

目次

1.	まとめ	2
2.	分析方法.....	4
3.	吸収	6
4.	分布	6
4.1.	AAV9 の分布及び scAAV9.CB.GFP を用いた試験.....	6
4.2.	マウス新生仔に 6 ヶ月間静脈内投与したときの安全性及び体内分布に関する試験	7
4.3.	12 週間の追跡調査期間を設けた、GMP ロットを用いてマウス新生仔に静脈内投与する用量設定・安全性及び分布に関する試験.....	9
4.4.	12 週間の追跡調査期間を設けた、AVXS-101 の GMP ロットのマウス新生仔を用いた単回静脈内投与試験.....	10
5.	代謝（種間比較）	11
6.	排泄	11
7.	薬物動態学的相互作用.....	11
8.	その他の薬物動態試験.....	11
9.	考察及び結論.....	11
10.	図表	12
11.	参考文献.....	12

表目次

表 1 :	終了した AVXS-101 の体内分布に関する非臨床試験.....	4
表 2 :	生後 1 日の FVB マウスを用いた単回静脈内投与試験における体内分布解析用の組織採取の順序（AD49TV.7A32.BTL 試験）	4
表 3:	AVXS-101 のマウスを用いた毒性及び体内分布試験の試験デザイン	8
表 4 :	生後 1 日の FVB/NJ マウスを用いた GMP ロット番号 816836 の AVXS-101 の用量設定・安全性及び体内分布に関する試験の体内分布及び SMN 遺伝子の発現のパート	9
表 5 :	20122446 試験の体内分布及び遺伝子発現解析用に採取した組織	10
表 6 :	生後 1 日の FVB/NCrl マウスを用いた GMP ロット 600443 の AVXS-101 の単回静脈内投与試験のデザイン.....	10

図目次

図 1 :	カニクイザルに直接髄腔内投与したときの scAAV9.CB.GFP の組織分布.....	7
-------	--	---

1. まとめ

AVXS-101 はアデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 (AAV9) であり、AAV6, AAV8 などの複数のセロタイプのうちの 1 つである。これらのセロタイプは、1 回の全身静脈内投与又は腹腔内投与後に、骨格筋や心筋などのさまざまな組織全体に広範に形質導入することができる (Blankinship et al 2004, Wang et al 2005, Inagaki et al 2006, Nakai et al 2005, Pacak et al 2006)。これらのセロタイプは、すべて血管内皮細胞の関門を効率的に通過することが認められているが、他の AAV セロタイプと比べ、AAV9 はより迅速に脳内へ輸送される (Cearley and Wolfe, 2006)。AAV9 は AAV2 や AAV8 と同様にラミニン受容体を使うことが知られているが、AAV6 がラミニン受容体を使用しないように、細胞接着、内在化、形質導入にはラミニン受容体以外の未知の受容体を使用している可能性がある (Akache et al, 2006)。このため、AAV9 はカプシドの多様なトポグラフィーと標的細胞との相互作用を持つと考えられる。

AAV9 ベクターについて入手したデータから、AAV9 ベクターは、特に中枢神経系における分布に関してかなり多くのことが解明されている。しかし、弊社は SMN ベクターのコンストラクトを用いた分布に関する予備情報に代わるものとして、AAV9 に密接に関連する対照である緑色蛍光タンパク (GFP) 発現 scAAV9.CB.GFP ベクターを用いた試験にも数多く着手している。これらの試験では、scAAV9.CB.GFP ベクターが、さまざまな動物種において、静脈内投与した場合でも中枢神経系への直接投与した場合でも、効率的に中枢神経系を標的とすることが認められた。マウス新生仔に静脈内投与したところ、中枢神経系において顕著かつ広範囲にニューロンへの形質導入が認められたが、マウスが成体に成長したときに投与した場合は、形質導入は著しく低くなった。マウス疾患モデルを用いた別の試験では、中枢神経系内のニューロンを標的とする上で早期投与の重要性がさらに確認された。scAAV9.CB.GFP は、非ヒト霊長類に全身 (静脈内) 投与したときに中枢神経系のニューロンへ形質導入することができ、さらにブタを使った別の試験では、静脈内投与の用量の約 1/10 の用量で髄腔内へ直接投与した場合でも中枢神経系への形質導入と分布が認められた。上記の試験から、この scAAV9 ベクターには、局所 (脳室内又は髄腔内) 若しくは全身 (静脈内) のいずれの投与経路でも中枢神経系内のニューロンへ形質導入する可能性があること、さらに、ニューロンへの形質導入は投与時の動物の年齢によってかなり異なることが確認された。早期投与によってマウス及び非ヒト霊長類の中枢神経系のニューロンへの形質導入の程度が促進された。

AVXS-101 の体内分布及び持続性は、AVXS-101 の初期の製造工程で製造された製品を使って、正常な雌雄の FVB マウスに 6 ヶ月間静脈内投与したときの安全性及び体内分布に関する GLP 非準拠の予備試験で評価され、バリデートされていない分析方法を用いてその特徴を明らかにした。GLP 非準拠の本予備試験に続き、第 3 相試験で製造された製品及び承認申請書に記載した実生産の製造工程 (工程 B, [モジュール 3.2.S.2.6](#)) で製造された製品を用いて、正常な雌雄の FVB マウスに 3 ヶ月間静脈内投与したときの安全性及び体内分布に関する 2 件の GLP 試験を行い、バリデートされた分析方法を用いてその特徴を明らかにした ([モジュール 2.6.6](#), 毒性試験の概要文も参照)。

GLP 非準拠の 6 ヶ月間静脈内投与による安全性及び体内分布に関する予備試験では、マウスに溶媒としてリン酸緩衝生理食塩水又は AVXS-101 のいずれかを 6.7 E13~3.3 E14 vg/kg の用量で静脈内投与し (これらの試験の用量は、初期のバリデートされていない q-PCR 法を用いて実施された)、投与後 3, 6, 12 又は 24 週目にマウスを屠殺し、組織を qPCR 法による分布解析及び SMA 遺伝子の RNA 発現解析用に採取した。これらの試験の結果を以下に詳細に要約する。高用量の AVXS-101 を単回投与したマウスから採取した組織を qPCR 法で解析したところ (AD49TV.7A32.BTL 試験)、AVXS-101 を投与したマウスから注射後 24 週目までに採取したほぼすべての組織試料において高値の AVXS-101 DNA 量が認められた。マウスを用いた単回投与毒性試験では、生殖線を除いたほとんどの組織において DNA 量は高く、そのうち最も高かったのは心臓及び肝臓であった。重要な点は、心臓、肝臓、肺、腎臓、骨格筋に加え、脳や脊髄を含めた大部分の検討した組織において、AVXS-101 は持続性が

