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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.6.1 緒言 4

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）
BBB	blood brain barrier	血液脳関門
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
ERT	enzyme replacement therapy	酵素補充療法
kDa	kilodalton	キロダルトン
NCL	neuronal ceroid lipofuscinosis	セロイドリポフスチン症
TPP1	tripeptidyl peptidase 1	トリペプチジルペプチダーゼ 1

2.6.1 緒言

セロイドリポフスチン症2型（CLN2）は、セロイドリポフスチン症（NCL）のうち、主に遅発性乳児型を臨床病型とする、バッテン病の遺伝的アイソフォームである。CLN2は、*CLN2*遺伝子変異によって誘導されるライソゾームセリンプロテアーゼであるトリペプチジルペプチダーゼ1（TPP1）の欠損で特徴付けられる常染色体潜性遺伝性疾患である。TPP1は、ライソゾームに輸送されたポリペプチドのN末端からトリペプチドを非特異的に切断する（Sohar, 2000, Clin.Chem.）。TPP1が欠損すると、通常この酵素によって代謝されるライソゾーム蓄積物質が、様々な器官に特徴的な細胞内沈着物として蓄積する。中枢神経での沈着物の蓄積は神経変性症状を引き起こし、CLN2患者は最終的に死に至る。症状の発現は通常2～4歳である（Chang, 2011, Oxford Univ Press）（Kurachi, 2000, Neurology）。

酵素補充療法（ERT）は、その原発性発現が主に末梢組織性であるライソゾーム蓄積症に対する標準治療法であるが、CLN2では、高分子化合物の脳への生体内分布を制限する血液脳関門（BBB）のため、ERT薬を直接中枢神経系に投与する必要がある。BioMarin Pharmaceutical Inc.は、CLN2の治療を目的として遺伝子組換えヒトTPP1 ERT薬であるBMN 190を開発している。

BMN 190は、CLN2患者の欠損酵素であるヒトTPP1の遺伝子組換え体で、ERT薬として開発している。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、563アミノ酸残基から成るヒト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）を介して酵素が細胞に取り込まれるのに必要な、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）。細胞取込み後、プロ酵素はライソゾームに輸送され、プロ酵素は酸性環境で開裂され、46 kDaの活性酵素及び20 kDa（195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。

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に投与した。ヒトでの長期投与を担保するため、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、薬理作用、疾患進行及び疾患に関連して潜在する安全性に対するBMN 190の投与に関連する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使用した。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。これらの試験は、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数種の安全性パラメーターを評価できるようデザインされている。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へ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、免疫原性及び毒性についても明らかにした。半直立動物の脳室内投与より小児 CLN2 患者での BMN 190 のトキシコキネティクス、組織分布及び半減期をよりよく推測するために、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、ビーグル犬及びサルを用いた単回投与 3 試験に 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 試験を加えた 8 試験の *in vivo* 試験から成る。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。

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.1.1 作用機序 10
2.6.2.1.2 非臨床試験動物種の選択 11
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 12
2.6.2.2.1 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） 12
2.6.2.2.2 CLN2 動物モデル 12
2.6.2.2.3 TPP1 ノックアウトマウスの 3 日間反復腰部髄腔内投与薬理試験（BMN190-12-010 試験） 14
2.6.2.2.4 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの 3 ヵ月間反復大槽内投与毒性・中枢神経系分布・薬理試験（0190-09-066 試験） 15
2.6.2.2.5 ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内持続投与試験（BMN190-12-027 試験） 19
2.6.2.2.6 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理・毒性・トキシコキネティクス試験（0190-10-077 試験） 26
2.6.2.2.7 ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 44 週間隔週脳室内持続投与試験（BMN190-12-009 試験） 37
2.6.2.3 副次的薬理試験 43
2.6.2.4 安全性薬理試験 44
2.6.2.4.1 ダックスフンドの心血管系に対する影響（BMN190-12-027 試験） 44
2.6.2.4.2 カニクイザルの心血管系に対する影響（0190-09-071 試験） 44
2.6.2.4.3 呼吸器系に対する影響 44
2.6.2.4.4 中枢神経系に対する影響 45
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 45
2.6.2.6 考察及び結論 45

表目次

表 2.6.2.1.1.1 BMN 190 の薬理試験一覧 8
表 2.6.2.1.2.1 BMN 190 非臨床試験動物種とヒトの CI-M6PR 及び TPP1 のアミノ酸配列の類似性 [a] 11
表 2.6.2.1.2.2 非臨床試験動物種の中枢神経系パラメーター及び姿勢の比較 [a] 11
表 2.6.2.2.2.1 TPP1 欠損ダックスフンドで評価した臨床症状の Weill-Cornell 及び Hamburg CLN2 評価尺度への変換 13
表 2.6.2.2.3.1 TPP1 ノックアウトマウスの腰部髄腔内反復投与試験デザイン 14
表 2.6.2.2.4.1 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの大槽内反復投与毒性・中枢神経系分布・薬理試験の試験デザイン 16

表 2.6.2.2.5.1 ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内持続投与試験の試験デザイン....20
表 2.6.2.2.5.2 BMN190-12-027 試験の持続投与記録....21
表 2.6.2.2.6.1 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの脳室内 9 ヵ月間反復投与薬理・毒性・トキシコキネティクス・中枢神経系分布試験の試験デザイン....26
表 2.6.2.2.7.1 TPP1 欠損ダックスフンドに対する脳室内 44 週間反復投与薬理・毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン....38
表 2.6.2.2.7.2 BMN190-12-009 試験の BMN 190 投与記録....39

図目次

図 2.6.2.2.3.1 TPP1 ノックアウトマウスの生存期間に対する BMN 190 の延長作用....15
図 2.6.2.2.4.1 中枢神経系（大脳皮質及び小脳）ライソゾーム蓄積物質に対する BMN 190 の減少作用....18
図 2.6.2.2.4.2 中枢神経系ライソゾーム蓄積物質に対する BMN 190 の減少作用....19
図 2.6.2.2.5.1 TPP1 欠損ダックスフンドに対する BMN 190 の生存期間延長作用....22
図 2.6.2.2.5.2 TPP1 欠損ダックスフンドの神経変性に関する臨床症状発現に対する BMN 190 の遅延作用....23
図 2.6.2.2.5.3 TPP1 欠損ダックスフンドの T 字型迷路の逆転学習で評価した認知機能に対する BMN 190 の維持作用....24
図 2.6.2.2.5.4 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの脳室容積に対する作用....25
図 2.6.2.2.5.5 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの全脳容積に対する作用....25
図 2.6.2.2.6.1 TPP1 欠損ダックスフンドの生存率に対する作用....31
図 2.6.2.2.6.2 TPP1 欠損ダックスフンドでの神経変性に関する臨床症状に対する BMN 190 の遅延作用....32
図 2.6.2.2.6.3 認知機能に対する BMN 190 の正常化作用....33
図 2.6.2.2.6.4 瞳孔対光反射低下に対する BMN 190 の抑制作用....34
図 2.6.2.2.6.5 BMN 190 及び溶媒投与 TPP1 欠損ダックスフンドの脳の MRI....35
図 2.6.2.2.6.6 脳室容積増加に対する BMN 190 の抑制作用....35
図 2.6.2.2.6.7 TPP1 欠損ダックスフンドの脳体積に対する BMN 190（16 mg）の安定化作用....36
図 2.6.2.2.6.8 ダックスフンドの中枢神経系組織の自家蛍光色素面積....37
図 2.6.2.2.7.1 TPP1 欠損ダックスフンドの生存期間に対する BMN 190 の延長作用....40
図 2.6.2.2.7.2 TPP1 欠損ダックスフンドの神経変性に関する臨床症状の発現に対する BMN 190 の遅延作用....41
図 2.6.2.2.7.3 TPP1 欠損ダックスフンドの T 字型迷路試験の逆転学習で評価した認知機能に対する BMN 190 の改善作用....42
図 2.6.2.2.7.4 脳室容積増加に対する BMN 190 の抑制作用....42

図 2.6.2.2.7.5 全脳容積に対する BMN 190 の安定化作用..... 43

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）
ACUC	Animal Care and Use Committee	動物実験委員会
CFR	Code of Federal Regulations	連邦規則集
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣（由来の樹立細胞株）
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
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery	フレアー法
ERT	enzyme replacement therapy	酵素補充療法
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
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
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
LED	light-emitting diode	発光ダイオード
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
N/A	not applicable	該当なし
NJ	New Jersey	ニュージャージー州（米国）
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PK	pharmacokinetics	薬物動態
POC	proof of concept	コンセプトの証明
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
SOP	standard operating procedure	標準作業手順書
TK	toxicokinetic(s)	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）

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

セロイドリポフスチン症2型（CLN2）は、*CLN2*遺伝子変異によって誘導されるトリペプチジルペプチダーゼ1（TPP1）の欠損で特徴付けられる極めて稀な遺伝子疾患である。TPP1が欠如すると、様々な器官では、通常この酵素によって代謝されるライソゾーム蓄積物質が蓄積し、中枢神経系への蓄積は神経変性症状を引き起こし、CLN2患者は最終的に死に至る。症状の発現は通常2～4歳であり（Chang, 2011, Oxford Univ Press）（Kurachi, 2000, Neurology）、平均診断年齢は4歳である。患者は通常、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、発達退行を発現し、視力及び運動機能の低下により約6歳までに失明及び車椅子の生活を強いられる。患者は疾患の後期段階で植物状態に陥り、摂食及び日々の身の回りのことを自分ですることが非常に困難になる。疾患の進行は非常に急速で、通常10～16歳の間に死に至る。

BMN 190は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生された遺伝子組換えヒトトリペプチジルペプチダーゼ1（rhTPP1）である。rhTPP1は、酵素的に不活性な563アミノ酸残基からなるプレプロ酵素複合体として産生される。BMN 190は、rhTPP1の544アミノ酸からなる平均分子量約65 kの不活性なプロ酵素で、ペプチド鎖の同位体平均分子量計算値は61,247.93である。rhTPP1のN末端に位置する19残基のプレペプチドは、産生細胞からの分泌過程で切断されている。プロ酵素はライソゾームに取り込まれた後*in vivo*で活性化され、成熟体の活性型プロテアーゼになる。

脳室内又は髄腔内投与によるBMN 190の主要薬理活性、心血管系安全性薬理、薬物動態（PK）、中枢神経系分布及び毒性について、*in vitro*試験は1試験及び*in vivo*試験は単回及び反復投与6試験で広範に検討した。非臨床試験で評価した動物種のTPP1は全て、ヒトTPP1に対して90%以上のアミノ酸配列の相同性を有する。TPP1のアミノ酸配列の相同性を基にダックスフンド及びビーグル犬、並びにカニクイザルは、BMN 190の脳脊髄液投与後の非臨床プロファイルを明らかにするために適切な非臨床試験動物種と判断された。TPP1欠損ダックスフンドは、ヒトCLN2を再現する大型動物疾患モデルとして選択された。カニクイザルは、ヒトに類似した解剖学的特性及び脳脊髄液の産生を示すことから、当該毒性を評価する正常動物種として選択された。正常（野生型）ビーグル犬は、疾患がない状態でのBMN 190投与の安全性を明らかにするために使用した。

BMN 190の効力を裏付ける試験は、1試験の*in vitro*試験及び5試験の*in vivo*試験で検討した。*In vitro*試験では、TPP1欠損ヒト線維芽細胞で細胞内取込み量が最大取込み量の1/2となるBMN 190濃度で定義される細胞のK_{uptake}を測定した。*In vivo*試験では、腰部髄腔内投与TPP1ノックアウトマウスの1試験及びTPP1欠損及び正常野生型ダックスフンドの4試験を含む反復投与5試験のCLN2動物モデルで、主要薬理活性を明らかにした。TPP1欠損及び野生型ダックスフンドの反復投与1試験では、大槽内投与（3箇月間）でBMN 190の効果を評価した。TPP1欠損及び野生型ダックスフンドの反復投与3試験では、脳室内投与、腰部髄腔内投与、及び大槽内投与を組み合わせて、19箇月間までBMN 190を投与した。脳室内持続投与後の心血管系安全

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、並びにカニクイザルの単回投与毒性及びトキシコキネティクス（TK）試験で評価した。中枢神経系に基づくパラメーターは、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。薬理試験の概要を表 2.6.2.1.1.1 に示す。

表 2.6.2.1.1.1 BMN 190 の薬理試験一覧

試験内容及び試験番号	試験系	投与経路	投与レジメン	投与量（mg/回）	GLP
効力を裏付ける試験（*in vitro*）					
rhTPP1（BMN 190）の TPP1 欠損ヒト線維芽細胞内取込み量の測定 (TR-00195)	GM09404A （TPP1 欠損） ヒト線維芽細胞	*In vitro*	N/A	0.625～20 nmol/L	非適用
効力を裏付ける試験（*in vivo*）					
3 日間反復腰部髄腔内投与薬理試験 [a] (BMN190-12-010)	TPP1 ノックアウトマウス	IT-L、ボーラス投与	1 日 1 回投与、3 日間	0.4 mg（3 日間連続で合計 1.2 mg）	非適用
3 ヵ月間反復大槽内投与毒性・中枢神経系分布・薬理試験 [b] (0190-09-066)	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	IT-C、ボーラス投与	月 1 回投与、3 箇月間	0、32	非適用
ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内持続投与試験 [bcde] (BMN190-12-027)	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	隔週、6 箇月間	最高 16 mg[f]	非適用
TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理・毒性・トキシコキネティクス試験 [cdg] (0190-10-077)	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、2 又は 4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	隔週、9 箇月間以上	0、4、16	非適用
ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 44 週間隔週脳室内持続投与試験 [cdg] (BMN190-12-009)	TPP1 欠損ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	隔週、最長 19 箇月間 [j]	最高 48 mg[h]	非適用

表 2.6.2.1.1.1 BMN 190 の薬理試験一覧（続き）

試験内容及び試験番号	試験系	投与経路	投与レジメン	投与量（mg/回）	GLP
安全性薬理試験					
ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内持続投与試験 [bcde] (BMN190-12-027)	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	隔週、6 箇月間	最高 16 mg[f]	非適用
TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理・毒性・トキシコキネティクス試験 [cdg] (0190-10-077)	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、2 又は 4 時間持続投与、IT-L, 4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	隔週、9 箇月間以上	0、4、16	非適用
ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 44 週間隔週脳室内持続投与試験 [cdg] (BMN190-12-009)	TPP1 欠損ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L, 4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	隔週、最長 19 箇月間[j]	最高 48 mg[h]	非適用
単回脳室内投与試験 (0190-09-071)	カニクイザル	ICV、4 時間持続投与（単回）	単回, 3、7 及び 14 日間回復性	0、5、14、20	適用[i]

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、(rh) TPP1：(遺伝子組換えヒト) トリペプチジルペプチダーゼ 1、N/A：該当なし、IT-L：腰部髄腔内、IT-C：大槽内、CLN2：セロイドリポフスチン症 2 型、ICV：脳室内。

[a] 試験開始時マウスは、4 又は 15 週齢であった。

[b] 試験開始時イヌは、約 4 箇月齢であった。

[c] ICV/IT カテーテルのイヌの中枢神経系での開存性は限定的であった。ICV カテーテルが開存している限り、ICV 投与経路を使用した。ICV カテーテルの開存性が失われた場合は、IT-L 投与経路を使用した。IT-L カテーテルの開存性が失われた場合は、IT-C ボーラス投与を実施した。

[d] イヌは、過敏性反応をできるだけ緩和するために、BMN 190 の投与 30 分前にジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）で前処理した。

[e] 16 mg の BMN 190 投与イヌで心電図パラメーターを測定した。

[f] 16 mg の反復投与後に投与関連反応が発現したため、投与量を 2 mg に減量し、徐々に漸増することにより BMN 190 に対し脱感作した。

[g] 試験開始時イヌは、約 2.5 箇月齢であった。

[h] 2 回目又は 3 回目の 48 mg の投与時に投与関連反応が発現したため、投与量を 2 mg に減量し、4 箇月かけて再び 48 mg に漸増することにより BMN 190 に対し脱感作した。

[i] 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。

[j] イヌ 1 例で、投与期間は 81 週間であった。

サル及びダックスフンド脳室内投与試験の投与量は、試験開始時の BMN 190 濃度、持続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、脳脊髄液容積の急激な変化による頭蓋内圧への影響を最小にし、動物の麻酔時間が最短になるように選択した。脳室内投与の可能な最大投与量は、ダックスフンドでは 48 mg、及びサルでは 20 mg であった。

TPP1 欠損ダックスフンドを用いた効力を裏付ける試験は、一般に受け入れられた科学的原則に従い、このモデルが利用可能な唯一の施設である[redacted]で実施した。[redacted]は GLP 適合確認施設ではないため、試験はGLP に準拠して実施していない。しかし、GLP に準拠した厳密な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。生殖能力が低く、動物の入手が困難であるため、投与量及び遺伝子型ごとに1 群3 動物で、9 箇月間ダックスフンド試験を実施した。疾患進行の全体の経過は、TPP1 欠損ダックスフンド及びCLN2 患者で個体間及び性別で大きく異ならないことから、この動物数は、臨床症状、神経機能及び脳組織学などの疾患に基づくパラメーターに対するBMN 190 の薬理活性を評価するのに十分であった（Awano, 2006, Mol.Genet.Metab）(Chang, 2011, Oxford Univ Press）。ダックスフンドの9 箇月間BMN 190投与試験は、この動物の中枢神経系カテーテルの設置が[redacted]動物実験委員会（ACUC）によって承認された最少齢である約2.5 箇月齢で開始した。BMN190-12-009 試験では、9 箇月間投与試験の0190-10-077 試験から高投与量をダックスフンドに投与し（48 mg 対16 mg）、投与量を増加するとBMN 190 の薬理活性が増加されることを示した。BMN190-12-027 試験では、より遅い月齢でBMN 190 の投与を開始した場合にも機能改善が得られることを示した。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 の効能を機能的及び組織学的に明らかにした。TPP1 ノックアウトマウス及びTPP1 欠損ダックスフンドモデルを用いた薬理試験では、BMN 190 を脳脊髄液経由で投与すると、中枢神経系に広範に分布し、ライソゾームに取り込まれ、活性型の酵素に変換されることを示した。TPP1 活性が復元されるとライソゾーム蓄積物質の蓄積が減少し、臨床状態の悪化を抑制し、神経機能の改善及び生存期間の延長をもたらした（Sleat, 2008, Mol Genet Metab)。

