, 2.5, 3, 4, 6, 12 and 26 hours from initiation of infusion	

2.6.5.4A.2 サル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.07		Location: 4.2.3.2.2			Test Article: Cipaglucosidase Alfa
PK Parameters [a]:	**Day 1**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
30	t_{max}	hr	2.00	2.00	2.00
	C_{max}	µg/mL	361	366	356
	AUC_{0-t}	µg· hr/mL	841	846	812
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	842	848	812
	$t_{1/2\alpha}$	hr	0.713	0.709	0.698
	$t_{1/2\beta}$	hr	1.82	1.78	2.11
	CL_T	L/hr	0.104	0.104	0.108
	V_{ss}	L	0.148	0.148	0.138
	V_z	L	0.255	0.257	0.331
60	t_{max}	hr	2.08	2.08	2.08
	C_{max}	µg/mL	816	829	748
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	2290	2300	1900
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	2300	2300	1900
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.03	1.03	0.882
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.85	2.80	1.83
	CL_T	L/hr	0.071	0.071	0.087
	V_{ss}	L	0.145	0.142	0.127
	V_z	L	0.293	0.287	0.229

2.6.5.4A.2 サル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.07		Location: 4.2.3.2.2			Test Article: Cipaglucosidase Alfa
PK Parameters [a]:	**Day 1**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
200	t_{max}	hr	2.04	2.04	2.00
	C_{max}	µg/mL	3490	3470	2660
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	15400	15300	7770
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	15400	15400	7770
	$t_{1/2\alpha}$	hr	2.59	2.48	1.19
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.57	2.54	1.67
	CL_T	L/hr	0.044	0.044	0.096
	V_{ss}	L	0.129	0.129	0.174
	V_z	L	0.161	0.160	0.231
PK Parameters [a]:	**Day 85**				
30	t_{max}	hr	2.00	2.00	2.04
	C_{max}	µg/mL	438	443	385
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	1180	1190	981
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	1180	1200	981
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.02	1.02	0.893
	$t_{1/2\beta}$	hr	1.49	1.50	2.17
	CL_T	L/hr	0.083	0.082	0.099
	V_{ss}	L	0.144	0.142	0.166
	V_z	L	0.172	0.175	0.316

2.6.5.4A.2 サル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.07		Location: 4.2.3.2.2			Test Article: Cipaglucosidase Alfa
PK Parameters [a]:	**Day 85**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
60	t_{max}	hr	1.95	1.95	1.95
	C_{max}	µg/mL	939	944	771
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	2980	2980	2220
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	2980	2980	2220
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.38	1.38	1.14
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.67	2.64	2.08
	CL_T	L/hr	0.061	0.061	0.084
	V_{ss}	L	0.154	0.152	0.172
	V_z	L	0.237	0.235	0.264
200	t_{max}	hr	1.96	1.96	2.05
	C_{max}	µg/mL	4040	4080	3120
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	20400	20400	9870
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	20500	20500	9880
	$t_{1/2\alpha}$	hr	3.58	3.94	1.32
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.91	2.90	2.35
	CL_T	L/hr	0.035	0.035	0.076
	V_{ss}	L	0.141	0.141	0.207
	V_z	L	0.149	0.148	0.265

2.6.5.4A.2 サル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.07	Location: 4.2.3.2.2		Test Article: Cipaglucosidase Alfa		
PK Parameters [a]:	**Day 169**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
30	t_{max}	hr	2.08	2.08	2.08
	C_{max}	µg/mL	473	467	407
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	1380	1370	1170
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	1390	1370	1170
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.18	1.17	1.09
	$t_{1/2\beta}$	hr	1.47	1.46	2.14
	CL_T	L/hr	0.072	0.073	0.088
	V_{ss}	L	0.135	0.136	0.157
	V_z	L	0.153	0.154	0.271
60	t_{max}	hr	2.00	2.04	2.00
	C_{max}	µg/mL	1090	1070	909
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	4090	4070	2980
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	4110	4090	2990
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.66	1.69	1.30
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.89	2.90	2.25
	CL_T	L/hr	0.044	0.044	0.060
	V_{ss}	L	0.121	0.122	0.135
	V_z	L	0.182	0.183	0.193

