目次

1　まとめ 6

2　単回投与毒性試験 11

2.1　シパグルコシダーゼ アルファ 11

2.1.1　ラットにおけるシパグルコシダーゼ アルファ単回投与毒性試験 11

2.1.2　カニクイザルにおけるシパグルコシダーゼ アルファ単回投与毒性試験 11

3　反復投与毒性試験 13

3.1　シパグルコシダーゼ アルファ 13

3.1.1　ラットにおけるシパグルコシダーゼ アルファ 26 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 13

3.1.2　カニクイザルにおけるシパグルコシダーゼ アルファ 26 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 14

3.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与 15

3.2.1　カニクイザルにおけ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による 13 週間反復投与毒性試験 15

4　遺伝毒性試験 17

5　がん原性試験 18

6　生殖発生毒性試験 19

6.1　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与 19

6.1.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 19

6.1.2　胚・胎児発生に関する試験 22

6.1.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 29

7　局所刺激性試験 32

8　その他の毒性試験 33

8.1　溶血性 33

8.2　凝集能 33

9　考察及び結論 34

9.1　反復投与毒性 34

9.2　生殖発生毒性 35

9.3　溶血性及び凝集能 41

9.4　結論 41

10　参考文献 42

付表 1.....43

表目次

表 2.6.6- 1　シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与のための毒性試験プログラム 8

表 2.6.6- 2　Sprague Dawley ラット 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン 13

表 2.6.6- 3　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン 14

表 2.6.6- 4　カニクイザル 13 週間反復投与毒性試験の試験デザイン 15

表 2.6.6- 5　ラット受胎能及び初期胚発生試験の試験デザイン - コホート A（雌受胎能） 19

表 2.6.6- 6　ラット受胎能及び初期胚発生試験の試験デザイン - コホート B（雄受胎能） 20

表 2.6.6- 7　ラット受胎能及び初期胚発生試験の試験デザイン - コホート C（TK 評価） 20

表 2.6.6- 8　ラット胚・胎児発生用量設定試験の試験デザイン（コホート 1） 23

表 2.6.6- 9　ラット胚・胎児発生用量設定試験の試験デザイン（コホート 2） 23

表 2.6.6- 10　ラット胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン 25

表 2.6.6- 11　ウサギ胚・胎児発生用量設定試験の試験デザイン 27

表 2.6.6- 12　ウサギ胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン 28

表 2.6.6- 13　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験の試験デザイン 30

表 2.6.6- 14　反復投与毒性試験の NOAEL におけるシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比 34

表 2.6.6- 15　反復投与毒性試験の NOAEL におけるミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比 35

表 2.6.6- 16　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比 36

表 2.6.6- 17　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比 37

表 2.6.6- 18　胚・胎児発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比.....39

表 2.6.6- 19　胚・胎児発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比.....40

略語及び用語の説明

略語及び用語	日本語	英語
ADA	抗薬物抗体	anti-drug antibody
ALGLU	アルグルコシダーゼ アルファ	alglucosidase alfa
ATB200	シパグルコシダーゼ アルファ（遺伝子組換え）	cipaglucosidase alfa (genetical recombination)
AUC	血漿中濃度 - 時間曲線下面積	area under the concentration-time curve
$AUC_{0\text{-}24h}$	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
DPH	ジフェンヒドラミン塩酸塩	diphenhydramine hydrochloride
ECG	心電図	electrocardiogram
ERT	酵素補充療法	enzyme replacement therapy
FOB	機能観察総合評価	functional observation battery
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
ICH	医薬品規制調和国際会議	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
M6P	マンノース-6-リン酸	mannose 6-phosphate
MTD	最大耐量	maximal tolerated dose
NOAEL	無毒性量	no observed adverse effect level
PK	薬物動態	pharmacokinetic
rhGAA	遺伝子組換えヒト酸性 α-グルコシダーゼ	recombinant human acid-α-glucosidase
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics

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疾患である。この酵素活性の欠乏により、ライソゾーム内にグリコーゲンが蓄積し、特に心臓、骨格筋及び肝臓において細胞機能の破壊が進行する。

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

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

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

rhGAA を含む全てのライソゾーム酵素と同様に、シパグルコシダーゼ アルファは中性 pH で不安定であり、静脈内投与後に循環血中で変性／不活性化されやすい。ミグルスタット（AT2221）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に、シパグルコシダーゼ アルファと併用投与する経口剤として開発された。ミグルスタットは、現在多くの国々でゴーシェ病 1 型及び／又はニーマン・ピック病 C 型の治療薬として販売名 Zavesca®で承認されている。国内では、ミグルスタットはニーマン・ピック病 C 型の治療薬として 2012 年 3 月 30 日に製造販売承認されたブレーザベス®カプセルの有効成分であり、再審査期間（10 年）が 2022 年 3 月 29 日に終了している。本申

請と同時申請するミグルスタットの申請区分は（4）新効能医薬品、（6）新用量医薬品、（8 の 2）剤形追加に係る医薬品（再審査期間中でないもの）である。

ポンペ病患者の治療を目的と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の開発を裏付けるため、シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による完全な非臨床開発プログラムを実施した。

Sprague Dawley ラット及びカニクイザルは、ALGLU の開発及び承認申請に用いられ、rhGAA の非臨床試験動物種として確立されていたことから、毒性学的に適切な動物種と考えられた。ヒトに対するカニクイザル及びラットの GAA 一次アミノ酸配列の相同性はそれぞれ 95.69%及び 82.33%であった（付表 1）。ラット GAA に対するヒト GAA の相同性が低く、ラットへの rhGAA 高用量投与により過敏症／アナフィラキシー反応が引き起こされるため、ラットの試験ではヒトタンパク質に対する潜在的アナフィラキシー及び／又は過敏症反応を防止するためにジフェンヒドラミン塩酸塩（DPH）を前投与した。

医薬品規制調和国際会議（ICH）M3（R2）及び S6（R1）に従い、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いてシパグルコシダーゼ アルファの単回及び 26 週間反復投与毒性試験を実施した。26 週間投与試験では、両試験ともシパグルコシダーゼ アルファを隔週静脈内投与し、4 週間の回復期間を設けた。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与毒性試験で検討した。さらに、シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による、ラット受胎能及び初期胚発生、ラット及びウサギ胚・胎児発生並びにラット出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。その他の試験として、溶血性及び凝集能を in vitro で検討した。

重要な試験は、全て医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施に関する基準（GLP）に従って実施した。シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与のために実施された毒性試験プログラムを表 2.6.6- 1 に示す。

表 2.6.6- 1　　シパグルコシダーゼ アルファ単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与のための毒性試験プログラム

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

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

単回及び反復投与毒性試験では、シパグルコシダーゼ アルファをラットには 10 分間、サルには 2 時間かけて静脈内投与した。単回投与毒性試験では、いずれの動物種においてもシパグルコシダーゼ アルファの最大耐量（MTD）は試験した最高用量の 200 mg/kg であった。

反復投与毒性試験では、臨床での投与方法を考慮し、シパグルコシダーゼ アルファを隔週静脈内投与した。ラット及びカニクイザルにおけるシパグルコシダーゼ アルファの 26 週間反復投与試験では、いずれの動物種でも投与された最高用量（200 mg/kg）まで毒性所見は認められなかった。カニクイザル 13 週間併用投与試験では、ミグルスタットをシパグルコシダーゼ アルファの静脈内投与前に経口投与した。当該試験では、いずれも最高用量のシパグルコシダーゼ アルファ（100 mg/kg）単独及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（100/175 mg/kg）併用投与まで毒性所見は認められなかった。

生殖発生毒性試験では、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隔日投与し、その影響を評価した。ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、性周期、交尾行動及び受胎能に投与に関連した変化は認められなかった。シパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg まで）を単独投与した雌の子宮内検査結果に影響は認められなかった。しかし、ミグルスタット単独（60 mg/kg）又はシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）を併用投与した雌で着床前胚損失率の増加が認められたことから、当該所見はミグルスタット投与に関連すると考えられた。シパグルコシダーゼ アルファの雄親動物及び雌親動物の一般毒性並びに受胎能及び初期胚発生に関する無毒性量（NOAEL）はいずれも 400 mg/kg であった。ミグルスタットの雄親動物及び雌親動物の一般毒性に関する NOAEL はいずれも 60 mg/kg、受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL は 60 mg/kg 未満であった。

ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験では、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与の母動物毒性及び胚・胎児毒性を評価した。ラットの試験では、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、子宮内検査結果並びに胎児の変異及び奇形に投与に関連した所見は観察されなかった。母動物毒性及び胚・胎児発生毒性に対する NOAEL はシパグルコシダーゼ アルファ単独投与で 400 mg/kg、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与で 400/60 mg/kg であった。ウサギの試験の併用投与群で認められた体重増加量及び摂餌量の低下はミグルスタットに関連した所見と思われ、シパグルコシダーゼ アルファには関連しないと考えられた。ミグルスタットは腸管内腔において特に腸管二糖類分解酵素の α-グルコシダーゼ活性阻害を介して糖類の吸収不良を引き起こすことが知られている（Amiri and Naim 2012）。その結果生じる二糖類の蓄積は、浸透圧不均衡、下痢、その他の消化器系の有害作用を誘発し、摂餌量及び体重増加に影響を及ぼす可能性が高い。この知見は、体重増加量及び摂餌量の低下はミグルスタットに関連した所見であるという考察を裏付けている。さらに、併用投与群では、個々の心血管系奇形の有意な増加並びに奇形を有する胎児及び母動物の総数の増加が認められた。これらの胎児の心血管系の奇形は、シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットのそれぞれ単独投与では認められなかったことから、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与により観察された所見と考えられた。ラット胚・胎児発生に関する試験では胎児の心血管系奇形は認められなかったことから、ウサギにおける心血管系所見のヒトへの関連性は不明である。本試験では 1 用量のみの検討であったため、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投

与時の母動物毒性及び胚・胎児毒性に対する NOAEL は算出できなかった。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与の母動物毒性及び胚・胎児毒性に対する NOAEL は 175 mg/kg と考えられた。

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、着床から離乳までシパグルコシダーゼ アルファを単独又はシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタットを併用投与し、妊娠及び授乳期の雌及び児の発生に及ぼす影響を評価した。途中死亡の増加、同腹児全死亡の発現頻度増加並びに一般状態観察における異常歩行及び活動性低下が、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）併用投与群の母動物に認められた。これらの母動物の所見は、被験物質の直接作用ではなく、拘束ストレス及び／又は異種タンパク質投与に対する有害な免疫反応に起因していた。また、同腹児全死亡の発現頻度の軽度増加は、母動物の哺育放棄によると考えられた。この群では、有害でない軽微かつ一過性の、出生児の体重低値も観察された。400 mg/kg までのシパグルコシダーゼ アルファ単独投与では、母動物に毒性所見は認められず、胎児及び出生児の発達パラメータにも、毒性所見は認められなかった。これらの所見に基づき、母動物並びに胎児及び出生児に対する NOAEL はシパグルコシダーゼ アルファ単独及びミグルスタット（60 mg/kg）との併用投与のいずれも 400 mg/kg であった。

シパグルコシダーゼ アルファを用いて in vitro 溶血性及び凝集能試験を実施した。試験した最高濃度 1000 µg/mL まで溶血又は凝集は認められなかった。

以上より、これらの非臨床試験成績は、ポンペ病の次世代治療薬として、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の承認申請を支持している。

2　単回投与毒性試験

ラット及びカニクイザルを用いたシパグルコシダーゼ アルファの単回静脈内投与毒性試験を実施した。これら初期の単回投与毒性試験には雌を選択した。

2.1　シパグルコシダーゼ アルファ

2.1.1　　ラットにおけるシパグルコシダーゼ アルファ単回投与毒性試験

報告書番号：283-0011-TX、添付資料番号：4.2.3.1.1

雌 Sprague Dawley ラット（10 匹／群）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 Day 1 に 10 分間かけて単回静脈内投与し、7 日間にわたり毒性を検討した。投与速度は 1 mL/kg/分とし、溶媒は 2.92 mg/mL 塩化ナトリウム、20 mg/mL マンニトール及び 0.5 mg/mL ポリソルベート 80 を含む 25 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6）とした。さらに、各群 9 匹の雌ラットにシパグルコシダーゼ アルファを同様に投与し、トキシコキネティクス（TK）を評価した。TK 評価結果は Module 2.6.4, Section 3.1.1 に示した。

死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査値及び血液生化学的検査値を評価した。

途中死亡及びシパグルコシダーゼ アルファに関連した一般状態所見は認められなかった。体重及び摂餌量に投薬による影響は認められず、背景値と比較して、投薬に起因した血液学的検査値及び血液生化学的検査値の変動は認められなかった。

本試験では明らかな毒性所見は認められず、MTD は最高用量の 200 mg/kg であった。当該用量におけるシパグルコシダーゼ アルファの最高血漿中濃度（C_{max}）は 4940 µg/mL、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（$AUC_{0\text{-}24h}$）は 9360 µg·h/mL であった。

2.1.2　　カニクイザルにおけるシパグルコシダーゼ アルファ単回投与毒性試験

報告書番号：283-0012-TX、添付資料番号：4.2.3.1.2

雌カニクイザル（2 匹／群）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 Day 1 に橈側皮静脈内に 2 時間かけて投与し、7 日間にわたり毒性を検討した。投与速度は 10 mL/kg/時間とし、溶媒は 2.92 mg/mL 塩化ナトリウム、20 mg/mL マンニトール及び 0.5 mg/mL ポリソルベート 80 を含む 25 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6）とした。

死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査値、血液生化学的検査値及び TK を評価した。TK 評価結果の詳細は Module 2.6.4, Section 3.1.2 に示した。

途中死亡及びシパグルコシダーゼ アルファに関連した一般状態所見は認められなかった。体重及び摂餌量に投薬による影響は認められず、投与前値と比較して、投薬に関連した血液学的検査値及び血液生化学的検査値の変動は認められなかった。

本試験では明らかな毒性所見は認められず、MTD は最高用量の 200 mg/kg であった。当該用量におけるシパグルコシダーゼ アルファの C_{max} は 3520 μg/mL であり、$AUC_{0\text{-}26h}$ は 11400 μg·h/mL であった。

3　反復投与毒性試験

ポンペ病患者に対し予定されている臨床投与法を裏付けるため、雌雄ラット及びカニクイザルを用いて、シパグルコシダーゼ アルファ単独及びミグルスタットとの併用投与による反復投与毒性試験を実施した。ラット又はサルにおける単回投与毒性試験において、シパグルコシダーゼ アルファは 10～200 mg/kg の広範囲の用量で明らかな毒性を示さなかったことから、反復投与毒性試験では 30～200 mg/kg の用量を選択した。

3.1　シパグルコシダーゼ アルファ

3.1.1　ラットにおけるシパグルコシダーゼ アルファ 26 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

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

Sprague Dawley ラットにシパグルコシダーゼ アルファを 0（溶媒）、30、70 又は 200 mg/kg の用量で隔週に 26 週間（13 回）、10 分間かけて尾静脈内投与し、4 週間の回復期間を設定した。溶媒は、2.92 mg/mL 塩化ナトリウム、20 mg/mL マンニトール及び 0.5 mg/mL ポリソルベート 80 を含む 25 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6）とした。本試験では、ヒトタンパク質に対するアナフィラキシー反応及び／又は過敏反応を防ぐために第 2 群を除く全ての群において、2 回目投与（Day 15）から被験物質又は溶媒対照投与の約 10～20 分前に DPH を腹腔内投与した。第 2 群の動物には等量の滅菌注射用水を腹腔内投与した。また、第 2 群を除く全ての群に TK 評価動物を追加した。

試験デザインを表 2.6.6- 2 に示す。

表 2.6.6- 2　　Sprague Dawley ラット 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

Group	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Dose of DPH (IP)	Number of Animals	
					Males	Females
1	IV	0	10	Yes	$10^a + 5^b + 5^c$	$10^a + 5^b + 5^c$
2	IV	0	10	No	10^a	10^a
3	IV	30	10	Yes	$10^a + 5^b + 15^c$	$10^a + 5^b + 15^c$
4	IV	70	10	Yes	$10^a + 5^b + 15^c$	$10^a + 5^b + 15^c$
5	IV	200	10	Yes	$10^a + 5^b + 15^c$	$10^a + 5^b + 15^c$

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; IV = intravenous; IP = intraperitoneal injection; TK = toxicokinetics
a　Main toxicity animals, terminal necropsy on Day 183
b　Main toxicity animals, recovery necropsy on Day 211
c　TK animals, euthanized following final dosing/TK blood draw on Day 169 or 170

一般状態観察、機能観察総合評価（FOB）を用いた神経行動学的機能検査、摂餌量、体重、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査、TK、抗薬物抗体（ADA）及び中和抗体、剖検、臓器重量並びに病理組織学的検査を評価した。TK、ADA 及び中和抗体の評価結果の詳細は Module 2.6.4, Section 3.1.3 に示した。

シパグルコシダーゼ アルファ 30、70 及び 200 mg/kg を隔週で 26 週間静脈内投与したときの忍容性は良好であった。本試験では、投薬に関連した死亡は認められず、一般状態観察、神経行動学的機能検査、摂餌量、体重、体重増加量、眼科学的検査、尿検査、凝固パラメータ、臓器重量並びに剖検及び病理組織学的検査所見に被験物質投与に関連した影響は認められなかった。70 mg/kg 以上の群の雌でグルコース濃度の軽度減少が観察され、200 mg/kg 群の雌で白血球数、リンパ球数及び好塩基球数の軽度上昇が、雄でカルシウム濃度の軽度上昇が観察された。これらの変動は投薬に関連する可能性が示唆されたが、変化の程度は概して小さく、関連する病理組織学的変化も認められなかったことから、毒性学的に意義のあるものではないと考えられた。

以上のとおり、本試験の条件下では、シパグルコシダーゼ アルファの 200 mg/kg までの 26 週間静脈内投与で、Sprague Dawley ラットに毒性所見は観察されず、NOAEL は最高用量の 200 mg/kg であった。NOAEL における Day 169 でのシパグルコシダーゼ アルファ（総タンパク質量）の 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 21150 µg·h/mL、C_{max} は 5490 µg/mL であった（雌雄合算値）。