2.6.2.1.1 作用機序

BMN 190 は、CLN2 患者の治療を目的とした、TPP1 酵素（E.C. 3.4.14.9）のプロ型を利用した酵素補充療法（ERT）薬である。TPP1 は、ライソゾーム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セリンプロテアーゼである（Sleat, 1997, Science)。TPP1 活性が欠如すると、ライソゾーム蓄積物質が蓄積し、CLN2 で認められる病原性カスケードが誘導される。
BMN 190 は、脳脊髄液に投与される 66 kDa の 563 アミノ酸からなる不活性なプロ酵素である。TPP1 は、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CI-M6PR）を介して酵素がライソゾームに取り込まれるのに必要な、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)。プロ酵素は、CI-M6PR を介してライソゾームに取り込まれ、酸性環境で 20 kDa のアミノ酸 195 残基のプロペプチド断片が切断され、46 kDa の活性酵素を産出する（Sleat, 1997, Science）(Wlodawer, 2003, BMC.Struct.Biol.)。BMN 190 は、糖鎖付加プロファイルを維持し、一貫してライソゾームへ取り込まれ活性化される。

2.6.2.1.2 非臨床試験動物種の選択

BMN 190 の薬理学的プロファイルは、TPP1 ノックアウトマウス、TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド並びに正常カニクイザルを用いて、中枢神経系投与により評価した。TPP1 欠損ダックスフンドを CLN2 動物疾患モデルとして選択し、BMN 190 の薬理活性及び安全性を評価した。カニクイザルは、解剖学的特性及び脳脊髄液の産生がヒトに類似していることから、選択した。試験に用いた動物種は全て、BMN 190 を認識する CI-M6PR を発現し、ヒト TPP1 に対して 90%以上の TPP1 アミノ酸配列の同一性を有する（http://www.uniprot.org）。ヒトとマウス、イヌ及びカニクイザルとの間の CI-M6PR 及び TPP1 のアミノ酸配列の類似性を表 2.6.2.1.2.1 に要約した。

表 2.6.2.1.2.1 BMN 190 非臨床試験動物種とヒトの CI-M6PR 及び TPP1 のアミノ酸配列の類似性 [a]

動物種	マウス	イヌ	カニクイザル	ヒト
CI-M6PR	81%	86%	94%	100%
TPP1	91%	95%	98%	100%

CI-M6PR：カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
[a] Sequence comparison conducted at http://www.uniprot.org/

イヌ及びサルは、げっ歯類に比較して、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など、よりヒトに類似した中枢神経系パラメーターを有する（表 2.6.2.1.2.2）。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の解剖学的特性を有し、中枢神経系分布試験では特に適切な動物種である。TPP1 欠損ダックスフンド疾患モデルで実施された長期反復投与試験では、CLN2 患者と類似した TPP1 欠損及び神経変性背景での主要薬理活性、PK 及び安全性への影響を評価した。したがって、これらの試験結果は対象となる患者集団に特異的に適応できると考えられる。

表 2.6.2.1.2.2 非臨床試験動物種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

[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

遺伝子組換えタンパク質を発育中の幼若動物に脳室カテーテルを介して脳脊髄液へ長期反復投与することは技術的難易度が高く、非臨床データの品質を得るためには、特別な技能及び注意深いモニタリングが必要であった。イヌはヒト遺伝子組換え ERT 薬の投与に感受性があり、頻繁に過敏性反応を示すことが報告されている（Shull, 1994, Proc Natl Acad Sci USA）（Brooks, 1999, Mol Genet Metab）。過敏性反応は、BMN 190 の反復投与後の TPP1 欠損ダックスフンドに認められた。脱感作動物で、持続投与時間を延長し、BMN 190 の投与量を徐々に増加させる投与計画を開発し、これらの反応の軽減に成功した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 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）

BMN 190 の TPP1 欠損ヒト線維芽細胞への *in vitro* 試験での取込み量を測定するために、細胞中の TPP1 定量アッセイを開発した。3 種の TPP1 欠損細胞株をスクリーニングし、GM09404A（TPP1 欠損）線維芽細胞株を測定用に選択した。GM09404A 細胞株は、スクリーニングしたほかの TPP1 欠損細胞株に比較して最適な受容体取込みシグナル及び増殖作用を示したことを基に選択した。線維芽細胞は、連続希釈した BMN 190（0.625～20 nmol/L）と 37°C で 48 時間反応させ、洗浄後、溶解した。細胞に取り込まれた BMN 190 の総量は、溶解液中の TPP1 活性を測定して求めた（Sohar, 2000, Clin.Chem.）。測定パラメーターは、反応時間、マンノース-6-リン酸及び N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ（ASB）による阻害、再現性並びに室内再現精度を評価した。TPP1 取込み量測定は、細胞中の TPP1 定量アッセイとして十分な精度を示し、CI-M6PR を介した取込みに対して適切な特異性を示した。K_{uptake} は、細胞内取込み量が最大取込み量の 1/2 となる濃度と定義され、値が 10 nmol/L 以下の場合、BMN 190 が高効率で細胞内に取り込まれることを意味する。非臨床試験で用いた BMN 190 の個々のロットの K_{uptake} の平均値は、約 3.1 nmol/L（Data source：TR-00195-Table 5.3.1）であった。

2.6.2.2.2 CLN2 動物モデル

BMN 190 の効力を裏付ける試験では、CLN2 の TPP1 ノックアウトマウス及び TPP1 欠損ダックスフンドの 2 種の *in vivo* 疾患モデルを用いた。これらの動物モデルは、CLN2 の進行を再現し、同様の自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質の蓄積、進行性神経変性、神経機能の低下及び生存期間の大幅な短縮を示す。

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た。このモデル動物は、神経変性症状及び生存期間の短縮を伴う、中枢神経系にライソゾーム蓄積物質の進行性の蓄積を示した（Sleat, 2004, J.Neurosci.）。TPP1 ノックアウトマウスは、TPP1 ERT 薬の中枢神経系に対する生体内での Proof of Concept（POC）を確立するために用いた。

TPP1 欠損ダックスフンドは、CLN2 患者に類似した TPP1 欠損を示す自発的に生じた CLN2 疾患モデルである。このモデル動物は、TPP1 遺伝子のエクソン 4 に、1 塩基対が欠失（c.325delC）

したホモ接合体を有し、フレームシフトにより不活性な TPP1 酵素を産生する（Awano, 2006, Mol.Genet.Metab.）。ヒト CLN2 の正確な突然変異については報告されていないが、疾患を引き起こすことが知られる約 70 のヒト CLN2 突然変異により、類似した TPP1 活性の大幅な減少を示すと説明されている（Kousi, 2012, Hum.Mutat.; http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml）。これらのイヌでの疾患進行の自然経過では、6～7 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が認められるようになる。これらのイヌの摂餌、歩様及び運動機能を示す臨床症状は、CLN2 評価尺度に直接変換することが可能である（Worgall, 2007, Neurology）（表 2.6.2.2.2.1）。TPP1 欠損ダックスフンドは、認知の喪失、重度の精神作用異常、視覚追跡欠損、薬剤難治性ミオクロニー単収縮及び補助なしでの摂餌能力の低下のため、11 箇月齢までに安楽死が必要になる。

表 2.6.2.2.2.1 TPP1 欠損ダックスフンドで評価した臨床症状の Weill-Cornell 及び Hamburg CLN2 評価尺度への変換

Weill-Cornell Scale Parameter	Hamburg Scale Parameter	ダックスフンド関連評価パラメーター
摂食	--	餌に対する企図振戦
歩様	運動（歩行）	運動失調、固有位置感覚欠損、旋回
言語	言語	N/A
--	発作	ミオクローヌス、振戦、脳波、神経学的検査
--	視覚	眼科検査, 網膜電図、瞳孔対光反射

--：該当なし、N/A：該当なし。

ヒトの疾患で観察されるのと同様の自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質が、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顕微鏡で観察された。病理組織学的解析では、CLN2 患者の組織学的パターンと同様に、大脳皮質に貯蔵体の分布は認められないが、小脳では全ての層に貯蔵体の分布が認められ、主にプルキンエ細胞に限定された（Awano, 2006, Mol.Genet.Metab）。核磁気共鳴画像法（MRI）で進行性の脳委縮症及び小脳委縮症が検出されるが、これは、これらの動物で疾患進行の結果として発生する。7 箇月齢で、網膜電図で視覚異常が検出される（Katz, 2008, Invest Ophthalmol.Vis.Sci.）。瞳孔対光反射すなわち光に対する瞳孔応答も、疾患進行に伴い減少する（Whiting, 2013, Exp.Eye Res.）。この動物モデルでは、6 箇月齢までに、T 字型迷路装置を用いた逆転学習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の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。試験では、CLN2 患者に類似した神経学的変化を被った動物での薬理活性及び安全性が評価されたことから、結果は対象とする患者集団に適用することができると考えられる。

2.6.2.2.3 TPP1 ノックアウトマウスの 3 日間反復腰部髄腔内投与薬理試験（BMN190-12-010 試験）

TPP1 ノックアウトマウスに、BMN 190 を腰部髄腔内（IT-L）にボーラス投与し、ライソゾーム蓄積物質の蓄積及び生存期間に対する影響をそれぞれ別の試験（非 GLP2 試験）で検討した。試験は、TPP1 及び CLN2 の生化学に関する専門家である Peter Lobel 博士のニュージャージー医科歯科大学の研究室で実施された。2 試験は、米国 FDA CFR 21 Part 58 で規定される GLP に準拠して実施していないが、一般に受け入れられた科学的原則に従って実施した。

2.6.2.2.3.1 BMN 190 の髄腔内投与の脳内取込み及びミトコンドリア ATP 合成酵素サブユニット C の脳内貯蔵に対する効果

TPP1 ノックアウトマウス（n = 6）15 週齢に、0.8 mg の BMN 190 を 3 日間連続して IT-L にボーラス投与した。最終投与 24 時間後にマウスを安楽死させ、溶媒（人工脳脊髄液［148 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl、1.4 mmol/L $CaCl_2$、0.9 mmol/L $MgCl_2$、0.8 mmol/L Na_2HPO_4、0.196 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.2］）投与 TPP1 ノックアウトマウス（n = 4）を対照動物として処理し、脳ホモジネートの TPP1 酵素活性を測定した。さらに、CLN2 で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 合成酵素のサブユニット C（SCMAS）に対するウエスタンブロッティング分析を実施した。

BMN 190 は、15 週齢の TPP1 ノックアウトマウスに ITL 投与すると脳に分布し、脳ホモジネートの TPP1 酵素活性は野生型マウス内因性 TPP1 酵素活性の最大 500%まで増加した。ウエスタンブロッティング分析から、溶媒投与 TPP1 ノックアウトマウスに比較して脳内 SCMAS 免疫抗原の減少が認められた。

2.6.2.2.3.2 BMN 190 の髄腔内投与の生存期間に対する効果

TPP1 ノックアウトマウス（n = 32）4 週齢に、0.4 mg の BMN 190 又は溶媒を 3 日間 IT-L 投与し、BMN 190 の生存期間に対する効果を検討した。投与を行わない対照動物（n = 14）には注入を実施しなかった。ノックアウトマウスに追加の投与は行わず、生存期間を測定した。試験デザインの概要を表 2.6.2.2.3.1 に示す。

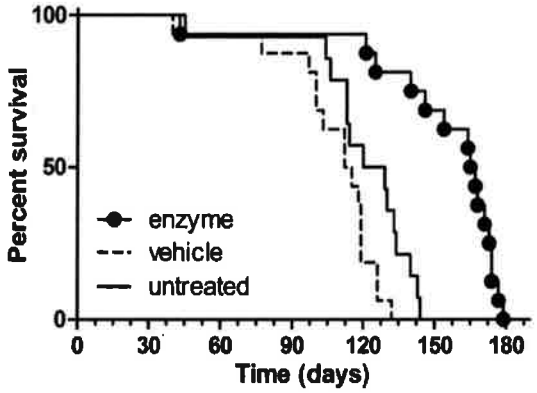
表 2.6.2.2.3.1 TPP1 ノックアウトマウスの腰部髄腔内反復投与試験デザイン

群	遺伝子型	動物数	処理	投与量（mg）	投与レジメン
1	TPP1 ノックアウト	16	BMN 190	0.4	1 日 1 回、3 日間
2	TPP1 ノックアウト	16	溶媒 [a]	0	1 日 1 回、3 日間
3	TPP1 ノックアウト	14	投与なし	0	1 日 1 回、3 日間

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
[a] 人工脳脊髄液（148 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl、1.4 mmol/L $CaCl_2$、0.9 mmol/L $MgCl_2$、0.8 mmol/L Na_2HPO_4、0.196 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.2）

溶媒投与対照動物の 113.5 日間、及び投与を行っていない対照動物の 124.5 日間に比較して、BMN 190 投与動物の生存期間の中央値は 164 日間に延長した（図 2.6.2.2.3.1）（Xu, 2011, Mol.Ther.）。4 週齢で BMN 190 を投与すると、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をそれぞれ、平均で 32%及び 44%延長し、TPP1 ノックアウトマウスで疾患進行の経過を遅らせる BMN 190 の顕著な薬理活性を示した。

図 2.6.2.2.3.1 TPP1 ノックアウトマウスの生存期間に対する BMN 190 の延長作用



Data source: Report BMN190-12-010-Figure 5 (b)
TPP1 ノックアウトマウス 4 週齢に BMN 190 を 3 日間 IT-L 投与後の生存期間中央値は、溶媒投与対照動物の 113.5 日間、及び投与を行っていない対照動物の 124.5 日間に比較して、164 日間に延長した。
BMN 190 及び溶媒投与動物群は n = 16、投与を行っていない動物群は n = 14。
P < 0.0001、P = 0.0144：enzyme（BMN 190 投与）群のそれぞれ、溶媒（人工脳脊髄液）対照群、投与を行っていない群に対するマンテル・コックス検定のペアワイズ比較（Xu, 2011, Mol.Ther）。

2.6.2.2.4 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの 3 ヵ月間反復大槽内投与毒性・中枢神経系分布・薬理試験（0190-09-066 試験）

CLN2 モデルの TPP1 欠損ダックスフンド 4 箇月齢に、月 1 回 BMN 190 を大槽内（IT-C）にボーラス投与し、3 箇月間反復投与の薬理活性を評価した。さらに試験では、CLN2 患者と類似した神経変性背景でのBMN 190 の中枢神経系分布及び毒性について明らかにし、2.6.4 及び 2.6.6 項にそれぞれ記載した。試験は、[redacted]USA [redacted]で、 施設標準作業手順書 （SOP） 及び一般に受け入れられた科学的原則に従って実施し、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始され、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。

[redacted]で繁殖され飼育されたナイーブダックスフンド同腹仔4 匹（雄性 TPP1 欠損ダックスフンド2 匹及び正常のTPP1 活性を発現する雌性ホモ接合性野生型ダックスフンド2 匹）を用い、4 箇月齢で試験を開始した。体重は2.6～4.5 kg の範囲であった。ダックスフンドを4 群に割り当て（n = 1/群、表 2.6.2.2.4.1 に記載した溶媒又はBMN 190 を投与した。

ナイーブダックスフンド 4 箇月齢に、月 1 回、32 mg の BMN 190 又は溶媒（2.3 mL）を IT-C にボーラス投与した。各投与前にダックスフンドを一晩絶食し、ブプレノルフィン（0.1 mg/kg、筋肉内）及びデクスメデトミジン（5～10 μg/kg、筋肉内）を前投与した。アトロピン

（0.06 mg/kg、皮下）を、唾液分泌を減少し心拍数を増加する目的で投与し、プロポフォール（6 mg/kg、効果発現まで静脈内にボーラス）は麻酔導入のため投与した。ダックスフンドに、気管内チューブを挿管し、無菌的に IT-C 投与部位を準備した。脳脊髄液（1～3 mL）は、投与 1、2、3 及び 4 回目の投与前並びに 4 回目投与の 48 時間後の剖検直前に自然流下方式で採取した。

表 2.6.2.2.4.1 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの大槽内反復投与毒性・中枢神経系分布・薬理試験の試験デザイン

群	遺伝子型	動物数	性別	処理	投与量 (mg)	投与レジメン
1	野生型	1	雌	溶媒[a]	0	月 1 回、3 箇月間
	TPP1 欠損	1	雄	溶媒[a]	0	月 1 回、3 箇月間
2	野生型	1	雌	BMN 190[b]	32	月 1 回、3 箇月間
	TPP1 欠損	1	雄	BMN 190[b]	32	月 1 回、3 箇月間

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
[a] 人工脳脊髄液（216.5 mmol/L NaCl、0.8 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.4 mmol/L $CaCl_2$、0.8 mmol/L Na_2HPO_4、0.2 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3）
[b] BMN 190 lot [redacted]（[redacted] mg/mL）：[redacted] から提供された。