2.6.5.4A.2 サル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.07		Location: 4.2.3.2.2			Test Article: Cipaglucosidase Alfa
PK Parameters [a]:	**Day 169**				
Dose (mg/kg):	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
200	t_{max}	hr	2.14	2.14	2.05
	C_{max}	µg/mL	4200	4210	3630
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	25100	24900	14400
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	25300	25100	14600
	$t_{1/2\alpha}$	hr	3.71	3.84	1.41
	$t_{1/2\beta}$	hr	3.24	3.25	3.14
	CL_T	L/hr	0.030	0.030	0.053
	V_{ss}	L	0.138	0.139	0.180
	V_z	L	0.135	0.135	0.224

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; CL_T = total clearance (based on $\lambda_{z\beta}$); C_{max} = maximal observed concentration; IV = intravenous; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2\alpha}$ = half-life based on the first three time points after t_{max}; $t_{1/2\beta}$ = terminal elimination half-life based on λ_z; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration; V_{ss} = apparent volume of distribution at equilibrium; V_z = volume of distribution based on the terminal phase (based on $\lambda_{z\beta}$)

[a] Male and female data combined (overall effect of dose level and repeat dosing were consistent between sexes).

2.6.5.4B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

2.6.5.4B.1　　サル 13 週間反復投与毒性試験

Report Number: [redacted].423.10	**Location: 4.2.3.2.3**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	Cynomolgus monkeys	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/4 per group, Female/4 per group	
Feeding Condition:	Fasted	
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6 containing 2.92 mg/mL sodium chloride, 20 mg/mL mannitol and 0.5 mg/mL polysorbate 80	
Method of Administration:	IV 2 hour infusion, 7 doses	
Sample:	Plasma	
Analyte:	4-MU, signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK) and miglustat	
Assay:	Enzyme activity assay or LC-MS/MS	
Time Points:	Days 1 and 85 at the following time points. Pre-dose and 0.25 hours post-Miglustat administration (i.e., 0.25 hours prior to cipaglucosidase alfa dosing), and at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 26, 50, and 74 hours following the initiation of cipaglucosidase alfa infusion (i.e., pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 4.5, 6.5, 12.5, 26.5, 50.5, and 74.5 hours post-Miglustat dosing).	

2.6.5.4B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.10	Location: 4.2.3.2.3		Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat		
PK Parameters [a]:	**Day 1**				
Treatment	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
50 mg/kg Cipaglucosidase Alfa + 25 mg/kg Miglustat	t_{max}	hr	2.00	2.00	2.06
	C_{max}	µg/mL	890	900	495
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	3060	3080	1700
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	3070	3100	1700
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.69	1.69	2.01
	$t_{1/2\beta}$	hr	1.70	1.71	1.92
	CL_T	L/hr	0.058	0.058	0.106
	V_{ss}	L	0.145	0.144	0.266
	V_z	L	0.144	0.143	0.296
100 mg/kg Cipaglucosidase Alfa + 175 mg/kg Miglustat	t_{max}	hr	2.00	2.00	2.25
	C_{max}	µg/mL	1960	1980	1150
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	10400	10400	6130
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	10400	10400	6140
	$t_{1/2\alpha}$	hr	2.77	2.77	3.07
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.72	2.70	2.54
	CL_T	L/hr	0.034	0.034	0.057
	V_{ss}	L	0.140	0.140	0.231
	V_z	L	0.133	0.133	0.210

