ブリニューラ®脳室内注射液 150 mg

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床試験の概括評価

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.1 緒言 5
2.4.1.2 CLN2 5
2.4.1.3 CLN2 の動物モデル 6
2.4.1.4 非臨床試験計画 6
2.4.1.5 非臨床試験に使用した BMN 190 の製造工程 12
2.4.2 薬理試験 12
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 13
2.4.2.2 安全性薬理試験 15
2.4.3 薬物動態試験 15
2.4.3.1 吸収 16
2.4.3.2 分布 17
2.4.3.3 薬物動態まとめ 18
2.4.4 毒性試験 18
2.4.5 総括及び結論 21
2.4.6 参考文献 23

表目次

表 2.4.1.4.1 動物種間の中枢神経系パラメーター及び姿勢の比較 [a] 7
表 2.4.1.4.2 BMN 190 の非臨床試験の一覧 9
表 2.4.1.5.1 非臨床試験に使用した BMN 190 の製造工程 12

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
$AUC_{0-\infty}$	area under concentration-time curve from zero to infinity	時間 0 から無限時間までの濃度-時間曲線下面積
CFR	Code of Federal Regulations	連邦規則集
CI-M6PR	cation-independent mannose-6-phosphate receptor	カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体
CLN2	neuronal ceroid lipofuscinosis type 2	セロイドリポフスチン症 2 型
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
ECG	electrocardiogram	心電図
EEG	electroencephalography	脳波検査
ERT	enzyme replacement therapy	酵素補充療法
FBDS	formulated bulk drug substance	製剤化バルク原薬
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
g	gram	グラム
GFAP	glial fibrillary acidic protein, a marker of astrocytosis	グリア線維性酸性タンパク質、星状膠細胞症マーカー
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HE	hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン・エオシン
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
h	hour	時間
IBA1	a marker of microgliosis/microglia	小膠細胞マーカー
ICV	intracerebroventricular	脳室内
IT	intrathecal	髄腔内
IT-C	intrathecal-cisternal	大槽内
IT-L	intrathecal-lumbar	腰部髄腔内
kDa	kilodalton	キロダルトン
KO	knockout	ノックアウト
K_{uptake}	Concentration of substance yielding 50% of maximal uptake into cells	細胞への最大取込み量の 50%が得られる物質濃度
mg	milligram	ミリグラム
MHLW	Ministry of Health, Labor, and Welfare	厚生労働省
mL	milliliter	ミリリットル
mm	millimeter	ミリメートル
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development	経済協力開発機構

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
PK	pharmacokinetics	薬物動態
rhTPP1	recombinant form of human tripeptidyl peptidase-1	遺伝子組換えヒトトリペプチジルペプチダーゼ 1
SCMAS	subunit C of mitochondrial ATP synthase	ミトコンドリア ATP 合成酵素のサブユニット C
SD	Standard deviation	標準偏差
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TPP1	tripeptidyl peptidase 1	トリペプチジルペプチダーゼ 1
WT	wild type	野生型（正常）

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 緒言

BMN 190 は、セロイドリポフスチン症 2 型（CLN2）患者の欠損酵素である、ヒトトリペプチジルペプチダーゼ 1（TPP1）の遺伝子組換え体で、酵素補充療法（ERT）薬として開発されている。TPP1 は、ライソゾームに分解処理のために蓄積するポリペプチドの N 末端からトリペプチドを切断するタンパク質分解酵素である（Sohar, 2000, Clin.Chem.）。CLN2 では、中枢神経系へのライソゾーム蓄積物質の蓄積が、神経変性症状及び機能消失を引き起こし、小児期の間に死に至る。BMN 190 は、中枢神経系に TPP1 酵素活性を復元し、CLN2 の進行を抑制することが期待されている。

BMN 190 は、66 kDa で 544 アミノ酸から成るヒト TPP1 の不活性なプロ酵素で、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CI-M6PR）を介して酵素を細胞に取り込むために必要な、N-結合型オリゴ糖の付加により翻訳後に修飾されている（Golabek, 2005, J Biol Chem）。細胞内取込み後、プロ酵素はライソゾームに輸送され、酸性環境で開裂され、46 kDa の活性酵素及び 20 kDa（176 アミノ酸）の不活性断片を産生する（Sleat, 1997, Science）（Wlodawer, 2003, BMC.Struct.Biol.）。BMN 190 は、不活性なプロ酵素として投与され、その活性はライソゾームに限定される。

BMN 190（TPP1）ERT 薬の投与経路は、側脳室に設置したカテーテルを介した脳脊髄液への脳室内投与である。脳脊髄液の脳室系からの通常の循環パターンより、酵素は中枢神経系全体に分布することが予測される。他の ERT 薬は、腰部髄腔内投与により中枢神経系に送達されているが（Felice, 2011, Toxicol.Pathol.）（Dickson, 2011, Curr Pharm Biotechnol）、BMN 190 の非臨床試験では、脳室内投与経路により優れた中枢神経系分布が示された。

2.4.1.2 CLN2

CLN2（バッテン病の一種）は、*CLN2* 遺伝子変異に起因するライソゾーム酵素 TPP1 の欠損が原因となって引き起こされる稀な遺伝性疾患である。現在まで、CLN2 では約 70 の異なる突然変異が、TPP1 活性の大幅な減少又は消失を導き、CLN2 を引き起こすと説明されている（Kousi, 2012, Hum.Mutat.; http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml）。これらの突然変異により、短縮又はミスフォールディング TPP1 タンパク質が合成され、ライソゾーム輸送は改変され、プロ酵素の活性化は減少し、酵素活性は著しく減少又は消失する（Walus, 2010, Hum.Mutat.）。TPP1 活性の欠損により、中枢神経細胞に神経毒性のあるライソゾーム蓄積物質の蓄積がもたらされる。最初の臨床症状は、通常 2～4 歳の患者に出現し（Chang, 2011, Oxford Univ Press）（Kurachi, 2000, Neurology）、平均診断年齢は 4 歳である。患者は、初めにけいれん発作、続いて運動失調、ミオクローヌス、言語障害、認知障害及び発達退行を発現する。視覚能力、認知機能及び運動機能の急速な低下により患者は、約 6 歳までに失明及び車椅子の生活を強いられることになる。患者は疾患の後期段階で植物状態に陥り、通常 10～16 歳の間に死に至る。

CLN2 に対する承認された治療法はない。現在の治療法は、苦痛緩和法で、発作（抗けいれん薬）、運動制御の喪失（補装具又は車椅子）及び摂餌（胃瘻管）の症状の軽減に集中している。

2.4.1.3 CLN2 の動物モデル

非臨床試験では、薬理試験及び毒性試験評価項目を測定するために、2 種類の CLN2 動物モデルを使用した。TPP1 ノックアウトマウスは、酵素をコードする CLN2 遺伝子座の標的破壊により作製され、神経変性症状及び生存期間の短縮を示す（Sleat, 2004, J.Neurosci.）。これらの動物に低次形態 CLN2 対立遺伝子を用いて、TPP1 活性の残存活性（正常動物の 3 又は 6%）を復元すると、運動機能の改善及び生存期間の延長で評価される疾患進行速度の著しい減少を示した（Sleat, 2008, Mol Genet Metab）。

TPP1 欠損ダックスフンドモデルは、TPP1 遺伝子にフレームシフト突然変異[エクソン 4 に 1 塩基対の欠失（c.325delC）]を起こしたホモ接合体を有し、CLN2 患者と同様の TPP1 活性の欠損症を誘導する（Awano, 2006. Mol Genet Metab）。TPP1 欠損ダックスフンドは、ヒト疾患の神経変性の進行を再現し、7～8 箇月齢で運動失調、視覚追跡欠損、振戦、ミオクローヌス及び固有位置感覚欠損の臨床症状を発現する。疾患進行は非常に急速で、11 箇月齢までに TPP1 欠損ダックスフンドは、補助なしでの摂餌能力を低下し、安楽死が必要となる。ヒトの疾患で観察されるのと同様の自家蛍光を発する貯蔵体が、7 箇月齢までに TPP1 欠損ダックスフンドの中枢神経全体の神経細胞に出現する（Vuillemenot, 2011, Mol.Genet.Metab）。TPP1 欠損ダックスフンドでは、神経変性による疾患進行に伴い、脳委縮症及び小脳委縮症が出現し、7 箇月齢までに網膜電図で視覚異常が検出される（Katz, 2008, Invest Ophthalmol.Vis.Sci.）（Whiting, 2013, Exp.Eye Res.）。瞳孔対光反射すなわち光に対する瞳孔反応も、疾患進行に伴い減少する。この動物モデルでは 6 箇月齢で、T 迷路装置での逆転学習課題の評価で認知障害が検出される（Sanders, 2011, Genes Brain Behav.）。TPP1 欠損ダックスフンドで観察される臨床疾患の進行及び神経変性の経過は、CLN2 患者で観察される臨床状態の悪化を厳密に再現している。このうち、Weill-Cornell 及び Hamburg の CLN2 評価尺度で評価される 2 つのパラメーターである運動機能及び歩様の急速な進行性低下は、主要有効性評価項目として臨床の場でも使用される。