3.1.2　カニクイザルにおけるシパグルコシダーゼ アルファ 26 週間反復投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

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

カニクイザルにシパグルコシダーゼ アルファを 0（溶媒）、30、60 又は 200 mg/kg の用量で隔週に 26 週間（13 回）、2 時間かけて静脈内投与し、4 週間の回復期間を設定した。溶媒は、2.92 mg/mL 塩化ナトリウム、20 mg/mL マンニトール及び 0.5 mg/mL ポリソルベート 80 を含む 25 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6）とした。

試験デザインを表 2.6.6- 3 に示す。

表 2.6.6- 3　　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

Group	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose Volume (mL/kg)	Number of Animals	
					Males	Females
1	2-hour IV infusion	0	0	10	4[a] + 2[b]	4[a] + 2[a]
2	2-hour IV infusion	30	3	10	4[a] + 2[b]	4[a] + 2[b]
3	2-hour IV infusion	60	6	10	4[a] + 2[b]	4[a] + 2[b]
4	2-hour IV infusion	200	20	10	4[a] + 2[b]	4[a,c] + 2[b]

Abbreviations: IV = intravenous
a　Terminal necropsy on Day 183
b　Recovery necropsy on Day 211
c　Animal 37, group 4 (female); unscheduled necropsy on Day 128

一般状態観察、詳細な観察、摂餌量、体重、心電図（ECG）、血圧、眼科学的検査、呼吸数、尿検査、血液学的検査、血液凝固系検査、血液ガス分析、血液生化学的検査、TK、ADA 及び中和抗体、剖検、臓器重量、病理組織学的検査を評価した。TK、ADA 及び中和抗体の評価結果の詳細は Module 2.6.4, Section 3.1.4 に示した。

200 mg/kg 群の雌 1 匹を投薬に関連しない自傷行為のために Day 128 に早期屠殺した。その他の動物は全て計画屠殺時まで生存した。

一般状態観察、詳細な観察、摂餌量、体重、ECG 及び血圧パラメータ、眼科学的検査、呼吸数、尿検査、血液学的検査、血液凝固系検査、血液ガス分析、血液生化学的検査、剖検、臓器重量並びに病理組織学的検査にシパグルコシダーゼ アルファ投与に関連した所見は認められなかった。

以上のとおり、シパグルコシダーゼ アルファ投与に関連した毒性所見は確認されなかったことから、NOAEL は試験した最高用量である 200 mg/kg であった。NOAEL における Day 169 でのシパグルコシダーゼ アルファ（総タンパク質量）の $AUC_{0\text{-}t}$ は 25000 µg·h /mL、C_{max} は 4205 µg/mL であった（雌雄合算値）。

3.2　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与

3.2.1　カニクイザルにおけ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による 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

シパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用し、カニクイザルに 13 週間隔週（7 回）投与した。試験デザインを表 2.6.6- 4 に示す。

表 2.6.6- 4　　カニクイザル 13 週間反復投与毒性試験の試験デザイン

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Number of Animals (Male/Female)
1	control article/vehicle[a]	IV infusion	0	0	4/4
2	cipaglucosidase alfa	IV infusion	50	5	4/4
	miglustat [b]	PO	25	2.5	
3	cipaglucosidase alfa	IV infusion	100	10	4/4
	miglustat [b]	PO	175	17.5	
4	miglustat [b]	PO	175	17.5	4/4
5	cipaglucosidase alfa	IV infusion	100	10	4/4

Abbreviations: IV = intravenous; PO=per os; USP = United States Pharmacopeia
a: 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 (Formulation Buffer)
b: Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

シパグルコシダーゼ アルファは 2 時間かけて静脈内投与し、ミグルスタットは経口投与した。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群にはそれぞれ 50/25 mg/kg（第 2 群）又は 100/175 mg/kg（第 3 群）のシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタットを投与した。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与群（第 5 群）には 100 mg/kg のシパグルコシダーゼ アルファを、ミグルスタット単独投与群（第 4 群）には 175 mg/kg のミグルスタットをそれぞれ投与した。第 2 群及び第 3 群ではシパグルコシダーゼ アルファの投与開始 30 分前にミグルスタットを投与した。投与容量はいずれも 10 mL/kg とした。

一般状態観察、詳細な観察、理学的検査、摂餌量、体重、ECG、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査、TK、ADA 及び中和抗体、剖検、臓器重量、病理組織学的検査を評価した。TK、ADA 及び中和抗体の評価結果の詳細は Module 2.6.4, Section 3.2.6 に示した。

全動物が計画屠殺時（Day 99、最終投与 14 日後）まで生存した。一般状態観察、詳細な観察、理学的検査、摂餌量、体重、ECG パラメータ及び眼科学的検査にシパグルコシダーゼ アルファ、ミグルスタット又はそれらの併用投与に関連した所見は認められなかった。同様に、尿検査、血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査においてシパグルコシダーゼ アルファ、ミグルスタット又はそれらの併用投与に関連した所見は認められなかった。

以上のとおり、被験物質に関連した毒性所見は確認されなかったことから、本試験におけるシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は、ミグルスタット併用の有無にかかわらず試験した最高用量である 100 mg/kg であった。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与時の NOAEL における Day 85 のシパグルコシダーゼ アルファ（総タンパク質量）の $AUC_{0\text{-}t}$ は 7810 µg·h/mL、C_{max} は 2015 µg/mL であった（雌雄合算値）。ミグルスタット 175 mg/kg と併用時の Day 85 のシパグルコシダーゼ アルファ（総タンパク質量）の $AUC_{0\text{-}t}$ は 13850 µg·h/mL、C_{max} は 2270 µg/mL であった（雌雄合算値）。

また、本試験におけるミグルスタットの NOAEL は、シパグルコシダーゼ アルファ併用の有無にかかわらず、試験した最高用量である 175 mg/kg であった。ミグルスタット単独投与時の NOAEL における Day 85 のミグルスタットの $AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max} はそれぞれ 204000 ng·h/mL 及び 14700 ng/mL であり、シパグルコシダーゼ アルファ 100 mg/kg との併用投与時ではそれぞれ 216000 ng·h/mL 及び 22000 ng/mL であった（雌雄合算値）。

4　遺伝毒性試験

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

5　がん原性試験

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

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

6　生殖発生毒性試験

6.1　シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与

6.1.1　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

シパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用投与し、受胎能及び初期胚発生に対する被験物質投与の影響を評価した。Sprague Dawley ラットに、雄は交配 28 日前から 6 週間、雌は交配 14 日前から妊娠 7 日まで被験物質を隔日投与した。シパグルコシダーゼ アルファは 10 分間かけて静脈内投与し、ミグルスタットはシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。雌は妊娠 13 日に剖検し、子宮内検査を実施した。

雌受胎能（コホート A）及び雄受胎能（コホート B）評価のための試験デザインをそれぞれ表 2.6.6- 5 及び表 2.6.6- 6 に示す。さらに、TK 評価（コホート C）のための試験デザインを表 2.6.6- 7 に示す。

表 2.6.6- 5　　ラット受胎能及び初期胚発生試験の試験デザイン
- コホート A（雌受胎能）

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH [c]	Number of Animals (Male[a]/Female)
1	vehicle control [b]	IV	0	0	No	22/22
2	vehicle control	IV	0	0	Yes	22/22
3	vehicle control	IV	0	0	Yes	22/22
	miglustat [d]	PO	60	6.0		
4	cipaglucosidase alfa	IV	70	3.5	Yes	22/22
5	cipaglucosidase alfa	IV	150	7.5	Yes	22/22
6	cipaglucosidase alfa	IV	400	20	Yes	22/22
7	cipaglucosidase alfa	IV	400	20	Yes	22/22
	miglustat [d]	PO	60	6.0		

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; IV = intravenous; PO = per os; USP = United States Pharmacopeia

a　Males were treatment naïve.

b　Group 1 females: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion every other day beginning at least 14 days prior to pairing, and on GD 1, 3, 5, and 7.

c　Groups 2 through 7 females: DPH oral antihistamine (10 mL/kg) administered at 90 minutes ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on the second dose administration, and continuing every other day until the last dose administration.

d　Groups 3 and 7 females: Oral miglustat (60 mg/kg) administered 30 minutes ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) every other day beginning at least 14 days prior to pairing until confirmation of mating, and then on GD 1, 3, 5, and 7. Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

表 2.6.6- 6　　ラット受胎能及び初期胚発生試験の試験デザイン
- コホート B（雄受胎能）

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH [c]	Number of Animals (Male/Female[a])
1	vehicle control [b]	IV	0	0	No	22/22
2	vehicle control	IV	0	0	Yes	22/22
3	vehicle control	IV	0	0	Yes	22/22
	miglustat [d]	PO	60	6.0		
4	cipaglucosidase alfa	IV	70	3.5	Yes	22/22
5	cipaglucosidase alfa	IV	150	7.5	Yes	22/22
6	cipaglucosidase alfa	IV	400	20	Yes	22/22
7	cipaglucosidase alfa	IV	400	20	Yes	22/22
	miglustat [d]	PO	60	6.0		

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; IV = intravenous; PO = per os; USP = United States Pharmacopeia
a　Females were treatment naïve.
b　Group 1 males: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning at least 28 days prior to pairing and continuing every other day through the day up to and including the day prior to termination.
c　Groups 2 through 7 males: DPH oral antihistamine (10 mL/kg) administered at 90 minutes ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on the second dose administration and continuing every other day until the last dose administration.
d　Groups 3 and 7 males: Oral miglustat (60 mg/kg) administered 30 minutes ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning at least 28 days prior to pairing and continuing every other day for 6 weeks. Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

表 2.6.6- 7　　ラット受胎能及び初期胚発生試験の試験デザイン
- コホート C（TK 評価）

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL) [c]	Dose of DPH [a]	Number of Animals (Male/Female)
8	vehicle control	IV	0	0	Yes	6/6
	miglustat [b]	PO	60	6.0		
9	cipaglucosidase alfa	IV	400	13.34	Yes	6/6
10	cipaglucosidase alfa	IV	400	13.34	Yes	12/12
	miglustat [b]	PO	60	6.0		

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; IV = intravenous; PO = per os; USP = United States Pharmacopeia
a　Groups 8 through 10: DPH oral antihistamine (10 mL/kg) administered 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on the second dose administration and continuing every other day until the last dose administration.
b　Groups 8 and 10: Oral miglustat (60 mg/kg,) administered 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa). Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.
c　Dose volume for cipaglucosidase alfa drug substance is 30 mL/kg.

死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、性周期、交尾行動、剖検及び子宮内検査所見を評価した。さらに、コホート B の雄で精子検査を実施した。TK 評価結果の詳細は Module 2.6.4, Section 3.2.7 に示した。

コホート A の雌 6 匹［第 2 群の 1 匹（妊娠 1 日）、第 4 群の 2 匹（交配前 12 日）、第 5 群の 1 匹（妊娠 7 日）及び第 7 群の 2 匹（交配前 6 及び 8 日）］が投与後に死亡した。いずれの動物に

も死亡前に一般状態観察において所見は認められなかった。雌 2 匹［第 7 群の 2 匹（交配前 6 及び 8 日）］は、剖検時に暗赤色肺を認めた。当該所見は、ヒト以外の動物種（ラット）に遺伝子組換えヒト酵素を反復投与したことによる有害な免疫反応である可能性が考えられた（Khanna et al. 2012）。残りの死亡動物には剖検所見が認められず、一般状態悪化や体重及び摂餌量の変化も認められなかった。

コホート B の雄 8 匹［第 2 群の 1 匹（交配前 8 日）、第 4 群の 4 匹（交配前 2、4、6 及び 8 日）、第 5 群の 1 匹（交配前 4 日）及び第 7 群の 2 匹（交配前 0 及び 6 日）］が投与後に死亡した。これらの動物にシパグルコシダーゼ アルファ又はミグルスタットに関連した剖検所見は認められなかった。死因は不明であった。雄 2 匹（第 2 及び 5 群の各 1 匹）のそれぞれ交配前 16 及び 22 日に不適切な投与が行われたためこれらの動物は試験から除外した。

コホート C の雌 4 匹［第 10 群の 4 匹（交配前 8 日）］が投与後に死亡した。これらの動物には死亡前に一般状態観察及び体重に有害所見は認められなかった。うち 3 匹の剖検において暗赤色肺が観察されたことから、ヒト酵素の反復投与による有害な免疫反応によるシパグルコシダーゼ アルファ投与に関連した死亡と考えられた。第 9 群の雌 1 匹を、全身状態悪化のため妊娠 1 日に屠殺した。当該動物の体重又は摂餌量に有害な所見は認められず、剖検所見も観察されなかったことから、死亡はシパグルコシダーゼ アルファに関連したものではないと考えられた。

雌雄ともに、一般状態観察並びに体重及び体重増加量に被験物質に関連した変化は認められなかった。コホート A の第 6 及び 7 群の雌では、妊娠期間中、シパグルコシダーゼ アルファに関連するとみられる摂餌量低下が散見されたが、体重への影響はみられず、毒性とはみなさなかった。

計画屠殺時まで生存した動物に、被験物質に関連した剖検所見は認められなかった。

性周期（回数及び期間）、交尾率、受胎率、妊娠率及び精子検査所見に被験物質に関連した変化は認められなかった。

コホート A の雌の子宮内検査では、第 1 及び 2 群と比較して第 7 群で着床前胚損失率の有意な増加が認められた。第 3 群でも同様の着床前胚損失率の増加（統計学的有意差なし）が認められたことから、本所見はミグルスタットに関連したものと考えられた。子宮内検査結果にシパグルコシダーゼ アルファに関連した毒性所見は認められなかった。コホート B の雌の子宮内検査結果に被験物質に関連した影響は認められなかった。

以上のとおり、シパグルコシダーゼ アルファに関連した死亡が、コホート A の第 7 群の雌 2 匹（交配前 6 及び 8 日、それぞれ投与 4 及び 5 回目に相当）及びコホート C の第 10 群の雌 4 匹（交配前 8 日、投与 5 回目に相当）で観察された。しかしながら、これらの死亡は、ヒト以外の動物種（ラット）に遺伝子組換えヒト酵素を投与したことによる免疫反応に関連する可能性が高いと考えられた。さらに、コホート A の第 3 及び 7 群の雌でミグルスタットに関連するとみられる着床前胚損失率の増加が認められた。

着床前胚損失率を除き、性周期、交尾行動、受胎能並びに精子運動性及び精子濃度を含む生殖能に被験物質に関連した毒性所見は認められなかった。

これらのデータに基づくと、シパグルコシダーゼ アルファの雄親動物及び雌親動物の一般毒性並びに受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL はいずれも 400 mg/kg であった。シパグルコシ

ダーゼ アルファ（400 mg/kg）単独投与時の $AUC_{0\text{-}24h}$（総タンパク質量）は 55100 µg·h/mL（Day 28 の雄）及び 38400 µg·h/mL（妊娠 7 日の雌）であり、ミグルスタット（60 mg/kg）との併用投与時では 62950 µg·h/mL（Day 28 の雄）及び 38050 µg·h/mL（妊娠 7 日の雌）であった。

ミグルスタットの雄親動物及び雌親動物の一般毒性に関する NOAEL はいずれも 60 mg/kg、受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL は 60 mg/kg 未満であった。ミグルスタット（60 mg/kg）単独投与時の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 27600 ng·h/mL（Day 28 の雄）及び 31400 ng·h/mL（妊娠 7 日の雌）であり、シパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg）との併用投与時の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 96000 ng·h/mL（Day 28 の雄）及び 87600 ng·h/mL（妊娠 7 日の雌）であった。

6.1.2　胚・胎児発生に関する試験

6.1.2.1　ラットにおける胚・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

胚・胎児発生に関する試験の用量を設定するために、ラット胚・胎児発生用量設定試験を実施し、母動物毒性及び胚・胎児毒性を検討した。妊娠ラットの器官形成期（妊娠 6～18 日）にシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用し、隔日投与した。

シパグルコシダーゼ アルファ（30、70 及び 150 mg/kg）を約 10 分間かけて静脈内投与し、ミグルスタット（12.5 mg/kg）はシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した。

試験デザインを表 2.6.6- 8（コホート 1）及び表 2.6.6- 9（コホート 2）に示す。コホート 1 の最高用量投与において、予想される臨床曝露量の 10 倍に達しなかったため、コホート 2（シパグルコシダーゼ アルファ投与量：300 及び 600 mg/kg）を追加した。

本試験ではシパグルコシダーゼ アルファの TK 評価を実施した。TK 評価結果の詳細は、Module 2.6.4, Section 3.2.8 に示した。

表 2.6.6- 8　　ラット胚・胎児発生用量設定試験の試験デザイン（コホート 1）

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH[b]	Number of Females	
						for Toxicity	for TK
1	vehicle control [a, d]	IV	0	0	No	6	3
2	vehicle control [d]	IV	0	0	Yes	6	3
3	vehicle control [d]	IV	0	0	Yes	6	3
	miglustat [c]	PO	12.5	1.25			
4	cipaglucosidase alfa [d]	IV	30	3	Yes	6	6
5	cipaglucosidase alfa [d]	IV	70	7	Yes	6	6
6	cipaglucosidase alfa [d]	IV	150	15	Yes	6	6
7	cipaglucosidase alfa [d]	IV	150	15	Yes	6	6
	miglustat [c]	PO	12.5	1.25			

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; IV = intravenous; PO = per os; TK = toxicokinetics; USP = United States Pharmacopeia

a　Group 1: 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18.

b　Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg approximately 90 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every-other-day through GD 18.

c　Groups 3 and 7: Oral miglustat (12.5 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg at 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18. Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

d　Vehicle control or cipaglucosidase alfa dose volume: 10 mL/kg

表 2.6.6- 9　　ラット胚・胎児発生用量設定試験の試験デザイン（コホート 2）

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH[b]	Number of Females	
						for Toxicity	for TK
8	vehicle control [a, c]	IV	0	0	Yes	6	3
9	cipaglucosidase alfa [c]	IV	300	15	Yes	2	3
10	cipaglucosidase alfa [c]	IV	600	30	Yes	2	3

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; IV = intravenous; TK = toxicokinetics

a　Group 8: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18.

b　Group 8 through 10: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg approximately 90 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every-other-day through GD 18.