2.6.5.4B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.10	Location: 4.2.3.2.3		Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat		
PK Parameters [a]:	**Day 1**				
Treatment	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
100 mg/kg Cipaglucosidase Alfa Monotherapy	t_{max}	hr	1.88	1.88	1.94
	C_{max}	µg/mL	1690	1670	1270
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	5490	5410	3230
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	5500	5420	3230
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.56	1.55	1.28
	$t_{1/2\beta}$	hr	11.1	6.29	1.71
	CL_T	L/hr	0.105	0.105	0.140
	V_{ss}	L	0.171	0.149	0.168
	V_z	L	0.729	0.401	0.383
PK Parameters [a]:	**Day 85**				
50 mg/kg Cipaglucosidase Alfa + 25 mg/kg Miglustat	t_{max}	hr	2.00	2.00	2.13
	C_{max}	µg/mL	927	921	586
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	3700	3700	2390
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	3700	3710	2390
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.98	1.95	2.35
	$t_{1/2\beta}$	hr	2.38	2.40	2.31
	CL_T	L/hr	0.049	0.049	0.076
	V_{ss}	L	0.147	0.147	0.223
	V_z	L	0.168	0.168	0.254

2.6.5.4B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.10	Location: 4.2.3.2.3		Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat		
PK Parameters [a]:	**Day 85**				
Treatment	**Parameter**	**Units**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay**
			TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**	
100 mg/kg Cipaglucosidase Alfa + 175 mg/kg Miglustat	t_{max}	hr	2.13	2.19	2.06
	C_{max}	µg/mL	2270	2270	1600
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	13900	13800	9240
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	14000	13900	9280
	$t_{1/2\alpha}$	hr	3.62	3.72	3.34
	$t_{1/2\beta}$	hr	4.83	4.83	2.90
	CL_T	L/hr	0.027	0.027	0.040
	V_{ss}	L	0.140	0.140	0.186
	V_z	L	0.174	0.174	0.165
100 mg/kg Cipaglucosidase Alfa Monotherapy	t_{max}	hr	2.13	2.13	2.00
	C_{max}	µg/mL	2020	2010	1510
	AUC_{0-t}	µg·hr/mL	7830	7790	4890
	AUC_{0-inf}	µg·hr/mL	7840	7800	4890
	$t_{1/2\alpha}$	hr	1.93	1.88	1.44
	$t_{1/2\beta}$	hr	6.62	2.63	2.03
	CL_T	L/hr	0.045	0.045	0.070
	V_{ss}	L	0.143	0.127	0.159
	V_z	L	0.396	0.170	0.205

2.6.5.4B.1 サル 13 週間反復投与毒性試験（続き）

Report Number: [redacted].423.10	Location: 4.2.3.2.3	Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat

PK Parameters [a]:

Treatment	Parameter	Units	Miglustat Assay	
			Day 1	Day 85
50 mg/kg Cipaglucosidase Alfa + 25 mg/kg Miglustat	t_{max}	hr	2.06	2.88
	C_{max}	ng/mL	7430	7510
	AUC_{0-t}	ng·hr/mL	47300	49100
	AUC_{0-inf}	ng·hr/mL	47400	49100
	$t_{1/2}$	hr	7.44	8.23
	CL_T/F	L/hr	1.92	1.99
	V_z/F	L	20.5	23.3
175 mg/kg Miglustat Monotherapy	t_{max}	hr	3.00	4.13
	C_{max}	ng/mL	16400	14700
	AUC_{0-t}	ng·hr/mL	173000	204000
	AUC_{0-inf}	ng·hr/mL	173000	204000
	$t_{1/2}$	hr	6.86	6.66
	CL_T/F	L/hr	3.67	3.49
	V_z/F	L	35.9	33.8

Abbreviations: 4-MU = 4-methylumbelliferone; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to the time point with the last measurable concentration; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; CL_T = total clearance (based on $\lambda_{z\beta}$); CL_T/F = total clearance divided by the bioavailable fraction; C_{max} = maximal observed concentration; IV = intravenous; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2\alpha}$ = half-life based on the first three time points after t_{max}; $t_{1/2\beta}$ = terminal elimination half-life based on λ_z; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration; V_{ss} = apparent volume of distribution at equilibrium; V_z = volume of distribution based on the terminal phase (based on $\lambda_{z\beta}$); V_z/F = volume of distribution based on the terminal phase divided by the bioavailable fraction

[a] Male and female data combined (overall effect of dose level and repeat dosing were consistent between sexes).