2.4.1.4 非臨床試験計画

CLN2 の特性及び重症度、利用可能な治療法の欠如、及び中枢神経系での BMN 190 の薬理活性及び潜在する毒性を評価する必要性を考慮して、BMN 190 の安全性評価方法を選択した。臨床試験適任患者数が少ないことから、臨床試験の開始に先立ち、BMN 190 の投与計画（投与量、経路及び頻度）、ヒトへの外挿が可能な薬理学的エンドポイント及び BMN 190 の安全性を理解することを目指して、非臨床試験を計画した。

BMN 190 の非臨床評価には、正常動物（ビーグル犬及びカニクイザル）での単回投与試験並びに正常動物及び CLN2 疾患モデル（TPP1 ノックアウトマウス及び TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド）での反復投与試験を組み入れた。これらの動物種は、以下のような、TPP1 アミノ酸配列の同一性の高さ、CI-M6PR の発現及びアミノ酸配列の同一性、並びに解剖学的類似性を基に選択された。TPP1 アミノ酸配列のヒトとマウス、イヌ及びサルとの同一性は、それぞれ、91%、

95%及び98%である。CI-M6PRアミノ酸配列のヒトとマウス、イヌ及びサルとの同一性は、それぞれ、81%、86%及び98%である。この疾患動物モデルはまた、ライソゾーム蓄積物質の蓄積、神経細胞死、振戦、運動失調、機能低下及び生存期間の短縮など、ヒトCLN2の臨床症状及び病理的変化を、疾患進行に対して類似した相対的時期に再現する（Sleat, 2004, J.Neurosci.）（Awano, 2006, Mol.Genet.Metab）。したがって、これらの動物モデルは、臨床への外挿が可能な評価項目を使用し、疾患進行の薬理学的抑制に関して有益な知見を提供する。

イヌ及びサルは、げっ歯類と比較してよりヒトに類似した中枢神経系及び脳脊髄液パラメーターを有し、より複雑でより大きな脳を有し、ヒトに類似した脳脊髄液代謝速度を示すことから、試験に使用した（in-house data; Herculano-Houzel, 2009, Front Hum Neurosci.）。さらに、サルは、ヒトに類似した半直立姿勢及び中枢神経系形態を有することから、サルの中枢神経系分布試験は、ヒトの脳分布を再現するものと期待される。動物種間の中枢神経系パラメーター及び姿勢の比較を、表 2.4.1.4.1 に要約した。

表 2.4.1.4.1 動物種間の中枢神経系パラメーター及び姿勢の比較[a]

動物種	マウス	イヌ （幼若ダックスフンド）	サル	小児[b] （3～5歳）
脳重量[a]	0.4 g （ヒトの0.0004倍）	50 g （ヒトの0.05倍）	100 g （ヒトの0.1倍）	1000 g
脳脊髄液量[a]	0.04 mL （ヒトの0.0004倍）	12 mL （ヒトの0.12倍）	15 mL （ヒトの0.15倍）	100 mL
脳脊髄液代謝回転[a]	12.5 ×/日 （ヒトの2.5倍）	5.75 ×/日 （ヒトの1.15倍）	4 ×/日 （ヒトの0.8倍）	5 ×/日
姿勢	四足	四足	半二足	二足
TPP1アミノ酸配列相同性	91%	95%	98%	100%

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ1
[a] マウス及びサル：Herculano-Houzel, 2009, Front Hum Neurosci、イヌ（社内データ）及びヒト：Dekaban, 1978, Ann Neurol)
[b] Giedd, 1996, Cereb.Cortex

CLN2は小児患者に発症することから、可能な限り幼若動物を使用した。中枢神経系を標的とすることから、全ての試験で、BMN 190は、臨床の場で使用されている中枢神経系送達システムと原理的及び構造的に類似した脳室カテーテル及び投与ポートを用いて、脳脊髄液コンパートメントへ投与した。ヒトでの長期投与の妥当性を裏付けるために、反復投与試験では、TPP1欠損幼若ダックスフンド及び正常野生型の幼若同腹子の両方を使用し、BMN 190を18箇月間投与した。TPP1欠損ダックスフンドを用いることにより、BMN 190の投与に関連する薬理作用、疾患進行への影響、及び疾患に潜在する安全性への影響を評価することが可能になった。特に、ライソゾーム蓄積物質の蓄積を有するTPP1欠損ダックスフンドは、細胞内外に蓄積したライソゾーム蓄積物質の急速な除去に潜在する有害な影響を予測するために用いた。野生型同腹子対照動物の使用により、神経変性に関するCLN2バックグラウンドデータがない条件でのBMN 190の投与に関連した毒性の評価が可能になった。試験は、適切な動物数を用いた標準的な反復投与毒性試験と合致する安全性パラメーターを評価できるようデザインした。

BMN 190 の非臨床試験では、TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの脳室内投与による BMN 190 の安全性薬理パラメーター、中枢神経系分布、薬物動態（PK）、免疫原性及び毒性についても明らかにした。半直立動物に脳室内投与した BMN 190 のトキシコキネティクス（TK）、組織分布及び半減期をよりよく理解するために、単回投与毒性試験は、幼若カニクイザルを用いて実施した。

非臨床試験は、TPP1 欠損線維芽細胞を用いた 1 試験の *in vitro* 試験と、ビーグル犬及びカニクイザルを用いた単回投与 3 試験と TPP1 ノックアウトマウス並びに TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドを用いた反復投与 5 試験の 8 試験の *in vivo* 試験から成る。試験の概要を表 2.4.1.4.2 に示し、薬理活性、毒性、脳脊髄液及び血漿の PK、並びに中枢神経系及び心血管系安全性薬理の評価の詳細を記載する。

非臨床試験で評価した BMN 190 の有効性及び安全性プロファイルより、960 mg までの投与量の BMN 190 を隔週で小児 CLN2 患者に長期脳室内投与する妥当性が裏付けられた。

表 2.4.1.4.2 BMN 190 の非臨床試験の一覧

試験内容及び番号	試験系	試験実施施設	投与経路 （持続投与時間）	投与量、投与期間 及び投与スケジュール	評価パラメーター	GLP	試験実施状況
効力を裏付ける試験							
rhTPP1（BMN 190）の TPP1 欠損ヒト線維芽細胞内取込み量の測定 （TR-00195 試験）	TPP1 欠損 ヒト線維芽細胞	BioMarin Pharmaceutical Inc.	*In vitro*	0.625～20 nmol/L	活性 K_{uptake}	非適用	完了
単回投与試験							
単回大槽内（IT-C）投与 CNS 分布試験 （0190-08-034 試験）	ビーグル犬	[redacted]	IT-C	8、33 又は 128 mg 回復性 1～4 日間	剖検所見 CNS 分布 CNS、肝臓、血漿、尿及び CSF 中の TPP1 活性	非適用	完了
単回脳室内（ICV）投与毒性、トキシコキネティクス及び CNS 分布試験 （0190-09-071 試験） 参考文献：Vuillemenot, 2014, Toxicol.Appl.Pharmacol.	カニクイザル	[redacted]	ICV （約 4 時間）	5、14 又は 20 mg 回復性 3、7 又は 14 日間	毒性 CSF／血漿中免疫原性 CSF／血漿中 TK CNS 分布 ECG	適用 [a]	完了
単回腰部髄腔内（IT-L）投与毒性、トキシコキネティクス及び CNS 分布試験 （BMN190-11-046 試験）	カニクイザル	[redacted]	IT-L （約 4 時間）	14 mg 回復性 3 日間	毒性 CSF／血漿中 TK CNS 分布	非適用	完了
反復投与試験							
3 日間反復 IT-L 投与薬理試験 （BMN190-12-010 試験） 参考文献：Xu, 2011, Mol.Ther.	TPP1 KO マウス	[redacted]	IT-L	15 週齢マウスに 1 日量 0.27 mg を 3 日間投与 4 週齢マウスに 1 日量 0.4 mg を 3 日間投与	CNS 酵素活性 ライソゾーム蓄積物質 歩行分析 生存期間	非適用	完了
3 ヵ月間反復 IT-C 投与毒性、CNS 分布及び薬理試験 （0190-09-066 試験） 参考文献：Vuillemenot, 2011, Mol.Genet.Metab.	TPP1 欠損及び正常（WT）ダックスフンド （4 箇月齢）	[redacted]	IT-C （ボーラス）	32 mg 月 1 回投与、3 箇月間	毒性 血漿中 TK CNS 分布 CSF／血漿中免疫原性 神経、視覚及び認知機能	非適用	完了