ダックスフンドは、毎週体重測定を含む一般状態を観察した。意識状態・姿勢・歩様の観察、脳神経評価、姿勢反応検査［固有位置感覚（フットパットを正常な位置に戻す）、跳び直り反応、手押し車反応、触覚性踏み直り反応及び姿勢性伸筋突伸反応］、脊髄反射［伸長及び屈曲反射］、並びに痛覚（表在及び深部）の神経学的検査を 1 週間に 2 回、疾患の進行を評価するために行った。脊髄反射は、正常、低下及び消失を評価した。痛覚は、正常、低下及び消失を評価した。動物は、異常行動及び発作活動についても評価した。

視覚機能は月 1 回、眼科検査、ポータブル網膜電図ユニット（[redacted]）を用いた網膜電図、及び視覚誘発電位を測定した（Katz, 2008, Invest Ophthalmol.Vis.Sci.）。

瞳孔対光反射は、明暗状態で評価し、後者（暗状態）は Finnoff トランスイルミネーターで評価した。その後、瞳孔を拡張し、間接検眼に続いて細隙灯生体顕微鏡検査を実施した。眼障害が明らかな場合、必要な眼科処置から一週間以上経過後の眼底状態をデジタル眼底カメラで記録した。脳波は、テレメトリー自動計測システム（[redacted]）を用いて測定し、双極導出法による7 リード頭皮接続脳波検査及び双極導出法による三頭筋の筋電図検査を設定し、測定した脳波は視覚的にてんかん様活動について解析した。

認知機能は月 1 回、T 字型迷路装置を用いて逆転学習課題で評価した（Sanders, 2011, Genes Brain Behav.）。MRI は、疾患進行により脳に生じる形態学的変化を評価するため、投与 4 回目の投与後の安楽死前に、1.5 テスラ磁場強度で実施した。パルスシーケンスは、三平面全てで T1、T2、プロトン密度及び FLAIR 強調画像が得られるよう選択した。

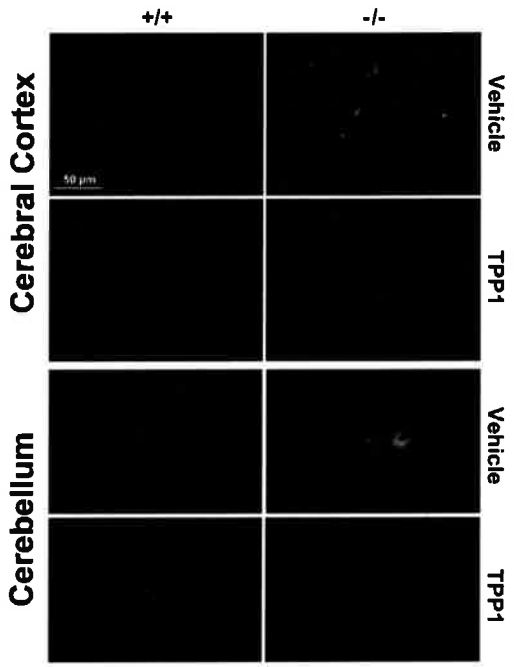
BMN 190 又は溶媒の 4 回目投与の 48 時間後に、ダックスフンドを安楽死させた。TPP1 活性分析のため、中枢神経系組織［小脳、海馬、視床下部、延髄、中脳、後頭皮質、前頭葉、橋（脳）、線条体、側頭及び頭頂葉皮質、視床、背側視床及び上頸部、頸部、並びに胸髄及び腰髄］を、剖検時に採取した。組織が大きな構造の場合、酵素活性分布勾配を評価するために表面組織（深さ 3 mm 未満）及び深部組織（深さ 3 mm 以上）を採取した。組織は均一化し、TPP1 活性を測定した（Sohar, 2000, Clin.Chem.）。定量的蛍光顕微鏡法で、上部頸髄、延髄、視床下部、後頭皮質、網膜、線条体、視床、小脳、心臓及び肝臓組織の自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質を測定した（Katz, 2008, Invest Ophthalmol.Vis.Sci.）。

BMN 190 は、IT-C 投与により、CLN2 発症機序の鍵となる中枢神経系の自家蛍光を発するライソゾーム貯蔵を減少した。BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、網膜以外の全ての中枢神経系測定部位で、溶媒投与 TPP1 欠損対照動物に比較して、自家蛍光を発するライソゾーム貯蔵の減少を示したが、野生型対照動物を超える貯蔵物質の増加は残存した。（図 2.6.2.2.4.1 及び図 2.6.2.2.4.2）。BMN 190 投与による心臓又は肝臓の自家蛍光に差異は認められなかった。

BMN 190 投与 TPP1 欠損動物に、視覚機能の低下に対する変化は認められなかった。光誘発応答を光受容体から脳に伝達する網膜神経細胞の機能を示す網膜電図 b 波の増幅は、BMN 190 及び溶媒投与両 TPP1 欠損動物で、6 箇月齢まで顕著に減少した。視覚誘発電位及び瞳孔対光反射も両 TPP1 欠損動物で試験期間中改善は認められなかったが、これは網膜電図と同様、レチナール応答の減少による可能性が考えられた。脳波に、発作活動を示唆する変化は認められなかった。認知機能は、T 字型迷路装置を用いて逆転学習で評価し、6 箇月齢まで、両 TPP1 欠損動物で野生型対照動物に比較して低下した。7 箇月齢で実施した MRI 評価では、両 TPP1 欠損ダックスフンドは、野生型ダックスフンドに比較して脳室拡張だけでなく、脳及び小脳委縮を被ったことを示した。試験で認知機能及び MRI 評価に改善が認められなかったのは、投与間隔が長すぎた、又は試験期間が短すぎたため、治療による改善を検知できなかった可能性がある。なお、このモデルでの最も顕著で急速な機能低下は 8～10 箇月齢で生じるため、BMN 190 の投与が疾患進行の後期に続いた場合に改善が認められる可能性はある。

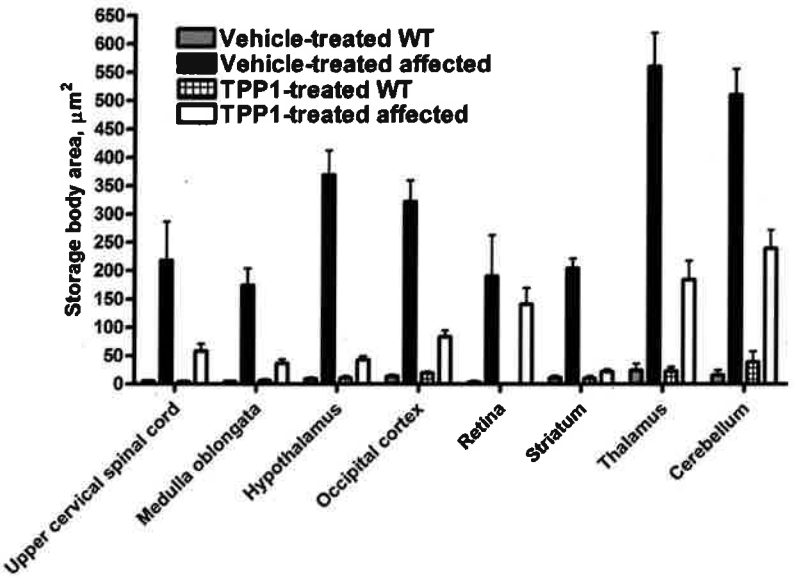
TPP1 酵素活性は、BMN 190 IT-C 投与動物の脳の多数の部位の組織ホモジネートに検出された（2.6.4.4.1 項）。TPP1 活性型の検出は、BMN 190 がライソゾームに輸送されプロセシングを受けたことを示す。

図 2.6.2.2.4.1 中枢神経系（大脳皮質及び小脳）ライソゾーム蓄積物質に対する BMN 190 の減少作用



Data source: Vuillemenot, 2011 Mol Genet Metab and, Report 0190-09-066
+/+：野生型、-/-：TPP1 欠損、 Vehicle：人工脳脊髄液溶媒投与、TPP1：BMN 190 投与。
ダックスフンド 4 例全ての大脳皮質（上部）及び小脳（下部）の蛍光顕微鏡画像を示す。溶媒及び BMN 190 投与野生型イヌは、少量の黄色の自家蛍光を示した。溶媒投与 TPP1 欠損イヌは、大脳皮質及び小脳のプルキンエ細胞に CLN2 の特徴である顕著な自家蛍光を示した。一方、BMN 190 投与 TPP1 欠損イヌでは、脳の同部位の自家蛍光を著しく減少した。

図 2.6.2.2.4.2 中枢神経系ライソゾーム蓄積物質に対する BMN 190 の減少作用



Data source: Report 0190-09-066-Figure 13 (A)
WT：野生型、affected：TPP1 欠損、TPP1-treated：BMN 190 投与。
各イヌの 8 箇所の中枢神経組織の自家蛍光を発する貯蔵面積を測定した。BMN 190 は、網膜以外の全ての測定組織で、自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質を溶媒対照に比較して減少した。BMN 190 投与 TPP1 欠損イヌの自家蛍光を発する平均貯蔵面積を溶媒投与 TPP1 欠損イヌに比較して約 2～9 分の 1 に減少した。しかし、それはまだ 2 例の野生型対照動物の平均より約 2～13 倍高い。データは平均値±標準誤差で示した。

TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を大槽内反復ボーラス投与すると、CLN2 進行の鍵となる自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質の蓄積が減少した。この結果は、BMN 190 はライソゾームに取り込まれ、活性型酵素に変換されたことを示し、大型動物モデルで脳脊髄液に投与される ERT の CLN2 治療に対する POC が確立された（Vuillemenot, 2011, Mol.Genet.Metab）。

2.6.2.2.5 ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内持続投与試験（BMN190-12-027 試験）

試験（非 GLP 試験）では、TPP1 欠損ダックスフンド 4 箇月齢に、投与量 16 mg の BMN 190 を脳室内（ICV）持続投与、腰部髄腔内（IT-L）持続投与、又は大槽内（IT-C）ボーラス投与し、主要薬理活性を明らかにした。さらに試験では、BMN 190 の毒性並びに脳脊髄液及び血漿 TK を評価した。試験は、0190-10-077 試験（後述）を継続し、より遅い投与開始齢（4 箇月齢、0190-10-077 試験では 2.5 箇月齢）の作用を分析した。4 箇月齢の試験開始齢は、CLN2 患者で BMN 190 治療を開始することが想定される 3～5 歳の等価齢に相当することから選択された。試験は、[redacted]USA[redacted]で実施し、米国 FDA CFR 21 Part 58 で規定されるGLP に準拠して実施していないが、一般に受け入れられた科学的原則に従い、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始され、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。

ナイーブTPP1 欠損ダックスフンド3 匹（雄 2 匹、雌 1 匹）及びナイーブ野生型ダックスフンド3 匹（雄 2 匹、雌 1 匹）（[redacted]）を試験に使用した。ダックスフンドは試験開始時約4 箇月齢で、体重4.8～5.6 kg（雄4 匹、3.9～4.7 kg（雌 2 匹）であった。動物は、表 2.6.2.2.5.1 に記載した 2 群に割り当て、BMN 190 を投与した。

表 2.6.2.2.5.1 ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 39 週間脳室内持続投与試験の試験デザイン

群	遺伝子型	動物数	処理 [ab]	投与量（mg）[c]	注入時間（時間）	投与レジメン [d]
1	TPP1 欠損	3	BMN 190	最高 16 mg	4	隔週、最長 6 箇月間
2	野生型	3	BMN 190	最高 16 mg	4	隔週、最長 6 箇月間

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
[a] 溶媒、人工脳脊髄液（1 mmol/L リン酸ナトリウム、148 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl、0.8 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$、1.4 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、pH 6.5）。
[b] BMN 190 lots [redacted]
[c] 2 回目及び 3 回目の投与後にインフュージョンリアクションが発現したため、投与量を減量し、表 2.6.2.2.5.2 に示すように徐々に増量した。
[d] 投与期間は、動物 J が 6 箇月間、動物 Aj、An 及び T が 5 箇月間、動物 C が 4 箇月間、動物 M が 4 箇月間であった。

動物に、2.6.2.2.6 項で説明されているように、定位技術を使用してカテーテル及び投与ポートを設置した。カテーテルはそれぞれ、BMN 190 の持続投与及び脳脊髄液の連続採取を可能にするため、1 本は側脳室まで挿入し、1 本は腰椎に設置した。BMN 190 は、隔週、0.3 mL/h で 4 時間持続投与した。持続投与後迅速に PBS を追加してフラッシング（0.6 mL/h、45 分間）を行い、カテーテルラインを洗浄した。動物に、プロポフォール（4 mg/kg、静脈内）及びデクスメデトミジン（5 µg/kg、筋肉内）を投与し、鎮静処置を行った。

動物に、BMN 190 を隔週、5～13 回、投与した。BMN 190 の投与は、CLN2 の進行又は中枢神経系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続けられた。ICV カテーテルが頭蓋骨の成長により側脳室からはずれた場合、又は開存性を失った場合は、IT-L 持続投与で可能な限り投与を継続した。ICV 及び IT-L カテーテルの両方が使用できなくなった場合は、残りの BMN 190 投与は、IT-C ボーラス投与で対応した。異種ヒトタンパク質の反復投与による過敏性反応をできるだけ緩和するために、BMN 190 の投与 30 分前にジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）を投与した。過敏性反応を示唆する臨床症状（顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈又は低血圧）が投与期間中又は投与後に認められた場合は、ジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）を追加投与した。

動物は、BMN 190 を 16 mg の投与量で 2 回 ICV 持続投与を受けると、投与 2 回目の投与開始時に数例に過敏性反応を生じた。振戦、発熱、頻脈、頻呼吸及び血圧上昇反応に関連する臨床症状が認められた。これらの反応は、最終的に全ての動物に発現し、完全な計画期間の投与は実施できなかった。これらの反応を示したイヌでは次の投与では投与量を減少させ、BMN 190 に対する耐性を誘導することを試みた。しかし、溶媒である人工脳脊髄液の持続投与においても

過敏性反応は継続して認められたため、完全な計画期間の試験の継続はできなかった。動物ごとの投与量及び投与経路を、表 2.6.2.2.5.2 に示した。

表 2.6.2.2.5.2 BMN190-12-027 試験の持続投与記録

投与番号	動物 J（野生型）	動物 T（TPP1 欠損）	動物 An（TPP1 欠損）	動物 Aj（TPP1 欠損）	動物 M（野生型）	動物 C（野生型）
1,2	16 mg、ICV	16 mg、ICV	16 mg、ICV	16 mg、ICV	16 mg、ICV	16 mg、ICV
3	16 mg、ICV	--	16 mg、ICV	16 mg、ICV	0 mg、ICV	0 mg、ICV
4	16 mg、ICV	16 mg、IT-C	16 mg、IT-L	4 mg、ICV	16 mg、ICV	16 mg、IT-L
5	16 mg、IT-L	8 mg、IT-C	16 mg、IT-L	8 mg、ICV	2 mg、IT-L	2 mg、IT-L
6	16 mg、IT-L	8 mg、IT-C	16 mg、IT-L	16 mg、ICV	--	2 mg、IT-C[a]
7	16 mg、IT-L	8 mg、IT-C	16 mg、IT-L	16 mg、ICV	--	--
8	16 mg、IT-L	--	16 mg、IT-L	16 mg、ICV	--	--
9	4 mg、IT-L	8 mg、IT-C	16 mg、IT-L	16 mg、ICV	--	--
10	0 mg、IT-L	8 mg、IT-C	0 mg、IT-L	16 mg、IT-L	--	--
11	2 mg、IT-L	2 mg、IT-C	2 mg、IT-L	0 mg、IT-L	--	--
12	2 mg、IT-L	--	--	2 mg、IT-L	--	--
13	2 mg、IT-L	--	--	--	--	--

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、IT-C：大槽内投与、ICV：脳室内投与、IT-L：腰部髄腔内投与、--：投与せず、0 mg： 人工脳脊髄液（溶媒）投与。
[a] 動物 C は 5 回目と 6 回目の投与間隔を約 10 週間空けた。

動物に、2.6.2.2.6 項に説明されているように、体重測定を含む一般状態の観察及び神経学的検査を毎週実施した。CLN2 の進行、BMN 190 の効果及び中枢神経系カテーテルの影響を示す神経学的症状を評価した。また、2.6.2.2.6 項に説明されているように、間接検眼に続いて細隙灯生体顕微鏡検査を含む眼科検査を、月 1 回実施し、眼障害の徴候が認められた場合は、各眼科検査から 1 週間以上経過後の眼底状態をデジタルカメラで記録した。

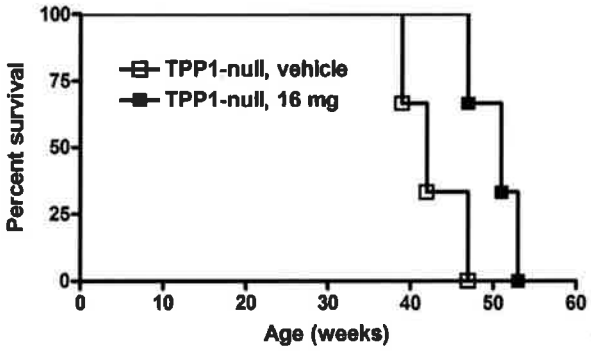
認知機能は、月 1 回 T 字型迷路装置を用いて逆転学習課題で評価した（CanCog Technologies, Toronto, Ontario Canada）（Sanders et al., 2011, Genes Brain Behav.）。MRI は、1.5 テスラ磁場強度で、約 2、6.5 及び 11 箇月齢の全ての動物に対して実施し、さらに、12 箇月齢の TPP1 欠損動物 2 匹及び野生型動物 1 匹にも実施した。パルスシーケンスは、三平面全てで T1、T2、プロトン密度及び FLAIR 強調画像が得られるよう選択した。疾患進行による形態学的変化の程度を評価するため、2.6.2.2.6 項に説明されているように MRI で、脳室容積及び全脳容積を定量的に評価した。