c　Vehicle control or cipaglucosidase alfa dose volume: 20 mL/kg

2 匹（第 9 及び 10 群の各 1 匹）が妊娠 8 日（2 回目投与後）に死亡した。死亡前の一般状態観察及び剖検に所見は認められなかった。コホート 2 の動物数が少なく、また各群 1 匹の死亡であったため、これらの死亡がシパグルコシダーゼ アルファ投与に関連するかどうかは不明確であった。

一般状態観察では、活動性低下が、コホート 1 の第 7 群の 1 匹（妊娠 16 日のミグルスタット投与後観察期間中）及びシパグルコシダーゼ アルファを投与したコホート 1（第 4、5、6 及び 7 群）の全動物（妊娠 14 日以降のシパグルコシダーゼ アルファ投与後観察期間中）に観察され

た。コホート 2 のシパグルコシダーゼ アルファ投与群（第 9 及び 10 群）では、活動性低下、運動失調、呼吸音異常又は努力性呼吸、低姿勢、瞳孔散大が認められたが、これらの一般状態は、妊娠 14 及び 16 日の活動性低下を除き、投与後の観察期間中に全て消失した。これらの一般状態は、ヒト以外の動物種にヒト酵素を投与したことによる有害な免疫反応であると考えられ、シパグルコシダーゼ アルファの薬理作用とは関連しないと考えられた。

体重、体重増加量又は摂餌量に被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

剖検では、コホート 1 の各群 1～2 匹（第 4、5 及び 6 群）のシパグルコシダーゼ アルファ単独投与動物の肝臓に、点状の黄斑が認められたが、低頻度で用量依存性を伴わず、コホート 2 には認められなかった。コホート 2 では、第 9 群の 1 匹に子宮及び膣内に茶褐色の液貯留が認められたが、高用量群では認められなかったことから、被験物質に関連した変化ではないと考えられた。

子宮内検査では、コホート 2 の第 10 群において補正胎児体重が約 10%減少した。動物数が少ないことから、本所見の被験物質投与との関連性は不明確であった。他の子宮内検査パラメータは、いずれも対照群と同程度であった。外表奇形及び変異は認められなかった。

以上のとおり、ミグルスタット投与に関連した影響は認められなかった。第 9 及び 10 群の各 1 匹が妊娠 8 日の投与後に死亡したが、これらの死亡は動物数が少なかったことからシパグルコシダーゼ アルファ投与に関連するかどうかは不明確であった。シパグルコシダーゼ アルファ投与に関連した影響として母動物の一般状態観察に神経学的影響が観察された（第 4、5、6、7、9、10 群）。これらの所見は、ヒト以外の動物種にヒト酵素を投与したことにより生じる有害な免疫反応と考えられ、シパグルコシダーゼ アルファの薬理作用とは関連がないと考えられた。その他の母動物への影響は認められなかった。コホート 2 の第 10 群の動物では、胎児体重の約 10%の減少が認められたが、動物数が少なかったため、この所見の意義は不確かであった。

6.1.2.2　　ラットにおける胚・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

妊娠ラットの器官形成期（妊娠 6～18 日）にシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用し、隔日投与したときの潜在的な母動物毒性及び胚・胎児毒性を評価した。シパグルコシダーゼ アルファ（70、150 及び 400 mg/kg）を隔日で 10 分間点滴静脈内投与した。ミグルスタット（60 mg/kg）はシパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与開始 30 分前に経口投与した。ヒト以外の動物種にヒトタンパク質を投与することにより生じる可能性のある有害な免疫反応を抑制するために、妊娠 8 日（2 回目投与）から妊娠 18 日まで DPH をシパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与の約 90 分前に経口投与した。

試験デザインを表 2.6.6- 10 に示す。死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、剖検、子宮内検査及び胎児検査所見を評価した。サテライト動物から血液サンプルを採取し、シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの TK を評価した。TK 評価結果の詳細は、Module 2.6.4, Section 3.2.9 に示した。

表 2.6.6- 10　　ラット胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)[d]	Dose of DPH[b]	Number of Females	
						for Toxicity	for TK
1	vehicle control[a]	IV	0	0	No	22	3
2	vehicle control	IV	0	0	Yes	22	3
3	vehicle control	IV	0	0	Yes	22	9
	miglustat[c]	PO	60	6.0			
4	cipaglucosidase alfa	IV	70	3.5	Yes	22	9
5	cipaglucosidase alfa	IV	150	7.5	Yes	22	9
6	cipaglucosidase alfa	IV	400	20	Yes	22	9
7	cipaglucosidase alfa	IV	400	20	Yes	22	12
	miglustat[c]	PO	60	6.0			

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; IV = intravenous; PO = per os; TK = toxicokinetics; USP = United States Pharmacopeia

a　Group 1: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18.

b　Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) administered 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every other day through GD 18.

c　Groups 3 and 7: Oral miglustat (60 mg/kg) administered 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18. Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

d　Vehicle control or cipaglucosidase alfa dose volume: 20 mL/kg, miglustat dose volume: 10 mL/kg

第 4 群の 1 匹が妊娠 14 日（5 回目投与後）に死亡し、第 7 群の 2 匹が妊娠 6 及び 8 日（それぞれ 1 及び 2 回目）の投与後に死亡した。2 回目投与以降に死亡した第 4 及び 7 群の動物の死因は、ヒト以外の動物種におけるヒト酵素の投与によるアナフィラキシー様反応であり、被験物質に関連した可能性があると考えられた。シパグルコシダーゼ アルファの 1 回目投与後に死亡した第 7 群の動物の死因は、免疫反応には関連しないと考えられ、投与中の技術的ミスに起因する可能性がある。その他の動物はいずれも計画屠殺時まで生存した。

一般状態観察、体重、体重増加量及び摂餌量に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

母動物の剖検では、被験物質に関連した所見として、第 7 群の 2 匹（死亡動物）に肺葉の暗赤色化が認められた。第 4 群の 2 匹及び第 7 群の 1 匹に肝葉の黄色／黄褐色化が観察された。これらの所見はシパグルコシダーゼ アルファ投与群でのみ認められたことから、シパグルコシダーゼ アルファに対するアナフィラキシー様反応と関連していた可能性がある。しかし、所見に用量依存性はみられなかった。

子宮内検査に被験物質に関連した所見は認められず、胎児検査に被験物質に関連した胎児の外表、内臓又は骨格の変異や奇形は認められなかった。

以上のとおり、3 匹（第 4 群の 1 匹及び第 7 群の 2 匹）の動物がそれぞれ妊娠 14 並びに 6 及び 8 日の投与後に死亡した。妊娠 8 日に死亡した動物に観察された肺葉の暗赤色化は、遺伝子組換えヒトタンパク質に対する有害な免疫反応に関連すると考えられた。妊娠 6 日に死亡した動物の死因は特定できなかった。被験物質投与に関連した一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌

量、子宮内検査所見並びに胎児の奇形及び変異は認められなかった。これらの成績に基づくと、母動物及び胚・胎児発生に対するシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は単独及びミグルスタットとの併用投与のいずれも 400 mg/kg であった。単独投与時の NOAEL における妊娠 18 日のシパグルコシダーゼ アルファの $AUC_{0\text{-}24h}$（総タンパク質量）は 27100 µg·h/mL であった。併用投与時の NOAEL における妊娠 18 日のシパグルコシダーゼ アルファの $AUC_{0\text{-}24h}$ は 28850 µg·h/mL であった。

ミグルスタット 60 mg/kg 単独投与時の NOAEL における妊娠 18 日の $AUC_{0\text{-}24h}$ は 41100 ng·h/mL であり、シパグルコシダーゼ アルファ 400 mg/kg との併用投与時では 84300 ng·h/mL であった。

6.1.2.3　ウサギにおける胚・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

胚・胎児発生に関する試験の用量を設定するために、ウサギ胚・胎児発生用量設定試験を実施し、母動物毒性及び胚・胎児毒性を評価した。妊娠ウサギの器官形成期（妊娠 7～19 日）にシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用し、隔日投与した。

シパグルコシダーゼ アルファは約 10 分かけて静脈内投与し、シパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与開始 30 分前にミグルスタットを経口投与した。ヒト以外の動物種にヒトタンパク質を投与することにより生じる可能性のある有害な免疫反応を抑制するために、妊娠 9 日（2 回目投与）から妊娠 19 日まで DPH をシパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与の約 90 分前に経口投与した。

試験デザインを表 2.6.6- 11 に示す。本試験ではシパグルコシダーゼ アルファの TK 評価を実施した。TK 評価結果の詳細は、Module 2.6.4, Section 3.2.11 に示した。

表 2.6.6- 11　　ウサギ胚・胎児発生用量設定試験の試験デザイン

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH[b]	Number of Females
1	vehicle control [a, d]	IV	0	0	No	6
2	vehicle control [d]	IV	0	0	Yes	6
3	vehicle control [d]	IV	0	0	Yes	6
	miglustat [c]	PO	25	2.5		
4	cipaglucosidase alfa [d]	IV	30	3	Yes	6
5	cipaglucosidase alfa [d]	IV	70	7	Yes	6
6	cipaglucosidase alfa [d]	IV	150	15	Yes	6
7	cipaglucosidase alfa [d]	IV	150	15	Yes	6
	miglustat [c]	PO	25	2.5		

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; IV = intravenous; PO = per os; USP = United States Pharmacopeia

a　Group 1: 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19.

b　Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg approximately 90 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 9 and continuing every-other-day through GD 19.

c　Groups 3 and 7: Oral miglustat (25 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg at 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19. Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

d　Vehicle control or cipaglucosidase alfa dose volume: 10 mL/kg

第 7 群の 1 匹を妊娠 21 日に一般状態悪化のため切迫屠殺した。当該動物は、一般状態観察において糞がほとんど認められず、妊娠 7 日以降、体重が約 5.3%減少し、11 日間連続して摂餌量が 1 日 60 g 以下であった。

母動物の一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、剖検所見に被験物質に関連した影響は認められなかった。

子宮内検査結果に被験物質に関連した影響はみられず、外表奇形及び変異も認められなかった。

以上のとおり、いずれの群においても被験物質投与に関連する影響は認められなかった。

6.1.2.4　　ウサギにおける胚・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

妊娠ウサギの器官形成期（妊娠 7～19 日）にシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットとの併用で隔日投与し、母動物毒性及び胚・胎児毒性を評価した。シパグルコシダーゼ アルファ（30、70 及び 175 mg/kg）を隔日で 10 分間静脈内投与し、ミグルスタット（25 mg/kg）は、シパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与開始 30 分前に経口投与した。ヒト以外の動物種にヒトタンパク質を投与することにより生じる可能性のある有害な免疫反応を抑制するために、妊娠 9 日（2 回目投与）から妊娠 19 日まで DPH（10 mg/kg）をシパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与の約 90 分前に経口投与した。

試験デザインを表 2.6.6- 12 に示す。毒性評価は、死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、剖検、子宮内検査及び胎児検査所見に基づいて行われた。血液サンプルを採取し、シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの TK を評価した。TK 評価結果の詳細は、Module 2.6.4, Section 3.2.12 に示した。

表 2.6.6- 12　　ウサギ胚・胎児発生に関する試験の試験デザイン

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH[b]	Number of Females
1	vehicle control [a, d]	IV	0	0	No	20
2	vehicle control [d]	IV	0	0	Yes	20
3	vehicle control [d]	IV	0	0	Yes	20
	miglustat [c]	PO	25	2.5		
4	cipaglucosidase alfa [d]	IV	30	3	Yes	20
5	cipaglucosidase alfa [d]	IV	70	7	Yes	20
6	cipaglucosidase alfa [d]	IV	175	17.5	Yes	20
7	cipaglucosidase alfa [d]	IV	175	17.5	Yes	20
	miglustat [c]	PO	25	2.5		

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; IV = intravenous; PO = per os; USP = United States Pharmacopeia

a　Group 1: 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19.

b　Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg approximately 90 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 9 and continuing every-other-day through GD 19.

c　Groups 3 and 7: Oral miglustat (25 mg/kg) dosed at a volume of 10 mL/kg at 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19. Miglustat was prepared in Sterile Water for Injection, USP.

d　Vehicle control or cipaglucosidase alfa dose volume: 10 mL/kg

第 7 群の 1 匹が妊娠 21 日に流産した。原因は摂餌量低下と考えられた。その他の動物はいずれも計画屠殺時まで生存した。一般状態観察に被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

いずれの群でも絶対体重に変化はみられなかった。第 3 及び 7 群の投与期間（妊娠 7～20 日）中及び全妊娠期間（妊娠 7～29 日）中の体重増加量が、第 1 及び／又は 2 群と比較して低下した。第 3 群及び第 7 群の体重増加は同様のパターンを示し、有意差はなかったことから、第 3 及び 7 群で観察された体重増加量の低下はシパグルコシダーゼ アルファではなく、ミグルスタットに関連することが示唆された。

第 3 及び 7 群の妊娠 11～25 日の摂餌量が、第 1 及び／又は 2 群と比較して有意に低下した（第 3 群の妊娠 20～21 日を除く）。妊娠 17～21 日で第 3 群と比較して第 7 群で有意な摂餌量低下を認めた以外、第 3 及び 7 群間に有意差はなかった。これらのデータから、第 3 及び 7 群で観察された摂餌量低下は、主にシパグルコシダーゼ アルファではなく、ミグルスタットに関連することが示唆された。

母動物の剖検所見に投与に関連した影響は認められなかった。

子宮内検査所見に投与に関連した影響は認められなかった。

胎児検査では、胎児の外表又は骨格検査に被験物質に関連した変異及び奇形は認められなかった。溶媒対照群（第 1 及び 2 群）と比較して、併用群（第 7 群）の胎児において、個々の心血管系奇形（肺動脈幹閉鎖、心室中隔欠損及び大動脈弓拡張）の発現頻度及び奇形の総発現頻度に増加が認められた。また、第 7 群の胎児では、内臓変異として肺動脈幹狭窄の発現頻度が対照群と比較して増加した。これらの所見は被験物質と関連があると考えられた。

ミグルスタット単独投与（第 3 群）と比較して、第 7 群で奇形を有する胎児数の増加が認められたが、これは心血管系奇形の増加に起因した。第 3 群（ミグルスタット単独投与）及び第 6 群（高用量シパグルコシダーゼ アルファ単独投与）の母動物の胎児に被験物質投与に関連した心血管系奇形は認められなかったことから、第 7 群の胎児に認められた心血管系奇形の増加は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与によるものと考えられた。

以上のとおり、第 1 及び／又は 2 群と比較して、第 3 群及び第 7 群に有意な体重増加抑制及び摂餌量低下が認められた。第 4、5 及び 6 群に体重増加量及び摂餌量への影響がみられなかったことから、第 3 及び 7 群で観察された体重増加量及び摂餌量低下は、主にシパグルコシダーゼ アルファではなく、ミグルスタットに関連すると考えられた。個々の心血管系奇形発現頻度、奇形を伴う胎児数及び母動物数の増加が第 7 群で認められたが、第 3 及び 6 群では認められなかった。したがって、これらの胎児の奇形及び変異は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与に起因するものであった。これらの成績に基づくと、シパグルコシダーゼ アルファ単独投与の母動物毒性及び胚・胎児毒性に対する NOAEL は最高用量の 175 mg/kg と考えられた。ミグルスタット及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は 1 用量のみの検討であったため、NOAEL は算出できなかった。シパグルコシダーゼ アルファ単独投与時の NOAEL における妊娠 19 日のシパグルコシダーゼ アルファの $AUC_{0\text{-}24h}$（総タンパク質量）は 11550 µg·h/mL であった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（175/25 mg/kg）併用投与時の妊娠 19 日のシパグルコシダーゼ アルファの $AUC_{0\text{-}24h}$ は 22550 µg·h/mL であった。

ミグルスタット 25 mg/kg 単独投与時の妊娠 19 日の $AUC_{0\text{-}t}$ は 39100 ng·h/mL であり、シパグルコシダーゼ アルファ 175 mg/kg との併用投与時では 66100 ng·h/mL であった。

6.1.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

報告書番号：8371932、添付資料番号：4.2.3.5.3.1

シパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用し、着床から離乳まで投与したときの妊娠及び授乳期の雌ラット及び児の発生に及ぼす影響を評価した。シパグルコシダーゼ アルファを約 10 分間、妊娠 6 日～授乳 19 日まで隔日で静脈内投与し、シパグルコシダーゼ アルファ静脈内投与開始 30 分前にミグルスタットを経口投与した。また、授乳 13 日目に血中及び乳汁中のシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタット濃度を測定した。

試験デザインを表 2.6.6- 13 に示す。毒性評価は、死亡、一般状態観察、体重、摂餌量、剖検、分娩、児動物の生存率、成長及び成熟、交配、受胎能、神経行動学的評価並びに子宮内検査所見に基づいて行われた。TK 評価の詳細は、Module 2.6.4, Section 3.2.10 に示した。

表 2.6.6- 13　　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験の試験デザイン

Group	Test Article	Dose Route	Dose Level (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Dose of DPH[a]	Number of Females
Toxicity Animals						
1	vehicle control[c]	IV	0	0	No	24
2	vehicle control[c]	IV	0	0	Yes	24
3	vehicle control[c]	IV	0	0	Yes	24
	miglustat	PO	60	6.0		
4	cipaglucosidase alfa[c]	IV	70	2.3	Yes	24
5	cipaglucosidase alfa[c]	IV	150	5.0	Yes	24
6	cipaglucosidase alfa[c]	IV	400	13.3	Yes	24
7	cipaglucosidase alfa[c]	IV	400	13.3	Yes	30 [b]
	miglustat	PO	60	6.0		
Toxicokinetic Animals						
8	cipaglucosidase alfa[c]	IV	400	13.3	Yes	3
	miglustat	PO	60	6.0		
9	Non-Treated (Naïve)	NA	NA	NA	No	6

Abbreviations: DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable
Animals were dosed every other day during the GD 6 to LD 19 dosing interval.
a　DPH dose level was 10 mg/kg.
b　Due to the increase in deaths in Group 7, six additional time-mated animals were added to the study.
c　Dose volume of 30 mL/kg.