試験内容及び番号	試験系	試験実施施設	投与経路 （持続投与時間）	投与量、投与期間 及び投与スケジュール	評価パラメーター	GLP	試験実施状況
					脳 MRI EEG ライソゾーム蓄積物質		
ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内（ICV）持続投与試験 （BMN190-12-027 試験）	TPP1 欠損及び正常（WT）ダックスフンド （4 箇月齢）	[redacted]	ICV、IT-L 及び IT-C[b] （約 4 時間）	最高 16 mg[c] 隔週、最長 6 箇月間	CSF／血漿中臨床病理学的検査所見 剖検及び病理組織学的検査所見 CSF／血漿中 PK 神経、視覚及び認知機能 脳 MRI ECG 生存期間延長	非適用	完了
TPP1 欠損及び正常ダックスフンドにおける 9 ヵ月間反復脳室内（ICV）投与薬理、毒性及びトキシコキネティクス試験 （0190-10-077 試験） 参考文献：Vuillemenot, 2014, Mol.Genet.Metab.	TPP1 欠損及び正常（WT）ダックスフンド （2.5 箇月齢）	[redacted]	ICV、IT-L 及び IT-C[b] （約 2 時間又は 4 時間）	0、4 又は 16 mg 隔週、9 箇月間以上	CSF／血漿中臨床病理学的検査所見 剖検及び病理組織学的検査所見 CSF／血漿中免疫原性 CSF／血漿中 PK CNS 分布 神経、視覚及び認知機能 脳 MRI 生存期間延長 ライソゾーム蓄積物質	非適用	完了
ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験 （BMN190-12-009 試験） 参考文献：Katz, 2014, J.Neurosci.Res.	TPP1 欠損ダックスフンド （2.5 箇月齢）	[redacted]	ICV、IT-L 及び IT-C[b] （約 4 時間）	最高 48 mg[d] 隔週、最長 18 箇月間[e]	CSF／血漿中臨床病理学的検査所見 剖検及び病理組織学的検査所見 CSF／血漿中 PK CNS 分布 神経、視覚及び認知機能 脳 MRI 生存期間延長	非適用	完了

CLN2：セロイドリポフスチン症 2 型、CNS：中枢神経系、CSF：脳脊髄液、ECG：心電図、EEG：脳波検査、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、K_{uptake}：細胞内取込み量が最大取込み量の 1/2 となる濃度、ICV：脳室内、IT-C：大槽内、IT-L：腰部髄腔内、KO：ノックアウト、MRI：核磁気共鳴画像法、PK：薬物動態、TK：トキシコキネティクス、(rh) TPP1：(遺伝子組換えヒト) トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT：野生型（正常）

[a] 米国食品医薬品局（FDA）Good Laboratory Practice Regulations (GLP) (21 CFR, Part 58)、日本厚生労働省（MHLW）医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（厚生省令第 21 号）及び経済協力開発機構（OECD）Principles of Good Laboratory Practice [C (97) 186/Final] を遵守して実施した。

[b] イヌの ICV/IT カテーテルには寿命があり、ICV カテーテルが開存している限り ICV ルートを使用した。ICV カテーテルが開存を失った場合には、IT-L ルートを使用した。IT-L カテーテルが開存を失った場合には、IT-C ボーラス投与を行った。

[c] 16 mg の反復投与後に過敏症反応が発現したため、投与量を 2 mg に減量し、その後、動物が BMN 190 に耐性を獲得するに従い徐々に増量した。

[d] 48 mg の 2 又は 3 回目の投与後に過敏症反応が発現したため、投与量を 2 mg に減量し、その後、動物が BMN 190 の耐性を獲得するに従い 48 mg まで 4 箇月かけて徐々に増量した。

[e] 1 例は投与期間が 81 週間であった。

カニクイザル及びダックスフンドの脳室内投与試験の投与量は、投与可能な BMN 190 濃度、持速投与速度及び持続投与時間の上限を基に選択した。持続投与条件は、脳脊髄液容量の急速な変化による頭蓋内圧への影響を最小にし、動物が持続投与処置のために麻酔される時間を最短にするよう選択された。初期の試験で投与可能な最大投与量は、ダックスフンドに対しては 16 mg 及びカニクイザルに対しては 20 mg であった。その後の試験でダックスフンドに対して投与可能な最大投与量は、原薬濃度の増加に基づき 48 mg であった。

カニクイザルを用いた脳室内単回投与の毒性及び TK 試験は、米国、経済協力開発機構（OECD）及び本邦のGLPに準拠して実施された。TPP1欠損及び野生型ダックスフンドを用いた試験は、この疾患モデル動物が利用可能な唯一の施設である[redacted]で実施された。[redacted]は GLP 適合確認施設ではない。したがって、ダックスフンドを用いた試験は、一般に受け入れられた科学的原則に厳密に従い、GLP 試験に準拠した文書化及び試験依頼者によるモニタリング調査を実施した。

2.4.1.5 非臨床試験に使用した BMN 190 の製造工程

製剤及び製造工程の最適化は、BMN 190 の非臨床及び臨床開発期間に実施された。臨床製剤及びその開発については、2.3.P.1 及び 2.3.P.2［BMN 190 脳室内注射剤（溶液）］項に記載している。製剤化バルク原薬（FBDS）製造工程の加工履歴については 2.3.S.2.6 項に記載している。非臨床試験に使用した BMN 190 の製造工程を、表 2.4.1.5.1 に示す。

表 2.4.1.5.1 非臨床試験に使用した BMN 190 の製造工程

試験	製造工程
マウス反復投与試験（BMN190-12-010 試験） ビーグル犬単回投与試験（0190-08-034 試験） ダックスフンド反復投与予備試験（0190-09-066 試験）	研究ベンチスケール
サル脳室内（ICV）単回投与試験（0190-09-071 試験）	非臨床プロセス A
サル髄腔内（IT）単回投与試験（BMN190-11-046 試験） ダックスフンド反復投与試験（0190-10-077 試験）	非臨床プロセス B
ダックスフンド反復投与試験（BMN190-12-009 試験）	非臨床プロセス C
ダックスフンド反復投与試験（BMN190-12-027 試験）	プロセス D

2.4.2 薬理試験

BMN 190 の非臨床薬理試験及び安全性薬理試験は、1 試験の *in vitro* 試験及び 6 試験の *in vivo* 試験（TPP1 ノックアウトマウスの 1 試験、TPP1 欠損ダックスフンドの 4 試験及びカニクイザルの 1 試験）で評価した。BMN 190 の効力を裏付ける試験の *in vitro* 試験は、TPP1 欠損ヒト線維芽細胞で評価した。BMN 190 の効力を裏付ける試験の *in vivo* 試験は、TPP1 ノックアウトマウスの 1 試験及び TPP1 欠損ダックスフンドの 4 試験（3 箇月間、9 箇月間、6 箇月間まで及び 18 箇月間まで）の反復投与 5 試験で評価した。独立した安全性薬理試験は実施しなかった。カニクイザルを用いた脳室内単回投与試験で、心血管系及び呼吸器系安全性薬理パラメーターを評価した。TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドを用いた反復投与試験で、心血管系及び中枢神経系安全性薬理パラメーターを評価した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験では、脳室内又は髄腔内投与による BMN 190 の薬理活性を機能的及び組織学的に評価した。TPP1 欠損ヒト線維芽細胞及び CLN2 の臨床症状に関連した動物モデルの TPP1 ノックアウトマウスを用いた腰部髄腔内（IT-L）反復投与 1 試験及び TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドを用いた反復投与［大槽内（IT-C）投与、又は脳室内（ICV）投与、IT-L 投与及び IT-C 投与の組合せ投与］4 試験を実施した。これらの薬理試験より、脳脊髄液を経由して投与された BMN 190 は、中枢神経系に広範に分布し、ライソゾームに取り込まれ活性化されることが示された。

In vitro 試験で BMN 190 の細胞への取込み量及び細胞での半減期を、TPP1 欠損線維芽細胞で測定した（TR-00195 試験）。TPP1 欠損線維芽細胞での BMN 190 のライソゾーム半減期は、約 11.5 日である（Lin, 2001, Biochem.J.）が、ライソゾームに最大取込み量の 50%が取り込まれる濃度で定義される BMN 190 のライソゾーム K_{uptake} の範囲は 2.7～3.4 nmol/L で平均 3.1 nmol/L であった（TR-00195 試験）。

TPP1 ノックアウトマウス 4 週齢に 0.4 mg の BMN 190 を 3 日間連続して投与（合計 1.2 mg）すると、脳ホモジネートの TPP1 酵素活性が野生型動物の内因性の水準より 3～10 倍上昇した（BMN190-12-010 試験）。BMN 190 の投与により、ライソゾーム蓄積物質の主要成分であるミトコンドリア ATP 合成酵素サブユニット C（SCMAS）が、脳及び肝臓で減少した（Xu, 2011, Mol.Ther.）。溶媒投与対照マウスの 113.5 日間及び投与を行っていない対照マウスの 124.5 日間に対して、BMN 190 投与マウスの生存期間は 164 日間であった。BMN 190 単回投与により、投与を行っていない対照動物及び溶媒投与対照動物の生存期間がそれぞれ、平均で 32%及び 44%延長した。