2.6.5.4B.2　　ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Report Number: 8371927	**Location: 4.2.3.5.1.1**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	SD rats	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Monotherapy group: Male/6 per group, Female/6 per group Combination group: Male/12 per group, Female/12 per group	
Feeding Condition:	Not fasted	
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride	
Method of Administration:	Cipaglucosidase alfa/Miglustat: 0/60, 400/0 and 400/60 mg/kg Male: every other day for at least 28 days prior to pairing and continuing every other day for 6 weeks Female: every other day for at least 14 days prior to mating and then on GD 1, 3, 5, and 7	
Sample:	Plasma	
Analyte:	Signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK) and miglustat	
Assay:	LC-MS/MS	
Time Points:	On Day 1 and on GD 7 (females) or Day 28 (males) predose and at approximately 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours post the end of Cipaglucosidase Alfa IV infusion. On Day 1 and on GD 7 (females) or Day 28 (males) predose and at approximately 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours post Miglustat oral dose.	

2.6.5.4B.2 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371927		**Location: 4.2.3.5.1.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**			
Summary of the TTPTFFPK Toxicokinetic Parameters							
Day	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg)	Sex	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
1	9	400	M	9960	0.417	54400	5.54
			F	8770	0.417	38600	6.11
			MF	9360	0.417	46500	5.74
	10	400	M	8690	1.17	61600	5.19
			F	7840	1.17	48600	5.14
			MF	8260	1.17	55100	5.17
GD 7	9	400	F	9420	0.417	38700	5.01
	10	400	F	8100	0.417	37900	4.39
28	9	400	M	9320	0.417	55200	5.61
	10	400	M	10100	0.417	63000	5.03

2.6.5.4B.2　　ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371927		**Location: 4.2.3.5.1.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**			
Summary of the VTSEGAGLQLQK Toxicokinetic Parameters							
Day	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg)	Sex	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
1	9	400	M	9890	0.417	54600	4.86
			F	8940	0.417	38400	6.15
			MF	9420	0.417	46500	5.74
	10	400	M	8780	1.17	61100	5.18
			F	7820	1.17	49100	5.09
			MF	8300	1.17	55100	5.14
GD 7	9	400	F	9290	0.417	38100	5.03
	10	400	F	8270	0.417	38200	4.35
28	9	400	M	9440	0.417	55000	5.54
	10	400	M	10300	0.417	62900	4.92

2.6.5.4B.2 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371927		**Location: 4.2.3.5.1.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**			
Summary of the Miglustat Toxicokinetic Parameters							
Day	Dose Group	Miglustat Dose Level (mg/kg)	Sex	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
1	8	60	M	4510	1.00	34300	3.39
			F	3200	4.00	39600	NC
			MF	3910	1.00	36800	3.48
	10	60	M	20900	1.00	111000	2.61
			F	17000	1.00	103000	2.51
			MF	18900	1.00	107000	2.55
GD 7	8	60	F	6000	1.00	31400	4.74
	10	60	F	16100	1.00	87600	2.85
28	8	60	M	4530	2.00	27600	3.29
	10	60	M	19900	1.00	96000	3.20

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous; GD = gestation day; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NC = not calculated due to lack of a distinct elimination phase; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration

2.6.5.4B.3　　ラット胚・胎児発生用量設定試験

Report Number: 8371929	**Location: 4.2.3.5.2.1**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**