合計 11 匹の母動物が死亡又は切迫屠殺された（第 1、2、3、4、5、6 及び 7 群で、それぞれ 1、0、1、3、1、1 及び 4 匹）。これらの動物の大部分は、拘束下での投与中又は投与直後に死亡し、多くの場合、一般状態観察に異常所見は認められなかった。死亡動物のうち、第 3 群の 1 匹では、投与中の身悶え、側臥位、口及び鼻からの分泌物などが認められた。第 7 群の 1 匹では活動性低下、半眼、被毛粗剛、体温低下及び努力性呼吸が観察された。第 4～6 群の途中死亡の発生率は、用量依存性がなく、シパグルコシダーゼ アルファに関連しないと考えられた。第 3 群と比較して、第 7 群で途中死亡動物数が高値であった。死亡数増加の理由は不明であるが、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与に関連した拘束ストレスの増加又は有害な免疫反応の可能性がある。げっ歯類では、異種タンパク質に対する有害な免疫反応による死亡が報告されている（Bugelski et al. 2000; Jönsson et al. 2011; Luffer-Atlas et al. 2018）。

一般状態観察では、第 7 群で被験物質投与に関連した異常歩行及び活動性低下（それぞれ 3 及び 5 匹）が認められた。第 6 群では活動性低下が 1 匹のみに認められた。

妊娠及び授乳期間中、体重、体重増加量及び摂餌量に被験物質投与に関連した有害な変化は認められなかった。妊娠率、分娩率、妊娠期間、妊娠指数、出生児数、死産児数、出生児指数に対する被験物質投与の影響は認められなかった。

出生児の生存に有意な変化は認められなかった。第 7 群では、同腹児全死亡の発現頻度の軽度増加が認められ（第 7 群では同腹児全死亡が 3 匹であったのに対し、他の群では 1 又は 0 匹であった）、その結果、産児死亡数の統計学的に有意ではない明らかな上昇が認められた。しかし、生後 0～4 日の生存データから、同腹児全死亡の児数を除外した場合、児の生存率に変化は認められなかった。さらに、生存率及び離乳率で表される児動物の生存は、統計学的に群間に差がなく、同腹児全死亡の死亡児数の除外の有無にかかわらず、背景値の範囲内であった。第 7 群における同腹児全死亡の発現頻度の軽度増加は母動物の哺育放棄と考えられ、母動物の死亡数増加及び活動性低下並びに剖検時に胃に乳汁が認められなかった児の発現頻度の軽度増加と一致した。上述のとおり、これらの母動物への影響は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与による拘束ストレス又は有害な免疫反応に関連する可能性が考えられた。

着床痕数、着床後胚損失率、出産児の性比に対する被験物質に関連した影響は認められなかった。児動物では、被験物質に関連した一般状態所見は認められなかった。第 7 群では、対照群と比較して、生後 14 日及び 21 日に被験物質投与に関連した児動物体重の低値が認められた。この児動物の体重の低値は、一部の児動物の胃に乳汁が認められなかったことに関連している可能性がある。児動物体重の低値は離乳（生後 21 日）後の初期まで継続した。

母動物の剖検に、被験物質に関連した所見は認められなかった。

F1 世代の離乳前の発達並びに反射試験及び性成熟（包皮分離及び膣開口）に、被験物質に関連した影響は認められなかった。母動物にシパグルコシダーゼ アルファを単独又はミグルスタットと併用投与した雌雄いずれにも、自発運動（基本運動量又は X+Y 移動）、馴化、近位又は空間学習及び記憶保持、聴覚性驚愕反応に対する被験物質に関連した影響は認められなかった。

離乳後の F1 世代に、途中死亡並びに被験物質に関連した一般状態観察及び剖検所見は認められなかった。第 7 群の雌雄に被験物質に関連した体重低値が離乳後初期に認められたが、一過性で軽微であったため有害ではないと考えられた。性周期の数や長さに被験物質に関連した影響は認められなかった。F1 世代の雌雄の交尾行動、受胎能又は交配期間に被験物質に関連した影響は認められなかった。

F1 雌の妊娠期間中、被験物質に関連した体重、体重増加量及び摂餌量の変化は認められなかった。子宮内検査結果に被験物質に関連した変化は認められなかった。

以上のとおり、400/60 mg/kg のシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与群の母動物に、途中死亡動物数及び同腹児全死亡の増加並びに一般状態観察での異常歩行及び活動性低下が観察された。これらの母動物所見は、被験物質の直接作用ではなく、併用投与による拘束ストレス又は異種タンパク質投与に対する有害な免疫反応に起因していた。同群では、軽度かつ一過性の有害でない児動物体重の低値が観察された。400 mg/kg までのシパグルコシダーゼ アルファ単独投与の母動物に毒性所見はみられず、いずれの群においても出生前及び出生後の発生に対する有害な影響は認められなかった。これらの所見より、母動物並びに出生前及び出生後の発生に対するシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は単独及びミグルスタット（60 mg/kg）との併用投与のいずれも 400 mg/kg であった。ミグルスタットの NOAEL は単独及びシパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg）との併用投与のいずれも 60 mg/kg であった。

7　局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施しなかった。ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験における静脈内投与部位の検査（剖検及び病理組織学的検査）では、毒性所見は観察されなかった（3 項）。

8　その他の毒性試験

8.1　溶血性

報告書番号：0725XA132.001、添付資料番号：4.2.3.7.7.1

ヒト全血におけるシパグルコシダーゼ アルファの溶血性を確認するために、in vitro 試験を実施した。

シパグルコシダーゼ アルファ（300、600 及び 1000 µg/mL、生理食塩液で調製）、溶媒対照［2%マンニトール及び 0.05%ポリソルベート 80 を含む 25 mmol/mL クエン酸ナトリウム液（pH 6）を生理食塩液で調製］、陰性対照（生理食塩液）及び陽性対照（滅菌注射用水）をヒトドナー由来の血液基質と混和した。試料は 37℃で 1 時間、撹拌せずにインキュベートした。インキュベート後、室温で約 100×g で 10 分間遠心分離した。各試料の上清中のヘモグロビン量を分光光度法（540 nm）により分析した。

溶媒対照の 3 試料（それぞれ 3 濃度のシパグルコシダーゼ アルファと同じ比率となるよう生理食塩水で希釈）をヒト血液基質とインキュベートしたとき、ヒト血液の明らかな溶血は引き起こされなかった。各試料の溶血率はそれぞれ-1.3%、-1.3%及び 0.9%であった。300、600 及び 1000 µg/mL 濃度のシパグルコシダーゼ アルファをヒト血液基質とインキュベートしても、ヒト血液に明らかな溶血は認められなかった。各試料の溶血率は、それぞれ-0.1%、-1.5%及び-1.5%であった。

以上より、シパグルコシダーゼ アルファは、試験した全ての濃度でヒト血液と適合した。

8.2　凝集能

報告書番号：0726XA132.001、添付資料番号：4.2.3.7.7.2

ヒト血清及び血漿中シパグルコシダーゼ アルファの適合性を評価するために、in vitro 試験を実施した。

シパグルコシダーゼ アルファ（最終濃度として 300、600 及び 1000 µg/mL、生理食塩液で調製）及び溶媒対照［3 濃度の 2%マンニトール及び 0.05%ポリソルベート 80 を含む 25 mmol/mL クエン酸ナトリウム液（pH 6）を生理食塩液で調製］を等量の血漿又は血清と混合し、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、沈殿又は凝固について肉眼的及び顕微鏡的に検査した。さらに、分取した試料を 10 分間、14000 rpm で遠心分離した。各チューブについて沈降物（ペレット）の有無を調べた。沈殿／凝固及びペレットをスコア化した（0：陰性、1：ごくわずかな沈殿又はペレット、2：少量の沈殿又はペレット、3：中等度の沈殿又はペレット、4：顕著な沈殿又はペレット）。

いずれの濃度のシパグルコシダーゼ アルファと混合したヒト血清及び血漿も肉眼的及び顕微鏡的に沈殿は認められなかった。溶媒対照試料に沈殿は認められなかった。全ての溶媒対照又はシパグルコシダーゼ アルファ試料を遠心分離したところ、ペレットは観察されなかった。

以上より、シパグルコシダーゼ アルファは、最終濃度 1000 µg/mL までヒト血漿及び血清と適合した。

9　考察及び結論

9.1　反復投与毒性

シパグルコシダーゼ アルファ単独投与時の安全性を裏付けるため、ラット及びサルを用いたシパグルコシダーゼ アルファ 26 週間反復投与毒性試験（それぞれ 10 分間及び 2 時間かけて静脈内隔週投与）を実施した。また、サルを用いた 13 週間シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与試験（シパグルコシダーゼ アルファは 2 時間かけて静脈内隔週投与し、ミグルスタットはシパグルコシダーゼ アルファ投与開始 30 分前に経口投与した）を実施し、併用投与時の安全性を検討した。

いずれの試験でも、投薬に関連した明らかな毒性所見は認められなかった。ラット及びサルを用いた 26 週間試験の NOAEL は、いずれも試験した最高用量の 200 mg/kg であった。サル 13 週間併用投与試験におけるシパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの NOAEL は、単独及び併用投与のいずれについてもそれぞれ試験した最高用量である 100 mg/kg 及び 175 mg/kg であった。

反復投与毒性試験の NOAEL におけるシパグルコシダーゼ アルファの曝露量［C_{max} 及び血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC）］及び母集団薬物動態（PK）解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量より算出した曝露量比を表 2.6.6- 14 に示す。

ラット及びサル 26 週間反復投与毒性試験並びにサル 13 週間反復併用投与毒性試験におけるシパグルコシダーゼ アルファの曝露量比（AUC）は、それぞれ 15 倍、18 倍及び 10 倍であった。

表 2.6.6- 14　　反復投与毒性試験の NOAEL におけるシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比

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

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

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

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

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

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

サル 13 週間反復併用投与毒性試験の NOAEL におけるミグルスタットの曝露量（C_{max} 及び AUC）及び母集団 PK 解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量より算出した曝露量比を表 2.6.6- 15 に示す。

ミグルスタットの曝露量比（AUC）は 11 倍であった。

表 2.6.6- 15　　反復投与毒性試験の NOAEL におけるミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比

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

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

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

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

9.2　生殖発生毒性

受胎能及び着床までの初期胚発生

ラット受胎能及び初期胚発生試験では、シパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg）単独及びミグルスタットとの併用投与により、主にヒト以外の動物種に遺伝子組換えヒト酵素を反復投与したことによるアナフィラキシー様反応に起因する死亡が認められた。

ミグルスタット（60 mg/kg）単独投与及びシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）併用投与の雌でミグルスタットに関連すると考えられる着床前胚損失率の増加が認められた。

シパグルコシダーゼ アルファの雄親動物及び雌親動物の一般毒性並びに受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL はいずれも 400 mg/kg であった。ミグルスタットの雄親動物及び雌親動物の一般毒性に関する NOAEL はいずれも 60 mg/kg、受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL は 60 mg/kg 未満であった。

シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの曝露量並びに母集団 PK 解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量より算出した曝露量比をそれぞれ表 2.6.6- 16 及び表 2.6.6- 17 に示した。

表 2.6.6- 16　　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study		**Exposure of Cipaglucosidase Alfa**	**Cipaglucosidase Alfa Margin of Exposure [a]**
Male (on Day 28)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	NOAEL = 400 mg/kg for cipaglucosidase alfa	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 55100 µg·h/mL [b]	39 (272) [f]
	NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 62950 µg·h/mL [c]	44 (311) [f]
Female (on GD 7)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	NOAEL = 400 mg/kg for cipaglucosidase alfa	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 38400 µg·h/mL [d]	27 (189) [f]
	NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 38050 µg·h/mL [e]	27 (188) [f]

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

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

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

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

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

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

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

表 2.6.6- 17　　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比

Type of Study		**Exposure of Miglustat**	**Miglustat Margin of Exposure** [a]
Male (on Day 28)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	NOAEL = 60 mg/kg for miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 27600 ng·h/mL	1.4 (9.6) [b]
	NOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 96000 ng·h/mL	4.7 (33) [b]
Female (on GD 7)			
Fertility and Early Embryonic Development Study in Rats	LOAEL = 60 mg/kg for miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 31400 ng·h/mL	1.6 (11) [b]
	LOAEL = 400/60 mg/kg for cipaglucosidase alfa/miglustat	$AUC_{0\text{-}24h}$ = 87600 ng·h/mL	4.3 (30) [b]

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

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

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

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

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

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

<u>胚・胎児発生</u>

ラット胚・胎児発生に関する試験では、試験した最高用量である 400 mg/kg までの用量で、シパグルコシダーゼ アルファに直接起因すると考えられる所見は認められず、母動物毒性及び胚・胎児毒性に関する NOAEL は単独及びミグルスタット（60 mg/kg）との併用投与のいずれも 400 mg/kg であった。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、母動物毒性としてミグルスタットに関連した体重増加抑制及び摂餌量低下が認められた。ミグルスタットは腸管内腔において特に腸管二糖類分解酵素の α-グルコシダーゼ活性阻害を介して糖類の吸収不良を引き起こすことが知られている（Amiri and Naim 2012）。その結果生じる二糖類の蓄積は、浸透圧不均衡、下痢、その他の消化器系の有害作用を誘発し、摂餌量及び体重増加に影響を及ぼす可能性が高い。この知見は、体重増加量及び摂餌量の低下はミグルスタットに関連した所見であるという考察を裏付けている。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（175/25 mg/kg）併用投与群では、溶媒対照群と比較して心血管系奇形を有する胎児数の有意な増加が観察された。奇形を有する胎児数は、総発現頻度及び個々の発現頻度の両方がシパグルコシダーゼ アルファ単独群及びミグルスタット単独群より高かったことから、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起因していると考えられた。ミグルスタット単独投与と比較して併用投与において作用が大きかったのは、併用投与群の母動物毒性がやや高かったことに関連している可能性がある。実際、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妊娠 17～21 日の摂餌量がミグルスタット単独投与群より低かったことが、母動物毒性が高い可能性を示唆している。

既承認のミグルスタット（ブレーザベス®カプセル）では、動物において胚・胎児の生存に影響を及ぼす分娩異常などの生殖毒性が認められている。また、ミグルスタットはウサギ胚・胎児発生に関する試験で胎児における動脈弓からの過剰血管の発生が認められている（ブレーザベス®カプセル 100mg 申請資料概要モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文）。

以上より、ウサギ胚・胎児発生に関する試験におけるシパグルコシダーゼ アルファ単独投与の母動物毒性及び胚・胎児毒性に対する NOAEL は 175 mg/kg と考えられた。ミグルスタット単独又はシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与は 1 用量のみの検討であったため、NOAEL は算出できなかった。

シパグルコシダーゼ アルファ及びミグルスタットの曝露量並びに母集団 PK 解析（ATB200-02 及び ATB200-03 試験に基づく）（Module 2.7.2, Section 3.5）の曝露量より算出した曝露量比をそれぞれ表 2.6.6- 18 及び表 2.6.6- 19 に示した。

表 2.6.6- 18　　胚・胎児発生に関する試験のシパグルコシダーゼ アルファの血漿中曝露量及び曝露量比

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

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

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

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

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

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

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

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

表 2.6.6- 19　　胚・胎児発生に関する試験のミグルスタットの血漿中曝露量及び曝露量比

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

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

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

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

ラット胚・胎児発生に関する試験の NOAEL でのシパグルコシダーゼ アルファ曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、シパグルコシダーゼ アルファ単独（400 mg/kg）投与時で 19 倍（累積曝露量比で 134 倍）、ミグルスタットとの併用投与時で 20 倍（累積曝露量比で 142 倍）であった。また、ミグルスタット曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、ミグルスタット単独（60 mg/kg）投与時で 2 倍（累積曝露量比で 14 倍）、シパグルコシダーゼ アルファとの併用投与時で 4 倍（累積曝露量比で 29 倍）であった。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験でのシパグルコシダーゼ アルファ曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、NOAEL での 175 mg/kg のシパグルコシダーゼ アルファ単独投与時で 8 倍（累積曝露量比で 57 倍）であった。最小毒性量（175/25 mg/kg）でのシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与時では 16 倍（累積曝露量比で 111 倍）であった。また、ミグルスタット曝露量のヒト曝露量に対する曝露量比は、最小毒性量での 25 mg/kg のミグルスタット単独投与時で 2 倍（累積曝露量比で 14 倍）、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（175/25 mg/kg）併用投与時では 3 倍（累積曝露量比で 23 倍）であった。

<u>出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験</u>

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、400 mg/kg までのシパグルコシダーゼ アルファ単独投与の母動物に毒性所見はみられなかった。シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット（400/60 mg/kg）併用投与群の母動物に、被験物質の直接作用ではなく、併用投与による拘束ストレス又は異種タンパク質投与に対する有害な免疫反応に起因した途中死亡動物数及び同腹児全死亡の増加並びに一般状態観察での異常歩行及び活動性低下が観察された。いずれの群においても出生前及び出生後の発生に対する有害な影響は認められなかった。

以上より、母動物並びに胎児及び出生児に対するシパグルコシダーゼ アルファの NOAEL は単独及びミグルスタット（60 mg/kg）との併用投与のいずれも 400 mg/kg であった。母動物並びに胎児及び出生児に対するに対するミグルスタットの NOAEL は単独及びシパグルコシダーゼ アルファ（400 mg/kg）との併用投与のいずれも 60 mg/kg であった。

9.3　溶血性及び凝集能

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

9.4　結論

ラット及びカニクイザルにおける 26 週間までの静脈内隔週投与でのシパグルコシダーゼ アルファの反復投与毒性試験に、明らかな毒性所見は認められなかった。ラット及びサル 26 週間反復投与毒性試験での NOAEL はいずれも最高用量の 200 mg/kg であり、このときの曝露量は、それぞれ臨床曝露量の 15 倍及び 18 倍であった。生殖発生毒性試験においてシパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用投与後に認められた受胎能への影響は主にミグルスタットに関連すると考えられた。一方、胚・胎児発生に関する影響は、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用に関連すると考えられた。

これらの非臨床試験成績は、ポンペ病の次世代治療薬として、シパグルコシダーゼ アルファ／ミグルスタット併用療法の承認申請を支持している。

10　　参考文献

Amiri M, Naim HY. Miglustat-induced intestinal carbohydrate malabsorption is due to the inhibition of α-glucosidases, but not β-galactosidases. J Inherit Metab Dis. 2012;35(6):949-54.