3 箇月間反復投与探索試験（0190-09-066 試験）では、TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド 4 箇月齢に月 1 回、32 mg の BMN 190 又は溶媒を IT-C 投与し、中枢神経系に既にライソゾーム蓄積物質の蓄積を有する TPP1 欠損ダックスフンドで BMN 190 の薬理活性を評価した（Vuillemenot, 2011, Mol.Genet.Metab）。BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドでは、大脳皮質、小脳、視床下部、橋（脳）、髄質及び脊髄に、野生型と同等以上の TPP1 活性の広範な中枢神経系分布が認められた。TPP1 欠損ダックスフンドでは同時に、中枢神経系に自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質の蓄積の減少が認められたが、毒性学的影響は認められなかった。試験結果から、蓄積したライソゾーム蓄積物質の急速な除去により毒性がもたらされる可能性はないことが示された。

BMN 190 の疾患予防に関する潜在能力を評価するため、TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドに溶媒、4 又は 16 mg の BMN 190 を隔週で ICV 投与、IT-L 投与、又は IT-C 投与により脳脊髄液に 9 箇月間投与した（0190-10-077 試験）（Vuillemenot, 2014, Mol.Genet.Metab）。試験は、イヌに技術的に脳室内持続投与が可能な最少齢で、ほぼヒトの 3 歳（疾患発症齢）に相当する 2.5 箇月齢のダックスフンドで開始し、疾患進行の遅延の薬理学的エンドポイント、並びに疾患進行、蓄積したライソゾーム蓄積物質の急速な除去及び BMN 190 に特異的に潜在する毒性を評価した。試験では、BMN 190 は、溶媒投与対照動物に比較して、投与量依存的に疾患の発現及び進

行を遅延した。運動機能及び歩様パラメーターを含む神経変性に関する臨床症状の最初の発現は、溶媒投与対照動物に比較して、4 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドでは 3.5～11 週間、16 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドでは 10～28 週間遅延した。これらの神経学的評価は、臨床で使用されている CLN2 評価尺度に直接変換が可能である。BMN 190 の投与は、TPP1 欠損ダックスフンドに生じる脳委縮を抑制した。定量的核磁気共鳴画像法で、投与量に依存した脳室拡張の減少及び脳容積の安定化が認められた。同様の脳委縮が CLN2 患者で認められている（Katz, 2014, J.Neurosci.Res.）。瞳孔対光反射は、眼に照射する光の強さの増加に対する瞳孔の収縮度を測定した。治療しないまま放置すると、TPP1 欠損ダックスフンドでは、疾患進行に伴い瞳孔対光反射が低下するが、4 mg 又は 16 mg の BMN 190 の投与により、6 箇月齢で、正常野生型動物の水準近くの瞳孔対光反射が保存された。瞳孔対光反射の改善は、8 及び 10 箇月齢の投与まで維持された（Whiting, 2014, Exp.Eye Res.）。蛍光顕微鏡により、溶媒投与動物及び 4 mg の BMN 190 投与動物に比較して 16 mg の BMN 190 投与動物の大脳皮質にライソゾーム蓄積物質の減少が認められた。線条体でも 4 mg の BMN 190 投与動物に比較して 16 mg の BMN 190 投与動物に、ライソゾーム蓄積物質の減少傾向が認められた。

BMN190-12-009 試験では、TPP1 欠損ダックスフンド（2.5 箇月齢）に、48 mg までの投与量の BMN 190 を隔週で、19 箇月間、ICV 投与、IT-L 投与、又は IT-C 投与した。試験より、TPP1 欠損ダックスフンドが徐々に投与量を増加されることにより脱感作される場合、このモデルで高投与量の BMN 190 の投与が可能であることが示された。16 mg の投与に比較して、さらなる、生存期間の延長、神経変性に関する臨床症状の発現の遅延及び神経機能の保存が認められた（0190-10-077 試験）。異種タンパク質に対するイヌの免疫応答が原因である可能性が高い 2 回目及び 3 回目投与後の過敏性反応以外、BMN 190 の投与に関連する安全性への影響は認められなかった。

疾患発症後期での投与の有効性の可能性を評価するために、4 箇月齢の TPP1 欠損ダックスフンドに、16 mg までの投与量の BMN 190 を隔週で 6 箇月齢まで、ICV 投与、IT-L 投与、又は IT-C 投与した（BMN190-12-027 試験）。BMN 190 は、CLN2 患者とほぼ同等齢（約 5 歳）で投与した。異種ヒトタンパク質に対するイヌに共通の免疫応答である反復投与後の過敏性反応及び抗 BMN 190 抗体産生以外の、BMN 190 の投与に関連した安全性への影響は認められなかった。BMN 190 投与動物では溶媒投与対照動物に比較して疾患症状の発現の遅延が認められたが、CLN2 疾患進行の抑制は、2.5 箇月齢で投与を開始したときに認められたほど顕著ではなかった（0190-10-077 試験）。

以上の結果より、BMN 190 の非臨床薬理試験では、ヒト疾患を再現する CLN2 の動物モデルへの脳室内又は髄腔内投与により BMN 190 の安定した薬理活性が示された。CLN2 疾患モデルへの BMN 190 の投与は、疾患進行を顕著に抑制した。効力を裏付ける試験では、脳脊髄液経由で中枢神経系に直接投与した BMN 190 の薬理活性を組織学的及び機能的に明らかにした。TPP1 ノックアウトマウスでは、BMN 190 の腰部髄腔内投与後に、ライソゾーム蓄積物質の蓄積の減少、運動機能の改善及び生存期間の延長がもたらされた。TPP1 欠損ダックスフンドでは、脳室内投与後に、ライソゾーム蓄積物質の減少、認知機能及び運動機能の維持、神経変性に関する

臨床症状発現の遅延又は抑制、並びに生存期間の延長の BMN 190 の薬理活性が認められた。BMN 190 投与により、投与量に依存して生存期間が延長された。溶媒投与 TPP1 欠損ダックスフンドは、疾患進行により、11 箇月齢までに安楽死を必要としたが、4 mg の BMN 190 投与ダックスフンドは、約 12 箇月齢で疾患の末期に到達した。16 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドは、13～15.5 箇月齢まで生存し（0190-10-077 試験）、48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドは、脳室内カテーテルに対する反応のため安楽死が必要になるまでの 8～20 箇月齢まで生存した（BMN190-12-009 試験）。

2.4.2.2 安全性薬理試験

独立した安全性薬理試験は実施していない。心血管系及び呼吸器系の安全性薬理パラメーターは、カニクイザルの脳室内（ICV）単回投与試験で評価した。中枢神経系及び心血管系の安全性薬理パラメーターは、TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの反復投与試験で評価した。BMN 190 の投与に関連した心血管系、中枢神経系又は呼吸器系に対する変化を示唆する所見は、*in vivo* 試験の 8 試験に認められなかった。

カニクイザルの単回投与試験（0190-09-071 試験）及びダックスフンドでの反復投与試験（BMN190-12-027 試験）で、BMN 190 の投与に関連した心血管系に対する影響を示唆する心電図波形又は心拍数の変化は認められなかった。通常の生存期間以上生存した BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドに、約 10 箇月齢で心筋トロポニン I の上昇が認められた。この変化は、生存期間が限られた溶媒投与 TPP1 欠損動物又は BMN 190 投与正常野生型動物には認められなかった。このため、この上昇は、BMN 190 投与に起因するものではなく、心臓での CLN2 の進行によるものと考えられた。未治療の TPP1 欠損イヌでは生存期間が限られていたために、心臓での CLN2 進行及びそれに関連するトロポニンの変化が生じるより前に安楽死が必要とされた可能性が高い。

BMN 190 の 18 箇月間長期投与 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドに、毎月、神経学的検査を実施した。臨床症状の観察で BMN 190 の投与に関連した全身性又は中枢神経系への有害な影響の徴候は、TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドのいずれにも認められなかった。CLN2 の疾患進行に関連して中枢神経系変性（運動失調、振戦、ミオクローヌス、固有位置感覚欠損及び視覚機能低下）が、TPP1 欠損ダックスフンドに徐々に発現したが、これはこの動物モデルの表現型として報告されている（Awano, 2006, Mol.Genet.Metab.）。

非臨床試験評価では、呼吸器系に、BMN 190 の投与に関連した明白な有害な影響は認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験

ビーグル犬への単回 IT-C 投与 1 回、カニクイザルへの単回 IT-L 投与 1 回、カニクイザルへの単回 ICV 投与 1 回、ダックスフンドへの反復 IT-C 投与 1 回及びダックスフンドへの反復 ICV 投与 3 回の中枢神経系（CNS）への直接投与を行い、BMN 190 の非臨床 PK を検討した。ダックスフンドへの反復 ICV 投与 3 回には以下の試験が含まれている。BMN 190 を 4 mg 及び 16 mg