Species	SD rats
Gender (M/F)/Number of Animals:	0/12.5, 300/0 and 600/0 mg/kg: Female/3 per group 30/0, 70/0, 150/0 and 150/12.5 mg/kg: Female/6 per group
Feeding Condition:	Not fasted
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride
Method of Administration:	Cipaglucosidase alfa/Miglustat: 0/12.5, 30/0, 70/0, 150/0, 150/12.5, 300/0 and 600/0 mg/kg GD6-GD18
Sample:	Plasma
Analyte:	Signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK)
Assay:	LC-MS/MS
Time Points:	approximately 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours post IV administration of Cipaglucosidase Alfa

Cohort	Analyte	Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24h} (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
1	TTPTFFPK	4	30	338	0.417	413	NC
		5	70	832	0.417	1290	NC
		6	150	2310	0.417	5730	NC
		7	150	1680	0.417	4670	NC
	VTSEGAGLQLQK	4	30	342	0.417	416	NC
		5	70	844	0.417	1300	NC
		6	150	2340	0.417	5770	NC
		7	150	1690	0.417	4720	NC
2	TTPTFFPK	9	300	4540	0.417	14200	NC
		10	600	8650	0.417	37300	7.75

Abbreviations: AUC_{0-24h} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous; GD = gestation day; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NC = not calculated; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration

2.6.5.4B.4　　ラット胚・胎児発生に関する試験

Report Number: 8371930	**Location: 4.2.3.5.2.2**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	SD rats	
Gender (M/F)/Number of Animals:	0/60, 70/0, 150/0 and 400/0 mg/kg: Female/9 per group 400/60 mg/kg: Female/12 per group	
Feeding Condition:	Not fasted	
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride	
Method of Administration:	Cipaglucosidase alfa/Miglustat: 0/60, 70/0, 150/0, 400/0 and 400/60 mg/kg GD6-GD18	
Sample:	Plasma	
Analyte:	Signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK) and miglustat	
Assay:	LC-MS/MS	
Time Points:	On GD 6 and on GD 18 Predose and 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours postdose IV Cipaglucosidase Alfa Predose and 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours postdose oral Miglustat	

2.6.5.4B.4 ラット胚・胎児発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371930		**Location: 4.2.3.5.2.2**			**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**	
Summary of the TTPTFFPK Toxicokinetic Parameters						
Gestation Day	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
6	4	70	1240	0.417	2780	11.6
	5	150	3040	0.417	7750	10.1
	6	400	6130	0.417	21700	6.91
	7	400	6630	1.17	29500	5.37
18	4	70	1110	0.417	1850	7.63
	5	150	2600	0.417	6090	NC
	6	400	7500	0.417	27300	NC
	7	400	6760	0.417	28700	7.27
Summary of the VTSEGAGLQLQK Toxicokinetic Parameters						
Gestation Day	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
6	4	70	1340	0.417	2850	11.4
	5	150	3130	0.417	7940	9.84
	6	400	6110	0.417	21700	6.72
	7	400	6670	1.17	30200	5.24
18	4	70	1170	0.417	1910	7.51
	5	150	2830	0.417	6330	NC
	6	400	7340	0.417	26900	NC
	7	400	6820	0.417	29000	7.09

2.6.5.4B.4 ラット胚・胎児発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371930		**Location: 4.2.3.5.2.2**			**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**	
Summary of the Miglustat Toxicokinetic Parameters						
Gestation Day	Dose Group	Miglustat Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24h} (ng·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
6	3	60	3980	1.00	29700	3.39
	7	60	15900	1.00	75200	3.09
18	3	60	6160	1.00	41100	5.02
	7	60	13200	1.00	84300	4.88

Abbreviations: AUC_{0-24h} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous; GD = gestation day; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NC = not calculated; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration

2.6.5.4B.5　　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

Report Number: 8371932	**Location: 4.2.3.5.3.1**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	SD rats	
Gender (M/F)/Number of Animals:	400/60 mg/kg: Female/3 per group Non treated: Female/6 per group	
Feeding Condition:	Not fasted	
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride	
Method of Administration:	Cipaglucosidase alfa/Miglustat: 400/60 mg/kg LD1-LD13	
Sample:	Plasma and milk	
Analyte:	Signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK) and miglustat	
Assay:	LC-MS/MS	
Time Points:	On LD13 2.5 hours postdose IV Cipaglucosidase Alfa 3 hours postdose oral Miglustat	

2.6.5.4B.5　　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験（続き）

Report Number: 8371932		**Location: 4.2.3.5.3.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**		
Analyte	**Dose Group**	**Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg)**		**Plasma Concentration (µg/mL)**	**Milk Concentration (µg/mL)**	**Milk : Plasma**
TTPTFFPK	8	400	Mean	4820	184	0.0383
			Standard Deviation	137	35.0	0.00791
			CV%	2.85	19.0	20.7
			N	3	3	3
	9	0	Mean	N/A	0.00	N/A
			Standard Deviation	N/A	0.00	N/A
			CV%	N/A	N/A	N/A
			N	0	3	3
VTSEGAGLQLQK	8	400	Mean	4770	178	0.0373
			Standard Deviation	135	31.6	0.00625
			CV%	2.82	17.8	16.8
			N	3	3	3
	9	0	Mean	N/A	0.00	N/A
			Standard Deviation	N/A	0.00	N/A
			CV%	N/A	N/A	N/A
			N	0	3	3

2.6.5.4B.5 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験（続き）

Report Number: 8371932		**Location: 4.2.3.5.3.1**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**		
Analyte	**Dose Group**	**Miglustat Dose Level (mg/kg)**		**Plasma Concentration (ng/mL)**	**Milk Concentration (ng/mL)**	**Milk : Plasma**
Miglustat	8	60	Mean	8960	15400	1.71
			Standard Deviation	622	5790	0.574
			CV%	6.94	37.6	33.5
			N	3	3	3
	9	0	Mean	N/A	0.00	N/A
			Standard Deviation	N/A	0.00	N/A
			CV%	N/A	N/A	N/A
			N	0	3	3

Abbreviations: CV% = coefficient of variation (%); IV = intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LD = lactation day; N = number; N/A = not applicable as plasma samples were not collected; PK = pharmacokinetic; SD = Sprague-Dawley

2.6.5.4B.6　　ウサギ胚・胎児発生用量設定試験

Report Number: 8371928		**Location: 4.2.3.5.2.3**		**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**		
Species	NZW rabbits					
Gender (M/F)/Number of Animals:	Female/6 per group					
Feeding Condition:	Not fasted					
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride					
Method of Administration:	Cipaglucosidase alfa/Miglustat: 30/0, 70/0, 150/0 and 150/25 mg/kg GD7-GD19					
Sample:	Plasma					
Analyte:	Signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK)					
Assay:	LC-MS/MS					
Time Points:	approximately 0.417, 1.167, 2.167, 4.167, 6.167, and 24.167 hours from the start of infusion of Cipaglucosidase Alfa					
Peptide	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24h} (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
TTPTFFPK	4	30	540	0.417	1410	4.50
	5	70	1350	0.417	2950	5.50
	6	150	3470	0.417	13600	3.86
	7	150	3300	0.417	14100	3.06
VTSEGAGLQLQK	4	30	549	0.417	1460	4.41
	5	70	1350	0.417	3010	5.59
	6	150	3500	0.417	13700	3.99
	7	150	3310	0.417	14200	3.12

Abbreviations: AUC_{0-24h} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous; GD = gestation day; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NZW = New Zealand White; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration

2.6.5.4B.7　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

Report Number: 8371931	**Location: 4.2.3.5.2.4**	**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**
Species	NZW rabbits	
Gender (M/F)/Number of Animals:	Female/20 per group	
Feeding Condition:	Not fasted	
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride	
Method of Administration:	Cipaglucosidase alfa/Miglustat: 0/25, 30/0, 70/0, 175/0 and 175/25 mg/kg GD7-GD19	
Sample:	Plasma	
Analyte:	Signature peptides (T50: VTSEGAGLQLQK and T09: TTPTFFPK) and miglustat	
Assay:	LC-MS/MS	
Time Points:	On GD 7 and on GD 19 Predose and 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours postdose IV Cipaglucosidase Alfa Predose and 0.25, 1, 2, 4, 6, and 24 hours postdose oral Miglustat	

2.6.5.4B.7 ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371931		**Location: 4.2.3.5.2.4**			**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**	
Summary of the TTPTFFPK Toxicokinetic Parameters						
Gestation Day	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
7	4	30	670	0.459	1630	N/A
	5	70	1740	0.417	4640	N/A
	6	175	4200	0.417	19900	3.78
	7	175	4900	0.417	27300	3.43
19	4	30	648	0.442	1290	4.72
	5	70	1430	0.417	3640	5.08
	6	175	3500	0.417	11500	4.44
	7	175	3820	0.417	22700	3.17
Summary of the VTSEGAGLQLQK Toxicokinetic Parameters						
Gestation Day	Dose Group	Cipaglucosidase Alfa Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (hr)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
7	4	30	690	0.459	1640	N/A
	5	70	1780	0.417	4730	N/A
	6	175	4190	0.417	20000	3.79
	7	175	4780	0.417	26900	3.50
19	4	30	661	0.442	1300	4.63
	5	70	1440	0.417	3690	5.00
	6	175	3510	0.417	11600	4.51
	7	175	3730	0.417	22400	3.18

2.6.5.4B.7 ウサギ胚・胎児発生に関する試験（続き）

Report Number: 8371931		**Location: 4.2.3.5.2.4**			**Test Article: Cipaglucosidase Alfa+/-Miglustat**	
Summary of the Miglustat Toxicokinetic Parameters						
Gestation Day	Dose Group	Miglustat Dose Level (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (hr)	AUC_{0-24h} (ng·hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)
7	3	25	10100	1.00	34700	7.82
	7	25	14500	1.00	58400	5.50
19	3	25	9740	1.00	39100	6.48
	7	25	13100	1.00	66100	4.94

Abbreviations: AUC_{0-24h} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; IV = intravenous; GD = gestation day; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; N/A = not applicable; NZW = New Zealand White; $t_{1/2}$ = elimination half-life; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration

2.6.5.5　　薬物動態試験：分布

2.6.5.5A　　シパグルコシダーゼ アルファ

マウスにシパグルコシダーゼ アルファ投与時の組織分布を検討した結果は 2.6.5.3B.5 項に要約した。

2.6.5.5B　　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット

マウス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時のシパグルコシダーゼ アルファの組織分布に及ぼすミグルスタットの影響を評価した結果を 2.6.5.3B.2 項及び 2.6.5.3B.5 項に要約した。

2.6.5.6　　薬物動態試験：たん白結合

該当なし。

2.6.5.7　　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし。

2.6.5.8　　薬物動態試験：その他の分布試験

該当なし。

2.6.5.9　　薬物動態試験：代謝：*In Vivo*

該当なし。

2.6.5.10　　薬物動態試験：代謝：*In Vitro*

該当なし。

2.6.5.11　　薬物動態試験：推定代謝経路

該当なし。

2.6.5.12　　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

該当なし。

2.6.5.13　　薬物動態試験：排泄

該当なし。

2.6.5.14　　薬物動態試験：排泄：胆汁中

該当なし。

2.6.5.15　　薬物動態試験：薬物相互作用

該当なし。

2.6.5.16　　薬物動態試験：その他

該当なし。