Bugelski PJ, Herzyk DJ, Rehm S, Harmsen AG, Gore EV, Williams DM, et al. Preclinical development of keliximab, a Primatized anti-CD4 monoclonal antibody, in human CD4 transgenic mice: characterization of the model and safety studies. Hum Exp Toxicol. 2000;19(4):230-43.

Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. J Clin Invest. 2011;121(4):1484-96.

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.

Luffer-Atlas D, Reddy VR, Hilbish KG, Grace CE, Breslin WJ. PDGFRalpha monoclonal antibody: Assessment of embryo-fetal toxicity and time-dependent placental transfer of a murine surrogate antibody of olaratumab in mice. Birth Defects Res. 2018;110(18):1358-71.

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 2.6.6 毒性試験の概要文. 2012. https://www.pmda.go.jp/files/common/js/pdfjs/web/viewer.html?file=/drugs/2012/P201200038/100888000_22400AMX00659_J100_1.pdf

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

付表 1

GAA SEQUENCE ALIGNMENT COMPARISON (HUMAN, RAT, MOUSE, AND RHESUS AND CYNOMOLGUS MONKEY) AND PERCENT HOMOLOGY TABLE

```
Human    MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPREL----SGSSPVLEET-HPA
Rat      MNIRKPLCSNSVVGACTLVSLTTAVILGHLMLRELMLLPQDLHESSSG----LWKTYRPH
Mouse    MNIRKPLCSNSVVGACTLISLTTAVILGHLMLRELMLLPQDLHESSSG----LWKTYRPH
Rhesus   MGVRHPLCSRRLLAVCALVSLATAVLLGHILLHDFLLVPREL----SGSSLVLEET-RPA
Cyno     MGVRHPLCSRRLLAVCALVSLATAVLLGHILLHDFLLVPREL----SGSSLVLEET-RPA

Human    HQQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQ
Rat      HQES-YEPAPLHIQEHAEQLRAVPTQCDVTPNSRFDCAPDKGITQEQCEARGCCWVPAGQ
Mouse    HQEG-YKPGPLHIQEQTEQPKEAPTQCDVPPSSRFDCAPDKGISQEQCEARGCCYVPAGQ
Rhesus   RQQGASRPGPQNAQAHPGCPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQ
Cyno     RQQGASRPGPQNAQAHPGCPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQ

Human    GLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMET
Rat      VLNGPVMGQPWCFFPPSYPSYRLENLSSTESGYTATLTRTSPTFFPKDVLTLQLEVLMET
Mouse    VLKEPQIGQPWCFFPPSYPSYRLENLSSTESGYTATLTRTSPTFFPKDVLTLQLEVLMET
Rhesus   ELRRAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSASEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMET
Cyno     ELRRAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSASEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMET

Human    ENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTT
Rat      DSRLHFMIKDPTSKRYEVPLETPRVLSQAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRKLGGRVLLNTT
Mouse    DSRLHFKIKDPASKRYEVPLETPRVLSQAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRKLGGRVLLNTT
Rhesus   ENRLHFTIKDPANKRYEVPLETPRVPSRALSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTT
Cyno     ENRLHFTIKDPANKRYEVPLETPRVPSRALSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTT

Human    VAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH
Rat      VAPLFFADQFLQLSTSLPSQHIAGLGEHLSPLMLSTEWTRITLWNRDVAPSQGVNLYGSH
Mouse    VAPLFFADQFLQLSTSLPSQHITGLGEHLSPLMLSTDWARITLWNRDTPPSQGTNLYGSH
Rhesus   VAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH
Cyno     VAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSH

Human    PFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYL
Rat      PFYLALEDGGLAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALTWRSTGGILDVYVFLGPEPKSVVQQYL
Mouse    PFYLALEDGGLAHGVFLLNSNAMDVILQPSPALTWRSTGGILDVYVFLGPEPKSVVQQYL
Rhesus   PFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVRQYL
Cyno     PFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVRQYL

Human    DVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFT
Rat      DVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIVRQVVENMTRTHFPLDVQWNDLDYMDARRDFT
Mouse    DVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIVRQVVENMTRTHFPLDVQWNDLDYMDARRDFT
Rhesus   DVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFT
Cyno     DVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFT

Human    FNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQP
Rat      FNQDGFADFPDMVHELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQP
Mouse    FNQDSFADFPDMVRELHQDGRRYMMIVDPAISSAGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQP
Rhesus   FNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYVMIVDPAISISGPAGSYRPYDEGLRRRVFITNETGQP
Cyno     FNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYVMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRAVFITNETGQP

Human    LIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPN
```

```
Rat     LIGKVWPGSTAFPDFTNPETLDWWQDMVSEFHAQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSQQGCPD
Mouse   LIGKVWPGTTAFPDFTNPETLDWWQDMVSEFHAQVPFDGMWLDMNEPSNFVRGSQQGCPN
Rhesus  LIGKVWPGSTAFPDFTNPAALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPH
Cyno    LIGKVWPGSTAFPDFTNPAALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPH

Human   NELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRP
Rat     NELENPPYVPGVVGGALQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASSRALVKTRGTRP
Mouse   NELENPPYVPGVVGGILQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASSRALVKTRGTRP
Rhesus  NELEEPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASYRALVKARGTRP
Cyno    NELEEPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASYRALVKARGTRP

Human   FVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE
Rat     FVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEHLAYSVPEILQFNLLGVPLVGADICGFQGNTTE
Mouse   FVISRSTFSGHGRYAGHWTGDVRSSWEHLAYSVPDILQFNLLGVPLVGADICGFIGDTSE
Rhesus  FVISRSTFAGHGRYAGHWMGDVWSSWEQLAASVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE
Cyno    FVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLAASVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSE

Human   ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLS-LPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFH
Rat     ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNDL-NSLPQEPYRFSETAQQAMRKAFTLRYALLPYLYTLFH
Mouse   ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNDL-NSVPQEPYRFSETAQQAMRKAFALRYALLPYLYTLFH
Rhesus  ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNGLLN-LPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFH
Cyno    ELCVRWTQLGAFYPFMRNHNGLLN-LPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFH

Human   QAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYD
Rat     GAHVKGDTVARPLFLEFPEDPSTWSVDRQLLWGPALLITPVLEPGKTDVTGYFPKGMWYN
Mouse   RAHVRGDTVARPLFLEFPEDPSTWSVDRQLLWGPALLITPVLEPGKTEVTGYFPKGTWYN
Rhesus  QAHVAGETVARPLFLEFPEDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPSGTWYN
Cyno    QAHVAGETVARPLFLEFPEDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPSGTWYD

Human   LQTVPVEALGSLPP-PP--AAP-REPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPG
Rat     LQMVPVETLGSLPSSSP--ASSFR-SIVHSKGQWLTLEAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPS
Mouse   MQMVSVDSLGTLPS--PSSASSFR-SAVQSKGQWLTLEAPLDTINVHLREGYIIPLQGPS
Rhesus  LETVPIEALGSLPP-PP--AAP-REPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGHIIPLQGPG
Cyno    LETVPIEALGSLPP-PP--AAP-REPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGHIIPLQGPG

Human   LTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELV
Rat     LTTTESRKQPMALAVALTESGEASGELFWDDGESLGVLERGAYTLVTFSAKNNTIVNKLV
Mouse   LTTTESRKQPMALAVALTASGEADGELFWDDGESLAVLERGAYTLVTFSAKNNTIVNKLV
Rhesus  LTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGSYTQVIFLARSNTVMNELV
Cyno    LTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARSNTVMNELV

Human   RVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVS
Rat     HVTKEGGELQLREVTILGVTTAPTQVLSNGISVSNFTYSPDDKSLSIPVSLLMGERFQID
Mouse   RVTKEGAELQLREVTVLGVATAPTQVLSNGIPVSNFTYSPDNKSLAIPVSLLMGELFQIS
Rhesus  HVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGAPVSNFTYSPDTKVLDIPVSLLVGEQFLIS
Cyno    HVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGAPVSNFTYSPDTKVLDIPVSLLVGEQFLIS

Human   WC
Rat     WS
Mouse   WS
Rhesus  WS
Cyno    WS
```

Species Comparison of the Percent Homology of the Primary Amino Acid Sequence of Acid AlphaGlucosidase (GAA)

Species	Human	Rat	Mouse	Rhesus	Cyno
Human	100	82.33	81.25	95.27	95.69
Rat	82.33	100	92.85	81.69	81.90
Mouse	81.25	92.85	100	80.40	80.61
Rhesus	95.27	81.69	80.40	100	99.47
Cyno	95.69	81.90	80.61	99.47	100

Comparison was completed using Kalign 2.0

目次

2.6.7.1　毒性試験：一覧表 2
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 6
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 7
2.6.7.5　単回投与毒性試験 10
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 11
2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験 26
2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験 26
2.6.7.10　がん原性試験 26
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験 27
2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 28
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 35
2.6.7.14　生殖発生毒性試験：　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 45
2.6.7.15　新生児を用いた試験 55
2.6.7.16　局所刺激性試験 55
2.6.7.17　その他の毒性試験 56

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat								
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg)** [a]	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in CTD**
Single-dose Toxicity								
Single-dose	Sprague-Dawley Rat	Cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion)	Single dose	10, 20, 50, 100, 200	No	[redacted], China	283-0011-TX	4.2.3.1.1
Single-dose	Cynomolgus Monkey	Cipaglucosidase alfa: IV (2-hour infusion)	Single dose	10, 20, 50, 100, 200	No	[redacted], China	283-0012-TX	4.2.3.1.2
Repeat-dose Toxicity								
26-week Toxicity Study	Sprague-Dawley Rat	Cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion)	26 weeks (once every other week, 13 doses)	0, 30, 70, 200	Yes	[redacted], USA	[redacted].423.08	4.2.3.2.1
26-week Toxicity Study	Cynomolgus Monkey	Cipaglucosidase alfa: IV (2-hour infusion)	26 weeks (once every other week, 13 doses)	0, 30, 60, 200	Yes	[redacted], USA	[redacted].423.07	4.2.3.2.2
13-week Toxicity Study	Cynomolgus Monkey	Cipaglucosidase alfa: IV (2-hour infusion) Miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	13 weeks (once every other week, 7 doses)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 50/25, 100/175, 0/175, 100/0	Yes	[redacted], USA	[redacted].423.10	4.2.3.2.3
Genotoxicity								
N/A								
Carcinogenicity								
N/A								

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat								
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg) [a]**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in CTD**
Reproductive and Developmental Toxicity								
Fertility and Early Embryonic Development	Sprague-Dawley Rat	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	Cohort A: females treated every other day starting at least 14 days prior to pairing, through the pairing phase, then on GD 1, 3, 5, and 7 Cohort B: males treated every other day starting at least 28 days prior to pairing and throughout the pairing phase (dosed for at least 6 weeks)	cipaglucosidase alfa/miglustat: Cohort A: Female-0/0, 0/60, 70/0, 150/0, 400/0, 400/60 Male-not treated Cohort B: Male-0/0, 0/60, 70/0, 150/0, 400/0, 400/60 Female-not treated	Yes	[redacted], USA	8371927	4.2.3.5.1.1
Dose-range Finding for Embryo-fetal Development	Sprague-Dawley Rat	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	GD 6 to GD 18 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: Cohort 1: 0/0, 0/12.5, 30/0, 70/0, 150/0, 150/12.5 Cohort 2: 0/0, 300/0, 600/0	No	[redacted], USA	8371929	4.2.3.5.2.1
Embryo-fetal Development	Sprague-Dawley Rat	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	GD 6 to GD 18 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/60, 70/0, 150/0, 400/0, 400/60	Yes	[redacted], USA	8371930	4.2.3.5.2.2

2.6.7.1　毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat								
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg)[a]**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in CTD**
Reproductive and Developmental Toxicity (Continued)								
Dose-range Finding for Embryo-fetal Development	New Zealand White Rabbit	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	GD 7 to GD 19 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/25, 30/0, 70/0, 150/0, 150/25	No	[redacted], USA	8371928	4.2.3.5.2.3
Embryo-fetal Development	New Zealand White Rabbit	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	GD 7 to GD 19 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/25, 30/0, 70/0, 175/0, 175/25	Yes	[redacted], USA	8371931	4.2.3.5.2.4
Prenatal and Postnatal Development Including Maternal Function Studies	Sprague-Dawley Rat	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion)	GD 7 to LD 19 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/60, 70/0, 150/0, 400/0, 400/60	Yes	[redacted], USA	8371932	4.2.3.5.3.1
Local Tolerance								
N/A								
Other Toxicity Studies								
Hemolysis Assay	Human Whole Blood	*In vitro*	1 hour	300 to 1000 µg/mL	Yes	[redacted], USA	0725XA 132.001	4.2.3.7.7.1
Flocculation Assay	Human Plasma and Serum	*In vitro*	30 minutes	300 to 1000 µg/mL	Yes	[redacted], USA	0726XA 132.001	4.2.3.7.7.2

Abbreviations: GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; LD = lactation day; N/A = not applicable; NOAEL= no observed adverse effect level; PO = per os; USA = The United States of America

[a] Unless otherwise specified, for repeat-dose toxicity the highest NOAEL is underlined.

2.6.7.2　　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

					Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Dose (mg/kg)**	**GLP**	**Study Number**
26-week Repeat Dose	Sprague-Dawley Rat	IV (10-minute infusion)	0, 30, 70, 200	Yes	[redacted].423.08
26-week Repeat Dose	Cynomolgus Monkey	IV (2-hour infusion)	0, 30, 60, 200	Yes	[redacted].423.07
13-week Repeat Dose	Cynomolgus Monkey	Co-administration cipaglucosidase alfa (2-hour IV infusion) and miglustat (PO)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 50/25, 100/175, 0/175, 100/0	Yes	[redacted].423.10
Fertility and Early Embryonic Development	Sprague-Dawley Rat	Co-administration cipaglucosidase alfa (10-minute IV infusion) and miglustat (PO)	cipaglucosidase alfa/miglustat: Cohort C: 0/60, 400/0, 400/60	Yes	8371927
Embryo-fetal Development	Sprague-Dawley Rat	Co-administration cipaglucosidase alfa (10-minute IV infusion) and miglustat (PO)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/60, 70/0, 150/0, 400/0, 400/60	Yes	8371930
Embryo-fetal Development	New Zealand White Rabbit	Co-administration cipaglucosidase alfa (10-minute IV infusion) and miglustat (PO)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/25, 30/0, 70/0, 175/0, 175/25	Yes	8371931
Prenatal and Postnatal Development Including Maternal Function Studies	Sprague-Dawley Rat	Co-administration cipaglucosidase alfa (10-minute IV infusion) and miglustat (PO)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/60, 70/0, 150/0, 400/0, 400/60	Yes	8371932

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; PO = per os

2.6.7.3　　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

トキシコキネティクス試験成績は Module 2.6.5 に要約した。血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC）及び最高血漿中濃度（C_{max}）は本概要表の各試験の項に示した。

2.6.7.4　　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

2.6.7.4A　　シパグルコシダーゼ アルファ

Test Article: Cipaglucosidase Alfa					
Batch Number	**Purity[a] (%)**	**Drug Substance/Drug Product Specified Impurities**		**Study Number**	**Type of Study**
		Residual HCP	**Residual DNA**		
110140729[b]	[redacted]	Acceptance criteria: ≤ [redacted] ppm Results: [redacted] ppm	Acceptance criteria: ≤ [redacted]pg/mg Results: < [redacted]pg/mg	[redacted].423.08	26-week Rat
110141005[b]	[redacted]	Acceptance criteria: ≤ [redacted] ppm Results: [redacted] ppm	Acceptance criteria: ≤ [redacted]pg/mg Results: < [redacted]pg/mg	[redacted].423.10	13-week Monkey
110140729[b]	[redacted]	Acceptance criteria: ≤ [redacted] ppm Results: [redacted] ppm	Acceptance criteria: ≤ [redacted]pg/mg Results: < [redacted]pg/mg	[redacted].423.07	26-week Monkey
201801001[c]	[redacted]	-	-	8371927	Fertility and Early Embryonic Development (Cohorts A and B)
				8371930	Embryo-fetal Development (Rat)
DEMO-WBP110-201704001-1KEB2-DP1[c]	[redacted]	-	-	8371927	Fertility and Early Embryonic Development (Cohorts A and B)
				8371931	Embryo-fetal Development (Rabbit)

2.6.7.4A　　シパグルコシダーゼ　アルファ（続き）

Test Article: Cipaglucosidase Alfa					
Batch Number	**Purity[a] (%)**	**Drug Substance/Drug Product Specified Impurities**		**Study Number**	**Type of Study**
		Residual HCP	**Residual DNA**		
110C180306b[b]	[redacted]	Acceptance criteria: ≤ [redacted]ppm Results: [redacted]ppm	Acceptance criteria: ≤ [redacted]pg/mg Results: < [redacted] pg/mg	8371927	Fertility and Early Embryonic Development (Cohort C)
DEMO-WBP110-201707001-1KEB2-DP2[c]	[redacted]	-	-	8371927	Fertility and Early Embryonic Development (Cohorts A and B)
110170720[b]	[redacted]	Acceptance criteria: ≤ [redacted]ppm Results: [redacted]ppm	Acceptance criteria: ≤ [redacted]pg/mg Results: < [redacted] pg/mg	8371932	Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function (Rats)
DEMO-WBP110-201506001[c]	[redacted]	-	-	0725XA132.001	Hemolysis Assay
				0726XA132.001	Flocculation Assay

Abbreviation: DNA = deoxyribonucleic acid; HCP = host cell protein; [redacted]; - = not applicable

[a] [redacted](main peak)
[b] Drug Substance
[c] Drug Product

2.6.7.4B　　ミグルスタット

Test Article: Miglustat				
Batch Number	**Purity[a] (%)**	**Drug Substance Specified Impurities**	**Study Number**	**Type of Study**
4237.G.12.1	[redacted]	No individual unknown impurities ≥ [redacted]% 4237.IMP10 (RRT [redacted]) <[redacted]% 4237.IMP11 (RRT[redacted]) <[redacted]%	[redacted].423.10	13-week Monkey
4237.G.16.1	[redacted]	No individual unknown impurities ≥ [redacted]% 4237.IMP10 <[redacted]% 4237.IMP11 <[redacted]%	8371927	Fertility and Early Embryonic Development
			8371930	Embryo-fetal Development (Rat)
			8371931	Embryo-fetal Development (Rabbit)
4237G.18.2	[redacted]	No individual unknown impurities ≥ [redacted]% 4237.IMP10 <[redacted]% 4237.IMP11 <[redacted]%	8371932	Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function (Rats)

Abbreviation: [redacted]; RRT = relative retention time; - = not applicable

[a] [redacted] (weight %)

2.6.7.5　単回投与毒性試験

Test Article: Cipaglucosidase Alfa						
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Dose (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
Sprague-Dawley Rat	IV (10-minute infusion)[a] (Vehicle: 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)	10, 20, 50, 100, 200	19 F[b]	200	Highest dose tested (200 mg/kg) was well tolerated with a corresponding C_{max} of 4940 µg/mL and $AUC_{0\text{-}24h}$ of 9360 µg·h/mL.	283-0011-TX[c]/ 4.2.3.1.1
Cynomolgus Monkey	IV (2-hour infusion)[d] (Vehicle: 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)	10, 20, 50, 100, 200	2 F[e]	200	Highest dose tested (200 mg/kg) was well tolerated with a corresponding C_{max} of 3520 µg/mL and $AUC_{0\text{-}26h}$ of 11400 µg·h/mL.	283-0012-TX[c]/ 4.2.3.1.2

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h/26h}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) to 24/26 hours postdose; C_{max} = maximum observed concentration; F = females; IV = intravenous; No. = number

[a] Dosing volume: 1 mL/kg/minute
[b] Rats were 6 to 9 weeks of age and weighed from 220.92 to 269.07 g at Day 1.
[c] Cipaglucosidase alfa batch: 110140729
[d] Dosing volume: 10 mL/kg/hour
[e] Cynomolgus monkeys were 2.5 to 5 years of age and weighed from 2.7 to 4 kg at Day 1.