CLN2 の進行又は脳室カテーテルに対する中枢神経系反応（髄膜炎、閉塞性水頭症）が認められ安楽死が必要とされたとき、動物を安楽死させた。生存期間は、誕生から安楽死までの期間と定義した。

4 箇月齢で 16 mg の BMN 190 の投与を開始した TPP1 欠損動物の生存期間は、0190-10-077 試験の溶媒投与 TPP1 欠損対照動物に比較して延長した（図 2.6.2.2.5.1）。溶媒投与 TPP1 欠損動物の平均生存期間が 42.7 週間（齢）であったのと比較して、BMN 190 投与 TPP1 欠損動物の平均生存期間は 50.3 週間であった。一方、2.5 箇月齢で 16 mg の BMN 190 の投与を開始した TPP1 欠

損動物（0190-10-077 試験）は、平均生存期間 62 週間を示し、ERT の開始年齢が若いほど、より効果がもたらされることが示された。

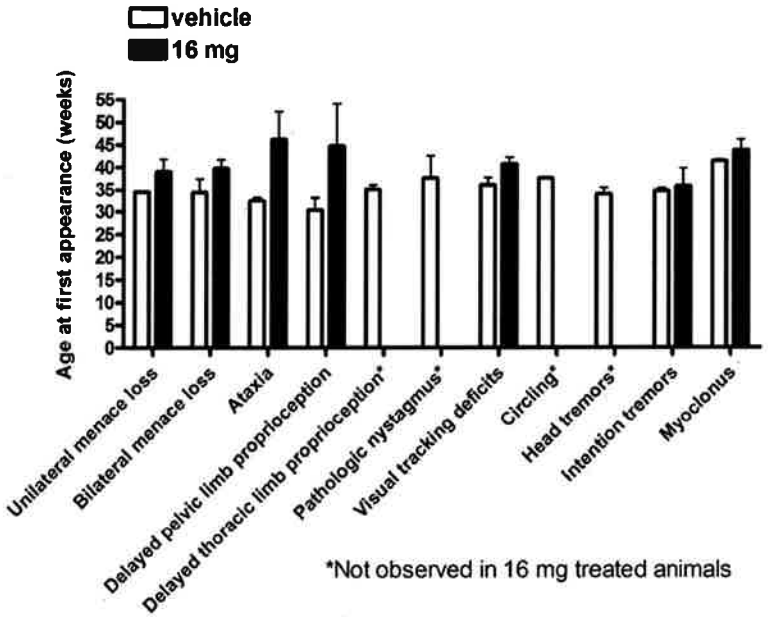
図 2.6.2.2.5.1 TPP1 欠損ダックスフンドに対する BMN 190 の生存期間延長作用



Data source: Report BMN190-12-027-Figure 7.9.1
TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
TPP1 欠損ダックスフンドの疾患の終末期への進行期間を検討した。4 箇月齢で 16 mg の BMN 190 投与を開始し、0190-10-077 試験の溶媒投与 TPP1 欠損対照動物との比較を示す（n = 3/群）。

臨床検査では、4 箇月齢で BMN 190 の投与を開始すると、溶媒投与 TPP1 欠損対照動物に比較して疾患の進行が抑制されることが示された。CLN2 の進行を示す臨床症状の最初の発現は、約 5～15 週間まで遅延し、BMN 190 投与動物で発現しない症状もあった（図 2.6.2.2.5.2）。一方、2.5 箇月齢で BMN 190 の投与を開始した 0190-10-077 試験では、疾患症状の最初の発現は、溶媒投与対照動物に比較して、4 mg の投与動物では約 3.5～11 週間遅延し、16 mg の投与動物では約 10～30 週間遅延した。4 箇月齢が CLN2 患者の約 3～5 歳に換算されることから、4 箇月齢で BMN 190 の投与を開始したときに観察される疾患症状の発現の遅延は、BMN 190 の開発を支える原動力となる。

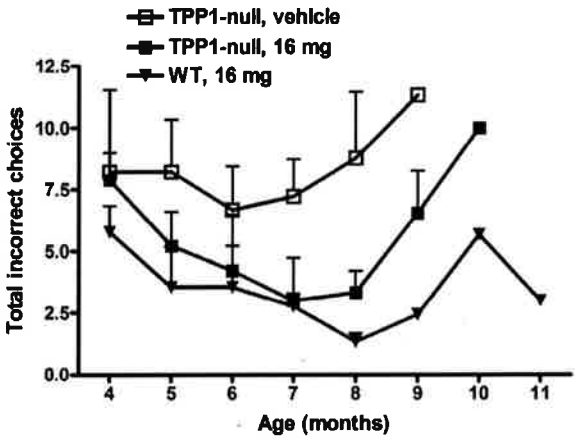
図 2.6.2.2.5.2 TPP1 欠損ダックスフンドの神経変性に関する臨床症状発現に対する BMN 190 の遅延作用



Data source: Report BMN190-12-027-Figure 7.4.1
CLN2 の進行を示す臨床症状が最初に発現した週齢を示す。16 mg の BMN190 の投与を TPP1 欠損動物 4 箇月齢で開始し、0190-10-077 試験の溶媒投与対照動物との比較を示す（n = 3/群）。エラーバーは標準偏差を示す。この測定では、臨床症状の重症度又は発現期間の差については評価していない。11 の臨床症状の全てが、投与各群の全ての動物には発現していない。

T 字型迷路装置を用いた逆転学習での認知機能の評価から、BMN 190 の投与を継続する間、約 8 箇月齢まで、野生型対照動物に類似した成績が示された（図 2.6.2.2.5.3）。一方、0190-10-077 試験の溶媒投与 TPP1 欠損対照動物では、6 箇月齢以降明らかに成績は低下した。約 8 箇月齢で投与が中止された後は、TPP1 欠損動物の成績は、野生型対照動物に比較して低下した。

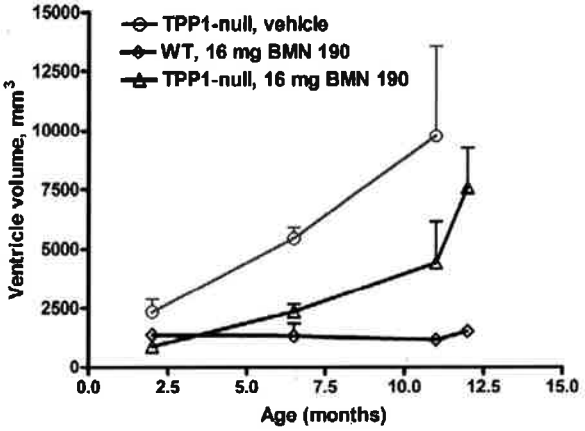
図 2.6.2.2.5.3 TPP1 欠損ダックスフンドのT字型迷路の逆転学習で評価した認知機能に対するBMN 190の維持作用



Data source: Report BMN190-12-027-Figure 7.7.1
TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ1、WT：野生型。
T字型迷路装置で基準（2回連続したセッションで8/10の正解選択、又は1回のセッションで9/10以上の正解選択）に達するまでの不正解の平均選択数を測定した。0190-10-077試験の溶媒投与TPP1欠損動物の測定結果との比較を示す。溶媒投与TPP1欠損動物9箇月齢、16 mg投与TPP1欠損動物10箇月齢、16 mg投与野生型動物10及び11箇月齢はn＝1、それ以外の全てのデータはn＝3で、エラーバーは標準偏差を示す。

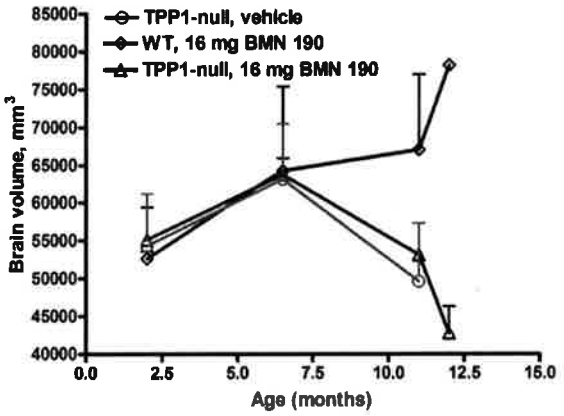
MRIの定量解析から、4箇月齢で16 mgのBMN 190の投与を開始した場合、脳の形態学的低下に影響しないことが示された。これは脳室容積（図 2.6.2.2.5.4）及び全脳容積（図 2.6.2.2.5.5）の両方で確認された。4箇月齢で16 mgのBMN 190の投与を開始したTPP1欠損動物のCLN2に関連した脳室容積の増加は、0190-10-077試験で溶媒投与TPP1欠損対照動物で見られた増加に類似した。一方、4箇月齢で16 mgのBMN 190の投与を開始した正常野生型動物の脳室容積は、試験期間中増加しなかった。同様に、4箇月齢で16 mgのBMN 190の投与を開始したTPP1欠損動物に6～12箇月齢で認められた全脳容積の減少は、0190-10-077試験の溶媒投与対照動物で見られた減少に類似した。一方、4箇月齢で16 mgのBMN 190の投与を開始した野生型対照動物の全脳容積は、6～12箇月齢で増加した（図 2.6.2.2.5.5）。4箇月齢での投与開始は、CLN2進行により脳の形態学的変化を阻害するには遅すぎる可能性が示されたが、試験の進行に伴い投与に関連した反応が生じ（表 2.6.2.2.5.2参照）、投与計画を変更し、投与量を下げて投与したため、確定的な結論を得ることはできない。

図 2.6.2.2.5.4 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの脳室容積に対する作用



Data source: Report BMN190-12-027-Figure 7.6.1
TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT：野生型。
MRI の定量解析で脳室容積を測定した。0190-10-077 試験の溶媒投与 TPP1 欠損動物の測定結果との比較を示す。16 mg 投与野生型動物 2 箇月齢及び 16 mg 投与 TPP1 欠損動物 12 箇月齢は n = 2、16 mg 投与野生型動物 12 箇月齢は n = 1、それ以外の全てのデータは n = 3 で、平均値と標準偏差を示すエラーバーを示す。

図 2.6.2.2.5.5 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの全脳容積に対する作用



Data source: Report BMN190-12-027-Figure 7.6.2
TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT：野生型。
MRI の定量解析で全脳容積を測定した。0190-10-077 試験の溶媒投与 TPP1 欠損動物の測定結果と比較した。16 mg 投与野生型動物 2 箇月齢及び 16 mg 投与 TPP1 欠損動物 12 箇月齢は n = 2、16 mg 投与野生型動物 12 箇月齢は n = 1、それ以外の全てのデータポイントは n = 3 で、エラーバーは標準偏差を示す。

以上の結果から、4 箇月齢で 16 mg の BMN 190 の投与を開始した場合、TPP1 欠損ダックスフンドに、2.5 箇月齢で ERT を開始した場合（0190-10-077 試験）と同様の CLN2 進行を抑制する薬理活性は認められなかった。認知機能は改善され、CLN2 の臨床症状発現時期は溶媒投与対照動物に比べ遅延したが、2.5 箇月齢で同様の投与を開始した場合に比較して改善効果は減少した。また、4 箇月齢で投与を開始した場合、脳の委縮に対する効果は認められなかった。しかし、試

験の進行に伴い投与に関連した反応が生じ、試験では投与計画を変更し、投与量を下げて投与を行ったため（表 2.6.2.2.5.2 参照）、確定的な結論を得ることはできない。

2.6.2.2.6 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理・毒性・トキシコキネティクス試験（0190-10-077 試験）

試験（非 GLP 試験）では、TPP1 欠損ダックスフンド CLN2 動物モデルに BMN 190 を隔週、9 箇月間反復［脳室内（ICV）持続投与、腰部髄腔内持続投与（IT-L）、又は大槽内（IT-C）ボーラス投与］し、主要薬理活性及び生存期間を検討した。さらに試験では、BMN 190 の毒性、脳脊髄液及び血漿TK、免疫原性並びに中枢神経系分布を評価し、2.6.6 及び2.6.4 項に記載した。試験は、[redacted]USA [redacted]で実施した。使用した動物モデルが利用可能な唯一の施設がGLP 適合確認施設ではなかったことから、試験は米国 FDA CFR 21 Part 58 で規定されるGLP に準拠して実施していない。しかし、GLP に準拠した試験で実施されているのと同様に、一般に受け入れられた科学的原則に従った厳密な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。試験は 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始され、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。

ナイーブ雌雄ダックスフンド（[redacted]）は、約 2.5 月齢［[redacted]動物実験委員会（ACUC）によって承認された最少齢］で、体重 1.9～2.8 kg（雄）、1.2～2.1 kg（雌）であった。TPP1 欠損ダックスフンド9 匹及びイヌTPP1 正常活性を示すホモ接合性野生型ダックスフンド10 匹を試験に用いた。繁殖コロニーから必要な遺伝子型をもつ動物が得られたとき動物の試験登録を行い、表 2.6.2.2.6.1 に記載した6 群に割り当て、溶媒又はBMN 190 を投与した。

表 2.6.2.2.6.1 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドの脳室内 9 ヵ月間反復投与薬理・毒性・トキシコキネティクス・中枢神経系分布試験の試験デザイン

群	遺伝子型	動物数	処理 [ab]	投与量（mg）	注入時間（時間）	投与レジメン
1	野生型	4[c]	Vehicle	0	2	隔週、9 箇月間
2	野生型	3	BMN 190	4	2	隔週、9 箇月間
3	野生型	3	BMN 190	16	4[d]	隔週、9 箇月間
4	TPP1 欠損	3	Vehicle	0	2	隔週、9 箇月間
5	TPP1 欠損	3	BMN 190	4	2	隔週、9 箇月間
6	TPP1 欠損	3	BMN 190	16	4[d]	隔週、9 箇月間

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
[a] 溶媒、人工脳脊髄液（216.5 mmol/L NaCl、0.8 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.4 mmol/L $CaCl_2$、0.8 mmol/L Na_2HPO_4、0.2 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3）
[b] BMN 190 lots [redacted]
[c] 第 1 群 1 例は 15 回目の投与後安楽死されたため、交換用の動物を試験に追加した。
[d] 16 mg 投与群（第 3 群及び第 6 群）の 3 回目と 4 回目の投与後発現した過敏性反応のため、これらの投与群ではその後の投与に対して全て、注入期間を 2 時間（0.6 mL/hr）から 4 時間（0.3 mL/hr）に延長した。

BMN 190 の持続投与及び脳脊髄液の連続採取を可能にするため、動物の側脳室及び腰椎にカテーテル及び投与ポートをそれぞれ設置した。ICV カテーテル配置目標位置は、MRI を用いて決

定した。イソフルラン麻酔下で頭蓋冠の上に背側に矢状切開部を作成し、開頭術を用いてポリウレタン製カテーテルを挿入した。定位技術を用いて左又は右側脳室にカテーテルを配置した。カテーテルは、歯科用アクリルで固定し、皮下アクセスポートを接続した。カテーテルの配置は、[redacted]を用いて脳室のX 線写真で確認した。腰部カテーテル設置のために、背部L4、L5 又はL6 突起を切開した。筋肉を切断し、ポリウレタン製カテーテルの挿入を可能にするために片側椎弓切除を実施した。カテーテルは胸腰椎移行部まで到達し、歯科用アクリルで所定の位置に固定した。皮下アクセスポートをカテーテルに接続し、配置の適切性は脳脊髄液を採取して確認した。動物は、BMN 190 又は溶媒投与前に少なくとも 7 日間の術後回復期間を設けた。

BMN 190 を隔週、0.6 mL/h で 2 時間持続投与した。16 mg を投与する持続投与時間は、投与 3 回目及び 4 回目の投与期間中に過敏性反応が認められたため、その後 4 時間（0.3 mL/h）に延長した。対照動物には 1.2 mL の溶媒を 2 時間持続投与した。投与は、TPP1 欠損動物の CLN2 が進行し安楽死が必要になるまで、又は脳室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実施した。TPP1 欠損動物が安楽死を必要とする場合には、月齢を適合させた野生型動物も可能な限り、対照として安楽死させた。ICV 及び IT-L カテーテルは、中枢神経系へのデバイスの挿入に対する反応及び動物の成長のため、幼若イヌへの使用期間は限られた。ICV カテーテルが頭蓋骨の成長により側脳室から外れた場合、又は開存性を失った場合は、IT-L 持続投与で可能な限り投与を継続した。ICV 及び IT-L カテーテルの両方がもはや機能しなくなった場合、BMN 190 の残りの投与は、IT-C ボーラス投与で対応した。異種ヒトタンパク質の反復投与による過敏性反応をできるだけ緩和するために、投与 1 日目の投与 30 分前にジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）を予防的に投与した。過敏性反応を示唆する臨床症状（顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈又は低血圧）が投与期間中又は投与後に認められた場合は、ジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）を追加投与した。16 mg の BMN 190 投与群（第 3 群及び第 6 群）では、BMN 190 の複数回投与後に 3/3 例の動物に過敏性反応が認められた。第 4 群（TPP1 欠損動物、溶媒投与）では 1 例で 4 回の過敏性反応が認められ、ジフェンヒドラミンの 2 回目の投与を実施した。ほとんどの事象はジフェンヒドラミンの 2 回目の投与直後に消失した。しかし、以下の表に示すように、数例では追加投与が必要であった。