の用量で反復 ICV 投与 1 回、48 mg の用量で反復 ICV 投与 1 回、16 mg の用量で 4 箇月齢から反復 ICV 投与 1 回（他の試験では約 2.5 箇月齢から投与開始）。

ダックスフンド及びカニクイザルを用いた非臨床試験で使用するため、薬物濃度測定法を開発した。また、PK 及び CNS における分布を測定するため、血漿中又は脳脊髄液（CSF）中の前駆体としての遺伝子組換えヒトトリペプチジルペプチダーゼ 1（rhTPP1）を測定し、CNS 組織中では前駆体及び活性体としての rhTPP1 を測定した。電気化学発光測定法（Electrochemiluminescence assays：Meso Scale Discovery）を用いて、イヌ及びカニクイザルの CSF 及び血漿中の総抗 BMN 190 抗体を測定した。

2.4.3.1 吸収

野生型（WT）及び TPP1 欠損ダックスフンドに ICV 定速投与、また、カニクイザルに IT-L 又は ICV 定速投与したときの CSF 及び血漿中における BMN 190 の PK を評価した。その結果、IT 又は ICV 定速投与後の CSF 中に BMN 190 は高濃度（約 1×10^6～3×10^6 ng/mL）に存在していた。両動物とも、定速投与後の直近に CSF における最大曝露となった。両動物とも BMN 190 は体循環系にも存在していたが、単回投与後の CSF 中の最高濃度（C_{max}）は血漿の C_{max} より 100 倍から 1000 倍高濃度であった。CSF 中の BMN 190 濃度は K_{uptake}（約 3.1 nmol/L 又は約 183 ng/mL; TPP1 欠損ヒト線維芽細胞での結果；TR-00195 試験、2.6.2.2.1 項）を投与後 2 日から 3 日間上回っており、この期間は CNS 組織への分布が生じていると考えられる。

各群における個体間のばらつきは大きかったが、WT 及び TPP1 欠損ダックスフンドの初回 ICV 定速投与の CSF と血漿における曝露は類似していた。初回 ICV 定速投与後の CSF における時間 0 から無限時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）（平均 ± SD）は、4 mg 投与（n = 2）で $1.88 \times 10^6 \pm 5.98 \times 10^5$ ng•h/mL、16 mg 投与（n = 6）で $6.45 \times 10^6 \pm 3.45 \times 10^6$ ng•h/mL、48 mg 投与（n = 2）で $1.06 \times 10^7 \pm 3.52 \times 10^5$ ng•h/mL であり、4 mg 投与と 16 mg 投与及び 48 mg 投与と比較すると、それぞれ約 3.4 倍及び 5.6 倍であった。

16 mg を 10 回反復 ICV 定速投与後（n = 2）の CSF の平均 $AUC_{0-\infty}$ は、$1.52 \times 10^7 \pm 1.49 \times 10^7$ ng•h/mL であり、半減期は 2.71 ± 0.0184 時間であった。16 mg 投与群における CSF の平均 $AUC_{0-\infty}$ の投与 1 回目と 10 回目の差は動物間のばらつきによるものと考えられる。CSF における PK プロファイルにおいて、投与 1 回目と 10 回目を比較したとき、反復投与における明確な曝露の増加又は減少は見られなかった。なお、4 mg と 48 mg を反復投与したときの PK パラメーターは得られなかった。CSF からの BMN 190 の消失は 2 相性で、終末相における半減期（平均 ± SD）は、単回 ICV 定速投与 4 mg（n = 2）、16 mg（n = 6）及び 48 mg（n = 2）でそれぞれ 10.2 ± 5.34、5.86 ± 3.39 及び 6.59 ± 1.69 時間であった。

ダックスフンドにおける初回 ICV 定速投与後の平均血漿 $AUC_{0-\infty}$（平均 ± SD）は、4 mg 投与（n = 6）で $1.89 \times 10^3 \pm 1.89 \times 10^3$ ng•h/mL、16 mg 投与（n = 6）で $5.18 \times 10^3 \pm 1.91 \times 10^3$ ng•h/mL、48 mg 投与（n = 3）で $4.02 \times 10^4 \pm 1.69 \times 10^4$ ng•h/mL であり、4 mg 投与と 16 mg 投与及び 48 mg 投与と比較すると、それぞれ約 2.7 倍及び 21.3 倍であった。BMN 190 を 4 mg 又は 16 mg の用量で ICV 又は IT-L で投与したとき、反復投与後の曝露は、単回投与後の曝露に比して小さかった。

原因は、血漿中に抗 BMN 190 抗体が存在したためと考えられる（2.6.6.3.2 項参照）。BMN 190 の血漿からの消失は 2 相性であり、終末相における半減期（平均 ± SD）は、単回 ICV 定速投与 4 mg（n = 6）、16 mg（n = 6）及び 48 mg（n = 3）でそれぞれ 10.4 ± 13.9、8.97 ± 1.89 及び 22.9 ± 2.91 時間であった。

投与開始時約 4 箇月齢のダックスフンドに、BMN 190 を 16 mg の用量で ICV 定速投与したときの CSF 及び血漿における PK パラメーターは、投与開始時約 2.5 箇月齢のダックスフンドに BMN 190 を 16 mg の用量で ICV 定速投与したときの PK パラメーターと類似していた（BMN190-12-027 試験）。

カニクイザルにおいて、14 mg 単回投与後の CSF の平均 $AUC_{0-\infty}$は、IT-L 投与（n = 3）で、$1.10 \times 10^7 \pm 1.86 \times 10^6$ ng•h/mL、ICV 定速投与（n = 9）で $5.77 \times 10^6 \pm 1.11 \times 10^6$ ng•h/mL であり、ほぼ 2 倍の差があった。CSF 中の BMN 190 中濃度は、同じ投与量、同じ投与経路においても動物間でばらつきが大きかった。CSF 中の BMN 190 濃度は K_{uptake}（約 3.1 nmol/L 又は約 183 ng/mL、TPP1 欠損ヒト線維芽細胞での結果；TR-00195 試験、2.6.2.2.1 項）の 14 mg を IT-L 投与後約 28 時間、ICV 定速投与後 51 時間で上回っていた。CSF からの BMN 190 の消失は 2 相性で、単回 5 mg（n = 3）、14 mg（n = 9）及び 20 mg（n = 2）ICV 定速投与の平均終末相半減期は、7.63 ± 1.05、24.1 ± 23.6 及び 7.62 時間であった。

血漿中の平均 $AUC_{0-\infty}$は、14 mg を単回 IT-L 投与（n = 3）で、$3.88 \times 10^4 \pm 1.00 \times 10^4$ ng•h/mL、ICV 定速投与（n = 9）で $1.75 \times 10^4 \pm 4.61 \times 10^3$ ng•h/mL であった。BMN 190 は、血漿中で 2 相性に減少し、平均終末相半減期は 5 mg（n = 3）、14 mg（n = 9）及び 20 mg 単回投与でそれぞれ 15.5 ± 8.06、6.16 ± 2.16 及び 6.31 ± 3.21 時間であった。

2.4.3.2 分布

BMN 190 をビーグル犬に単回 IT-C 急速投与、カニクイザルに単回 IT-L 定速投与及び ICV 定速投与、ダックスフンドに反復 IT-C 投与又は反復 ICV/IT 投与し、CNS 組織への分布を検討した。ダックスフンドに ICV 定速投与したとき、BMN 190 は CNS 組織に広く分布し、BMN 190 を投与していない WT 動物の CNS 組織中濃度を超える分布を示した。

ビーグル犬に単回 IT-C 投与、サルに単回 IT-L 定速投与又はダックスフンドに毎月 1 回、合計 4 回 IT-C 急速反復投与したときの CNS 組織への分布パターンは類似していた。BMN 190 は脳に広く分布し、多くの CNS 組織で WT 動物の TPP-1 レベルよりも 2 倍から 40 倍高濃度で分布した。また、BMN 190 の分布には濃度勾配が見られ、測定した多くの脳組織で、深部（3 mm 超）より高い濃度が表層（3 mm 未満）で見られた。しかし、IT 投与したとき、視床、線条体又は中脳のような脳室近傍の深部の脳では、検出されないかわずかに検出されただけであった。

ICV 定速投与を IT-C 投与及び IT-L 投与と比較したとき、カニクイザルに単回 ICV 定速投与すると、BMN 190 は脳に広く分布し、脳室髄近傍の深部の脳（視床、線条体又は中脳）により多く分布した。このことから、ICV 経路により投与すると、BMN 190 が多く分布しより多くの病態の影響を受ける CNS 組織に曝露する可能性がある。そのため、ICV 定速投与は BMN 190 の投与方法に適していると考えられる。CNS 組織における平均半減期は、約 2 週間（CNS の部位