2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当せず。

2.6.7.7　　反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A　　ラット 26 週間反復投与毒性試験

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa
Report Title: A 26-Week Intravenous Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study of ATB200 in Sprague-Dawley Rats Followed by a 4-Week Recovery		
Species/Strain: Sprague-Dawley Rat	**Duration of Dosing:** 26 weeks (once every other week, 13 doses)	**Location in CTD:** 4.2.3.2.1
Initial Age: 8 weeks	**Duration of Post-dose:** 4 weeks recovery period	**Study No.:** [redacted].423.08
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV (10-minute infusion)	**GLP Compliance:** Yes
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 (Formulation Buffer)		
Special Features: DPH was administered by intraperitoneal injection at approximately 10 to 20 minutes before the test or control article dose to all groups except Group 2 (controls) to prevent potential anaphylactic and/or hypersensitivity response to human protein. Group 2 animals were injected with an equivalent volume of sterile water for injection. Blood samples were collected from all main toxicity animals once at pre-dose on Days 1, 50, 92, 183 (terminal necropsy animals only) and 211 for ADA/NAb assays. ADA/NAb did not substantially alter cipaglucosidase alfa exposure or other TK parameters during the course of this study.		
No Observed Adverse Effect Level: 200 mg/kg		

2.6.7.7A　　ラット 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**1**		**2**		**3**		**4**		**5**	
Dose (mg/kg)	**0 (DPH)[a]**		**0**		**30 (DPH)[a]**		**70 (DPH)[a]**		**200 (DPH)[a]**	
Number of Animals and Gender	**M: 15**	**F: 15**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Noteworthy Findings										
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurobehavioral Function	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight Changes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology-Week 27[b]										
WBC (10^3/uL)	6.75	4.25	6.71	4.27	-	-	-	-	+14%	+46%**
Lymphocytes, Absolute (10^3/uL)	5.47	3.51	5.39	3.51	-	-	-	-	+15%	+45%**
Basophils, Absolute (10^3/uL)	0.04	0.02	0.04	0.02	-	-	-	-	+25%	+100%**
Serum Chemistry-Week 27[b]										
Glucose (mg/dL)	176	206	162	183	-	-	-10%	-19%*	-11%	-20%*
Ca (mg/dL)	9.5	10.1	9.6	10.0	-	-	+3%	-1%	+5%***	+1%

2.6.7.7A　　ラット 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**3**			**4**			**5**		
Number of Animals and Gender	**15M and 15F**			**15M and 15F**			**15M and 15F**		
Dose (mg/kg)	**30 (DPH)[a]**			**70 (DPH)[a]**			**200 (DPH)[a]**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[c]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[d]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[c]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[d]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[c]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[d]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Toxicokinetic Parameters[e]									
Day 1									
t_{max} (h)	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
C_{max} (µg/mL)	582	585	557	1340	1340	1210	4260	4300	4300
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	801	805	668	2350	2340	1740	11200	11300	7120
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.793	0.789	0.642	0.891	0.894	0.773	1.14	1.13	0.911
$t_{1/2\beta}$ (h)	11.1	10.9	9.26	12.5	12.3	4.93	10.1	10.1	2.97
CL_T (L/h)	0.007	0.007	0.009	0.006	0.006	0.009	0.003	0.003	0.006
Day 85									
t_{max} (h)	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
C_{max} (µg/mL)	749	751	642	1830	1830	1680	5390	5470	4960
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	1230	1230	982	4400	4390	2910	19800	19800	11000
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.994	0.983	0.923	1.40	1.39	1.11	1.73	1.69	1.21
$t_{1/2\beta}$ (h)	6.37	6.33	4.76	8.80	8.67	3.40	8.18	8.15	2.83
CL_T (L/h)	0.010	0.010	0.013	0.006	0.006	0.010	0.004	0.004	0.007

2.6.7.7A ラット 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**3**			**4**			**5**		
Number of Animals and Gender	**15M and 15F**			**15M and 15F**			**15M and 15F**		
Dose (mg/kg)	**30 (DPH)[a]**			**70 (DPH)[a]**			**200 (DPH)[a]**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[c]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[d]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[c]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[d]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[c]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[d]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Toxicokinetic Parameters[e]									
Day 169									
t_{max} (h)	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
C_{max} (µg/mL)	672	666	608	1730	1710	1480	5450	5530	4840
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	1420	1400	1080	5070	4930	2840	21300	21000	10800
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.24	1.24	1.13	1.43	1.40	1.15	2.13	2.11	1.45
$t_{1/2\beta}$ (h)	7.25	7.12	4.12	10.1	9.94	3.46	7.59	7.45	2.73
CL_T (L/h)	0.010	0.010	0.014	0.006	0.006	0.012	0.004	0.004	0.009

- = No noteworthy findings

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); AUC_{0-t} = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to time point with the last measurable concentration; CL_T = total clearance (based on $\lambda_{z\beta}$); C_{max} = maximum observed concentration; DPH = diphenhydramine hydrochloride; F = female; GAA = acid α-glucosidase; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NAb = neutralizing antibody; No. = number; $t_{1/2\alpha}$ = alpha half-life, early distribution terminal elimination phase; $t_{1/2\beta}$ = beta half-life, terminal phase half-life; TK = toxicokinetics; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration; WBC = white blood cells

[a] DPH was administered by intraperitoneal injection at approximately 10 to 20 minutes before the test or control article dose to all groups except Group 2 (controls) to prevent potential anaphylactic and/or hypersensitivity response to human protein. Group 2 animals were injected with sterile water for injection.

[b] For controls, means are shown. For treated groups, percent differences from controls (Group 1) are shown. Statistical significance is based in actual data (not on the percent differences); *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001.

[c] Cipaglucosidase alfa total protein assay: validated under study No. [redacted]-NL-SML-1589/AMH318EL-143183-E

[d] Cipaglucosidase alfa (GAA) activity assay: validated under Study No. 4000041 – Validation of a method to determine the GAA activity in rat and monkey plasma

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

2.6.7.7B　　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa
Report Title: A 26-Week Intravenous Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study of ATB200 in Cynomolgus Monkeys Followed by a 4-Week Recovery		
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 26 weeks (once every other week, 13 doses)	**Location in CTD:** 4.2.3.2.2
Initial Age: 2 years	**Duration of Post-dose**: 4-week recovery period	**Study No.:** [redacted].423.07
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** IV (2-hour infusion)	**GLP Compliance:** Yes
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 (Formulation Buffer)		
Special Features: Blood samples were collected from all animals once during acclimation and on Days 85 (predose), 92, 169 (predose) and 211 for ADA/NAb assays. Treated animals were positive for both ADA and NAb, but with no obvious effect on cipaglucosidase alfa exposure or other TK parameters.		
No Observed Adverse Effect Level: 200 mg/kg		

2.6.7.7B　　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**1**		**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)	**0**		**30**		**60**		**200**	
Number of Animals and Gender	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Noteworthy Findings								
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Detailed Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiratory Rates	-	-	-	-	-	-	-	-
ECG	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Gas Parameters	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight Changes	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observation	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7B　　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**2**			**3**			**4**		
Dose (mg/kg)	**30**			**60**			**200**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Toxicokinetic Parameters[c]									
Day 1									
t_{max} (h)	2.00	2.00	2.00	2.08	2.08	2.08	2.04	2.04	2.00
C_{max} (µg/mL)	361	366	356	816	829	748	3490	3470	2660
$AUC_{0\text{-}t}$ (µg·h/mL)	841	846	812	2290	2300	1900	15400	15300	7770
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	842	848	812	2300	2300	1900	15400	15400	7770
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.713	0.709	0.698	1.03	1.03	0.882	2.59	2.48	1.19
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.82	1.78	2.11	2.85	2.80	1.83	2.57	2.54	1.67
CL_T (L/h)	0.104	0.104	0.108	0.071	0.071	0.087	0.044	0.044	0.096
V_{ss} (L)	0.148	0.148	0.138	0.145	0.142	0.127	0.129	0.129	0.174
V_z (L)	0.255	0.257	0.331	0.293	0.287	0.229	0.161	0.160	0.231

2.6.7.7B　　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**2**			**3**			**4**		
Dose (mg/kg)	**30**			**60**			**200**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Toxicokinetic Parameters[c]									
Day 85									
t_{max} (h)	2.00	2.00	2.04	1.95	1.95	1.95	1.96	1.96	2.05
C_{max} (µg/mL)	438	443	385	939	944	771	4040	4080	3120
$AUC_{0\text{-}t}$ (µg·h/mL)	1180	1190	981	2980	2980	2220	20400	20400	9870
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	1180	1200	981	2980	2980	2220	20500	20500	9880
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.02	1.02	0.893	1.38	1.38	1.14	3.58	3.94	1.32
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.49	1.50	2.17	2.67	2.64	2.08	2.91	2.90	2.35
CL_T (L/h)	0.083	0.082	0.099	0.061	0.061	0.084	0.035	0.035	0.076
V_{ss} (L)	0.144	0.142	0.166	0.154	0.152	0.172	0.141	0.141	0.207
V_z (L)	0.172	0.175	0.316	0.237	0.235	0.264	0.149	0.148	0.265

2.6.7.7B　　カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験（続き）

Group	**2**			**3**			**4**		
Dose (mg/kg)	**30**			**60**			**200**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[a]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[b]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Toxicokinetic Parameters[c]									
Day 169									
t_{max} (h)	2.08	2.08	2.08	2.00	2.04	2.00	2.14	2.14	2.05
C_{max} (µg/mL)	473	467	407	1090	1070	909	4200	4210	3630
$AUC_{0\text{-}t}$ (µg·h/mL)	1380	1370	1170	4090	4070	2980	25100	24900	14400
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	1390	1370	1170	4110	4090	2990	25300	25100	14600
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.18	1.17	1.09	1.66	1.69	1.30	3.71	3.84	1.41
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.47	1.46	2.14	2.89	2.90	2.25	3.24	3.25	3.14
CL_T (L/h)	0.072	0.073	0.088	0.044	0.044	0.060	0.030	0.030	0.053
V_{ss} (L)	0.135	0.136	0.157	0.121	0.122	0.135	0.138	0.139	0.180
V_z (L)	0.153	0.154	0.271	0.182	0.183	0.193	0.135	0.135	0.224

- = no noteworthy findings

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; $AUC_{0\text{-}t}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to time point with the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; CL_T = total clearance (based on $\lambda_{z\beta}$); ECG = electrocardiogram; F = female; GAA = human acid α-glucosidase; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; NAb = neutralizing antibody; No. = number; $t_{1/2\alpha}$ = alpha half-life, early distribution terminal elimination phase; $t_{1/2\beta}$ = beta half-life, terminal phase half-life; TK = toxicokinetics; 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] Cipaglucosidase alfa total protein assay: validated under Study No. [redacted]-NL-SML-1590/AMH318EL-143183-F

[b] Cipaglucosidase alfa (GAA) activity assay: validated under Study No. 4000041 – Validation of a method to determine the GAA activity in rat and monkey plasma

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

2.6.7.7C　　カニクイザル 13 週間反復併用投与毒性試験

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat
Report Title: A 13-Week Repeat Dose Toxicity Study of ATB200 Co-administered with Miglustat in Cynomolgus Monkeys		
Species/Strain: Cynomolgus Monkey	**Duration of Dosing:** 13 weeks (once every other week, 7 doses)	**Location in CTD:** 4.2.3.2.3
Initial Age: 2 to 3 years	**Duration of Post-dose**: N/A	**Study No.:** [redacted].423.10
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Cipaglucosidase alfa: IV (2-hour infusion) Miglustat: PO (30 minutes prior to the start of infusion of cipaglucosidase alfa)	**GLP Compliance:** Yes
Vehicle/Formulation: For cipaglucosidase alfa: 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 (Formulation Buffer) For miglustat: Sterile Water for Injection, USP		
Special Features: Blood samples were collected from all animals once during acclimation, predose (prior to administration of Miglustat) during Weeks 1 (Day 1) and 13 (Day 85), and on Day 99 for ADA/NAb assays. There was no obvious effect of ADA or NAb on cipaglucosidase alfa exposure or TK parameters in cynomolgus monkeys.		
No Observed Adverse Effect Level: 100 mg/kg (highest dosage tested) for cipaglucosidase alfa; 175 mg/kg (highest dosage tested) for miglustat		

2.6.7.7C　　カニクイザル 13 週間反復併用投与毒性試験（続き）

Group	**1**		**2**		**3**		**4**		**5**	
Dose Miglustat/Cipaglucosidase Alfa (mg/kg)[a]	**0/0**		**25/50**		**175/100**		**175/0 (Miglustat)**		**0/100 (Cipaglucosidase Alfa)**	
Number of Animals and Gender	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Noteworthy Findings										
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Physical Examination	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detailed Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECG Parameters	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight Changes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopic Observation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7C　　カニクイザル 13 週間反復併用投与毒性試験（続き）

Group	**2**			**3**			**5**		
Dose (mg/kg)	**50 (Cipaglucosidase Alfa)/25 (Miglustat)**			**100 (Cipaglucosidase Alfa)/175 (Miglustat)**			**100 (Cipaglucosidase Alfa Monotherapy)**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[b]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[c]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[b]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[c]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[b]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[c]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Cipaglucosidase Alfa: Toxicokinetic Parameters[d]									
Day 1									
t_{max} (h)	2.00	2.00	2.06	2.00	2.00	2.25	1.88	1.88	1.94
C_{max} (µg/mL)	890	900	495	1960	1980	1150	1690	1670	1270
$AUC_{0\text{-}t}$ (µg·h/mL)	3060	3080	1700	10400	10400	6130	5490	5410	3230
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	3070	3100	1700	10400	10400	6140	5500	5420	3230
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.69	1.69	2.01	2.77	2.77	3.07	1.56	1.55	1.28
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.70	1.71	1.92	2.72	2.70	2.54	11.1	6.29	1.71
CL_T (L/h)	0.058	0.058	0.106	0.034	0.034	0.057	0.105	0.105	0.140
V_{ss} (L)	0.145	0.144	0.266	0.140	0.140	0.231	0.171	0.149	0.168
V_z (L)	0.144	0.143	0.296	0.133	0.133	0.210	0.729	0.401	0.383

2.6.7.7C　　カニクイザル 13 週間反復併用投与毒性試験（続き）

Group	**2**			**3**			**5**		
Dose (mg/kg)	**50 (Cipaglucosidase Alfa)/25 (Miglustat)**			**100 (Cipaglucosidase Alfa)/175 (Miglustat)**			**100 (Cipaglucosidase Alfa Monotherapy)**		
Assay/Analyte	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[b]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[c]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[b]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[c]**	**Total Cipaglucosidase Alfa Protein Assay[b]**		**Cipaglucosidase Alfa Activity Assay[c]**
	TTPTFFPK	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**		**TTPTFFPK**	**VTSEGAGLQLQK**	
Cipaglucosidase Alfa: Toxicokinetic Parameters[d]									
Day 85									
t_{max} (h)	2.00	2.00	2.13	2.13	2.19	2.06	2.13	2.13	2.00
C_{max} (µg/mL)	927	921	586	2270	2270	1600	2020	2010	1510
$AUC_{0\text{-}t}$ (µg·h/mL)	3700	3700	2390	13900	13800	9240	7830	7790	4890
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	3700	3710	2390	14000	13900	9280	7840	7800	4890
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.98	1.95	2.35	3.62	3.72	3.34	1.93	1.88	1.44
$t_{1/2\beta}$ (h)	2.38	2.40	2.31	4.83	4.83	2.90	6.62	2.63	2.03
CL_T (L/h)	0.049	0.049	0.076	0.027	0.027	0.040	0.045	0.045	0.070
V_{ss} (L)	0.147	0.147	0.223	0.140	0.140	0.186	0.143	0.127	0.159
V_z (L)	0.168	0.168	0.254	0.174	0.174	0.165	0.396	0.170	0.205