群	動物（イヌ）	投与量（mg）	過敏性反応	ジフェンヒドラミン 2 回目投与	経過
3	Walt	4	持続投与の約 2 時間後（1 回目のジフェンヒドラミン投与の 5 時間後）の顔面及び耳介の血管性浮腫及び蕁麻疹。	有り	ジフェンヒドラミン追加投与に良好な応答を示した
		5	初回投与の 4 時間後に予防的に 2 回目の投与を行った。	有り	良好
		6	持続投与開始約 2.5 時間に血管性浮腫に気付き、持続投与前にジフェンヒドラミンが投与されなかったことが判明した。その時点でジフェンヒドラミンの投与を行い、徴候はその後 1 時間の間に徐々に消失した。	有り	顔面血管性浮腫は持続投与終了 1 時間以内に再発し、ジフェンヒドラミンの投与を繰り返した。その後 1 時間で徴候は徐々に消失した。
		7	脳脊髄液に到達した後、酵素を誤って 1 時間 0.6 mL/hr で持続投与した。その後、速度	有り	良好

群	動物（イヌ）	投与量（mg）	過敏性反応	ジフェンヒドラミン2回目投与	経過
			を 0.3 mL/hr に下げた。 1.5～2 時間持続投与後、血圧が低下した。2 回の乳酸リンゲル液 10 mL/kg ボーラス投与に良好な応答を示した。持続投与開始約 2.5 時間に、軽微な眼周囲血管性浮腫が認められた。そのため、ジフェンヒドラミンの投与を繰り返した。		
		10（CM#1）	獣医学教育病院で実施され、ICU で回復した。麻酔と回復に問題なし。持続投与の 3.5 時間後に、両耳に耳介紅斑を伴う鼻口部の血管性浮腫が認められた。ジフェンヒドラミン 2 mg/kg の筋肉内投与で消失した。	有り	良好
		11（CM#2）	投与の影響は顕著でない。持続投与の約 4 時間後に、眼窩周囲及び鼻口部に軽度の浮腫が認められたが、ジフェンヒドラミンに応答。バイタルパラメーターは安定。	有り	良好
3	Jubilee	2	顔面の血管性浮腫、耳介の充血及び掻痒の 2 事象	有り	各反応に伴い追加投与を行った。いずれの反応もジフェンヒドラミン投与後に消失した。
		5	紅斑、蕁麻疹及び浮腫が持続投与期間の最後の 1/4 に認められた。	有り	完全寛解
		10	持続投与開始 3 時間後に、吻側鼻口部の血管性浮腫、頻呼吸及び軽度の血圧低下	有り	完全寛解
3	Penelope	3	麻酔から回復後数分以内に、アナフィラキシーの皮膚科的徴候（顔面血管性浮腫及び全身性膨疹）が表れた。	有り	30 分以内に完全寛解
		4	持続投与終了の 2～3 時間後に顔面血管性浮腫及び蕁麻疹が発現した。	有り	初回投与から 4 時間後及び過敏性反応の徴候が認められた時点で反復投与、完全寛解
4	Rogue	8	鼻口部の一過性で軽度の血管性浮腫	有り	完全寛解
		10	耳介蕁麻疹	有り	完全寛解
		15	処置後の体温低下、血圧低下及び側臥位からの回復は遅かった。	有り	2 回目のジフェンヒドラミン、クリスタロイド及びコロイド輸液投与から 1 時間後に回復
		16	処置後の体温低下、血圧低下及び側臥位からの回復は遅かった。	有り	バイタルサインは、2 回目のジフェンヒドラミン、クリスタロイド、コロイド輸液療法に応答した。 動物は処置後も歩行不能のままであった。
6	Jenny	2	アチパメゾールからの回復後に、軽度の充血、耳介そう痒及び体全体のびまん性小疱疹	有り	30 分以内に完全寛解
		3	持続投与中に嘔吐、回復期間中に耳介充血を伴う頻呼吸	有り	20 分以内に改善、数時間以内に消失
		4	持続投与の約 1 時間後で、顔面及び耳介の血管性浮腫及び蕁麻疹	有り	完全寛解
		5	反応の徴候なし	有り	初回投与の 4 時間後に、予防的に 2 回目

群	動物（イヌ）	投与量（mg）	過敏性反応	ジフェンヒドラミン2回目投与	経過
					の投与を行った。
		6	持続投与終了1時間後に、軽微な血管性浮腫	有り	30分以内に完全寛解
		7	軽度の血管性浮腫の発現	有り	消失
6	Patooti	3	麻酔から回復後数分以内に、血圧低下、粘膜蒼白化、毛細血管再充満時間の遅延、頻脈、頻呼吸、顔面血管性浮腫	有り	数時間後に消失
		4	反応の徴候なし	有り	初回投与の4時間後及び持続投与の5時間後に、予防的にジフェンヒドラミンを反復投与
6	Lulu	3	麻酔から回復後数分以内に、粘膜蒼白化及び毛細血管再充満時間の遅延を伴う血圧低下、頻脈、頻呼吸並びに血性下痢等、全身性アナフィラキシーの臨床徴候が認められた。	有り	ジフェンヒドラミンの2回目の投与後に改善が認められたが、数時間後に再発したため、モニタリングのためにICUに収容した。下痢以外、全ての徴候は翌日までに消失した。
		4	持続投与中の血圧低下は、輸液のボーラス投与で消失した。	有り	初回投与の4時間後及び持続投与の4～6時間後にジフェンヒドラミンを反復投与

ICU：集中治療室、CM：大槽。

ダックスフンドに毎週体重測定を含む一般状態の観察を実施した。毎週2回、神経学的検査を実施し、疾患進行を評価した（Lorenz MD, Coates JR, Kent MR. Handbook of Veterinary Neurology, 5th edition, St. Louis, Elsevier, 2011, pp.2-36）。検査では、意識状態・姿勢・歩様の観察、脳神経評価、姿勢反応検査（固有位置感覚、跳び直り反応、手押し車反応、触覚性踏み直り反応及び姿勢性伸筋突伸反応）、脊髄反射（伸長及び屈曲反射）、並びに表在痛覚・深部痛覚を評価した。歩様検査では、正常、又は、運動失調（小脳性、感覚性、前庭性）及び不全まひの発現を伴う異常を評価した。姿勢反応、脊髄反射、脳神経テスト、及び知覚は、正常、亢進、低下又は消失を評価した。また、異常行動及び発作活動についても評価した。神経学的症状は、臨床疾患の発現を測定するために威嚇瞬目反応（片側及び両側）、視覚追跡、企図振戦、頭部振戦、ミオクローヌス、骨盤及び胸部の固有位置感覚、並びに小脳性運動失調及び旋回行動を評価した。

眼科検査は、月1回実施した。月1回、ポータブル網膜電図ユニット（[redacted]）を用いて網膜電図で、視覚機能変化を評価した。各網膜電図検査は、“European College of Veterinary Ophthalmology”で桿体視細胞及び錐体視細胞機能評価のために推奨されている“Dog Diagnostic Protocol”に準拠して暗順応及び明順応での測定で構成した。網膜電図波形は、a及びb波の振幅の変化及び陰的時間を評価した。視覚誘発電位検査では、ピーク振幅及び陰的時間を評価した。瞳孔対光反射は、6、8、10及び可能な場合は12箇月齢でも、明所及び暗所で評価し、後者はFinnoffトランスイルミネーターで評価した。測定は、発光

ダイオード（LED）からの可視光を指定時間照射刺激し、同時に眼の視覚化のために連続赤外線照射（910 nm）により、赤外線感度カメラで瞳孔画像を記録できる、カスタム装置で実施した。瞳孔画像は、Adobe Photoshop を用いて、収縮期面積をベースラインと比較して解析した。瞳孔対光反射を記録した後、瞳孔を拡張し、間接検眼に続いて細隙灯生体顕微鏡検査を実施した。眼障害が認められた場合、必要な眼科処置から一週間以上経過後の眼底状態をデジタル眼底カメラを用いて記録した。

認知機能は、投与 4 回目前後（約 4 箇月齢）から月 1 回、T 字型迷路装置（CanCog Technologies, Toronto, Ontario Canada）を用いて逆転学習課題で評価した（Sanders et al., 2011, Genes Brain Behav.）。MRI は、1.5 テスラ磁場計器（[redacted]）で、投与1 回目の投与前（投与1 週目、約2 箇月齢）、投与10 回目の投与前（投与19 週目、約6.5 箇月齢）及び投与 20 回目の投与前（投与39 週目、約 11 箇月齢）に実施した。パルスシーケンスは、三平面全てでT1、T2、プロトン密度及びFLAIR 強調画像が得られるよう選択した。疾患進行による脳委縮の程度を測定するため、脳室容積及び全脳容積の定量的評価は、[redacted]ソフトウェア([redacted]) を用いて MRI で実施した。

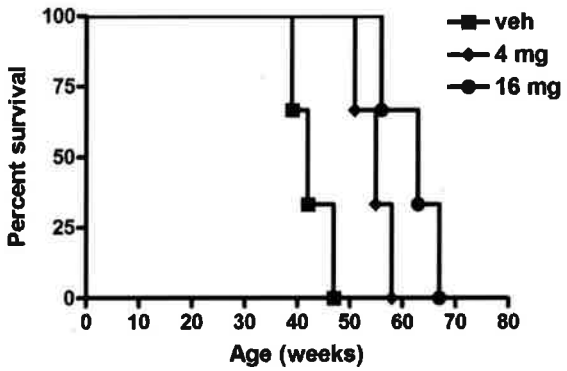
20 回以上投与後、野生型動物は可能な限り、月齢を適合させた TPP1 欠損動物と共に安楽死させた。認知の喪失（T 字型迷路試験を実行できない）、重度の精神作用異常、視覚追跡欠損、薬剤難治性ミオクロニー単収縮、及び補助なしでの摂餌能力の低下で定義される疾患の終末期への進行が認められた場合、TPP1 欠損動物を安楽死させた。生存期間は、誕生から疾患の終末期への進行による安楽死までの期間と定義され、薬理学的エンドポイントとした。脳室カテーテルに関連した合併症（無菌性髄膜炎、閉塞性水頭症）による神経系の損傷の悪化のため、数例のイヌを安楽死させた。これらのイヌは、昏迷・昏睡、四肢不全まひ、平均動脈圧の増加及び徐脈などの頭蓋内圧の増加に関連した臨床症状を示した。

瀕死状態の動物を除き動物の安楽死処置は、最終投与 48 時間後に実施した。剖検時、脳組織は、厚さ 3 mm の連続冠状切片に分割した。切片は全てそれぞれ、自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質の顕微鏡的評価用に処理した。残りの脳切片で、顕微鏡的変化を組織学的に解析した。組織スライスから作製した脳組織切片は、ヘマトキシリン・エオシン（HE、一般的な組織染色）、抗グリア線維性酸性タンパク質（GFAP、星状膠細胞症マーカー）及び IBA1（小膠細胞マーカー）抗体で組織染色した。大脳皮質、線条体、中脳及び小脳の相同領域の一連の系統的無作為化デジタル画像を記録し、デジタル画像処理（デジタルイメージング）により、自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質蓄積領域の定量解析を実施した。解析は、中枢神経系病理組織学的評価の専門知識を有する獣医病理専門学者により実施された。必要な領域を識別し、等間隔で領域の連続画像を選択できる、[redacted]ソフトウェア（[redacted]）を用いて、動物組織ごとに約15 枚の2500 μm^2 画像を選択した。各画像は、640 × 480 ピクセルで、全体面積は307200 ピクセルであった。画像を集積後、各画像の自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質量を計算し、画像ごとの陽性ピクセル数で示した。陽性ピクセルは、[redacted]を用い

て、動物ごとに限界値分析で解析し、中枢神経系の組織ごとに、各投与群の平均値を求めた。解析は、バックグラウンド染色のベースライン値を測定するために溶媒投与野生型動物、並びに BMN 190 投与の効果を評価するために、溶媒、4 mg 及び 16 mg を投与した TPP1 欠損動物で実施した。統計学的有意差は、独立両側スチューデント t 検定を用いて計算した。

生存期間は、BMN 190 投与 TPP1 欠損動物で延長した（図 2.6.2.2.6.1）。溶媒投与 TPP1 欠損ダックスフンドは、10～11 箇月齢で安楽死が必要な疾患の終末期に進行し、これはヒストリカル対照に類似した。4 mg の BMN 190 投与動物は全て、11 箇月齢を越えて生存した。16 mg の BMN 190 投与動物は全て、12 箇月齢を越えて生存した。中枢神経系送達システム（脳室カテーテル）関連の合併症及び疾患進行の組合せにより、BMN 190 を投与した 3 例（4 mg 投与 51 週齢動物、16 mg 投与 57 週齢動物及び 16 mg 投与 63 週齢動物）を安楽死させた。さらに、疾患進行が原因で補助なしでの摂餌能力が低下したため、BMN 190 を投与した 3 例（4 mg 投与 54 週齢動物、4 mg 投与 55 週齢動物及び 16 mg 投与 67 週齢動物）を安楽死させた。16 mg 投与動物 3 匹のうちの 2 例の死亡原因は主に、脳室内及び髄腔内反復投与に起因する合併症に関連したことから、16 mg 投与療法の生存期間延長作用は、過少評価されている可能性がある。各動物の死亡の経緯については、2.6.6.3.2 項で考察している。

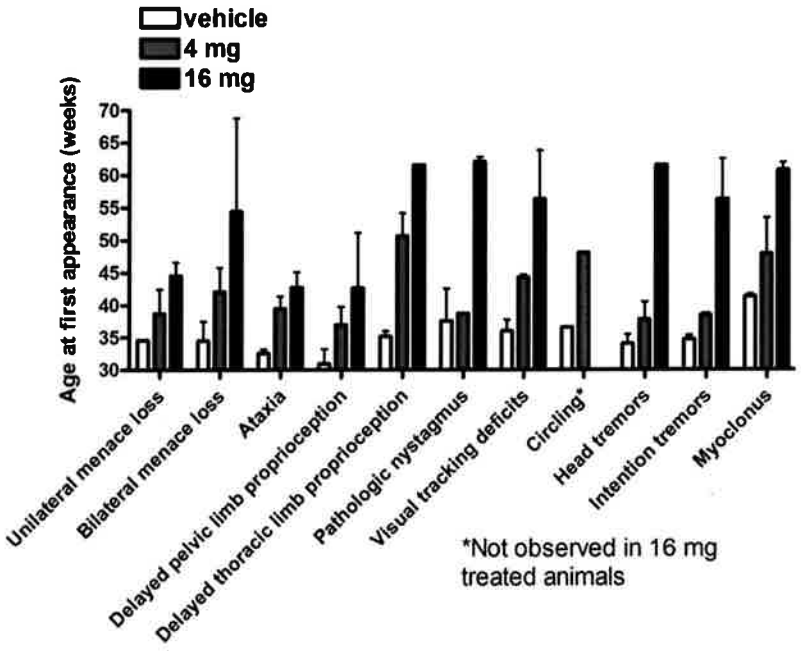
図 2.6.2.2.6.1 TPP1 欠損ダックスフンドの生存率に対する作用



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.8.1
動物に、BMN 190（4 又は 16 mg）又は人工脳脊髄液（溶媒）を隔週で投与した（n = 3/群）。

BMN 190 投与により、TPP1 欠損ダックスフンドの神経変性症状は抑制された。最初の神経障害（明白な臨床症状）は、溶媒投与動物に 7 箇月齢で発現し、10 箇月齢までに全てのパラメーターに障害を生じた（図 2.6.2.2.6.2）。一方、BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、溶媒投与対照動物に比較して、疾患の発現及び進行に投与に関連した遅延を示した。最初の神経変性に関する臨床症状の発現は、溶媒投与対照動物に比較して、4 mg の投与動物では 3.5～11 週間遅延し、16 mg の投与動物では 10～30 週間遅延した。これらの臨床症状は、CLN2 評価尺度の運動機能及び歩様の類似するパラメーターへの変換が可能である。

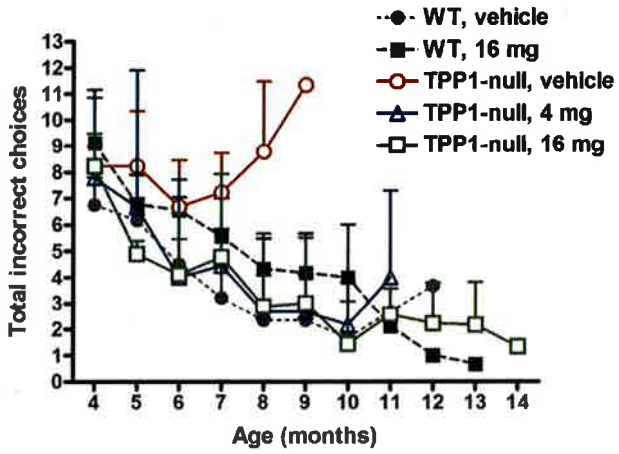
図 2.6.2.2.6.2 TPP1 欠損ダックスフンドでの神経変性に関する臨床症状に対する BMN 190 の遅延作用



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.4.1
CLN2 に関連する神経変性を示す臨床症状を最初に発現した週齢を示す。この測定では、臨床症状の重症度又は発現期間の差については評価していない。11 の臨床症状の全てが、投与各群の全ての動物には発現していない。n = 3/群で、エラーバーは標準偏差を示す。症状を発現したイヌが投与群 3 匹のうち 1 例のみである場合、エラーバーは示していない。

認知機能は、4 又は 16 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドで維持された。これらのイヌは、経齢的に、正常野生型対照動物と同程度まで認知機能を改善した（認知機能の改善は、T 字型迷路装置で不正解の選択肢数の減少で測定される）。一方、溶媒投与 TPP1 欠損動物は、経齢的に、不正解回数を増加した。9 箇月齢以降、溶媒投与 TPP1 欠損動物は、迷路に対処できず、試験を進めることができなかった（図 2.6.2.2.6.3）。16 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物の成績は、14 箇月齢までの全試験期間中、正常野生型対照動物と同様であった。