2.6.4 薬物動態試験の概要文

あり、高値で発現したと考えられたことである。実証されている AAV ベクターの持続性を考慮すると、SMN 導入遺伝子の長期にわたる形質導入及び持続的な発現がマウスモデルで達成されたと考えられる。

同様の結果は、第 3 相試験で製造された製品及び承認申請書に記載した実生産の製造工程（工程 B、[モジュール 3.2.S.2.6](#)）で製造された AVXS-101 を、生後 1 日の FVB マウスの側頭静脈から単回投与した試験後の GLP 準拠の安全性及び体内分布試験のための 12 週間静脈内投与による用量設定試験（[20122446 試験](#)）でも得られ、バリデートされた分析方法によってその特徴が明らかにされた。用量 2.37×10^{14} vg/kg [バリデートされたドロップレットデジタル PCR (ddPCR) 法によって決定] を静脈内単回投与した生後 1 日のマウスでは、ddPCR 法を用いて脳及び脊髄における AVXS-101 ゲノムが検出可能であったことから、全身投与時にこのベクターが血液脳関門を通過できることが示された。AVXS-101 の高値がすべての測定時点（投与後 3、7 及び 12 週間目）で観察されたことから、AVXS-101 は迅速に送達され、12 週間にわたって持続的に存在することが示された。ベクターゲノムの最高濃度は、心臓、肺、及び肝臓に加え骨格筋でも認められた。検討した他の組織と比較して、脾臓におけるベクターゲノム濃度は低かった。

同様の所見は、第 3 相試験で製造された製品及び承認申請書に記載した実生産の製造工程（工程 B、[モジュール 3.2.S.2.6](#)）で製造された AVXS-101 を FVB/NCrl マウスの側頭静脈から単回投与した試験の後に実施された、GLP 準拠の 12 週間静脈投与による安全性及び体内分布に関する最終試験（[8384031 試験](#)）でも認められ、バリデートされた分析方法を用いてその特徴を明らかにされた。 1.5×10^{14} vg/kg、 2.4×10^{14} vg/kg 及び 3.0×10^{14} vg/kg の用量で静脈内単回投与した生後 0 日のマウスでは、AVXS-101 のゲノムが脳及び腰髄において高濃度で検出されたことから、全身投与時にこのベクターが血液脳関門を通過できることが示された。AVXS-101 ゲノム及び発現した導入遺伝子の高値が投与後 3 週間目に認められたことから、組織において迅速に存在することが示された。高い濃度が投与後 6 週間目及び 12 週間目の時点でも維持されていることから、ゲノムと遺伝子発現の両方の安定性が示された。ベクターゲノム量は、概ね心臓、肝臓、肺及び骨格筋で最も高かった。

その他に公表された研究（[Gray et al, 2013](#); [Haurigot et al, 2013](#)）と同様に、中枢神経系組織の一貫した形質導入に加え、ブタ新生仔（5 日齢）に髄腔内投与及び嚢内投与した後では、低濃度のベクターが腎臓、肝臓、副腎、肺、脾臓及、心臓を含めた末梢組織で認められたが、濃度の程度はさまざまで、中枢神経系で認められたそれよりもはるかに低く、髄腔内経路で投与したときと同様であった。

AVXS-101 開発の裏付けとして、これらの体内分布に関する終了した非臨床試験を以下の[表 1](#)に示す。

表 1: 終了した AVXS-101 の体内分布に関する非臨床試験

Study Title	Study Number GLP status	Laboratory Name and Location	CTD Reference
Single-Dose Toxicity/Biodistribution Studies with AVXS-101			
24-week Toxicology and Biodistribution Study of the self-complementary serotype 9 Adeno-associated viral vector scAAV9.CB.SMN in FVB neonatal Mice	AD49TV.7A32.BTL Non-GLP	[REDACTED]	Summary: 2.6.4.4.2 Tabular Summary: 2.6.5
AVXS-101: A Single Dose Temporal Vein Injection Study in the Neonatal FVB/NJ Mouse Followed by a 12-Week Observation Period	20122446 GLP	[REDACTED] (in-life) AveXis, Inc. San Diego, CA (qPCR work)	Summary: 2.6.4.4.3 Tabular Summary: 2.6.5
A Single Dose of AVXS-101 (Lot Number 600443) via Temporal Vein Injection in Neonatal FVB/NCrl Mice Followed by a 12-Week Observation Period	8384031 GLP	[REDACTED] AveXis, Inc. San Diego, CA (ddPCR work)	Summary: 2.6.4.4.4 Tabular Summary: 2.6.3

2. 分析方法

[REDACTED] 社での最初の体内分布に関する試験では、以下の組織及び器官の一部を、投与後 3 週目に屠殺したすべての対照マウス及び投与後 6, 12 及び 24 週目に屠殺した第 3 群 (AVXS-101 高用量投与群) のすべてのマウスから以下に示した順序で採取し、急速凍結した。各組織試料は、直ちに滅菌チューブに入れ、液体窒素で急速凍結した後、-60°C 以下で保存した。各組織試料にそれぞれ 1 本ずつチューブを使用した。組織／器官は、以下の表 2 に示した順番に従って Q-PCR 用に採取した。

表 2: 生後 1 日の FVB マウスを用いた単回静脈内投与試験における体内分布解析用の組織採取の順序 (AD49TV.7A32.BTL 試験)

Collection Order	Tissue
1	Gonads
2	Spleen
3	Kidneys
4	Jejunum
5	Pancreas
6	Lung
7	Heart
8	Brain

2.6.4 薬物動態試験の概要文

Collection Order	Tissue
9	Inguinal Lymph node
10	Liver
11	Spinal Cord
12	Quadriceps Muscle
13	Masseter muscle (injection site)