2.6.7.7C カニクイザル 13 週間反復併用投与毒性試験（続き）

Group	2	3	4
Dose (mg/kg)	**25 (Miglustat)/50 (Cipaglucosidase Alfa)**	**175 (Miglustat)/100 (Cipaglucosidase Alfa)**	**175 (Miglustat Monotherapy)**
Miglustat: Toxicokinetic Parameters[e]			
Day 1			
t_{max} (h)	2.06	2.69	3.00
C_{max} (ng/mL)	7430	20400	16400
AUC_{0-t} (ng·h/mL)	47300	182000	173000
AUC_{0-inf} (ng·h/mL)	47400	182000	173000
$t_{1/2}$ (h)	7.44	6.85	6.86
CL_T/F (L/h)	1.92	3.22	3.67
V_z/F (L)	20.5	32.3	35.9
Day 85			
t_{max} (h)	2.88	3.56	4.13
C_{max} (ng/mL)	7510	22000	14700
AUC_{0-t} (ng·h/mL)	49100	216000	204000
AUC_{0-inf} (ng·h/mL)	49100	216000	204000
$t_{1/2}$ (h)	8.23	7.86	6.66
CL_T/F (L/h)	1.99	3.62	3.49
V_z/F (L)	23.3	39.1	33.8

- = no noteworthy findings

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from time zero (predose) extrapolated to infinite time; AUC_{0-t} = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to time point with the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; CL_T = total clearance (based on $\lambda_{z\beta}$); CL_T/F = total clearance divided by the bioavailable fraction; ECG = electrocardiogram; F = female; GAA = acid α-glucosidase; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; K_2EDTA = dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M = male; N/A = not applicable; NAb = neutralizing antibody; No. = number; PO = per os; $t_{1/2}$ = elimination half-life; $t_{1/2\alpha}$ = alpha half-life, early distribution terminal elimination phase; $t_{1/2\beta}$ = beta half-life, terminal phase half-life; TK = toxicokinetics; t_{max} = time to reach the maximum observed concentration following drug administration; USP =United States Pharmacopeia; 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] For Groups 2 and 3, miglustat was administered 30 minutes prior to the start of the infusion for cipaglucosidase alfa. For Group 4, miglustat was administered alone (175 mg/kg) at the same time as the other groups receiving miglustat.
[b] Cipaglucosidase alfa total protein assay: Method Validation Report [redacted]-NL-SML-1590/AMH318EL-143183-F
[c] Cipaglucosidase alfa (GAA) activity assay: validated under Study No 4000041 – Validation of a method to determine the GAA activity in rat and monkey plasma
[d] Male and female data combined (cipaglucosidase alfa concentrations as measured by protein and activity assays were similar between sexes)
[e] Bioanalytical method: LC-MS/MS method in K_2EDTA monkey plasma ([redacted] Method [redacted] 15021-M03)

2.6.7.8　　In Vitro 遺伝毒性試験

該当せず。

2.6.7.9　　In Vivo 遺伝毒性試験

該当せず。

2.6.7.10　　がん原性試験

該当せず。

2.6.7.11　生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat						
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Dosing Period**	**Dose (mg/kg)**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
Sprague-Dawley Rat	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) (Vehicle: 0.9% sodium chloride) Miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion) (Vehicle: Sterile Water for Injection, USP)	GD 6-GD 18 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: Cohort 1: 0/0, 0/12.5, 30/0, 70/0, 150/0, 150/12.5 Cohort 2: 0/0, 300/0, 600/0	Cohort 1: 6 Cohort 2: 2 (6 for vehicle control)	At all dose levels, maternal neurological clinical observation considered to have been an adverse immunological response to a human enzyme having been administered to a non-human species.	8371929/ 4.2.3.5.2.1
New Zealand White Rabbit	cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion) (Vehicle: 0.9% sodium chloride) Miglustat: PO (30 minutes prior to IV infusion) (Vehicle: Sterile Water for Injection, USP)	GD 7-GD 19 (every other day)	cipaglucosidase alfa/miglustat: 0/0, 0/25, 30/0, 70/0, 150/0, 150/25 mg/kg	6	No treatment-related changes	8371928/ 4.2.3.5.2.3

Abbreviations: GD = gestation day; IV = intravenous; No. = number; PO = per os; USP =United States Pharmacopeia

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat
Report Title: Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation, with Toxicokinetic Evaluation, in Rats with ATB200 Alone or Co-administered with AT2221		
Study Design: Standard Fertility and Early Embryonic Development Study Design in Rats	**Duration of Dosing:** M: every other day beginning at least 28 days prior to pairing and continuing for 6 weeks F: every other day beginning at least 14 days prior to mating and then on GD 1, 3, 5, and 7	**Location in CTD:** 4.2.3.5.1.1
Species/Strain: Sprague-Dawley Rat	**Day of Mating:** GD 1	**Study No.:** 8371927
Initial Age: 14 weeks (M) and 14-16 weeks (F) old at initiation of pairing (Cohort A) 10 weeks (M) old at initiation of dosing; 12-14 weeks (F) old at initiation of pairing (Cohort B) 17-18 weeks (M) old at initiation of dosing; 16-17 weeks (F) old at the start of pairing and 14-15 weeks old at initiation of dosing (Cohort C)	**Day of C-Section:** GD 13	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion), Miglustat: orally 30 minutes prior to the IV infusion	**Vehicle/Formulation:** Cipaglucosidase alfa: 0.9% sodium chloride, Miglustat: Sterile Water for Injection, USP
Special Features: DPH oral antihistaminic (10 mL/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on the second dose administration and continuing every other day until the last dose administration		
No Observed Adverse Effect Level of Cipaglucosidase Alfa: 400 mg/kg for both male and female parents and for fertility and early embryonic development **No Observed Adverse Effect Level of Miglustat:** 60 mg/kg for both male and female parents, < 60 mg/kg for fertility and early embryonic development		

Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); DPH = diphenhydramine hydrochloride; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; USP =United States Pharmacopeia

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Group	**1[a]**	**2[b]**	**3[b, c]**	**4[b]**	**5[b]**	**6[b]**	**7[b, c]**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**0**	**70**	**150**	**400**	**400**
Number of Animal: Cohort B (Male Fertility)	**M (22)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH+Miglustat)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH+Miglustat)**
Toxicokinetics (n=3/timepoint)[d]							
Number of Animal: Cohort C			**M (6) (DPH+Miglustat)**			**M (6) (DPH)**	**M (12) (DPH+Miglustat)**
Cipaglucosidase Alfa Peptides							
TTPTFFPK							
Day 1 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	54400	61600
Day 28 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	55200	63000
VTSEGAGLQLQK							
Day 1 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	54600	61100
Day 28 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	55000	62900
Miglustat							
Day 1 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	34300	N/A	N/A	N/A	111000
Day 28 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	27600	N/A	N/A	N/A	96000
Noteworthy Findings							
Number of Died or Sacrificed Moribund[e]	0	1	0	4	1	0	2[f]
Number of Males Cohabitated	22	20[g]	22	18	20[h]	22	21

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Group	**1[a]**	**2[b]**	**3[b, c]**	**4[b]**	**5[b]**	**6[b]**	**7[b, c]**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**0**	**70**	**150**	**400**	**400**
Number of Animal: Cohort B (Male Fertility)	**M (22)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH+Miglustat)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH)**	**M (22) (DPH+Miglustat)**
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-
Sperm Motility and Concentration	-	-	-	-	-	-	-
Mating Index (%)[i]	100	90	100	94	100	95	95
Fecundity Index (%)[j]	91	94	91	94	80	90	95
Fertility Index (%)[k]	91	85	91	89	80	86	90

- = no noteworthy findings

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; DPH = diphenhydramine hydrochloride; IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable

[a] Group 1 males: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning at least 28 days prior to pairing and continuing every other day through the day up to and including the day prior to termination.

[b] Groups 2 through 7 males: DPH oral antihistamine (10 mL/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on the second dose administration and continuing every other day until the last dose administration.

[c] Groups 3 and 7 males: Oral miglustat enzyme stabilizer (60 mg/kg) administered 30 minutes ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning at least 28 days prior to pairing and continuing every other day for 6 weeks.

[d] Evaluated in Cohort C for Vehicle Control DPH + miglustat (Group 8, 6 males), 400 mg/kg cipaglucosidase alfa DPH (Group 9, 6 males) and 400 mg/kg cipaglucosidase alfa DPH + miglustat (Group 10, 12 males). The data is presented under Groups 3, 6 and 7 , respectively.

[e] These mortalities were of unknown origin during premating phase.

[f] One male was replaced on premating day 0 due to its death following dosing.

[g] One male administered an improper dose and were removed from the study on premating day 16.

[h] One male administered an improper dose and were removed from the study on premating day 22.

[i] Mating index % = (Number of males mating with at least 1 female /Number of males cohabitated with at least 1 female) x 100

[j] Fecundity index % = (Number of males impregnating at least 1 female /Number of males mating with at least 1 female) x 100

[k] Fertility Index % = (Number of males impregnating at least 1 female /Number of males cohabitated with at least 1 female) x 100

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Group	**1[a]**	**2[b]**	**3[b, c]**	**4[b]**	**5[b]**	**6[b]**	**7[b, c]**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**0**	**70**	**150**	**400**	**400**
Number of Animal: Cohort A (Female Fertility)	**F (22)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH+Miglustat)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH+Miglustat)**
Toxicokinetics (n=3/timepoint)[d]							
Number of Animal: Cohort C			**F (6) (DPH+Miglustat)**			**F (6) (DPH)**	**F (12[e]) (DPH+Miglustat)**
Cipaglucosidase Alfa Peptides							
TTPTFFPK							
Day 1 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38600	48600
GD7 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38700	37900
VTSEGAGLQLQK							
Day 1 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38400	49100
GD7 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38100	38200
Miglustat							
Day 1 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	39600	N/A	N/A	N/A	103000
GD7 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	31400	N/A	N/A	N/A	87600
Noteworthy Findings							
Number of Died or Sacrificed Moribund	0	1	0	2	1	0	2[g]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-
Premating Body Weight	-	-	-	-	-	-	-
Gestation Body Weight	-	-	-	-	-	-	-
Premating Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Group	**1[a]**	**2[b]**	**3[b, c]**	**4[b]**	**5[b]**	**6[b]**	**7[b, c]**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**0**	**70**	**150**	**400**	**400**
Number of Animal: Cohort A (Female Fertility)	**F (22)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH+Miglustat)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH+Miglustat)**
Gestation Food Consumption[f]							
GD 3-5 interval (g)	36.6	35.9	35.9	+2.5%	+0.6%	-4.5%	-10.0%*
GD 5-7 interval (g)	34.3	33.8	35.4	-3.0%	+2.1%	-4.7%	-10.2%*
GD 7-9 interval (g)	36.7	36.1	37.2	-10.0%*	-1.7%	-10.2%*	-9.1%*
GD 9-11 interval (g)	37.7	36.4	38.6	-1.6%	-1.4%	-1.9%	-8.8%*
Mean No. Estrous Cycles/14 Days	-	-	-	-	-	-	-
Pregnancy Rate (%)	100	90	90	94	90	95	90
Necropsy Observations							
Discolored Dark Red Lungs	0	0	0	0	0	0	2[g]
Cesarean Section							
No. of Females Pregnant at Cesarean Section	20	18	19	17	18	19	18
Mean No. Corpora Lutea	16	16	15	16	15	16	16
Mean No. Implantations	15	15	12	16	14	15	13
Mean % Preimplantation Loss	9.6	8.5	21.6	4.2	11.8	8.5	21.4
Mean No. Early Resorptions	1	1	1	1	1	1	1

2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（続き）

Group	**1[a]**	**2[b]**	**3[b, c]**	**4[b]**	**5[b]**	**6[b]**	**7[b, c]**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0**	**0**	**0**	**70**	**150**	**400**	**400**
Number of Animal: Cohort A (Female Fertility)	**F (22)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH+Miglustat)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH)**	**F (22) (DPH+Miglustat)**
Mean No. Late Resorptions	0	0	0	0	0	0	0
Mean % Post implantation Loss	8.5	8.2	4.9	7.6	7.0	7.5	5.9
Mean No. Live Fetuses	13	14	12	14	13	14	12

- = no noteworthy findings, *P ≤0.05 using t-test.
Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; DPH = diphenhydramine hydrochloride; F = female; GD = gestation day; IV = intravenous; N/A = not applicable; No. = number

[a] Group 1 females: Administered 0.9% Sodium Chloride only via IV infusion every other day beginning at least 14 days prior to pairing and on GD 1, 3, 5, and 7.

[b] Groups 2 through 7 females: DPH oral antihistamine (10 mL/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on the second dose administration and continuing every other day until the last dose administration.

[c] Groups 3 and 7 females: Miglustat oral drug chaperone (60 mg/kg) administered 30 minutes ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning at least 14 days prior to pairing every other day until confirmation of mating and then on GD 1, 3, 5, and 7.

[d] Evaluated in Cohort C for Vehicle Control DPH + miglustat (Group 8, 6 females), 400 mg/kg cipaglucosidase alfa DPH (Group 9, 6 females) and 400 mg/kg cipaglucosidase alfa DPH + miglustat (Group 10, 12 females). The data is presented under Groups 3, 6 and 7, respectively.

[e] Four females died due to the possible adverse immunological response of the repeated administration of a human enzyme in a non-human species (rat), as indicated by the macroscopic observation of dark red lungs.

[f] For controls (Groups 1, 2, and 3), group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown (Groups 4, 5 and 6 versus Group 2; Group 7 versus Group 3, respectively).

[g] Discolored dark red lungs were noted in two Group 7 females and were considered test article-related possibly due to an immunological response from the repeated administration of a human enzyme in a non-human species (rat).

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13A　ラット

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat
Report Title: Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study for Effects with ATB200 Alone or Co-Administered with AT2221 in Rats		
Study Design: Standard Embryo-fetal Development Study in Rats	**Duration of Dosing:** Beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18	**Location in CTD:** 4.2.3.5.2.2
Species/Strain: Sprague-Dawley Rat	**Day of Mating:** GD 0	**Study No.:** 8371930
Initial Age: 11 to 12 weeks old	**Day of C-Section:** GD 21	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: ■ ■■■ 20■	**Method of Administration:** Cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion, tail vein slow bolus, 20 mL/kg), Miglustat: orally 30 minutes prior to the IV infusion	**Vehicle/Formulation:** Cipaglucosidase alfa: 0.9% sodium chloride (w/v), Miglustat: Sterile Water for Injection, USP
Special Features: DPH oral antihistaminic (10 mg/kg) administered at 90 +15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every other day through GD 18		
Maternal and Developmental NOAELs for Cipaglucosidase Alfa: 400 mg/kg (with or without miglustat) **Maternal and Developmental NOAELs for Miglustat**: 60 mg/kg (with or without cipaglucosidase alfa)		

2.6.7.13A　　ラット（続き）

Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b, c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b, c] (DPH + Miglustat)**
Dams/Does	**Toxicokinetics (n=3/timepoint):**							
	Cipaglucosidase Alfa Peptides							
	TTPTFFPK							
	GD 6 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	2780	7750	21700	29500
	GD 18 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	1850	6090	27300	28700
	VTSEGAGLQLQK							
	GD 6 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	2850	7940	21700	30200
	GD 18 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	1910	6330	26900	29000
	Miglustat							
	GD 6 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	29700	N/A	N/A	N/A	75200
	GD 18 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	41100	N/A	N/A	N/A	84300
	No. Evaluated	22	22	22	22	23	23	23
	No. Pregnant	21	22	21	22	23	22	23
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1[d]	0	0	2[e]
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.13A　　ラット（続き）

Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b, c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b, c] (DPH + Miglustat)**
Dams/Does (Continued)	**Necropsy Observations**							
	Discolored Red Lungs	0	0	0	0	0	0	2
	Yellow/tan Liver Lobes	0	0	0	2	0	0	1
	Body Weight (g)[f]	362	+1.4%	+1.7%	+1.9%	+2.2%	-1.4%	+0.6%
	Food Consumption (g)[g]	57.0	+1.6%	+7.4%	+0.9%	+0.7%	-9.8%	-3.3%
	Mean No. Corpora Lutea	14	14	14	14	14	14	15
	Mean No. Implantation Sites	13	13	12	13	13	13	13
	Mean % Preimplantation Loss	5.1	8.6	7.1	4.7	6.7	6.0	8.3
Litters	**No. Litters Evaluated**	21	22	21	21	22	21	21
	No. Live Fetuses	12	12	12	13	13	13	13
	Mean No. Resorptions [early (late)]	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	No. Dead Fetuses	0	0	0	0	0	0	0
	Mean % Post-implantation Loss	4.2	3.3	1.8	0.4	1.7	1.5	3.0
	Mean Fetal Body Weight (g) (Male+Female)	5.55	5.67	5.68	5.58	5.56	5.37	5.59
	Fetal Sex Ratios	-	-	-	-	-	-	-
	Fetal Anomalies							
	Gross External	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.13A　　ラット（続き）

Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b, c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b, c] (DPH + Miglustat)**
Litters (Continued)	Visceral Anomalies	-	-	-	-	-	-	-
	Skeletal Anomalies	-	-	-	-	-	-	-
	Total Affected Fetuses (Litters)	-	-	-	-	-	-	-

- = no noteworthy findings

Abbreviations and acronyms: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; DPH = diphenhydramine hydrochloride; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; N/A = not applicable; No. = number; NOAEL = no observed adverse effect level; USP =United States Pharmacopeia; w/v = weight/volume

[a] Group 1: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18.

[b] Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every other day through GD 18.

[c] Groups 3 and 7: Oral miglustat (60 mg/kg, 6.0 mg/mL) administered 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 6 and continuing every other day through GD 18.

[d] Found dead on GD 14 (the fifth dose of cipaglucosidase alfa).

[e] Found dead on GD 8 (the second dose of cipaglucosidase alfa) and GD 6 (the first dose of cipaglucosidase alfa) respectively. The cause of death of the animal (R0617) found dead after the first dose on GD 6 was unknown (not related to immunological reaction since the death occurred after the first dose) and possibly attributed to a technical error dosing.

[f] Data from GD 21. For controls, group means are shown. For other groups, percent differences from controls are shown.

[g] Data from the interval GD 18-GD 21. For controls, group means are shown. For other groups, percent differences from controls are shown.