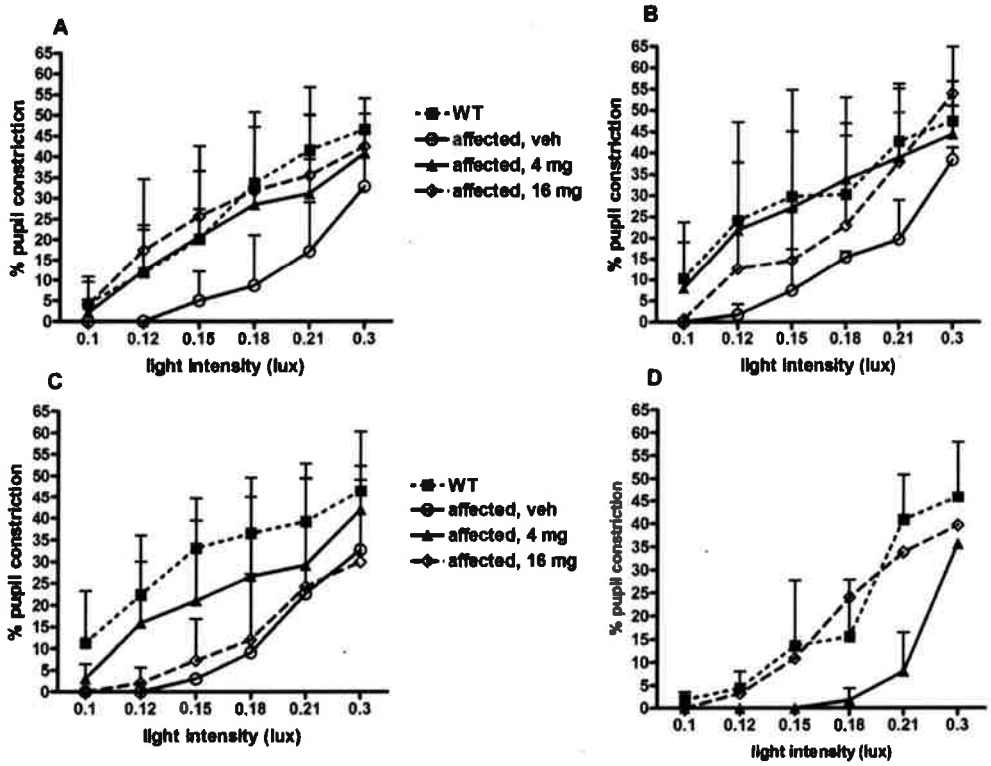
図 2.6.2.2.6.3 認知機能に対する BMN 190 の正常化作用



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.7.1. and Appendix 11
WT：野生型、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
溶媒投与野生型動物の 4～6 箇月齢は n＝4、10 箇月齢は n＝2、11～12 箇月齢は n＝1、16 mg 投与野生型動物の 9 箇月齢は n＝2、12～13 箇月齢は n＝1、溶媒投与 TPP1 欠損動物の 9 箇月齢は n＝1、4 mg 投与 TPP1 欠損動物の 8～11 箇月齢は n＝2、16 mg 投与 TPP1 欠損動物の 13 箇月齢は n＝2、14 箇月齢は n＝1、それ以外の全てのデータポイントは n＝3 で、エラーバーは標準偏差を示す。

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、TPP1 欠損動物は BMN 190 投与により、瞳孔対光反射の低下が抑制された（図 2.6.2.2.6.4）。溶媒投与 TPP1 欠損動物では、瞳孔対光反射の進行性の低下が認められた。4 又は 16 mg の BMN 190 投与により、6、8、10 及び 12 箇月齢の瞳孔対光反射は、ほぼ正常野生型動物の水準まで増加した。BMN 190 による瞳孔対光反射の保護作用に用量反応関係は認められなかった。試験で観察された網膜電図 b 波の減少は、網膜内の機能の低下を示唆し、これは、BMN 190 投与動物で抑制されなかった。以前の大槽内投与ダックスフンド試験（0190-09-066 試験）から、BMN 190 は脳脊髄液投与後に網膜に分布しないことが示されている。これらを総合すると、瞳孔対光反射の保護作用は、主に眼よりはむしろ網膜を脳に接続する脳又は神経細胞の視覚中枢での疾患進行の抑制による可能性があることが示された。

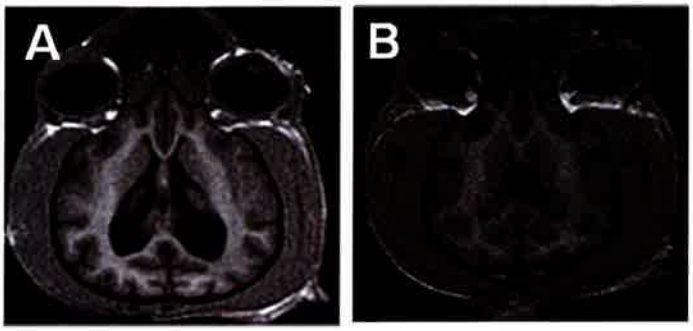
図 2.6.2.2.6.4 瞳孔対光反射低下に対する BMN 190 の抑制作用



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.5.1
WT：野生型、affected：TPP1 欠損、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、veh：溶媒投与。
瞳孔対光反射を約 6（A）、8（B）、10（C）及び 12（D）箇月齢の動物で測定した。瞳孔対光反射は、BMN 190 投与 TPP 欠損動物で、溶媒投与 TPP1 欠損対照動物に比較して保護された。溶媒投与 TPP 欠損動物は、12 箇月齢まで生存しなかったため 12 箇月齢では評価されなかった。溶媒投与、4 mg の BMN 190 又は 16 mg の BMN 190 投与野生型動物は、類似した反応を示し、図中では一群にまとめられている。溶媒投与 TPP1 欠損動物の 10 箇月齢及び 16 mg 投与 TPP1 欠損動物の 12 箇月齢は n = 1、溶媒投与 TPP1 欠損動物の 6 及び 8 箇月齢、並びに 4 mg 投与 TPP1 欠損動物の 6 及び 12 箇月齢は n = 2、野生型動物の 6 及び 8 箇月齢は n = 6、野生型動物の 10 箇月齢は n = 7、それ以外の全てのデータポイントは n = 3 で、エラーバーは標準偏差を示す。

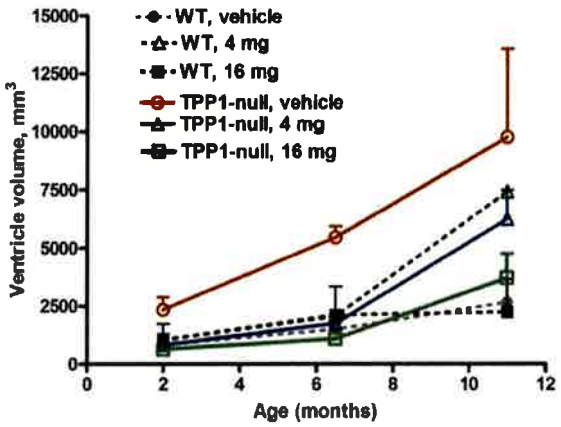
MRI で、TPP1 欠損ダックスフンドで疾患進行による脳委縮の結果生じる脳室拡張は、BMN 190 の投与により抑制されることが示された。溶媒及び BMN 190 投与 TPP1 欠損動物の MRI 結果を図 2.6.2.2.6.5 に示す。MRI の定量的解析で、BMN 190 投与 TPP1 欠損動物は、溶媒投与対照動物に比較して、投与に関連した脳室拡張の抑制を示した（図 2.6.2.2.6.6）。

図 2.6.2.2.6.5 BMN 190 及び溶媒投与 TPP1 欠損ダックスフンドの脳の MRI



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.6.2
約 6.5 箇月齢の TPP1 欠損ダックスフンド同腹仔の MRI 画像を示す。画像 A：溶媒投与動物、画像 B：4 mg の BMN 190 投与動物。画像 A では脳室拡張及び皮質委縮が認められ、画像 B は正常な脳形態を示している。

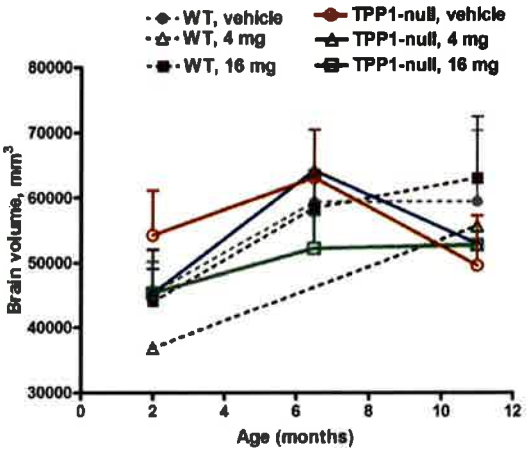
図 2.6.2.2.6.6 脳室容積増加に対する BMN 190 の抑制作用



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.6.1-A and Appendix 10
WT：野生型、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
脳室容積は MRI の定量解析で測定した。4 mg 投与 TPP1 欠損動物の 2 及び 11 箇月齢、並びに 16 mg 投与 TPP1 欠損動物の 6.5 箇月齢は n = 2、4 mg 投与野生型動物及び 4 mg 投与 TPP1 欠損動物の 6.5 箇月齢は n = 1、それ以外の全てのデータポイントは n = 3 で、エラーバーは標準偏差を示す。

全脳容積の定量解析より、16 mg の投与量の BMN 190 は、全脳容積を安定させるが、4 mg の投与量は安定させないことが示された（図 2.6.2.2.6.7）。溶媒又は 4 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、6.5～11 箇月齢で脳体積の減少を示し、これは CLN2 により引き起こされる脳委縮に関連している可能性がある。16 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、6.5～11 箇月齢での脳体積は野生型対照動物と同様に不変であった。

図 2.6.2.2.6.7 TPP1 欠損ダックスフンドの脳体積に対する BMN 190（16 mg）の安定化作用

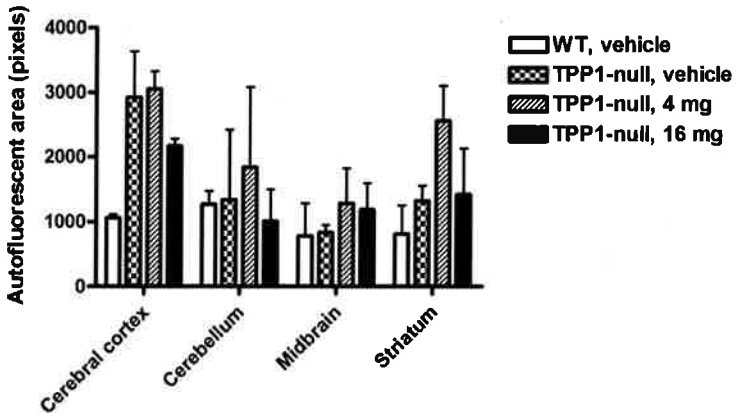


Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.6.1-B and Appendix 10
WT：野生型、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
全脳容積は MRI の定量解析で測定した。溶媒投与野生型動物の 6.5 箇月齢、4 mg 投与 TPP1 欠損動物の 2 及び 11 箇月齢、並びに 16 mg 投与 TPP1 欠損動物の 6.5 箇月齢は n = 2、4 mg 投与野生型動物の 2 及び 11 箇月齢、並びに 4 mg 投与 TPP1 欠損動物の 6.5 箇月齢は n = 1、4 mg 投与野生型動物の 6.5 箇月齢は n = 0、それ以外の全てのデータポイントは n = 3 で、エラーバーは標準偏差を示す。

MRI パラメーターは CLN2 患者の機能消失に関連していることが示されており（Worgall, 2007, Neurology）、臨床への外挿が可能であることから、TPP1 欠損ダックスフンドの MRI で認められた改善は、特に CLN2 患者での改善が期待できるものである。

ライソゾーム蓄積物質の解析から、溶媒投与 TPP1 欠損動物に比較して、4 又は 16 mg の BMN 190 投与動物の大脳皮質、線条体、中脳又は小脳で自家蛍光色素顆粒の統計学的に有意な減少は認められなかった。しかし、大脳皮質では、溶媒投与動物に比較して 16 mg の投与動物に減少傾向が認められ（$p = 0.2056$）、4 mg の投与動物に比較して 16 mg の投与動物に統計学的に有意な減少が認められた（$p < 0.05$）。線条体では、4 mg の投与動物に比較して 16 mg の投与動物に減少傾向が認めらた（$p = 0.0967$）（図 2.6.2.2.6.8）（溶媒、4 mg 及び 16 mg の投与動物の統計学的有意差は、t 検定を用いて計算した。Data source：Report 0190-10-077-Appendix 13 Final Supplemental Pathology Report -Table 2）。溶媒を投与した TPP1 欠損動物は、4 又は 16 mg の BMN 190 投与動物より生存期間が短かったため、ライソゾーム蓄積物質が蓄積する期間が少なくなった。したがって、もし全ての動物を同じ月齢で安楽死させた場合、より顕著な自家蛍光色素の減少が認められる可能性がある。

図 2.6.2.2.6.8 ダックスフンドの中枢神経系組織の自家蛍光色素面積



Data source: Report 0190-10-077-Figure 7.9.1
WT：野生型、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
中枢神経組織の自家蛍光は、デジタル画像ごとの陽性ピクセル数で示し、各動物組織ごとに約 15 枚の 2500 μm^2 画像を選択し、限界値分析で解析した。図では画像ごとの陽性ピクセル数を示した（全体面積は 307200 ピクセル）。各動物組織ごとに n = 3 で測定し、エラーバーは標準偏差を示す。

以上の結果から、BMN 190 の脳室内反復投与、腰部髄腔内反復投与、又は大槽内反復投与により、神経変性症状発現の遅延、神経学的機能の改善、脳形態の安定化及び生存期間の延長で評価される TPP1 欠損ダックスフンドの疾患進行を顕著に抑制した。この疾患モデルで評価したパラメーターは、CLN 評価尺度パラメーターの一部を評価したのと等価であり、疾患モデルで認められた症状の改善をかなりの精度で CLN2 患者での症状の改善に外挿することが可能である。さらに、イヌで認められた認知機能の改善は、BMN 190 治療を受ける患者で学習能力が維持されることを意味する。

2.6.2.2.7 ダックスフンド CLN2 モデルを用いた BMN 190 の 44 週間隔週脳室内持続投与試験（BMN190-12-009 試験）

試験（非 GLP 試験）では、TPP1 欠損ダックスフンドに 48 mg の BMN 190 を隔週で脳室内（ICV）持続投与、腰部髄腔内（IT-L）持続投与、又は大槽内（IT-C）ボーラス投与したときの生存期間に対する主要薬理活性を評価した。さらに、BMN 190 の毒性並びに脳脊髄液及び血漿 TK を評価し、2.6.6 及び 2.6.4 項に記載した。試験は、0190-10-077 試験を継続し、高投与量の作用を分析した。試験は、[redacted]USA [redacted]で実施し、米国 FDA CFR 21 Part 58 で規定されるGLP に準拠して実施していないが、一般に受け入れられた科学的原則に従い、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始され、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。

ナイーブ雌雄TPP1 欠損ダックスフンド（[redacted]）3 匹は、試験開始時、約2.5 箇月齢で［[redacted]動物実験委員会（ACUC）によって承認された最少齢］、体重

は、雄 2.65 kg（P）、雌 1.5 kg（U）及び 2.15 kg（M）であった。動物は表 2.6.2.2.7.1 に記載した 1 群に割り当て、BMN 190 を投与した。

表 2.6.2.2.7.1 TPP1 欠損ダックスフンドに対する脳室内 44 週間反復投与薬理・毒性・トキシコキネティクス試験の試験デザイン

群	遺伝子型	動物数	処理 [ab]	投与量（mg）[c]	注入時間（時間）	投与レジメン [d]
1	TPP1 欠損	3	BMN 190	最高 48 mg	4	隔週、最長 19 箇月間

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
[a] 溶媒、人工脳脊髄液（216.5 mmol/L NaCl、0.8 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.4 mmol/L $CaCl_2$、0.8 mmol/L Na_2HPO_4、0.2 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3）
[b] BMN 190 lots [redacted]
[c] 2 回目及び 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、表 2.6.2.2.7.2 に示すように徐々に 48 mg まで増量した。
[d] 投与期間：動物 M =8 箇月間、動物 P =10 箇月間、動物 U = 19 箇月間

動物に、2.6.2.2.6 項に説明されているように、定位技術を使用して ICV カテーテルを設置した。カテーテルはそれぞれ、BMN 190 持続投与及び脳脊髄液の連続採取を可能にするため、1 本は側脳室まで挿入し、1 本は腰椎に設置した。BMN 190 は、隔週、0.42 mL/h で 4 時間持続投与した。BMN 190 投与は、中枢神経系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続けられた。ICV カテーテルが頭蓋骨の成長のため側脳室からはずれた場合、又は開存性を失った場合は、IT-L 持続投与で、可能な限り投与を継続した。ICV 及び IT-L カテーテルの両方が使用できなくなった場合は、残りの BMN 190 投与は、IT-C ボーラス投与で対応した。異種ヒトタンパク質の反復投与による過敏性反応をできるだけ緩和するために、BMN 190 投与 30 分前にジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）を投与した。過敏性反応を示唆する臨床症状（顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈又は低血圧）が投与期間中又は投与後に認められた場合は、ジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）を追加投与した。

動物に、表 2.6.2.2.7.2 の記載のように、BMN 190 を隔週で投与した。投与は、0.42 mL/h の持続投与速度で 4 時間で行い、注入後 PBS をフラッシング（0.6 mL/h、45 分間）した。BMN 190 は、48 mg の投与量を最初の 1～2 回 ICV 投与した。投与 2～3 回目の投与期間中及び投与直後に過敏性反応が生じ、緩和するため投与量を 2 mg に下げ、BMN 190 に対する耐性の獲得に応じて徐々に投与量を増加し、48 mg の投与量まで戻した。プロポフォール（4 mg/kg、静脈内）及びデクスメデトミジン（5 μg/kg、筋肉内）を投与し、鎮静処置を行った。

表 2.6.2.2.7.2 BMN190-12-009 試験の BMN 190 投与記録

投与番号	動物 1（雄 P）	動物 2（雌 M）	動物 3（雌 U）
1	48 mg、ICV	48 mg、ICV	48 mg、ICV
2	48 mg、ICV	48 mg、ICV	23 mg、ICV
3	13 mg、ICV	4 mg、ICV	7 mg、ICV
4, 5	2 mg、ICV	2 mg、ICV	2 mg、ICV
6	3 mg、ICV	3 mg、ICV	3 mg、ICV
7	4 mg、IT-L	4 mg、ICV	4 mg、ICV
8	6 mg、IT-L	6 mg、ICV	6 mg、ICV
9	8 mg、IT-L	8 mg、IT-L	8 mg、ICV
10	10 mg、IT-L	10 mg、ICV	10 mg、ICV
11. 12	16 mg、ICV	16 mg、ICV	16 mg、ICV
13	20 mg、ICV	17.6 mg、ICV	20 mg、ICV
14, 15	24 mg、IT-L	--	24 mg、IT-L
16	32 mg、IT-C	24 mg、IT-C（最終投与）	32 mg、IT-L
17	32 mg、IT-C	--	32 mg、IT-L
18-22	48 mg, IT-C（最終投与）	--	48 mg、IT-L
23-31	--	--	48 mg、IT-L
32-41	--	--	48 mg、IT-C

--：投与せず、ICV：脳室内投与、IT-L：腰部髄腔内投与、IT-C：大槽内投与

2.6.2.2.6 項に説明されているように、毎週一般状態の観察及び神経学的検査を実施した。CLN2 の進行、BMN 190 の効果及び中枢神経系カテーテルの影響を示す神経学的症状を評価した。2.6.2.2.6 項に説明されているように、間接検眼に続いて細隙灯生体顕微鏡検査を含む眼科検査を月 1 回、実施した。瞳孔対光反射は 6、8、10 及び 12 箇月齢で評価した。網膜電図は月 1 回測定した。眼障害の徴候が認められた場合は、各眼科検査から 1 週間以上経過後の眼底状態をデジタルカメラを用いて記録した。

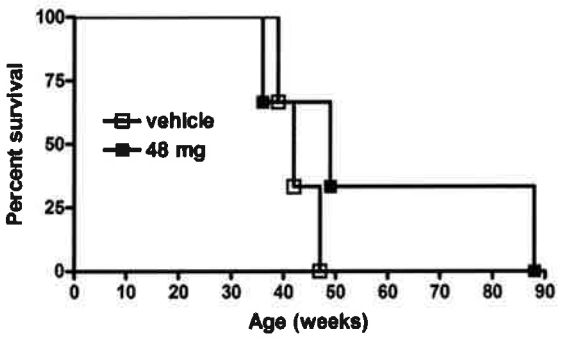
認知機能は、投与 4 回目前後（約 4 箇月齢）から月 1 回 T 字型迷路装置を用いて逆転学習課題で評価した（CanCog Technologies, Toronto, Ontario Canada）（Sanders et al., 2011, Genes Brain Behav.）。MRI は、3 匹全ての動物に対して、1.5 テスラ磁場計器で投与 1 回目（投与第 1 週、約 2 箇月齢）及び投与 10 回目（投与第 19 週、約 6.5 箇月齢）の投与前に実施した。動物 P 及び動物 U に対しては投与 20 回目の投与前（投与第 39 週、約 11 箇月齢）にも MRI を実施した。動物 U に対しては、約 12.5、14.5、16、18 及び 20 箇月齢でも MRI を実施した。パルスシーケンスは、三平面全てで T1、T2、プロトン密度及び FLAIR 強調画像が得られるよう選択した。疾患進行による形態学的変化の程度を測定するため、2.6.2.2.6 項に説明されているように、脳室容積及び全脳容積の定量的評価を、MRI で実施した。

ミズーリ大学動物実験委員会（ACUC）によって安楽死を義務づけられている脳室カテーテルに対する CLN2 の進行又は中枢神経系反応（髄膜炎、閉塞性水頭症）が生じたとき、動物を安楽死させた。生存期間は誕生から安楽死までの期間と定義した。疾患進行の臨床症状が安楽死時

の 1 例の動物に認められたが、この動物はまだ、2.6.2.2.6 項で定義された疾患の終末期には進行していなかった。

0190-10-077 試験で測定された 16 mg の投与量での 67 週間の最長生存期間は、48 mg の投与量では、88 週間にさらに延長された（図 2.6.2.2.7.1）。0190-10-077 試験で溶媒投与 TPP1 欠損ダックスフンドは、ヒストリカル対照に類似して、10～11 箇月齢で、安楽死の必要な疾患の終末期に進行した。48 mg の BMN 190 投与動物 2 例は、CLN2 進行の顕著な臨床症状が認められる前に 36 及び 49 週齢で脳室カテーテルに関連した髄膜炎又は閉塞性水頭症のため、安楽死された。残りの 1 例は、88 週齢で脳室カテーテルに関連した閉塞性水頭症のため、安楽死された。安楽死時この動物は CLN2 進行の症状を示したが、疾患の終末期にはまだ進行していなかった。3 例は全て、CLN2 の終末期に進行する前に安楽死されたことから、この試験では、48 mg の投与量での生存期間延長作用は過小評価されている可能性がある。

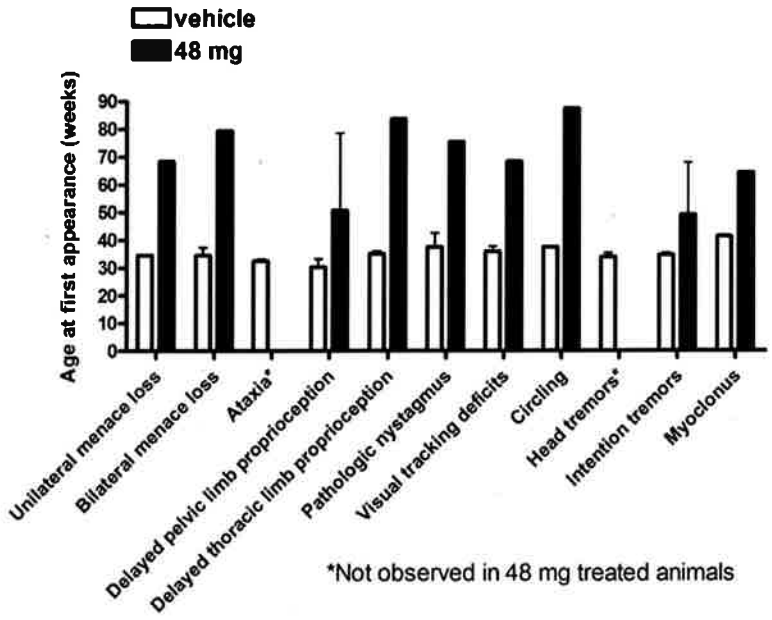
図 2.6.2.2.7.1 TPP1 欠損ダックスフンドの生存期間に対する BMN 190 の延長作用



Data source: Report BMN190-12-009-Figure 7.8.1
48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損ダックスフンドの生存期間を 0190-10-077 試験の溶媒投与 TPP1 欠損対照動物と比較した。BMN 190 投与動物は全て、CLN2 の進行ではなく、脳室カテーテルに関連した合併症のため、安楽死された。そのためこの解析では、生存期間延長作用を過少評価している可能性がある。

TPP1 欠損ダックスフンドの神経変性症状は、BMN 190 の投与により抑制された。最初の神経障害（明白な臨床症状）は、0190-10-077 試験で溶媒投与動物に約 7 箇月齢で発現し、約 10 箇月齢までに全てのパラメーターに障害が認められた（図 2.6.2.2.7.2）。一方、48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、疾患の発現及び進行に遅延が示された。神経変性に関する臨床症状の最初の発現は、48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、溶媒投与対照動物に比較して約 20～50 週間延長した。これらの臨床症状は、CLN2 評価尺度で評価される運動機能及び歩様の類似するパラメーターへの変換が可能である。

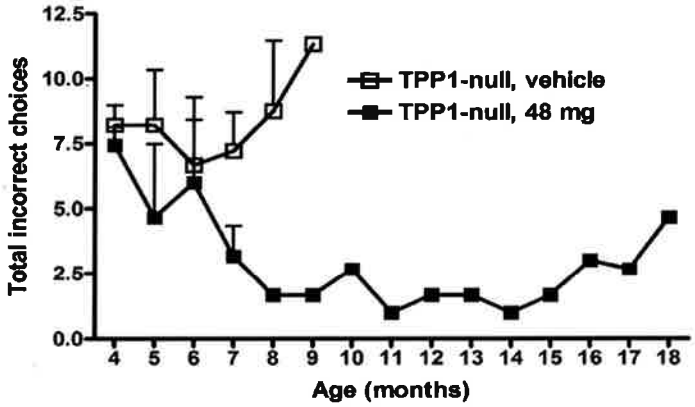
図 2.6.2.2.7.2 TPP1 欠損ダックスフンドの神経変性に関する臨床症状の発現に対する BMN 190 の遅延作用



Data source: Report BMN190-12-009-Figure 7.4.1
CLN2 の進行を示す神経変性に関連した臨床症状を最初に発現した平均週齢を示す。48 mg の BMN190 投与 TPP1 欠損動物を 0190-10-077 試験の溶媒投与対照動物と比較した（n = 3/群）。エラーバーは標準偏差を示す。この測定では、臨床症状の重症度又は発現期間の差については評価していない。11 の臨床症状の全てが、投与各群の全ての動物には発現していない。

認知機能は、48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、試験期間中維持された（図 2.6.2.2.7.3）。これらのイヌでは、試験の最初の 4 箇月間、T 字型迷路装置で不正解選択数の減少が測定され、正常野生型対照動物と同程度まで改善した。一方、0190-10-077 試験で溶媒投与 TPP1 欠損動物は、経齢的に不正解選択数の増加を示した。9 箇月齢以降、溶媒投与 TPP1 欠損動物は、迷路を進むことができず、試験を継続できなかった。48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物の成績は、15 箇月齢まで正常野生型対照動物と同様であった。試験の最後の 3 箇月間に 48 mg の投与生存動物に野生型対照動物と比較してわずかな減少が認められたが、これは、CLN2 の進行又は脳室カテーテルに関連した水頭症の発現による可能性があり、これにより動物を安楽死させた。

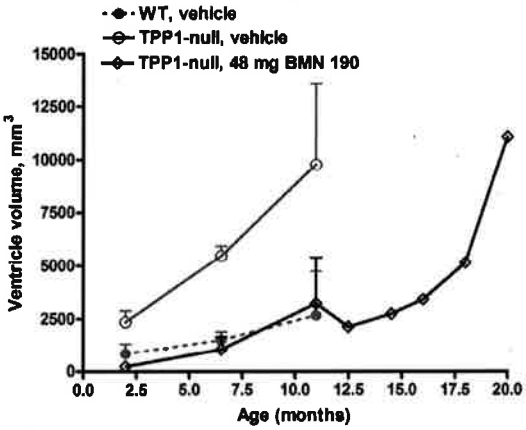
図 2.6.2.2.7.3 TPP1 欠損ダックスフンドのT字型迷路試験の逆転学習で評価した認知機能に対するBMN 190の改善作用



Data source: Report BMN190-12-009-Figure 7.7.1
TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ1。
T字型迷路装置で基準（2回連続したセッションで8/10の正解選択、又は1回のセッションで9/10以上の正解選択）に達するまでの不正解の平均選択数を測定した。0190-10-077試験の溶媒投与TPP1欠損動物の測定結果との比較を示す。溶媒投与TPP1欠損動物8箇月齢はn＝2及び9箇月齢はn＝1、48 mg投与TPP1欠損動物5～7箇月齢はn＝2及び8～18箇月齢はn＝1、それ以外の全てのデータはn＝3で、エラーバーは標準偏差を示す。

BMN 190投与は、TPP1欠損ダックスフンドで脳委縮により発現する脳室拡張を減少した。MRIの定量的解析から、48 mgのBMN 190投与動物は、16.5箇月齢まで、溶媒投与対照動物に比較して脳室拡張を減少することが示された（図 2.6.2.2.7.4）。動物Uの最後の3箇月間の脳室容積の増加は、この動物でCLN2が進行したことが原因である可能性が高い。

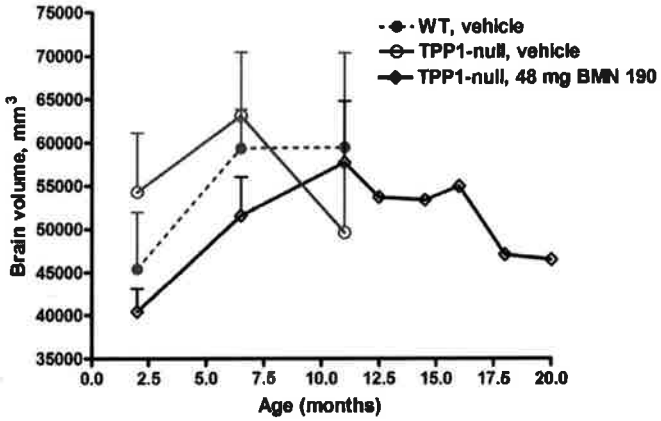
図 2.6.2.2.7.4 脳室容積増加に対するBMN 190の抑制作用



Data source: Report BMN190-12-009-Figure 7.6.1
WT：野生型、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ1。
MRIの定量解析で平均脳室容積を測定した。48 mg投与TPP1欠損動物11箇月齢はn＝2、48 mg投与TPP1欠損動物12.5、14、16、18及び20箇月齢はn＝1、それ以外の全てのデータはn＝3で、エラーバーは標準偏差を示す。

MRI の定量的解析でも、BMN 190 は 48 mg の投与量で全脳容積を安定化することが示された（図 2.6.2.2.7.5）。溶媒投与 TPP1 欠損対照動物では 6.5～11 箇月齢で全脳容積の減少を示し、これは、CLN2 進行の結果である脳委縮による可能性が高い。48 mg の BMN 190 投与 TPP1 欠損動物では、6.5～11 箇月齢で、野生型対照動物に観察されたのと同様の脳体積を示した。動物 U は、11 箇月齢以降評価された唯一の動物だが、その脳体積は 16.5 箇月齢まで一定に保たれていた。この動物は 18～20 箇月齢では脳体積の減少を示し、これは CLN2 進行による可能性がある。

図 2.6.2.2.7.5 全脳容積に対する BMN 190 の安定化作用



Data source: Report BMN190-12-009-Figure 7.6.2
WT：野生型、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1。
MRI の定量解析で平均全脳容積を測定した。48 mg 投与 TPP1 欠損動物 11 箇月齢は n = 2、48 mg 投与 TPP1 欠損動物 12.5、14、16、18 及び 20 箇月齢は n = 1、それ以外の全てのデータは n = 3 で、エラーバーは標準偏差を示す。

MRI パラメーターは CLN2 患者の機能消失との関連性が認められていることから（Worgall, 2007, Neurology）、MRI で認められた改善は、特にヒトでの改善が期待できるものである。

以上の結果から、48 mg の投与量の BMN 190 を隔週で脳室内投与すると、0190-10-077 試験の 16 mg で観察された以上の CLN2 の進行の抑制を示した。この投与量（48 mg）の BMN 190 投与を受けた 3 動物は全て、CLN2 の進行ではなく、中枢神経系カテーテルに関連した反応のため、安楽死された。投与に関連した生存期間の延長、認知機能の改善及び脳の形態学的安定化は、さらに、CLN2 患者での BMN 190 の投与量に依存した反応性及び治療の可能性を示す。

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。BMN 190 は、ライソゾームのペプチド基質の異化作用という特異的な作用機序の ERT である（Sohar, 2000, Clin.Chem）。BMN 190 は、不活性型で投与され、ライソゾームの酸性条件でのみ活性化される（Lin, 2001, Biochem.J.）。そのため、全身性のオフターゲット効果の可能性はかなり低い。

2.6.2.4 安全性薬理試験

独立した心血管系、呼吸器系又は中枢神経系の安全性薬理試験は実施していないが、心血管系又は中枢神経系に対する評価は、薬理試験及び毒性試験で実施した。BMN 190 の投与に関連した心血管系、呼吸器系又は中枢神経系の有害な影響は、非臨床 6 試験で認められなかった。

2.6.2.4.1 ダックスフンドの心血管系に対する影響（BMN190-12-027 試験）

ダックスフンド CLN2 疾患モデルを用いた反復投与試験（非 GLP 試験）で、心血管系パラメーターも評価した（BMN190-12-027 試験）。心拍数及び心電図測定（P 波振幅、P 波の間隔、PR 間隔、QRS 間隔、R 波振幅、QT 間隔、T 波及び平均電気軸）は、三極誘導（心電図）システムを用いて実施した。標準的な心超音波検査も超音波を使用して全てのイヌに実施した。心血管系パラメーターの測定は、約 6 箇月齢から全ての動物に隔月 1 回実施した。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。したがって、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。心拍数、心電図波形又は心超音波パラメーターに、BMN 190 の投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 カニクイザルの心血管系に対する影響（0190-09-071 試験）

GLP に準拠して実施したカニクイザルの単回脳室内（ICV）投与毒性及び TK 試験（0190-09-071 試験）に組み入れて心血管系パラメーターを評価し、2.6.6.2.1 項に記載した。心電図測定［PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、補正 QT（QTc）間隔、RR 間隔及び心拍数］は、投与前及び投与 1 日目（投与 1、6 及び 24 時間後）に、三極誘導（心電図）システムを用いて 1 回実施した。心拍数又は心電図波形に、BMN 190 の投与に関連した影響は認められなかった。

2.6.2.4.3 呼吸器系に対する影響

呼吸数は直接測定していない。ダックスフンドの 4 試験（0190-09-066 試験、0190-10-077 試験、BMN190-12-009 試験及び BMN190-12-027 試験）、並びにカニクイザルの 2 試験（0190-09-071 試験及び BMN190-011-046 試験）に、BMN 190 の投与に関連した呼吸機能に対する影響の徴候は認められなかった。

2.6.2.4.4 中枢神経系に対する影響

中枢神経系に対する独立した安全性薬理試験は実施していない。しかし、脳室内（ICV）投与、腰部髄腔内（IT-L）投与、又は大槽内（IT-C）投与での反復投与試験（0190-10-077 試験、BMN190-12-009 試験及び BMN190-12-027 試験）で、4、16 又は 48 mg の BMN 190 投与ダックスフンド（TPP1 欠損及び野生型）に毎週、神経学的検査及び臨床検査を実施した。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。疾患進行による中枢神経系の変化は、TPP1 欠損ダックスフンドに運動失調、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認められた。これらの臨床症状は、TPP1 欠損ダックスフンドを用いた疾患モデルに関する文献に記載されている（Awano, 2006, Mol. Genet. Metab）。疾患に関連した神経学的症状の発現は、溶媒投与対照動物に比較して、4 mg の BMN 190 投与動物では約 3.5～11 週間、16 mg の BMN 190 投与動物では約 5～15 週間（投与開始時 4 箇月齢）、16 mg の BMN 190 投与動物では約 10～30 週間（投与開始時 2.5 箇月齢）、及び 48 mg の BMN 190 投与動物では約 15～50 週間、遅延した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

非臨床の効力を裏付ける試験は、TPP1 欠損ヒト線維芽細胞を用いた 1 試験の *in vitro* 試験及び CLN2 薬理学的動物モデルを用いた 5 試験の *in vivo* 反復投与試験（TPP1 ノックアウトマウスでの 1 試験及び TPP1 欠損ダックスフンドでの 4 試験）で検討した。BMN 190 の脳室内又は髄腔内投与を薬理学的に総合判断すると、CLN2 患者への外挿が可能な中枢神経系疾患進行に対して機能的、形態学的及び組織学的な効能が示された。臨床で使用されているデバイスと非常に類似したデバイスを用いて BMN 190 を長期脳室内投与すると、TPP1 欠損ダックスフンドの脳組織全体に分布し、神経学的低下及び MRI で評価した脳の委縮を投与量に依存して遅らせた。BMN 190 は、脳の重要な領域でライソゾーム蓄積物質の蓄積を減少させた。BMN 190 投与 TPP1 ノックアウトマウス及び TPP1 欠損ダックスフンドの両方で、生存期間が延長され、生活の質（QOL）が改善された。

CLN2 の 2 種類の動物モデルである TPP1 ノックアウトマウス及び TPP1 欠損ダックスフンドは、BNM 190 の薬理学的プロファイルを評価するために用いられた。TPP1 ノックアウトマウスで TPP1 活性が復元されると、4 週齢の動物に連日 3 日間の限られた髄腔内投与回数にもかかわらず、ライソゾーム蓄積物質の蓄積を減少し、運動機能の改善及び顕著な生存期間の延長をもたらした。TPP1 欠損ダックスフンドモデルは、比較的大きな脳サイズ、ヒトと類似した脳脊髄液代謝速度、及び神経学的機能をヒトへ外挿する方法で評価することが可能なことを基に、広範囲な薬理活性を評価するために選択された。正常の TPP1 活性を発現するホモ接合性野生型ダックスフンドは、対照動物として、TPP1 欠損ダックスフンドと同時に評価した。BMN 190 未投

与 TPP1 欠損ダックスフンドは、ライソゾーム蓄積物質の蓄積、認知機能及び運動機能の喪失、脳委縮並びに生存期間の短縮などの CLN2 患者の疾患進行の経過を厳密に再現した。

TPP1 欠損ダックスフンドの疾患進行に対する BMN 190 の薬理効果は、姿勢及び歩様を評価するための一般状態の観察、神経学的機能・視覚機能・認知機能、MRI による脳の形態学的変化、脳構造の組織学、自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質の脳への蓄積、及び生存期間の複数の薬理活性パラメーターを用いて評価した。4 箇月齢の TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドに、32 mg の BMN 190 を月 1 回、大槽内投与した 3 箇月間反復投与パイロット試験では、中枢神経系組織へのライソゾーム蓄積物質の蓄積の減少、及び測定したほとんどの中枢神経系組織に、BMN 190 の酵素活性の分布が認められた（0190-09-066 試験）。9 箇月間反復投与薬理試験では、4 及び 16 mg の BMN 190 を、試験開始時 2.5 箇月齢の TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドに 9 箇月間以上隔週で、脳室内持続投与した。一般状態の観察で評価した神経変性に関する臨床症状（歩様及び運動機能）発現までの期間は、溶媒投与対照動物に比較して、4 mg の BMN 190 投与動物では約 3.5～11 週間、及び 16 mg の BMN 190 投与動物では約 10～30 週間遅延した。BMN 190 投与は、T 字型迷路試験に基づく認知機能を維持し、瞳孔対光反射をほぼ正常動物の水準まで増加し、投与量依存的な脳委縮の減少（MRI 評価）をもたらし、生存期間を延長した。

0190-10-077 試験終了後、TPP1 欠損ダックスフンド疾患モデルで、BMN 190 の反復投与試験は継続された。BMN190-12-009 試験では、BMN 190 の高投与量の 48 mg を TPP1 欠損ダックスフンドに投与した。0190-10-077 試験で評価した 16 mg の投与量に比較して、CLN2 症状発現の延長、認知機能の改善及び生存期間の延長が認められ、BMN 190 の用量反応関係及び薬理効果がさらに示された。BMN190-12-027 試験では、BMN 190 の 16 mg の投与量を約 4 箇月齢の TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドに投与した。BMN190-12-027 試験では、溶媒投与対照動物に比較して、疾患発現の遅延及び認知機能の改善が認められたが、2.5 箇月齢で BMN 190 の投与を開始した 0190-10-077 試験及び BMN190-12-009 試験ほどの改善は認められなかった。このことから、CLN2 患者では、できるだけ低年齢で BMN 190 の投与を開始することの重要性が明確に示された。

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 39 週間反復投与薬理試験及びカニクイザルの単回脳室内投与試験に組み込み、中枢神経系及び心血管系機能に対する影響を評価した。ダックスフンドの心血管系、呼吸器系又は中枢神経系、並びにカニクイザルの心血管系に対する BMN 190 の投与に関連する変化は認められなかった。

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された薬理活性パラメーターの多くは、疾患の進行を評価するために臨床で使用されている有効性評価項目であり、歩様及び運動機能（CLN2 評価尺度を使用）並びに脳 MRI 評価を含む。BMN 190 の薬理試験の結果から、正常な脳形態と共に神経機能及び認知機能が維持されると、CLN2 患者の

QOL が向上し、生存期間を延長する可能性が示された。

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 7
2.6.3.4 安全性薬理試験 8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 10

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：BMN 190

試験内容	試験系	投与方法	試験実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
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	TPP1 欠損ヒト線維芽細胞（GM09404A）	*In vitro*	BioMarin Pharmaceutical Inc., Novato, カリフォルニア州 (CA), USA	TR-00195	4.2.1.1-1
3 日間反復腰部髄腔内投与薬理試験	TPP1 ノックアウトマウス	IT-L、ボーラス投与	University of Medicine and Dentistry of New Jersey (UMDNJ), Piscataway, ニュージャージー州 (NJ), USA	BMN190-12-010	4.2.1.1-2
3 ヵ月間反復大槽内投与試験	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	IT-C、ボーラス投与	[redacted] USA	0190-09-066	4.2.1.1-3
39 週間反復脳室内投与試験	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	[redacted] USA	BMN190-12-027[a]	4.2.1.1-6
9 ヵ月間反復脳室内投与試験	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、2 又は 4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	[redacted] USA	0190-10-077[b]	4.2.1.1-4
44 週間隔週反復脳室内投与試験	TPP1 欠損ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	[redacted] USA	BMN190-12-009[b]	4.2.1.1-5
副次的薬理試験					
	実施試験なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし

試験内容	試験系	投与方法	試験実施施設	試験番号	CTD 記載箇所
安全性薬理試験					
39 週間反復脳室内投与試験：中枢神経系/心血管系	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与	[redacted] USA	BMN190-12-027[a]	4.2.1.1-6
9 ヵ月間反復脳室内投与試験：中枢神経系	TPP1 欠損及び野生型ダックスフンド	ICV、2 又は 4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	[redacted] USA	0190-10-077[b]	4.2.1.1-4
44 週間隔週反復脳室内投与試験：中枢神経系	TPP1 欠損ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	[redacted] USA	BMN190-12-009[b]	4.2.1.1-5
安全性薬理試験：心血管系	カニクイザル	ICV、4 時間持続投与	[redacted] USA	0190-09-071[c,d]	4.2.3.1-1
薬力学的薬物相互作用試験					
	実施試験なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし

(rh) TPP1：(遺伝子組換えヒト) トリペプチジルペプチダーゼ 1、IT-L：腰部髄腔内、ICV：脳室内、IT-C：大槽内。

[a] ダックスフンド反復投与毒性試験は、中枢神経系及び心血管系安全性薬理評価項目を組み入れて実施した。この反復投与試験では、眼科検査、瞳孔対光反射、網膜電図、視覚誘発電位、光コヒーレンストモグラフィ、MRI（脳室容積及び全脳容積）、並びに認知機能試験（T 字型迷路）のほかの薬理活性パラメーターを測定した。2.6.2 項 薬理試験の概要文を参照。

[b] ダックスフンド反復投与毒性試験は、中枢神経系安全性薬理評価項目を組み入れて実施した。この反復投与試験では、眼科検査、瞳孔対光反射、網膜電図、視覚誘発電位、MRI（脳室容積及び全脳容積）、並びに認知機能試験（T 字型迷路）のほかの薬理活性パラメーターを測定した。2.6.2 項 薬理試験の概要文を参照。

[c] カニクイザルの単回投与毒性試験は、心血管系安全性薬理評価項目を組み入れて実施した。

[d] 生存期間試験は、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。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：BMN 190

試験内容	動物種/系統	投与方法	投与量（/回）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	CTD 記載箇所
rhTPP1（BMN 190）の TPP1 欠損ヒト線維芽細胞内取込み量の測定	TPP1 欠損ヒト線維芽細胞（GM09404A）	*In vitro*	0.625～20 nmol/L	n = 3	K_{uptake} = ~3.1 nmol/L	TR-00195	4.2.1.1-1
3 日間反復腰部髄腔内投与薬理試験	TPP1 ノックアウトマウス	IT-L、ボーラス投与	0.8 mg 1 日 1 回 3 日間 0.4 mg 1 日 1 回 3 日間	n = 6 n = 16	BMN 190 は TPP1 ノックアウトマウスに ITL 投与すると脳に分布し、脳ホモジネートの TPP1 酵素活性は野生型マウス内因性 TPP1 酵素活性の最大 500%まで増加した。BMN 190 投与は、投与を行っていない対照動物及び溶媒投与対照動物（4 週齢）の生存期間をそれぞれ、平均で 32%及び 44%延長した。	BMN190-12-010	4.2.1.1-2
3 ヵ月間反復大槽内投与試験	TPP1-/-イヌ/ダックスフンド	IT-C、ボーラス投与	32 mg 月 1 回 3 箇月間	雄 1	TPP1 欠損イヌ（4 箇月齢）に BMN 190 を IT-C 反復ボーラス投与すると、CLN2 進行の鍵となる自家蛍光を発するライソゾーム蓄積物質の蓄積が減少した。	0190-09-066	4.2.1.1-3
39 週間反復脳室内投与試験	TPP1-/-イヌ/ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	最高 16 mg 隔週	雄 2/雌 1	TPP1 欠損ダックスフンド（4 箇月齢）に BMN 190 を ICV 持続投与すると、認知機能は改善され、CLN2 の臨床症状発現時期は溶媒投与対照動物に比べ遅延したが、2.5 箇月齢で同様の投与を開始した場合に比較して改善効果は減少した。	BMN190-12-027	4.2.1.1-6

試験内容	動物種/系統	投与方法	投与量（/回）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	CTD 記載箇所
9 ヵ月間反復脳室内投与試験	TPP1-/-イヌ/ダックスフンド	ICV、2 又は 4 時間持続投与、 IT-L、4 時間持続投与、 IT-C、ボーラス投与	4 mg, 16 mg 隔週	n = 3 （雌雄）	BMN 190 反復 ICV/IT-L/IT-C 投与は、神経変性症状発現の遅延、神経学的機能の改善、脳形態の安定化及び生存期間の延長で評価される TPP1 欠損ダックスフンド（2.5 箇月齢）の疾患進行を顕著に抑制した。BMN 190 投与イヌでは、認知機能も改善された。	0190-10-077	4.2.1.1-4
44 週間隔週反復脳室内投与試験	TPP1-/-イヌ/ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、 IT-L、4 時間持続投与、 IT-C、ボーラス投与	最高 48 mg 隔週	雄 1/雌 2	48 mg の投与量の BMN 190 を隔週で ICV 投与すると、16 mg で観察された以上の CLN2 の進行の抑制を示した。投与に関連した生存期間の延長、認知機能の改善及び脳の形態学的安定化は、さらに、CLN2 患者での BMN 190 の投与量に依存した反応性及び治療の可能性を示す。	BMN190-12-009	4.2.1.1-5

(rh) TPP1：(遺伝子組換えヒト) トリペプチジルペプチダーゼ 1、 K_{uptake}：細胞内取込み量が最大取込み量の 1/2 となる濃度：非臨床試験で使用された BMN 190 各ロットの値の平均値、IT-L：腰部髄腔内、IT-C：大槽内、CLN2：セロイドリポフスチン症 2 型、ICV：脳室内。

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：BMN 190

評価対象となる組織	動物種/系統	投与方法[a]	投与量（mg/回）	性別及び動物数/群（遺伝子型、投与量）	特記すべき所見	GLP	試験番号	CTD 記載箇所
中枢神経系/心血管系	イヌ/ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	16	雄 2/雌 1（TPP1 欠損） 雄 2/雌 1（野生型）	なし NOAEL：NA	非適用	BMN190-12-027[b]	4.2.1.1-6
中枢神経系	イヌ/ダックスフンド	ICV、2 又は 4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	0, 4, 16	雄 1/雌 3（野生型、0） 雄 2/雌 1（野生型、4） 雄 1/雌 2（野生型、16） 雄 2/雌 1（TPP1 欠損、0） 雄 2/雌 1（TPP1 欠損、4） 雌 3（TPP1 欠損、16）	なし NOAEL：16 mg	非適用	0190-10-077[c]	4.2.1.1-4
中枢神経系	イヌ/ダックスフンド	ICV、4 時間持続投与、IT-L、4 時間持続投与、IT-C、ボーラス投与	48	雄 1/雌 2（TPP1 欠損）	なし NOAEL：48 mg	非適用	BMN190-12-009[c]	4.2.1.1-5
心血管系[d]	サル/カニクイザル	ICV、4 時間持続投与（単回投与）	0, 5, 14, 20	雌 3（0） 雌 3（5） 雌 3（14） 雌 3（20） 雌 2（0） 雌 3（14） 雌 3（14）	なし NOAEL：20 mg	適用[e]	0190-09-071[f]	4.2.3.1-1

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、ICV：脳室内、IT-L：腰部髄腔内、IT-C：大槽内、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、NOAEL：無毒性量、NA：該当なし。

[a] ICV/IT カテーテルのイヌでの開存性は限定的であった。ICV カテーテルが開存している限り、ICV 投与経路を使用した。ICV カテーテルの開存性が失われた場合は、IT-L 投与経路を使用した。IT-L カテーテルの開存性が失われた場合は、IT-C ボーラス投与を実施した。

[b] ダックスフンド反復投与毒性試験は、中枢神経系及び心血管系安全性薬理評価項目を組み入れて実施した。この反復投与試験は、眼科検査、瞳孔対光反射、網膜電図、視覚誘発電位、光コヒーレンストモグラフィ、MRI（脳室容積及び全脳容積）、並びに認知機能試験（T 字型迷路）のほかの薬理活性パラメーターを測定した。2.6.2 項 薬理試験の概要文を参照。

[c] ダックスフンド反復投与毒性試験は、中枢神経系安全性薬理評価項目を組み入れて実施した。この反復投与試験は、眼科検査、瞳孔対光反射、網膜電図、視覚誘発電位、MRI（脳室容積及び全脳容積）、並びに認知機能試験（T 字型迷路）のほかの薬理活性パラメーターを測定した。2.6.2 項 薬理試験の概要文を参照。

[d] 試験は 7 群で実施した。 第 1、2、3 及び 4 群（それぞれ投与量は、0、5、14 及び 20 mg /回）は、雌 3 匹/群で各群は投与 15 日目に剖検した。第 5 群は雌 2 匹（投与量 0 mg /回）で、投与 4 日目に 1 例を剖検し、投与 8 日目に 1 例を剖検した。第 6 及び第 7 群（投与量 14 mg/回）は雌 3 匹/群で、投与 4 日目（第 6 群）及び投与 8 日目（第 7 群）に剖検した。

[e] 生存期間試験は、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。

[f] カニクイザルの単回投与毒性試験は、心血管系安全性薬理評価項目を組み入れて実施した。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。