により 3.1～87.2 日）であり、2 週間に一度の ICV 定速投与により、BMN 190 の CNS 組織での高い曝露が維持されることを示している。

ダックスフンドに 4 又は 16 mg を 2 週間に一度約 20 回又は 48 mg を 2 週間に一度 42 回 ICV/IT 投与したとき、全てのイヌにおいて測定した CNS 組織（表層及び深部の小脳、大脳皮質、視床下部、髄質、中脳、脳橋、線条体、視床）で BMN 190 が検出された。BMN 190 の組織への分布パターンは ICV 定速投与したサルの分布に類似していた。

2.4.3.3 薬物動態まとめ

イヌ及びサルを用いた血漿中濃度推移及び組織分布試験の結果から、BMN 190 を CSF に IT 又は ICV 定速投与したとき、BMN 190 は表層脳及び深部脳に効果的に分布することが示された。CSF における BMN 190 の濃度は、投与終了直後に最高となり、投与後 2 日から 3 日間は K_{uptake}（約 3.1 nmol/L 又は約 183 ng/mL）を超える濃度を維持した。BMN 190 の CSF 中の曝露（C_{max} 及び AUC）は、カニクイザルにおいて投与量 5 mg から 20 mg の間では用量比例性を上回る増加を示し、ダックスフンドにおいて投与量 4 mg から 48 mg の間では用量比例性を下回る増加を示した。ICV 投与又は IT 投与したとき、BMN 190 の全身曝露が見られたが、BMN 190 を ICV 又は IT 単回投与後の血漿中 BMN 190 濃度は CSF 中の濃度の 1/100 から 1/1000 倍であった。ダックスフンドにおいて反復投与後の血漿中濃度は、単回投与後の血漿中濃度より低かったが、CSF における曝露は単回投与と反復投与で類似していた。BMN 190 を反復投与したとき、CSF 中及び血漿中共に抗 BMN 190 抗体の産生が見られた。BMN 190 を ICV 又は IT 投与すると、CNS 組織に広く分布し、一般的に組織の深層部より表層部に多く分布した。CNS 組織における平均半減期は約 2 週間であった。全体としてみると、CNS 組織における BMN 190 濃度は、用量依存的であった。IT 投与に比べ、ICV 投与したとき、視床、線条体、中脳を含む脳室近傍の脳深部組織により分布することが示された。これらの非臨床 PK 及び組織分布の結果は、CLN2 患者に BMN 190 を 2 週間に一度 ICV 投与することを支持する結果である。

2.4.4 毒性試験

BMN 190 の安全性を評価するため、カニクイザルを用いた単回投与試験（ICV 又は IT-L 持続投与）を 2 試験、及びダックスフンドを用いた反復投与試験（ICV/IT-L 持続投与、IT-C 投与）を 4 試験実施して、合計 6 試験の ***in vivo*** 試験により毒性及び TK を評価した。反復投与試験では標準的な毒性評価に加えて、BMN 190 に関連した免疫原性の評価、疾患モデルにおけるライソゾーム蓄積物質の急速な除去に起因する毒性及び過剰な薬理作用の発現を評価した。
BMN 190 の小児 CLN2 患者への長期間投与を担保するために、ダックスフンドの幼若動物（試験開始時に 2.5 又は 4 箇月齢）を用いて長期反復投与試験を実施した。CNS を標的とするため、全試験で臨床用の CNS 投与器具と同一原理で類似デザインの脳室カテーテル及び投与ポートを使用して、BMN 190 を脳脊髄液コンパートメントに投与した。BMN 190 は CNS に直接投与することを計画しているため、ダックスフンド及びカニクイザルの試験では 3 mm 厚で連続して冠状切断した脳切片、脊髄並びに背根神経・背根神経節及び腹根神経の 3 部位、坐骨神経、脛骨神経及び腓腹神経並びに三叉神経節を含む末梢神経など、広範な CNS の病理組織学的検査を実施した。器官毒性を評価するため、安全性試験では非 CNS 組織も検査に供した。試験では

標準的な病理組織学的検査を全て実施した。これらの試験では、BMN 190 に関連する標的器官毒性、若しくはそれ以外の毒性は認められなかった。

サルに BMN 190 を ICV 又は IT-L 持続投与する単回投与の組織分布、毒性及び TK 試験を 2 試験実施した。最初の単回投与毒性及び TK 試験（0190-09-071 試験）では、サルに BMN 190 を 0、5、14 及び 20 mg の用量で脳室内投与した結果、CNS 又は他の器官に BMN 190 に関連した所見は認められなかった。BMN 190 を 14 mg 単回投与後に 3、7 及び 14 日間の複数の回復期間を設けて、早期又は遅発性の CNS 所見及び神経毒性を経時的に評価した。回復期間を通じて、BMN 190 に関連した CNS 又は全身の所見は観察されなかった。溶媒対照群を含む全ての動物で、脳内の ICV カテーテルの経路に沿って、顆粒球浸潤及び神経変性の病理組織学的変化が観察された。これらの所見は CNS に投与器具を長期間留置することで予想された変化（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）であり、BMN 190 に関連した変化ではないと考えられた。BMN 190 の 20 mg を投与したサルでは、脳脊髄液中の最大曝露量（1.58×10^6 ng/mL）が血漿中（4.94×10^3 ng/mL）と比べて高値であった。多くの CNS 組織で半減期が 3～15 日の範囲にあった。2 番目の単回投与毒性及び TK 試験（BMN190-11-046 試験）では、サルに BMN 190 を 14 mg の用量で腰部髄腔内投与した結果、BMN 190 に関連した所見は認められなかった。本試験では主要な所見として、全例で脳及び脊髄を取り巻く髄膜にタンパク質製剤を CNS に直接投与した場合に見られる一般的な変化である単核細胞浸潤が観察された。BMN 190 をサルの脳室内に単回（約 4 時間）持続投与した場合の無毒性量（NOAEL）は、試験に用いた最高用量 20 mg であった。サルでは IT-L 持続投与と比べて ICV 投与により、特に脳室に隣接した脳の深部構造でより完全な CNS 組織分布が観察されたことから、臨床では IT-L 持続投与より ICV 投与の使用が支持される。

3 ヵ月間反復投与試験（0190-09-066 試験）では、4 箇月齢の野生型及び TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を 32 mg の用量で月 1 回投与して、BMN 190 の安全性並びに CNS におけるライソゾーム蓄積物質の急速な除去の結果を評価した。BMN 190 の反復投与により、TPP1 欠損動物（雄）及び正常動物（雌）で過敏症反応が観察された。TPP1 欠損動物では溶媒及び BMN 190 のいずれの投与でも、3 箇月間投与後に大脳及び小脳の萎縮、代表的な CNS 炎症である星状膠細胞症及びプルキンエ細胞の欠損に見られる小脳の神経細胞壊死など、CLN2 疾患進行に伴う変化が観察された。正常又は TPP1 欠損動物で、脳、脊髄、心臓、腎臓、肝臓及び肺に、BMN 190 に関連した病理組織学的変化は認められなかった。また、TPP1 欠損動物でライソゾーム蓄積物質の急速な除去に伴う影響は見られなかった。BMN 190 を投与した全動物で、初回投与後に血漿中で 30 日以内、脳脊髄液中で 60 日以内に抗 BMN 190 抗体が検出され、その後の試験期間中に抗体価が上昇した。血漿及び脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体の出現と、反復投与に伴う過敏症反応に関連が認められた。全例が予定剖検日まで生存した。BMN 190 の NOAEL は 32 mg であった。

9 ヵ月間反復投与試験（0190-10-077 試験）では、2.5 箇月齢の幼若な野生型及び TPP1 欠損イヌに、溶媒、BMN 190 の 4 及び 16 mg を隔週で ICV 投与（約 2～4 時間投与）した。野生型及び TPP1 欠損動物で BMN 190 に関連する死亡はなく、体重、摂餌量、臨床病理学的検査、（脳を含む）器官重量、剖検所見及び全身組織の病理組織学的検査で、BMN 190 に関連する変化は認め

られなかった。また、TPP1 欠損動物でライソゾーム蓄積物質の急速な除去の影響も見られなかった。溶媒投与群の 3 例（野生型及び TPP1 欠損動物）は 9 箇月間の試験期間より早期に途中死亡しており、IT-C ボーラス投与での不適切な注射針の留置による傷害、及び／又は CLN2 疾患の進行に起因すると考えられた。BMN 190 投与群の 3 例は、IT-C ボーラス投与での不適切な注射針の留置による傷害及び／又は CLN2 疾患の進行のため、9 箇月間の試験期間以降に死亡した。いずれも BMN 190 投与と関連がなかった。BMN 190 の 16 mg 反復投与後に、野生型及び TPP1 欠損動物で軽度～中等度の過敏症反応が観察された。ダックスフンドで過敏症反応が見られた時期の前後に採取された血漿及び脳脊髄液中で、抗 BMN 190 抗体が初めて検出された。ジフェンヒドラミンの前投与及び持続投与時間を 2 時間から 4 時間に延長することによって、その後ほとんどの過敏症反応を軽減することができた。野生型及び TPP1 欠損の全動物で BMN 190 又は溶媒の投与後に、脳室系の近傍、脊髄及びカテーテル留置経路に接する組織で、血管周囲性細胞浸潤を特徴とする炎症が観察された。これらの炎症性変化は、BMN 190 投与と関連がなかった。BMN 190 を投与した野生型及び TPP1 欠損動物の血漿及び脳脊髄液中で、それぞれ 14 日目及び 29 日目までに抗 BMN 190 抗体が検出された。血漿中の抗 BMN 190 抗体価はおおむね 100 日目まで時間と共に上昇し、その後の試験期間中安定して維持された。抗体価の範囲は脳脊髄液中と血漿中で類似していた。野生型動物と比べて TPP1 欠損動物で一般に抗体価が高く、BMN 190 の 4 mg を投与した動物と比べて 16 mg を投与した動物で高値であった。異種ヒト TPP1（BMN 190）に対して、イヌ TPP1 を発現する野生型イヌの抗体反応と比べて、TPP1 欠損動物で全般的に高い抗体価が観察されたのは、TPP1 欠損動物はイヌ TPP1 タンパク質を発現しないことが原因の可能性が考えられる。BMN 190 を隔週で 9 箇月間投与したイヌの NOAEL は、16 mg/dose であった。

2.5 箇月齢の TPP1 欠損ダックスフンドに、BMN 190 を最高 48 mg の用量で隔週 ICV/IT-L/IT-C 投与した最長 18 箇月間の反復投与試験（BMN190-12-009 試験）では、BMN 190 を高用量で長期間投与した場合に安全性に関わる所見が見られないことが一層明らかとなった。死亡例は全て、CLN2 疾患の進行及び／又は ICV カテーテルに関連した反応（閉塞性水頭症、髄膜炎）が死因であり、BMN 190 に関連した死亡例はなかった。BMN 190 48 mg の 2 又は 3 回目の ICV 投与後に、全例で軽度～中等度の過敏症反応が観察された。この過敏症反応は、脳脊髄液及び血漿中で最初の抗 BMN 190 抗体の検出と相関が見られた。投与量を 2 mg に減量し約 4 箇月かけて徐々に 48 mg に戻した結果、動物が 48 mg 投与に脱感作され、その後の試験期間中は抗 BMN 190 抗体が脳脊髄液及び血漿中に存在したにもかかわらず、投与に関連した反応は見られなかった。BMN 190 を投与した全例で、ICV カテーテルの留置経路及び脳室系に隣接して血管周囲性炎症が観察された。CNS 及び全身器官の器官重量（脳を含む）、剖検所見及び病理組織学的検査で BMN 190 に関連した変化は認められず、ライソゾーム蓄積物質の急速な除去の影響も見られなかった。イヌに BMN 190 を隔週で最長 18 箇月間投与した場合の NOAEL は 48 mg/dose であった。

4 箇月齢の TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を最高 16 mg の用量で隔週 ICV/IT-L/IT-C 投与した最長 6 箇月間の反復投与試験（BMN190-12-027 試験）では、BMN 190 の安全性に関わる所見は認められなかった。死亡例は全て CLN2 疾患の進行が死因であり、BMN 190 に関連した死

亡例はなかった。ダックスフンドの反復投与試験では、3 mm 厚で連続して冠状切断した脳切片、脊髄（3 部位）及び末梢神経など、広範な CNS の病理組織学的検査を実施した。心臓、肺、肝臓、腎臓及び他の全身組織には、BMN 190 に関連した変化は認められなかった。病理組織学的検査では、野生型動物で IT-L カテーテルの周囲に軽度の細胞浸潤、小膠細胞症及びカテーテル留置経路の炎症が認められた。野生型動物では ICV カテーテル留置経路の炎症反応は見られず、脳及び脳室系は正常に見えた。TPP1 欠損動物では、蛍光性蓄積物質の集積、星状膠細胞症、神経線維変性及び神経細胞脱落などの、CLN2 疾患の進行に伴う多数の CNS の組織学的変化が認められた。本試験で見られたカテーテル留置経路及び脳室周囲の炎症反応は、TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を投与した、0190-10-077 試験及び BMN190-12-009 試験で観察された炎症反応と比べて重度ではなかった。これらの炎症性変化は、有害所見若しくは BMN 190 に関連する所見ではないと考えられた。ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色による標準的な CNS の病理組織学的検査に加えて、特殊染色［星状膠細胞のマーカーである抗グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）、及び小膠細胞のマーカーである IBA1 の免疫染色］を使用して神経系に及ぼす影響を評価した。星状膠細胞症、小膠細胞症又は CNS の形態学的変化などの BMN 190 に関連する所見は認められなかった。

以上のように、BMN 190 の反復投与では野生型及び TPP1 欠損ダックスフンド並びに正常カニクイザルで、脳室及び ICV 投与器具／カテーテルに接する組織に、留置器具／カテーテル及び持続投与の手法に関連した炎症が見られた。ダックスフンドに BMN 190 の 16 又は 48 mg を反復 ICV 投与後に、動物に異種のヒトタンパク質を投与した場合に一般的に見られる過敏症反応が観察された（Shull, 1994, Proc Natl Acad Sci USA、Brooks, 1999, Mol Genet Metab）。持続投与時間の延長、ジフェンヒドラミンの前投与及び動物が BMN 190 に耐性を持つよう投与量を減量し、その後徐々に増加することによって、イヌの過敏症反応を臨床的に管理することができた。最長 18 箇月間の投与によってイヌで抗 BMN 190 抗体が産生されたが、CNS 又は全身組織の病理組織学的変化など、BMN 190 の免疫複合体に関連した病理学的変化は観察されなかった。

本試験では、集積したライソゾーム蓄積物質の急速な除去による毒性、又は BMN 190 に関連する全身的な器官毒性は観察されなかった。BMN 190 は、ライソゾームの酸性環境で取り込まれて活性化することが必要な TPP1 の前酵素であることから、全身曝露による非特異的な毒性は考え難い。BMN 190 をイヌに 9 箇月間又はそれ以上、隔週で ICV 持続投与したときの NOAEL は 48 mg であり、ヒト等価用量（HED）は 960 mg に相当する。

2.4.5 総括及び結論

CLN2 は、TPP1 活性の欠損が原因となって引き起こされ、利用できる病態修飾療法のない急速に進行する致死的疾患である。BMN 190 の薬理学、薬物動態及び毒性学的特徴は、正常及び疾患モデル動物で広範に評価された。非臨床試験で評価した BMN 190 の有効性及び安全性プロファイルより、960 mg までの投与量の BMN 190 を隔週で小児 CLN2 患者に長期脳室内投与する妥当性が裏付けられた。

CLN2 のげっ歯類及び非げっ歯類動物モデルでは、BMN 190 の中枢神経系への投与の薬力学的効果により、疾患進行の顕著な抑制、並びに臨床への外挿が可能な運動機能、歩様、認知機能、脳の形態及び生存期間の薬理学的エンドポイントの改善がもたらされた。

薬物動態の結果から、ヒトと同様な CSF 動態を示すイヌ又はサルに BMN 190 を単回 ICV（約 4 時間）持続投与又は IT-L 持続投与したとき、CSF 中の BMN 190 濃度はライソゾームの K_{uptake} 以上の濃度を 48～72 時間持続した。血漿中 BMN 190 濃度は CSF 中の濃度の 1/100 から 1/1000 倍であった。CSF 中の BMN 190 濃度が持続することにより、BMN 190 の脳への分布及びライソゾームへの取込みの期間も持続することが考えられる。イヌ及びサルに BMN 190 を ICV 又は IT 投与したとき、脳の各部位へ広く分布した。BMN 190 を ICV 持続投与したときの PK 及び組織分布の結果は、CLN2 患者に BMN 190 を 2 週間に一度 ICV（約 4 時間）持続投与することを支持する結果である。CNS 組織における BMN 190 の平均半減期は約 2 週間であり、2 週間に一度の投与により、投与から次の投与まで CNS において BMN 190 を高い濃度に維持できると考えられる。

本非臨床試験プログラムで BMN 190 に関連した毒性は認められなかった。非臨床試験で以下の 4 所見が明らかとなった。1) カニクイザル及びダックスフンドで、CNS カテーテル及び投与部位に隣接して投与器具に起因する炎症が認められた。2) BMN 190 の反復投与後に、野生型及び TPP1 欠損ダックスフンドの血漿及び脳脊髄液中で抗 BMN 190 抗体が検出された。3) ダックスフンドで、異種のヒトタンパク質を反復投与したことにより過敏症反応が発現した。4) BMN 190 の反復投与後に、脳脊髄液中の BMN 190 濃度及び用量依存的な CNS 組織中分布は明らかに維持されたが、血漿中の曝露量は低下した。溶媒対照群を含む全動物で CNS カテーテルに隣接して炎症が認められたが、CNS に投与器具を留置したこと、（若しくは、CNS に外因性の異種タンパク質を直接投与したこと）により予想された結果である（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。野生型及び TPP1 欠損動物で、異種のヒトタンパク質に対する過敏症反応が認められた。この変化はイヌの疾患モデルにヒト ERT 剤を投与後に一般的に見られる変化であり（Shull, 1994, Proc Natl Acad Sci USA、Brooks, 1999, Mol Genet Metab）、抗ヒトタンパク質抗体の産生との関連が考えられる。本非臨床試験プログラムでは、BMN 190 に関連した CNS 及び全身器官の毒性、又は急速なライソゾーム蓄積物質の除去などの過剰な薬理作用に起因する毒性は見られなかった。長期の非臨床試験で使用した CNS 投与器具は、臨床用の CNS 投与器具と同一原理で類似デザインの脳室カテーテル及び投与ポートを使用した。

BMN 190 を ICV 持続投与したイヌの血漿及び脳脊髄液中で、それぞれ 14 及び 29 日目に抗 BMN 190 抗体が初めて検出された。抗 BMN 190 抗体価は、おおむね 100 日目まで時間と共に上昇し、その後は試験期間中安定して維持された。抗体価の範囲は脳脊髄液中と血漿中で類似していた。4 及び 10 mg を投与した動物では、10 日目まで血漿中の BMN 190 曝露量の低下と抗体の存在に相関が見られた。しかし、BMN 190 の 16 mg を投与した動物で 10 日目まで、脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体の存在と薬物濃度の減少に相関は見られなかった。

ヒトとダックスフンドの脳重量比 20:1 に基づいて HED を算出した。健康な 2 歳児及び 5 歳児の平均脳重量は、それぞれ 1050 及び 1400 g である（Giedd, 1996, Cereb. Cortex）。CLN2 患者で

は脳萎縮が進行するためHEDの計算に平均脳重量1000 gを用い、ダックスフンドの平均脳重量50 gから、ヒトの倍率は20倍（1000 g/50 g）と算出した。脳組織におけるTPP1活性はライソゾーム蓄積物質の減少と緊密に関連するので、脳重量に基づくスケーリングによりヒトの治療用量を予測することが可能と考えられる。したがって、イヌの反復投与試験のNOAEL 48 mgから、脳重量を基にHEDは960 mgと算定される。

2.4.6 参考文献

Awano, T, Katz, ML, O'Brien, DP, Sohar, I et. al. A frame shift mutation in canine TPP1 (the ortholog of human CLN2) in a juvenile Dachshund with neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Genet Metab 89[3], 254-260. 2006.

Brooks, DA. Immune response to enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorder patients and animal models. Mol Genet Metab 68[2], 268-275. 1999.

Butt, MT. Morphologic changes associated with intrathecal catheters for direct delivery to the central nervous system in preclinical studies. Toxicol Pathol 39[1], 213-219. 2011.

Chang, M. CLN2. The Nueronal Ceroid Lipofuscinoses. New York: Oxford Univ Press, 2011: 80-109.

Coutinho, MF, Prata, MJ, Alves, S. Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. Mol Genet Metab 105[4], 542-550. 2012.

Dekaban, AS, Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. Ann Neurol 4[4], 345-356. 1978.

Dickson, PI, Chen, AH. Intrathecal enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: translating success in animal models to patients. Curr Pharm Biotechnol 12[6], 946-955. 2011.

Felice, BR, Wright, TL, Boyd, RB, Butt, MT et. al. Safety evaluation of chronic intrathecal administration of idursulfase-IT in cynomolgus monkeys. Toxicol Pathol 39[5], 879-892. 2011.

Fukumura, S, Saito, Y, Saito, T, Komaki, H et. al. Progressive conduction defects and cardiac death in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Dev Med Child Neurol 54[7], 663-666. 2012.

Giedd, JN, Snell, JW, Lange, N, Rajapakse, JC et. al. Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: ages 4-18. Cereb Cortex 6[4], 551-560. 1996.

Golabek, AA, Walus, M, Wisniewski, KE, Kida, E. Glycosaminoglycans modulate activation, activity, and stability of tripeptidyl-peptidase I in vitro and in vivo. J Biol Chem 280[9], 7550-7561. 2005.

Herculano-Houzel, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. Front Hum Neurosci 3:31, 1-11. 2009.

Katz, ML, Coates, JR, Cooper, JJ, O'Brien, DP et. al. Retinal pathology in a canine model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 49[6], 2686-2695. 2008.

Katz, ML, Coates, JR, Sibigtroth, CM, Taylor, JD et. al. Enzyme Replacement TherapyAttenuates Disease Progression in a Canine Model of Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (CLN2 Disease). J Neurosci Res. 92[11], 1591–1598. 2014.

Kousi, M, Lehesjoki, AE, Mole, SE. Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. Hum Mutat 33[1], 42-63. 2012.

Kurachi, Y, Oka, A, Mizuguchi, M, Ohkoshi, Y et. al. Rapid immunologic diagnosis of classic late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Neurology 54[8], 1676-1680. 2000.

Lin, L, Lobel, P. Production and characterization of recombinant human CLN2 protein for enzyme-replacement therapy in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Biochem J 357[Pt 1], 49-55. 2001.

Lorenz MD, Coates JR, Kent MR. Handbook of Veterinary Neurology, 5th edition, St. Louis, Elsevier, 2011, pp.2-36.

Sanders, DN, Kanazono, S, Wininger, FA, Whiting, RE et. al. A reversal learning task detects cognitive deficits in a Dachshund model of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Genes Brain Behav 10[7], 798-804. 2011.

Shull, RM, Kakkis, ED, McEntee, MF, Kania, SA et. al. Enzyme Replacement in a Canine Model of Hurler Syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 91[26], 12937-12941. 1994.

Sleat, DE, Donnelly, RJ, Lackland, H, Liu, CG et. al. Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Science 277[5333], 1802-1805. 1997.

Sleat, DE, El-Banna, M, Sohar, I, Kim, KH et. al. Residual levels of tripeptidyl-peptidase I activity dramatically ameliorate disease in late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Genet Metab 94[2], 222-233. 2008.

Sleat, DE, Wiseman, JA, El-Banna, M, Kim, KH et. al. A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration. J Neurosci 24[41], 9117-9126. 2004.

Sohar, I, Lin, L, Lobel, P. Enzyme-based diagnosis of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: comparison of tripeptidyl peptidase I and pepstatin-insensitive protease assays. Clin Chem 46[7], 1005-1008. 2000.

Vuillemenot, BR, Katz, ML, Coates, JR, Kennedy, D et. al. Intrathecal tripeptidyl-peptidase 1 reduces lysosomal storage in a canine model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Genet Metab 104[3], 325-337. 2011.

Vuillemenot, BR, Kennedy, D, Reed, RP, Boyd, RB et al. Recombinant human tripeptidyl peptidase-1 infusion to the monkey CNS: safety, pharmacokinetics, and distribution. Toxicol Appl Pharmacol 277[1], 49-57. 2014.

Vuillemenot, BR, Kennedy, D, Cooper, JD, Wong, A et. al. Nonclinical evaluation of CNS-administered TPP1 enzyme replacement in canine CLN2 neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Genet Metab. 114[2], 281-293. 2014.

Walus, M, Kida, E, Golabek, AA. Functional consequences and rescue potential of pathogenic missense mutations in tripeptidyl peptidase I. Hum Mutat 31[6], 710-721. 2010.

Whiting, RE, Narfstrom, K, Yao, G, Pearce, JW et. al. Pupillary light reflex deficits in a canine model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Exp Eye Res 116, 402-410. 2013.

Whiting, RE, Narfström, K, Yao, G, Pearce, JW et. al. Enzyme replacement therapy delays pupillary light reflex deficits in a canine model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Exp Eye Res 125, 164-172. 2014.

Wlodawer, A, Durell, SR, Li, M, Oyama, H et. al. A model of tripeptidyl-peptidase I (CLN2), a ubiquitous and highly conserved member of the sedolisin family of serine-carboxyl peptidases. BMC Struct Biol 3, 8. 2003.

Wood, SL, Beyer, BK, Cappon, GD. Species comparison of postnatal CNS development: functional measures. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 68[5], 391-407. 2003.

Worgall, S, Kekatpure, MV, Heier, L, Ballon, D et. al. Neurological deterioration in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Neurology 69[6], 521-535. 2007.

Xu, S, Wang, L, El-Banna, M, Sohar, I et. al. Large-volume intrathecal enzyme delivery increases survival of a mouse model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Ther 19[10], 1842-1848. 2011.