組織は、群の番号の小さい方（1, 2, 3）から順に採取した。1つしかない器官については、同じ位置の組織を滅菌チューブに採取し、液体窒素で急速凍結した後、qPCR 法による解析のために -60°C 以下で保存した。必要な場合は、遺伝子発現試験のために、1つしかない器官の同じ位置の組織も液体窒素で急速凍結し、 -60°C 以下で保存した。

両側性器官については、必要な場合、右側の器官から病理組織学的検査用の組織を、左側の器官から PCR 法による発現検査用の組織を採取した。肉眼的観察で認められた病変については、1つしかない器官の場合はその一部を、両側性器官の場合は片側から病理組織学的検査用に採取し、残りの部分／もう一方の側から PCR による遺伝子発現検査用に採取した。PCR 法は、第 3 群についてはすべての時点で実施し、対照群（第 1 群）については投与後 3 週目の採取時点で採取したすべての組織を解析した。

まず、各採取時点の間隔で各群雌雄各 5 匹の動物について検討した。中用量投与群（第 2 群）から採取した組織、並びに第 1 群及び解析用に選択しなかった動物の残りの組織を -70°C 以下で保存した。

試料を抽出し、ゲノム DNA（gDNA）についてリアルタイム qPCR 法による解析を行い、ベクターのコピー数を測定した。1 測定時点内に反応シグナルが陰性（gDNA $1\mu\text{g}$ あたり 100 コピー未満）となった組織は、いずれも同一の器官をその後の測定時点で追跡解析する必要はないため保存した。本アッセイの定量下限（LLOQ）は 1 反応あたり 25 コピー（50 コピー/ μg ）、定量上限（ULOQ）は 1 反応あたり 5×10^6 コピー（ 1×10^7 コピー/ μg ）であった。

RNA 発現解析用の試験試料は、高用量投与群（第 3 群：scAAV9.CB.SMN を 3.3×10^{14} vg/kg 投与）の各雌雄 FVB マウスに生後 1 日でベクターを投与してから 3, 6, 12 及び 24 週間後に採取した 11 種類の組織試料であった。第 3 群のマウスからすべての採取時点で採取した全組織を RNA 発現について解析した。

RNA 抽出物及びリアルタイム PCR（RT-PCR）法を用いて、AVXS-101 を静脈内投与した FVB マウスにおけるヒト SMN 遺伝子の発現を測定した。合計 11 種類の組織試料（ヒト SMN 遺伝子発現の測定用試料）を剖検時に採取し、 -60°C 以下で凍結した。凍結した試料を氷上で解凍し、トリゾール試薬を用いて RNA を抽出・定量し、逆転写酵素を用いた逆転写反応によって cDNA に変換した。DNA 試料は、AVXS-101 に特異的なフォワード及びリバースプライマーを用いて PCR 法で増幅した。試料は DNA ゲル電気泳動法を用いて定量した。ヒト SMN 遺伝子の発現は、目的とする大きさのバンド（300 塩基対）の存在によって評価した。

用量設定試験（[20122446 試験](#)）及びベクターの GMP ロットを用いた最終的な毒性試験（[8384031 試験](#)）の体内分布解析では、規定したすべての試料を重量測定後に直ちにドライアイス／アルコール浴で急速凍結し、ドライアイスを入れた冷却器に入れ、 -60°C 以下に保つよう設定した冷凍庫に発送まで保存した。ddPCR 用の組織試料は、解析のためにドライアイス上において発送した。組織は、試験実施計画書に規定したように、AVXS-101 ベクターの DNA ゲノムについて ddPCR 法を用いて解析し、選択した組織における遺伝子発現を検討した。バリデートされた ddPCR 法によって、SMN 遺伝子を標的とする特別に設計されたプライマーとプローブを用いて、カプシドに包まれた AAV9-SMN ウイルスゲノムの検出及び定量が可能となった。

2.6.4 薬物動態試験の概要文

DNA 試料を前希釈し、試料の調製に使用する材料に付着するカプシドを低減した。カプシドに含まれていない DNA 及びウイルス放出後に残ったその他の遺伝物質は、DNA 分解酵素を添加して消化した。このウイルスを ddPCR 法の検出可能範囲まで希釈した。マイクロドロップレットを作成し、[REDACTED]上で分析した。試料の陽性対照及び市販の陽性対照（合成遺伝子断片）並びに緩衝液の陰性対照も分析した。上記の方法から、ダイナミックレンジは1反応あたり 300～4000 の遺伝子コピー数となった。本方法が GLP に準拠しているかどうかは確認しなかった。

3. 吸収

AVXS-101 を用いた吸収試験は実施していない。

4. 分布

4.1. AAV9 の分布及び scAAV9.CB.GFP を用いた試験

AVXS-101 は、ニワトリ β アクチンハイブリッドプロモーターの制御下でヒト生存運動ニューロン（SMN）タンパクを発現するように遺伝子操作したアデノ随伴ウイルス（AAV）セロタイプ9である。AVXS-101 の開発の目的は、SMN タンパクの標的を中枢神経系、特に脳及び脊髄の運動ニューロンに定めることであった。

AAV9 は AAV のいくつかあるセロタイプの 1 つであり、1 回の全身静脈内注射又は腹腔内注射後に骨格筋や心筋などのさまざまな組織全体で広く形質導入することができる（Blankinship et al 2004, Wang et al 2005, Inagaki et al 2006, Nakai et al 2005, Pacak et al 2006）。AAV9, AAV6, AAV8 などのセロタイプは血管内皮細胞の関門を効率的に通過することが認められているが、AAV9 は他の AAV セロタイプと比べ、より迅速に脳内へ輸送される（Cearley and Wolfe, 2006）。AAV9 は AAV2 や AAV8 と同様にラミニン受容体を使用することが知られているが、AAV6 がラミニン受容体を使用しないのと同様に、細胞接着、内在化及び形質導入には他の未知の受容体を使用すると考えられる（Akache et al, 2006）。このため、AAV9 はカプシドの多様な組織分布及び標的細胞との相互作用を持つと考えられる。

その後、計画した AAV9 ベクターのコンストラクトで、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する scAAV9.CB を用いた複数の初期の試験が AVXS-101 開発期間に終了し、脳室内に直接投与又は全身（静脈内）投与のいずれかで投与したときに中枢神経系を標的とする scAAV9.CB の能力が確立された。

GFP 発現ベクターを用いた初期の試験では、AAV9-GFP をマウス新生仔に静脈内注射したところ、後根神経節及び脊髄全体の運動ニューロンへの広範な形質導入と、新皮質、海馬、小脳などの脳全体のニューロンへの幅広い形質導入が認められた。これとは反対に、成体マウスでは、AAV9-GFP ベクターの静脈内注射は中枢神経系全体の星状細胞への強力な形質導入を促進したが、ニューロンへの形質導入は限定的であった。

GFP ベクターの分布についても、脳室内へ直接投与した SMN Δ 7 マウス SMA 疾患モデルで検討した。中枢神経系への直接投与によって腰髄において広範な形質導入が認められ、最高用量では頸椎、胸椎及び腰椎のニューロンのそれぞれ 46%、47% 及び 72% が標的となった。

ベクターの分布は、カニクイザル新生仔の全身投与でも検討した。生後 1、30 又は 90 日のカニクイザルに静脈内投与したところ、主にニューロンへの形質導入が生後少なくとも 90 日間観察された。導入遺伝子の発現は、免疫蛍光染色法によって、脳、骨格筋、心筋のほか、多くの臓器においても検出された。運動ニューロン指向性は、少なくとも生後 90 日間持続した。

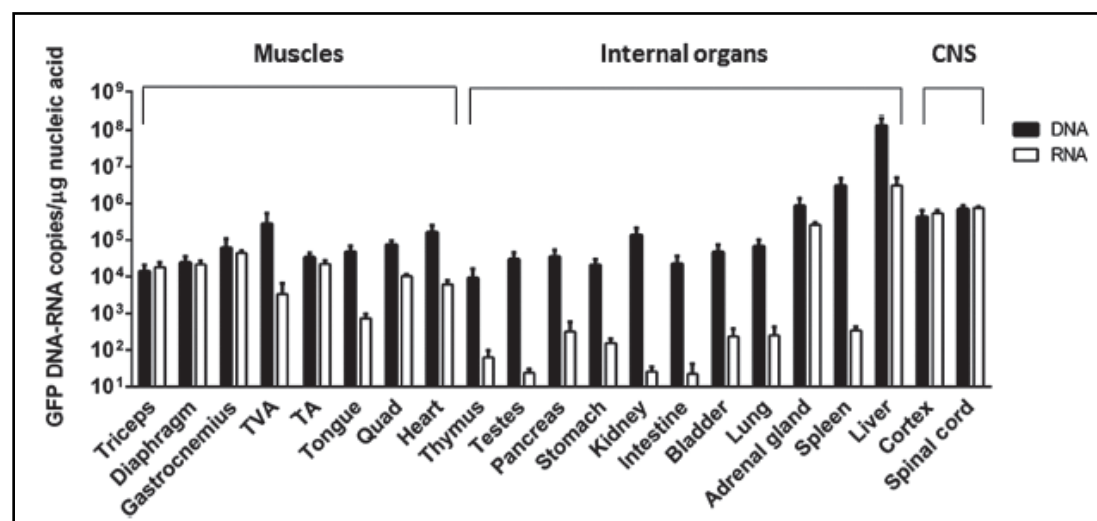
3 歳のサルを含めたやや年齢が上の動物に静脈内投与した結果から、脊髄の頸椎、胸椎及び腰椎領域における運動ニューロンへの形質導入が確認されたが、幼若サルで目標とする運動ニューロンの数と

比較して、運動ニューロンへの形質導入率は極めて低かった。さらに、マウスではニューロンへの形質導入が認められたのに対し、3歳のサルでは主にグリアへの形質導入が観察された。

同様に、5日齢の幼若ブタに髄腔内（IT）投与したところ、後根神経節の他に脊髄の灰白質及び白質に顕著な形質導入が観察された。ブタ新生仔に直接注射することにより、脊髄のすべての部分で運動ニューロンへ広範に形質導入された。

また、scAAV9.CB.GFP の体内分布は、幼若カニクイザルに髄腔内投与しても比較的広範囲であった。組織中のウイルスベクターの DNA 量は比較的高かったが、mRNA のコピー数は必ずしも DNA 量に相関しなかった（図 1）。

図 1： カニクイザルに直接髄腔内投与したときの scAAV9.CB.GFP の組織分布



DNA 及び RNA は、組織 1 mg を生検・分離し、ウイルスゲノム及び GFP mRNA 分子の存在について試験を行った。体内分布は、ウイルス DNA 又は RNA の Taqman 定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法によって測定した値で評価した。

ただし、重要なことは、AVXS-101 DNA の分布及び持続性を正常な雌雄の FVB マウスを用いた 6 ヶ月間静脈内投与による安全性試験の中で評価したことであった。マウスにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を溶媒として投与、又は AVXS-101 を 2 種類の用量のうち 1 種類の用量で投与した。以下に記載したように投与後 3, 6, 12 又は 24 週間目に屠殺し、qPCR 法による分布解析及び SMA 遺伝子の RNA 発現解析用に組織を採取した。

その後、GMP グレードの AVXS-101 ベクターの体内分布を、生後 1 日の FVB マウスに 2.37 E14 vg/kg の用量で単回投与し、投与後 3, 7 又は 12 週間追跡調査する 12 週間試験でも測定した。これらの試験の結果及び結論は、以下の項に要約する。

4.2. マウス新生仔に 6 ヶ月間静脈内投与したときの安全性及び体内分布に関する試験

試験の標題： 自己相補型アデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 ベクター-scAAV9.CB.SMN の FVB マウス新生仔における毒性及び体内分布に関する 24 週間試験

試験番号： [AD49TV.7A32.BTL](#)

GLP 非準拠の本試験の目的は、ニワトリ β アクチンハイブリッドプロモーター制御下でヒト SMN 遺伝子を導入する、自己相補型アデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 である AVXS-101（本試験報告書では scAAV9.CV.SMN と呼ぶ）を、FVB マウスに単回静脈内注射したときの毒性の可能性及び体内分布を

2.6.4 薬物動態試験の概要文

検討することであった。本試験は3つの試験群で構成された。生後1日（PND1）のマウスに、ベクター希釈液（対照：滅菌リン酸緩衝生理食塩水）又はAVXS-101のいずれかを、1匹あたり50 µLを投与容量として6.7 E13 vg/kg又は3.3 E14 vg/kgの用量で静脈内注射した。全投与群で、注射後3, 6, 12又は24週間目にすべてのマウスを剖検対象とした。

最終剖検時には、qPCR法による体内分布の解析用にマウスから組織を採取した。溶媒対照を投与し、投与後3週間目に屠殺したマウス、又は高用量を投与し（第3群）、投与後3, 6, 12又は24週間目に屠殺したマウスから組織を清潔に採取し急速冷凍した。これらの組織は、qPCR法を用いて組織分布について解析した。第2項に記載したように、脳、生殖腺、心臓、空腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節（鼠蹊部）、咀嚼筋（注射部位）、脾臓、四頭筋、脊髄及び脾臓から単離したゲノムDNA（gDNA）についてqPCR法を行った。qPCR法を用いた本アッセイの定量下限（LLOQ）は1反応あたり25コピー（50コピー/µg）、定量上限（ULOQ）は1反応あたり5 E6コピー（10E7コピー/µg）であった。

また、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によるベクターの分布解析、抗体解析、RNA発現解析及び生物学的活性に関するバイオアッセイを行い、選択した組織及び／又は血清中のAVXS-101の体内分布及び活性を説明した。本試験のデザインの概要を以下の表3に示す。

表 3: AVXS-101 のマウスを用いた毒性及び体内分布試験の試験デザイン

Group	Treatment	Vector Dose Level (vg/kg)	Total Number of Neonatal Mice/sex ¹	Number of Mice Sacrificed per Timepoint			
				3 Weeks	6 Weeks	12 Weeks	24 Weeks
1	PBS	0	51 M/57 F	23M/23F	6M/6F	6M/12F	8M/8F
2	AVXS-101	6.7E13	55M/54 F	23M/23F	6M/6F	9M/8F	8M/8F
3	AVXS-101	3.3 E14	53M/53F	22M/22F	6M/6F	9M/9F	8M/8F
4*	AVXS-101	3.3 E14	20M/20F	5M/5F	5M/5F	5M/5F	5M/5F
5*	PBS	0	20M/20F	5M/5F	5M/5F	5M/5F	5M/5F

1 合計数には、評価を行わなかった、あるいは3, 6, 12又は24週目の数字の欄に記載しなかった予備のマウスが含まれている。

本試験期間に投与に関連する死亡、注目すべき毒性又は明らかな臨床徴候はなかった。組織の全パネルは、体内分布及びRNA発現の解析用に、投与後3週目の溶媒対照群のマウス及び高用量投与群（第3群）の雌雄のマウスから採取した。本試験の毒性所見の要約は、本CTDのモジュール2.6.6に記載する。本項では、AVXS-101ベクター、又は必要に応じてSMA RNAの体内分布及びRNA発現について要約する。

AVXS-101の体内分布は、検証された定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）法を用いて測定した。qPCR用の試料は、対照動物（注射後3週目）及び第3群（注射後3, 6, 12及び24週目）のマウスの13種類の組織から単離したゲノムDNA（gDNA）について解析した。

高濃度のAVXS-101 DNAが、注射後3, 6, 12及び24週目の高用量投与群（第3群）のマウスのほぼすべての試料で検出されたことから、血液脳関門から脳及び脊髄への通過を含めた全身曝露が示された。AVXS-101 DNA量は、心臓、肝臓、肺、リンパ節、咀嚼筋（注射部位）、四頭筋及び脊髄から単離した試料中で最も多く検出された。AVXS-101 DNA量は、投与したこれらのマウスにおいてすべての測定時点で依然として高値であったことから、AVXS-101 DNAの持続性が示された。

すべての投与群から採取した空腸、腎臓、脾臓及び脾臓の試料で検出されたAVXS-101 DNA量は低値であった。AVXS-101 DNA量が最も低かったのは生殖腺試料であったが（ゲノムDNA 50～2,900

2.6.4 薬物動態試験の概要文

コピー／ μg ），24週間の時点でもほとんどの試料に AVXS-101 DNA が検出されたことから，大部分の主要な標的組織での DNA の持続性がさらに示された。また，脳の1つの試料及び脊髄の2つの試料を除き，第1群（対照群）の動物から採取したすべての試料の AVXS-101 量は本アッセイの定量下限未満（BLLOQ）であった（25 コピー／反応；50 コピー／ μg ）。

ヒト SMN 遺伝子の発現は，高用量投与群（第3群）の雌雄のマウスから採取した11種類の組織試料を使用し，ベクター投与後3，6，12及び24週目に屠殺したマウスから採取した組織から RNA を抽出し，逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法にて解析した。ヒト SMN は，すべての測定時点において雌雄の双方において SMA 療法薬の主な標的組織である脊髄及び脳で高度に発現した。ヒト SMN は，腎臓，肺，心臓，肝臓及び四頭筋で一貫して発現した。生殖腺はすべての測定時点で雌雄のいずれにも発現が検出されなかった唯一の組織であったことから，生殖系細胞に導入遺伝子が組み込まれる可能性は極めて低いことが示された。

以上の結果から，生後1日のマウス新生仔への単回静脈内投与後に，ほとんどの組織における AVXS-101 の顕著な形質導入及びベクター DNA の持続性が示唆される。これらのデータは，GFP ベクターを用いた試験の結果，及び scAAV9.CB ベクターが中枢神経系へ送達される可能性によく相関する。上記のデータから，標的組織（中枢神経系）における SMN RNA の発現も確認される。

4.3. 12週間の追跡調査期間を設けた，GMP ロットを用いてマウス新生仔に静脈内投与する用量設定・安全性及び分布に関する試験

試験の標題： 12週間の観察期間を設けた，FVB/NJ マウス新生仔を用いた単回側頭静脈内注射試験
試験番号： 20122446

本 GLP 試験の目的は，マウス新生仔に単回側頭静脈内注射したときの，AVXS-101（ロット番号 816836）の毒性の可能性及びその体内分布を検討することであった。AVXS-101 の体内分布は，臨床グレードのベクター（GMP ロット番号：816836）を 2.37 E14 vg/kg の用量で1回静脈内投与した生後1日の FVB/NJ マウスを用い，対照として生理食塩水を投与したマウスと比較検討した。本試験で3種類の用量について安全性を検討したが，体内分布は中用量の 2.37 E14 vg/kg のみで検討した。雌雄各45匹の生後1日の FVB/NJ マウスに，AVXS-101 を 2.37 E14 vg/kg の用量で側頭静脈へ単回静脈内投与した。ほぼ同じ大きさの生後1日の雌雄各45匹のマウスで構成する対照群には，対照として生理食塩水を投与した。投与後3，7又は12週間目にマウスを屠殺し，以下の表4に記載したように，対照群及び投与群の各群雌雄各5匹から体内分布解析用の組織を採取した。

表4： 生後1日の FVB/NJ マウスを用いた GMP ロット番号 816836 の AVXS-101 の用量設定・安全性及び体内分布に関する試験の体内分布及び SMN 遺伝子の発現のパート

Group	Treatment	Vector Dose Level (vg/kg)	Vector Dose Volume (μL)	Total Number of Neonatal Mice for Distribution	Number of Mice Sacrificed per Timepoint for Distribution		
					3 Weeks	7 Weeks	12 Weeks
1	PBS	0	50	15M 15F	5M/5F	5M/5F	5M/5F
3	AVXS-101	2.37 E14	50	15M 15F	5M/5F	5M/5F	5M/5F

以下の表5に示した組織の代表的な試料は，各群雌雄各5匹までのマウスから無菌操作により採取した。ddPCR 用の組織の重量は，小数点以下第4位まで測定し記録した。これらのマウスから採取した残りの脳，脊髄及び他の器官及び組織を収集し，病理組織学的検査用に保存した。すべての試料は，重量測定後に直ちにドライアイス／アルコール浴で急速冷凍し，ドライアイスが入った保冷バッグに入れ， -60°C 以下に保った冷凍庫に発送まで保存した。各測定時点に雌雄各2匹のマウスから採取した組織は，AVXS-101 ゲノムの存在について ddPCR 法を用いて解析し，さらに各測定時点の別の雌雄各2匹から採取した組織を選択した組織における遺伝子発現について解析した。

表 5 : 20122446 試験の体内分布及び遺伝子発現解析用に採取した組織

Brain	Heart ^a	Liver ^b
Spleen ^c	Spinal Cord: Lumbar	Quadriceps Muscle (Right only)
Lung (Right only)		

^a 心房及び心室を含めるために心臓を横方向に二分した。二分したうちの一方は標準的な病理組織学的検査用とし、もう一方は ddPCR 用の試料として保存した。

^b 左側葉の一部。

^c 正中で二分し、一方は標準的な病理組織学的検査用に保存し、もう一方は ddPCR 用試料として保存した。

分析用の対照及び対照物質を投与した群から採取した組織の評価では、ddPCR 法を用いた解析によるバックグラウンドはほとんど若しくは全く検出されず、対照テンプレートをゲノム DNA に添加した際のマトリクス効果もほとんど又は全くないことが示された。

AVXS-101 ゲノムが脳及び脊髄において高濃度で検出されたことから、生後 1 日のマウスに全身投与したときにベクターが血液脳関門を通過できることが示された。高濃度の AVXS-101 ゲノム量が投与後 3, 7 及び 12 週間目に認められたことから、検討した組織において 12 週間にわたる迅速かつ持続的な存在が示された。ベクターゲノム量は、心臓、肺及び肝臓に加え、骨格筋においても最も高濃度で認められた。他の組織と比較して脾臓でのベクターゲノム量は低値であった。

組織中に AVXS-101 ベクターゲノムが存在することによって SMN 遺伝子が発現した。これは、ゲノム DNA について同一の組織から抽出した mRNA から作成した cDNA に特異的な ddPCR 法を用いて明らかにされた。重要なことは、その発現が脳及び脊髄での両方で強力であったことである。肝臓や肺上皮などの組織は増殖性細胞によって構成されるが、これらの組織における AAV の形質導入に基づいた予想よりも遺伝子発現率は低かった。

4.4. 12 週間の追跡調査期間を設けた、AVXS-101 の GMP ロットのマウス新生仔を用いた単回静脈内投与試験

試験の標題： 12 週間の観察期間を設けた、AVXS-101（ロット番号 600443）の FVB/NCrl マウス新生仔を用いた単回側頭静脈内注射試験

試験番号： 8384031

本 GLP 試験の目的は、FVB/NCrl マウス新生仔に単回側頭静脈内注射したときの、AVXS-101（ロット 600443）の毒性の可能性及びその体内分布を検討することであった。雌雄の新生仔に、溶媒対照物質又は AVXS-101 を生後（PND）0 日に側頭静脈へ 1 回静脈内投与した（表 6）。動物は、投与後 3, 6 又は 12 週目に屠殺した。毒性データは、モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文で詳細に考察する。

表 6 : 生後 1 日の FVB/NCrl マウスを用いた GMP ロット 600443 の AVXS-101 の単回静脈内投与試験のデザイン

Group ¹	Treatment	Vector Dose Level (vg/kg)	Vector Dose Volume (µL) ³	Number of Animals ²	
				Male	Female
1	Control	0	50	49	47
2	AVXS-101	1.5 E14	50	49	47
3	AVXS-101	2.4 E14	50	48	48
4	AVXS-101	3.0 E14	50	47	49

PND = 生後日齢；Vg = ベクターゲノム

2.6.4 薬物動態試験の概要文

- 1 第1群には溶媒対照物質のみを投与した。
- 2 生後0日の各同腹仔は、雄3匹及び雌3匹であった。
- 3 投与量は、初回投与日以降の投与のために投与動物の体重に応じて調整した。

毒性の総合評価は、死亡率、一般状態、体重、摂餌量、器官重量、肉眼的観察、中枢神経系及びその他の組織における被験物質の体内分布、並びに臨床病理学検査及び解剖病理学検査に基づいた。

以下に示した組織試料（脳、心臓、肝臓、脾臓、腰髄、四頭筋、肺、精巣及び卵巣）は、各群雌雄各5匹までのマウスから無菌操作を用いて採取した後、DNA及びRNAの単離のために保存し、各測定時点で定量PCR法及びドロップレットデジタルポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）法を用いた解析を行った。以下の記載では、ddPCR法を用いた解析にはRNAの定量も含める。

重要な点は、高濃度のAVXS-101ゲノムが脳及び腰髄で検出されたことである。このことから、全身投与時に本ベクターが血液脳関門を通過できることが示された。高濃度のAVXS-101ゲノム量が投与後3週間目に観察されたことから、組織中に迅速に存在することが示された。このような高濃度が投与後6週間目及び12週間目でも維持されたことは、ゲノムと遺伝子発現の両方の安定性を示している。ベクターゲノム量が最も多かったのは、心臓及び骨格筋であった。脾臓におけるベクターゲノム量は他の組織と比較して少なかった。精巣及び卵巣でもベクターゲノム量及び発現率は低値であった。被験物質を投与しない動物を用いた対照試験では、ddPCR法によるバックグラウンドはほとんど若しくは全く検出されず、対照テンプレートをゲノムDNAに添加した際のマトリクス効果もほとんど又は全くないことが示された。

臓器中のAVXS-101ベクターゲノムによって組織中の遺伝子が発現した。これは、ゲノムDNAについて同一の組織から抽出したmRNAから作成したcDNAに特異的なddPCR法を用いて明らかにされている。重要なことは、この発現が脳及び腰髄で強力であったことである。肝臓や肺上皮などの組織は増殖性細胞によって構成されるが、これらの組織におけるAAVの形質導入に基づいた予想よりも遺伝子発現率は低かった。

要約すると、ロット600443のAVXS-101を1.5 E14 vg/kg、2.4 E14 vg/kg及び3.0 x E14 vg/kgの用量で静脈内投与したところ、AVXS-101ゲノムの広範な体内分布、及び投与3週間目まで脳及び腰髄などでそのコンストラクトの発現が認められ、その発現は投与6週間目及び12週間目の両時点で測定したときにも維持されていた。

5. 代謝（種間比較）

AVXS-101を用いた代謝試験は実施していない。

6. 排泄

AVXS-101を用いた排泄試験は実施していない。

7. 薬物動態学的相互作用

AVXS-101を用いた薬物動態学的相互作用試験は実施していない。

8. その他の薬物動態試験

AVXS-101を用いたその他の薬物動態（PK）試験は実施していない。

9. 考察及び結論

AVXS-101は、アデノ随伴ウイルス（AAV）セロタイプ9ベクターのクラスに属し、血液脳関門を通過して中枢神経系内の細胞へ形質導入する明白な能力を示している。同様の緑色蛍光タンパク（GFP）発現ベクターを用いた予備試験では、静脈内投与後に顕著な分布と脳及び脊髄内の中枢神経系細胞へ

2.6.4 薬物動態試験の概要文

の形質導入が認められた。正常マウス及び SMN Δ 7 SMN 疾患マウス新生仔の両マウスを用いた試験では、出生から時間を経て投与を開始した場合にニューロンへの形質導入が明らかに減少していたため、早期投与の重要性が確認された。早期投与によって、グリア細胞への形質導入と比較してニューロンへの形質導入率が高くなった。非ヒト霊長類に静脈投与したところ、AVXS-101 は血液脳関門も通過することができ、非ヒト霊長類及び幼若ブタを用いた試験においても、静脈内投与の 1/10 の用量で髄腔内又は脳室内へ直接投与しても、中枢神経系への顕著な形質導入が確認された。

ただし、申請する臨床試験用ベクターを用いて分布とベクターの持続性を確認するために、AVXS-101 の体内分布及び発現を、1 件の生後 1 日の FVB マウス新生仔を用いた GLP 非準拠の安全性及び分布に関する 24 週間試験、及び 2 件の生後 1 日の FVB マウス新生仔を用いた GLP 準拠の安全性及び分布に関する試験で測定した。AVXS-101 を投与したマウスから、注射後 3, 6, 12 及び 24 週目に採取したすべての組織試料で高濃度の AVXS-101 DNA が検出されたことから、明らかな全身曝露と血液脳関門を通過し脳及び脊髄に到達する能力が示された。主に心臓、肝臓、肺及び骨格筋において最も高濃度で検出され、AVXS-101 ゲノムが脳及び腰髄において高濃度で検出されたことから、全身投与時に本ベクターが効率的に血液脳関門を通過できることが示された。最も低い値は生殖腺試料で検出された。すべての測定時点で高値が維持され、ほとんどすべての試料中で検出可能であったことから、AVXS-101 DNA の持続性が示された。ベクター DNA の存在は、これらの組織、特に脳及び脊髄における SMA 遺伝子の発現とも関連しており、増殖性組織では予想よりも発現率は低かった。

以上をまとめると、静脈内投与後の AVXS-101 は広範に分布し、中枢神経系、心筋、骨格筋、肝臓、肺などのほとんどの組織中に持続的に存在すると考えられ、これは AAV ベクター、特にセロタイプの AAV9 の立証された標的指向性及び持続性と一致する。SMN 遺伝子の発現は、投与後 24 週間までの体内分布、及び標的となる主な治療対象組織である脳及び脊髄における特定の導入遺伝子の RNA の発現によって示された。

10. 図表

図表は本文中に記載した。

11. 参考文献

Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J. Virol.*, 2006,80(19):9831–9836.

Blankinship MJ, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, Miller AD, Chamberlain JS. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol. Ther.*, 2004, 10(4): 671–678.

Cearley CN and Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.*, 2006, 13(3): 528–537.

Gray SJ, Kalburgi SN, McCown TJ, Samulski RJ. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy*. 2013 Apr;20(4):450.

Haurigot V, Marcó S, Ribera A, Garcia M, Ruzo A, Villacampa P, Ayuso E, Añor S, Andaluz A, Pineda M, García-Fructuoso G. Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2013 Aug 1;123(8):3254-71.

Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA and Nakai H., Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.*, 2006, 14(1), 45–53.

2.6.4 薬物動態試験の概要文

Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J. Virol.*, 2005, 79(1), 214– 224.

Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.*, 2006, 99(4), e3–e9.

Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23(3):321–328.

2.6.5 薬物動態の概要表

1. 薬物動態試験

Overview			Test Article: AVXS-101		
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Distribution					
Single IV dose toxicity and biodistribution in FVB mice	FVB Mice; males and females	Single IV dose	[REDACTED]	AD49TV.7A32.BTL	4.2.3.1
Dose-Range-finding IV safety and biodistribution study with GMP Batch in FVB/n mice	FVB Mice; males and females	Single IV dose	[REDACTED]	20122446	4.2.3.1

2. 分析方法及びバリデーション報告

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Utilized	Noteworthy Findings (Precision and Accuracy Validation)	GLP Compliance	Study Number
FVB mouse tissues	AVXS-101 vector DNA	LLOQ: 25 copies per reaction (50 copies/μg) ULOQ: 5 E6 copies/reaction (1E7 copies/μg)	Q-PCR	Q-PCR using fluorogenic 5'-nuclease assay performed on [REDACTED] Sequence Detection System	Acceptance criteria %CV ±15%	No	NA
Mouse blood and tissues	AVXS-101 vector genome	400-200,000 copies per reaction	Digital Droplet PCR (DD-PCR)	SOP-137 v3.0	Acceptance criteria %CV ±15%	No	RPT-380

NA : なし

2.6.5 薬物動態の概要表

3. 薬物動態試験：組織／臓器分布

Study Title: 24-week Toxicology and Biodistribution Study of the self-complementary serotype 9 Adeno-associated viral vector scAAV9.CB.SMN in FVB neonatal Mice					Test Article: AVXS-101 (scAAV9.CV.SMN in report)				
Species: FVB mice (male and female)					Location in CTD: 4.2.3.1				
Number per Group: 5/sex/timepoint for distribution					Study No.: AD49TV.7A32.BTL				
Feeding condition: Ad libitum		Vehicle/Formulation: Saline			Sample matrix: Mouse tissues				
Tissue Collection Timepoints: Weeks 3, 6, 12 and 24									
Tissues Tested		Number of Tissues/subgroup with Positive Q-PCR signal (N=5/sex)							
		Week 3		Week 6		Week 12		Week 24	
Vehicle Control		Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Brain		-	1/5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gonads		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Heart		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Jejunum		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kidney		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Liver		- ^a	- ^a	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Lungs		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Lymph Node (Inguinal)		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Injection Site (Muscle)		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Pancreas		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Quadriceps Muscle		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Spinal Cord		1/5	1/5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Spleen		-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA

追記：(-)：検出せず又は定量限界未満

NA：該当せず（溶媒投与動物の評価は Week 3 のみ）

^a 試料の 1/5 が判定不能：PCR 効率 50%未満

2.6.5 薬物動態の概要表

Study Title: 24-week Toxicology and Biodistribution Study of the self-complementary serotype 9 Adeno-associated viral vector scAAV9.CB.SMN in FVB neonatal Mice					Test Article: AVXS-101 (scAAV9.CV.SMN in report)				
Species: FVB mice (male and female)					Location in CTD: 4.2.3.1				
Number per Group: 5/sex/timepoint for distribution					Study No.: AD49TV.7A32.BTL				
Feeding condition: Ad libitum		Vehicle/Formulation: Saline			Sample matrix: Mouse tissues				
Tissue Collection Timepoints: Weeks 3, 6, 12 and 24									
Tissues Tested	Number of Tissues/subgroup with Positive Q-PCR signal (N=5/sex/group/timepoint)								
	Week 3		Week 6		Week 12		Week 24)		
Dose Level: (3.3 E14 vg/kg)	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females	
Brain	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Gonads	5/5	5/5	5/5	4/5 ^a	3/5 ^b	3/5 ^b	4/5		2/5
Heart	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Jejunum	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		4/5 ^c
Kidney	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Liver	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Lungs	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Lymph Node (Inguinal)	5/5	5/5	5/5	5/5	1/1 ^d (4 IND)	5 IND	1/1 ^d (4 IND)		5 IND
Injection Site (Muscle)	5/5	5/5	4/5 (1 IND)	5/5	4/5 (1 IND)	3/5 (2 IND)	2/5 (3 IND)	1/5 (3 IND)	
Pancreas	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Quadriceps Muscle	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Spinal Cord	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5
Spleen	5/5	4/5 (1 IND)	5/5	5/5	4/5	4/5 (1 IND)	5/5		3/5

追記：(-)：検出せず又は定量限界未満；IND：判定不能

^a 試験した DNA について 0 µg

^b 各ケースで試料の 2/5 が判定不能。PCR のターゲット効率 50%未満。

^c 試料の 1/5 が判定不能。PCR のターゲット効率 50%未満

^d Week 12 及び 24 の雄のリンパ節試料のうち生細胞は 1/5 しかなく、Week 12 及び 24 の雌のリンパ節試料は判定不能（IND）であった。

2.6.5 薬物動態の概要表

Study Title: AVXS-101: A Single Dose Temporal Vein Injection Study in the Neonatal FVB/NJ Mouse Followed by a 12-Week Observation Period				Test Article: AVXS-101 Lot # 816836			
Species: FVB mice (male and female)				Location in CTD: 4.2.3.1			
Number per Group: 2/sex/timepoint for distribution				Study No.: 20122446			
Feeding condition: Ad libitum		Vehicle/Formulation: Saline			Sample matrix: Mouse tissues		
Tissue Collection Timepoints: Weeks 3, 7 and 12							
Tissues Tested		Number of Tissues/subgroup with Positive Q-PCR signal (N=2/sex)					
		Week 3		Week 7		Week 12	
Dose Level: (2.37 E14 vg/kg)		Males	Females	Males	Females	Males	Females
Brain		2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Lumbar Spinal Cord		2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Heart		NA ^b	NA ^b	2/2	2/2	2/2	2/2
Liver		NA ^b	NA ^b	2/2	2/2	2/2	2/2
Spleen		NA ^b	NA ^b	2/2 ^c	1 ^a /1 ^d	2/2 ^c	1 ^a /1 ^d
Quadriceps		NA ^b	NA ^b	2/2	2/2	2/2	2/2
Lung		NA ^b	NA ^b	2/2	2/2	2/2	2/2

追記： Week 3 に qPCR 法による測定を行ったのは脳及び脊髄の組織のみ。

^a 試験した DNA について 0 µg ; ^bNA- 該当せず ; ^c各ケースで試料の 2/2 が判定不能。PCR のターゲット効率 50%未満 ; ^d1 試料は判定不能。PCR のターゲット効率 50%未満。

による 8384031 試験、新生仔 FVB/NCrl マウスを用いた AVXS-101 (ロット番号 600443) の単回側頭静脈投与試験及び 12 週間観察期間については、[モジュール 2.6.7](#)、[6.1 項](#)を参照のこと。