2.6.7.13B　　ウサギ

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat
Report Title: Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study with ATB200 Alone or Co-administered with AT2221 in Rabbits		
Study Design: Standard Embryo-fetal Development Study in Rabbits	**Duration of Dosing:** Beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19	**Location in CTD:** 4.2.3.5.2.4
Species/Strain: New Zealand White Rabbit	**Day of Mating:** GD 0	**Study No.:** 8371931
Initial Age: 6 to 7 months old	**Day of C-Section:** GD 29	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion, marginal ear vein slow bolus, 10 mL/kg) Miglustat: orally 30 minutes prior to the IV infusion	**Vehicle/Formulation:** Cipaglucosidase alfa: 0.9% sodium chloride, Miglustat: Sterile Water for Injection, USP
Special Features: DPH oral antihistaminic (10 mg/kg) administered at 90 +15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 9 and continuing every other day through GD 19		
Maternal NOAEL for Cipaglucosidase Alfa: 175 mg/kg (with or without miglustat) **Maternal NOAEL for Miglustat**: < 25 mg/kg (with or without cipaglucosidase alfa) **Developmental NOAEL for Cipaglucosidase Alfa**: 175 mg/kg (cipaglucosidase alfa alone) and < 175 mg/kg (co-administration with miglustat) **Developmental NOAEL for Miglustat**: 25 mg/kg (miglustat alone) and < 25 mg/kg (co-administration with cipaglucosidase alfa)		

2.6.7.13B　　ウサギ（続き）

Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b, c] (DPH + Miglustat)**	**30[b] (DPH)**	**70[b] (DPH)**	**175[b] (DPH)**	**175[b, c] (DPH + Miglustat)**
Dams/Does	**Toxicokinetics (n=3/timepoint):**							
	Cipaglucosidase Alfa Peptides							
	TTPTFFPK							
	GD 7 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	1630	4640	19900	27300
	GD 19 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	1290	3640	11500	22700
	VTSEGAGLQLQK							
	GD 7 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	1640	4730	20000	26900
	GD 19 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	N/A	N/A	N/A	1300	3690	11600	22400
	Miglustat							
	GD 7 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	34700	N/A	N/A	N/A	58400
	GD 19 - $AUC_{0\text{-}24h}$ (ng·h/mL)	N/A	N/A	39100	N/A	N/A	N/A	66100
	No. Evaluated	20	20	20	20	20	20	20
	No. Pregnant	18	20	19	15	20	17	19
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0	0	0	1[d]
	Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-
	Body Weight (g)[e]	3801	-0.5%	-3.9%	-2.9%	-0.6%	-1.7%	-3.7%

2.6.7.13B　　ウサギ（続き）

Group		1	2	3	4	5	6	7
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		0[a] (Control)	0[b] (DPH)	0[b, c] (DPH + Miglustat)	30[b] (DPH)	70[b] (DPH)	175[b] (DPH)	175[b, c] (DPH + Miglustat)
Dams/Does (Continued)	Body Weight Gain (g)[f]	405	-5%	-24%*	-11%	-2%	-1%	-21%*
	Food Consumption (g)[g]	102.8	-3.3%	+1.4%	+1.5%	-3.2%	-6.0%	-6.7%
	Mean No. Corpora Lutea	10	10	10	10	10	9	10
	Mean No. Implantation Sites	9	9	9	9	9	8	9
	Mean % Preimplantation Loss	10.0	8.2	9.7	11.1	2.2	8.9	6.2
Litters	No. Litters Evaluated	18	20	19	15	20	17	18
	Mean No. Live Fetuses	9	9	8	8	9	8	9
	Mean No. Resorptions [early (late)]	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	Mean No. Dead Fetuses	0	0	0	0	0	0	0
	Mean % Post implantation Loss	2.5	4.7	7.0	8.5	1.0	2.7	5.6
	Mean Fetal Body Weight (g) (M+F)	41.5	41.2	41.9	39.2	39.3	40.9	39.4
	Fetal Sex Ratios	-	-	-	-	-	-	-
	Gross External	-	-	-	-	-	-	-
	Number of Dams/Fetus	20/160	20/171	20/157	20/122	20/186	20/141	20/159
	Number Examined Litter/Fetus	18/160	20/171	19/157	15/122	20/186	17/141	18159

2.6.7.13B　　ウサギ（続き）

Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b, c] (DPH + Miglustat)**	**30[b] (DPH)**	**70[b] (DPH)**	**175[b] (DPH)**	**175[b, c] (DPH + Miglustat)**
Litters (Continued)	**Visceral Malformations:**							
	Cardiovascular Malformations							
	Atrium malpositioned							
	% Litter	0	0	0	0	0	0	6
	% Fetal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.39
	Dextrocardia							
	% Litter	0	0	0	0	0	0	11
	% Fetal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.49
	Ventricle - large							
	% Litter	0	0	5	0	0	6	11
	% Fetal	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.49	2.18
	Atretic pulmonary trunk							
	% Litter	0	0	5	0	0	6	22[†#]
	% Fetal	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.49	4.01[#]
	Ventricular septum defect							
	% Litter	0	0	5	0	0	0	28[†#]
	% Fetal	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.00	4.57[†#]

2.6.7.13B　　ウサギ（続き）

Group		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)		**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b, c] (DPH + Miglustat)**	**30[b] (DPH)**	**70[b] (DPH)**	**175[b] (DPH)**	**175[b, c] (DPH + Miglustat)**
Litters (Continued)	Dilated aortic arch							
	% Litter	0	0	5	0	0	6	28†#
	% Fetal	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.49	8.55†#
	Visceral Variations:							
	Pulmonary trunk - narrow							
	% Litter	0	0	0	0	0	0	11
	% Fetal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.19
	Skeletal Anomalies	-	-	-	-	-	-	-
	Total Affected Fetuses (Litters)							
	Total Malformations (all)							
	Total number of litter affected	2	5	4	7	5	6	8
	% Litter	11	25	21	47	25	35	44
	Total number of fetuses affected	2	7	5	10	5	6	20
	% Fetal	1.25	4.1	3.2	8.2	2.7	4.3	12.6
	Total Malformations – Blood vessel and/or Heart							
	Total number of litter affected	0	0	1	0	1	1	6
	% Litter	0	0	5.3	0	5.0	5.9	33.3
	Total number of fetuses affected	0	0	1	0	1	1	15
	% Fetal	0	0	0.64	0	0.54	0.71	9.4

- = no noteworthy findings, *P ≤0.05 using t-test.
†: significantly different from Group 1, #: significantly different from Group 2 (P ≤ 0.05, Wilcoxon Rank Sum Tests for %Litter and Fisher's Exact Tests for %Fetal)

Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero (predose) to 24 hours postdose; DPH = diphenhydramine hydrochloride; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; M = male; N/A = not applicable; No. = number; NOAEL = no observed adverse effect level; USP =United States Pharmacopeia

[a] Group 1: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19.

[b] Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 9 and continuing every other day through GD 19.

[c] Groups 3 and 7: Oral miglustat enzyme stabilizer (25 mg/kg) administered at 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 7 and continuing every other day through GD 19.

[d] Removed from the study due to an abortion on GD 21 (attributed to the depressed dietary intake).

[e] Data from GD 29. For controls, group means are shown. For other groups, percent differences from controls are shown.

[f] Data from the interval GD 7-GD 29. For controls, group means are shown. For other groups, percent differences from controls are shown.

[g] Data from GD 28-29. For controls, group means are shown. For other groups, percent differences from controls are shown.

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

		Test Article: Cipaglucosidase Alfa, Miglustat
Report Title: Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function, with ATB200 Alone or Co-Administered with AT2221in Rats		
Study Design: Standard Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function Study in Rats	**Duration of Dosing:** Beginning on GD 6 and continuing every other day through LD 19	**Location in CTD:** 4.2.3.5.3.1
Species/Strain: Sprague-Dawley Rats	**Day of Mating:** GD 0	**Study No.:** 8371932
Initial Age: Toxicity animals: 10 to 12 weeks old at first dose Toxicokinetic animals:15 weeks old at first dose	**Litters Culled/Not Culled:** Culled	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Cipaglucosidase alfa: IV (10-minute infusion, tail vein slow bolus, 30 mL/kg) Miglustat: orally 30 minutes prior to the IV infusion	**Vehicle/Formulation:** Cipaglucosidase alfa: 0.9% sodium chloride, Miglustat: Sterile Water for Injection, USP
Special Features: DPH oral antihistaminic (10 mg/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every other day through LD 19		
Maternal and Pre- and Postnatal Developmental NOAEL for Cipaglucosidase Alfa: 400 mg/kg (with or without miglustat) **Maternal and Pre- and Postnatal Developmental NOAEL for Miglustat**: 60 mg/kg (with or without cipaglucosidase alfa)		

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
F_0 Females:							
No. Evaluated	24	25	24	25	25	26	30
No. Pregnant	24	25	24	25	24	24	29
No. Died or Euthanized in Extremis	1	0	1	3	1	1	4
Clinical Observations (Phase: Gestation)							
Activity							
General activity, severe, decreased	0	0	0	0	0	0	1
General activity, decreased	0	0	0	3	1	1	4
Gait							
Ataxia	0	0	0	1	0	0	3
Gestation Body Weight (g)							
GD 6	263	261	260	262	259	263	258
GD 20	369	364	374	371	370	369	362
Gestation Body Weight Changes (g)							
GD 6-20	106	104	113	109	112	106	104
Lactation Body Weight (g)							
LD 1	275	263	264	266	259	264	253
LD 19	309	302	305	309	306	308	303
Lactation Body Weight Changes (g)							
LD 1-19	34	38	41	41	45	43	49

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Gestation Food Consumption (g), interval X-X							
GD 6-8	45	45	46	45	45	45	45
GD 8-10	45	44	46	46	44	44	43
GD 10-12	47	46	48	47	47	46	46
GD 12-14	49	47	50	48	49	48	46
GD 14-16	52	49	52	47*	47*	47*	45*
GD 16-18	42	53	55	52	53	54	52
GD 18-20	47	44	48	42	44	44	46
GD 6-20	326	328	346	326	327	328	323
Lactation Food Consumption (g), interval X-X							
LD 1-3	66	70	64	65	61	63	54*
LD 3-5	74	74	85*	78	81*	76	79
LD 5-7	85	91	91	90	92	87	87
LD 7-9	109	101	101	99	101	94	98
LD 9-11	101	103	106	106	108	100	102
LD 11-13	105	107	107	110	110	105	102

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Lactation Food Consumption Changes (g), interval X-X							
LD 1-13	522	550	548	547	552	525	524
Mean Gestation Length (days)	23.0	23.0	22.9	23.0	23.0	23.0	23.1
No. of Total Litter Losses	0	1	0	0	1	1	3
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-
F_1 Litters:							
No. Litters Evaluated	23	23	23	23	23	22	27
Mean No. of Implantations	13.46	13.60	14.13	13.67	14.00	13.70	13.52
Mean No. of Pups Born/Litter	12.09	13.09	13.35	12.78	13.26	13.05	12.67
Mean No. Liveborn Pups/Litter	12.09	12.83	13.26	12.43	12.57	12.55	12.41
Postnatal Survival to Day 4 (% per Litter)	94	94	99	99	95	89	86
Postnatal Survival to Weaning (% per Litter)	100	95	99	99	96	95	88

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Pup Body Weights (g)							
Males:							
PND 1	7.66	7.31	7.35	7.46	7.21	7.08	7.23
PND 4 (postcull)	11.28	10.73	10.49	10.85	10.18	10.55	10.18
PND 7	17.25	17.02	16.85	17.17	16.53	16.62	16.01
PND 14	34.29	34.03	33.77	34.32	34.05	33.53	31.59*
PND 21	57.86	57.10	55.97	57.71	56.52	55.99	53.29*
Females:							
PND 1	7.09	7.00	6.95	7.09	6.88	6.75	6.85
PND 4 (postcull)	10.56	10.29	9.87	10.30	9.92	10.18	9.75
PND 7	16.68	16.41	16.25	16.58	16.20	16.34	15.49
PND 14	33.69	33.79	33.24	34.05	33.74	33.41	31.10*
PND 21	55.44	56.21	54.78	57.35	55.47	56.02	53.01
Pup Sex Ratio (% Males per litter)	48	53	49	50	56	49	49
Pup Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Pup Necropsy Observations							
No milk in stomach	1/124 (M) 2/142 (F)	1/151 (M) 0/139 (F)	0/147 (M) 0/157 (F)	0/147 (M) 0/143 (F)	1/173 (M) 1/131 (F)	1/135 (M) 2/147 (F)	8/160 (M) 6/166 (F)
F1 Males:							
Postweaning							
No. Evaluated Postweaning	20	20	20	20	20	20	20
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-
Mean Body Weights (g)							
PND 28	98	97	94	97	94	94	88*
PND 35	159	156	151*	154	151*	152	145*
PND 42	225	220	214*	218	212*	214*	207*
PND 49	287	280	274	279	271	274	269
PND 56	348	340	334	339	333	336	328
PND 63	392	387	380	385	379	383	377
PND 70	425	416	411	420	413	419	412
PND 77	459	450	446	453	448	455	447
PND 84	492	478	477	483	477	484	476

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Mean Body Weight Changes (g)							
Maturation Day 0-56	394	381	383	386	383	390	388
Mean Food Consumption (g)							
Maturation Day 0-56	1490	1420	1456	1423	1416	1455	1428
Mean Age at Balanopreputial Separation (days)	45.5	46.1	45.9	45.8	46.9	46.7	46.7
Mean Body Weights at Balanopreputial Separation (g)	256.6	254.3	246.4	249.5	251.8	254.5	249.0
Startle Response Assessment	-	-	-	-	-	-	-
Locomotor Activity (PND 56)	-	-	-	-	-	-	-
Morris Water Maze	-	-	-	-	-	-	-
No. of Males Mated with 1+ Females	18	16	19	18	20	16	18
No. of Males that Sired a Litter	15	16	15	18	19	14	18
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
F_1 Females:							
Postweaning							
No. Evaluated Postweaning	20	20	20	20	20	20	20
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-
Mean Premating Body Weights (g)							
PND 28	91	92	89*	92	90	90	84*
PND 35	137	137	133*	139	136	138	126*
PND 42	178	175	172	178	176	176	162*
PND 49	209	200	200	202	202	203	188*
PND 56	226	220	224	230	227	230	214
PND 63	244	239	242	249	245	250	233
PND 70	261	254	257	264	260	264	248
PND 77	276	269	272	277	277	281	262
PND 84	284	277	280	288	286	289	275
Mean Premating Body Weight Changes (g)							
Maturation Day 0-56	192	185	192	197	196	199	191

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Mean Premating Food Consumption (g)							
Maturation Day 0-56	1019	989	1021	1054	1009	1030	975
Mean Age at Vaginal Patency (days)	32.5	32.7	32.5	32.6	32.2	32.8	32.7
Mean Body Weights at Vaginal Patency (g)	120.6	121.1	116.0	121.4	117.2	122.2	113.7
Startle Response Assessment	-	-	-	-	-	-	-
Locomotor Activity (PN56)	-	-	-	-	-	-	-
Morris Water Maze	-	-	-	-	-	-	-
Mean Gestation Body Weights (g)							
GD 0	294	287	294	297	294	298	275
GD 13	366	353	361	366	367	370	344
Mean Gestation Body Weight Changes (g)							
GD 0-13	72	67	67	69	72	72	69
Gestation Food Consumption (g)							
GD 0-13	337	319	330	326	328	339	306

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

Group	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Cipaglucosidase Alfa Dose (mg/kg)	**0[a] (Control)**	**0[b] (DPH)**	**0[b,c] (DPH + Miglustat)**	**70[b] (DPH)**	**150[b] (DPH)**	**400[b] (DPH)**	**400[b,c] (DPH + Miglustat)**
Mean Estrous Cycle Length (days)	4.01	4.13	4.18	4.26	4.18	4.61	4.45
No. of Females Mated	20	19	20	20	20	18	18
No. of Females Pregnant	16	19	16	20	19	16	18
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-
Mean No. of Corpora Lutea	17.5	16.8	16.8	16.6	16.8	17.1	17.0
Mean No. of Implantations	16.3	14.9	16.4	15.3	16.2	15.4	16.0
F_2 Litters:							
No. of Litters Evaluated	14	17	16	18	19	15	18
Mean No. Early Absorptions	0.9	1.1	1.1	1.2	0.8	1.5	0.9
Mean No. Late Resorptions	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean No. Live Fetuses/Litter	15.4	13.9	15.4	14.1	15.4	13.9	15.1
Fetal Anomalies	-	-	-	-	-	-	-

NOTE: The concentration analysis of cipaglucosidase alfa and miglustat levels in plasma and milk of nursing dams (sample collected approximately 2.5 hours post the final dose on LD 13 from t satellite toxicokinetic animals) is presented in Module 2.6.5, Section 7.

- = no noteworthy findings

* = $p \leq 0.05$

Abbreviations: AT2221 = miglustat; ATB200 = cipaglucosidase alfa (genetical recombination); DPH = diphenhydramine hydrochloride; F=female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; LD = lactation day; M=male; No. = number; NOAEL = no observed adverse effect level; PND = postnatal day; USP =United States Pharmacopeia

[a] Group 1: Administered 0.9% sodium chloride only via IV infusion beginning on GD 6 and continuing every other day through LD 19.

[b] Groups 2 through 7: DPH oral antihistamine (10 mg/kg) administered at 90 ± 15 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 8 and continuing every other day through LD 19.

[c] Groups 3 and 7: Oral miglustat enzyme stabilizer (60 mg/kg) administered 30 ± 5 minutes prior to IV infusion (0.9% sodium chloride or cipaglucosidase alfa) beginning on GD 6 and continuing every other day through LD 19.

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当せず。

2.6.7.16　　局所刺激性試験

該当せず。

2.6.7.17　その他の毒性試験

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Dose	GLP Compliance	Noteworthy Findings	Study Number/ Location in CTD
Hemolysis Assay	Human Whole Blood	*In vitro* (Vehicle: 0.9% sodium chloride)	1 hour	300, 600, 1000 µg/mL	Yes	No hemolysis occurred at concentrations of cipaglucosidase alfa of 300, 600, and 1000 µg/mL	0725XA132.001/ 4.2.3.7.7.1
Flocculation Assay	Human Plasma and Serum	*In vitro* (Vehicle: 0.9% sodium chloride)	30 minutes	300, 600, 1000 µg/mL	Yes	No precipitation observed macroscopically and microscopically in the human plasma or serum mixed with cipaglucosidase alfa	0726XA132.001/ 4.2.3.7.7.2

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice