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

2.6.6　毒性試験の概要文

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文....6
2.6.6.1 まとめ....6
2.6.6.2 単回投与毒性試験....10
2.6.6.2.1 カニクイザルにおける単回脳室内投与毒性、TK 及び CNS 分布試験並びに 3、7 及び 14 日間回復性試験....10
2.6.6.2.2 BMN 190 のカニクイザルにおける単回腰部髄腔内投与毒性、TK 及び CNS 分布試験....15
2.6.6.3 反復投与毒性試験....18
2.6.6.3.1 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドにおける 3 ヵ月間反復大槽内投与毒性、CNS 分布及び薬理学的試験....18
2.6.6.3.2 野生型及び TPP1 欠損ダックスフンドにおける 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理、毒性及びトキシコキネティクス試験....21
2.6.6.3.3 BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルを用いた 44 週間隔週脳室内持続投与試験....32
2.6.6.3.4 BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルを用いた 39 週間脳室内持続投与試験....40
2.6.6.4 遺伝毒性試験....49
2.6.6.5 がん原性試験....49
2.6.6.6 生殖発生毒性試験....49
2.6.6.7 局所刺激性試験....49
2.6.6.8 その他の毒性試験....50
2.6.6.8.1 免疫毒性....50
2.6.6.8.2 不純物....50
2.6.6.9 考察及び結論....50

表目次

表 2.6.6.1.1: BMN 190 の毒性試験一覧....7
表 2.6.6.2.1.1: カニクイザルにおける単回脳室内投与毒性、TK 及び CNS 分布試験の デザイン....10
表 2.6.6.2.1.2: BMN 190 の単回脳室内投与後の脳脊髄液中 TK パラメーター平均値....13
表 2.6.6.2.1.3: BMN 190 の単回脳室内投与後の血漿中 TK パラメーター平均値....13
表 2.6.6.2.1.4: BMN 190 の 14 mg 単回持続脳室内投与後の CNS 組織内 TK パラメーター平均値....14
表 2.6.6.2.2.1: カニクイザルにおける単回腰部髄腔内投与毒性、TK 及び分布試験のデザイン....15
表 2.6.6.2.2.2: BMN 190 の単回腰部髄腔内投与後の TK パラメーター平均値....17

表 2.6.6.3.1.1: TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドにおける反復大槽内投与試験のデザイン 18
表 2.6.6.3.2.1: 野生型及び TPP1 欠損イヌにおける 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理、毒性及び TK 試験のデザイン 22
表 2.6.6.3.2.2: 0190-10-077 試験において動物を安楽死させた理由 26
表 2.6.6.3.2.3: 脳室内投与後の脳の組織学的変化のまとめ 27
表 2.6.6.3.2.4: TPP1 欠損動物の前頭葉における CLN2 疾患関連所見のまとめ 28
表 2.6.6.3.2.5: BMN 190 の脳脊髄液中 TK パラメーターのまとめ [a)] 29
表 2.6.6.3.2.6: BMN 190 の血漿中 TK パラメーターのまとめ [a)] 30
表 2.6.6.3.3.1: ダックスフンド CLN2 モデルにおける 44 週間隔週脳室内持続投与試験のデザイン 32
表 2.6.6.3.3.2: BMN190-12-009 試験における BMN 190 の投与履歴 33
表 2.6.6.3.3.3: BMN190-12-009 試験で検査した臨床病理学パラメーター 34
表 2.6.6.3.3.4: BMN 190 の初回 48 mg 脳室内持続投与後の脳脊髄液中 TK パラメーター 38
表 2.6.6.3.3.5: BMN 190 の初回 48 mg 脳室内持続投与後の血漿中 TK パラメーター 38
表 2.6.6.3.3.6: 脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体パラメーターのまとめ 39
表 2.6.6.3.3.7: 血漿中の抗 BMN 190 抗体パラメーターのまとめ 39
表 2.6.6.3.4.1: BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルを用いた 39 週間脳室内投与試験の デザイン 41
表 2.6.6.3.4.2: BMN190-12-027 試験の動物における BMN 190 の投与履歴 42
表 2.6.6.3.4.3: BMN190-12-027 試験で検査した臨床病理学パラメーター 43
表 2.6.6.3.4.4: BMN 190 の単回 16 mg 脳室内持続投与後の脳脊髄液中 TK パラメーター 46
表 2.6.6.3.4.5: BMN 190 の初回 16 mg 脳室内持続投与後の血漿中 TK パラメーター 46
表 2.6.6.3.4.6: 脳脊髄液中の抗体パラメーターのまとめ 47
表 2.6.6.3.4.7: 血漿中の抗体パラメーターのまとめ 48

図目次

図 2.6.6.2.1.1: 0190-09-071 試験において脳組織分布解析に使用した組織採取の模式図 12
図 2.6.6.3.1.1: BMN 190 を大槽内投与したイヌにおける脳脊髄液及び血漿中の 抗 BMN 190 抗体価 21
図 2.6.6.3.2.1: BMN 190 を投与したダックスフンドにおける脳脊髄液及び血漿中の 抗 BMN 190 抗体価 31
図 2.6.6.3.3.1: 脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体価 39
図 2.6.6.3.3.2: BMN 190 の脳室内／髄腔内投与後のダックスフンド脳組織中の BMN 190 平均濃度 40
図 2.6.6.3.4.1: 抗 BMN 190 抗体価（脳脊髄液及び血漿） 47

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）
aCSF	artificial cerebrospinal fluid	人工脳脊髄液
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AUC	area under concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	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
AUC_{0-t}	area under concentration-time curve from zero to time t	時間 0 から最終定量可能時間までの濃度-時間曲線下面積
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
CL	clearance	クリアランス
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
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ECG	electrocardiogram	心電図
ECLA	electrochemiluminescence immuno assays	電気化学発光免疫測定法
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
ERT	enzyme replacement therapy	酵素補充療法
F	female	雌
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GFAP	glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性タンパク質
GGT	gamma-glutamyl transferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
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
IBA1	a marker of microgliosis/microglia	小膠細胞マーカー
ICV	intracerebroventricular	脳室内
IT-C	intrathecal-cisternal	大槽内
IT-L	intrathecal-lumbar	腰部髄腔内
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
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
M	male	雄
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量

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）
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
n, N	number	例数
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
PD	pharmacodynamics	薬力学
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
SOP	standard operating procedure	標準操作手順書
$t_{1/2}$	half life	半減期
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum concentration following administration	最高濃度到達時間
TPP1	tripeptidyl peptidase-1	トリペプチジルペプチダーゼ 1
UMDNJ	University of Medicine and Dentistry of New Jersey	ニュージャージー医科歯科大学
V_z	volume of distribution based on terminal phase	終末相に基づく分布容積
WT	wild type	野生型（正常）
%CV	percent coefficient of variation	変動係数

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

BMN 190 は、バッテン病の一種であるセロイドリポフスチン症 2 型（CLN2）の患者に、ライソゾーム酵素補充療法（ERT）として長期投与を目的とする、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。BMN 190 は CLS2 患者に脳室内（ICV）投与され、中枢神経系（CNS）に広く分布することが期待される。他の酵素補充療法では、腰椎のレベルで髄腔内投与され CNS に到達する（Felice, 2011, Toxicol. Pathol.、Dickson, 2011, Curr Pharm Biotechnol）が、BioMarin 社の実施した非臨床試験では、ICV 投与で優れた CNS 分布が示された。BMN 190 は CNS 細胞に取り込まれたうえで、ライソゾームに輸送されて活性型 TPP1 に変換され、それによって CLN2 患者で不足する酵素を補充する。この結果生じるライソゾーム蓄積物質の除去により、疾患進行の緩和と神経系減退の防止が期待される。

カニクイザルを用いた単回投与 2 試験、及びダックスフンド［野生型（正常）及び TPP1 欠損］を用いた最長 18 箇月間の反復投与 4 試験の合計 6 種の *in vivo* 試験により、BMN 190 の非臨床毒性プロファイルを評価した。ダックスフンドの反復投与試験では、薬理学的及び毒性学的エンドポイント、免疫原性並びにトキシコキネティクス（TK）パラメーターを評価した。非臨床毒性試験における主要な所見は、サル及びイヌの CNS カテーテル及び注入部位に隣接した投与器具に関連する炎症、並びにイヌにおける異種ヒトタンパク質の反復投与後にみられた過敏症反応であった。CNS カテーテルに隣接した炎症は、溶媒対照群を含む全ての動物で認められ、CNS に異物である器具を長期間留置することによって生じる予期された結果である（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。ヒトの ERT 薬をイヌに投与した場合に過敏症反応は一般的にみられ（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関連している可能性が高い。これらの毒性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や、急速なライソゾーム蓄積物質の除去のような、過度の薬理作用による毒性は観察されなかった。BMN 190 の毒性試験の一覧を表2.6.6.1.1 に示す。イヌのCLN2 モデルを使用した試験は、一般的に許容される科学的基準に従って、[redacted]米国[redacted]で実施した。[redacted]はGLP 適合施設ではないため、試験は GLP 適用で実施しなかった。しかし、試験委託者によりGLP 適合試験と同等の厳格な文書管理及び試験のモニタリングが実施されている。

表 2.6.6.1.1: BMN 190 の毒性試験一覧

試験の種類及び試験番号	動物種	投与経路	投与レジメン	投与量（mg）	GLP 適合
単回投与毒性					
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）	カニクイザル	ICV：4 時間持続投与	単回投与、回復性 3、7 及び 14 日間	0, 5, 14, 20	適 [a]
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）	カニクイザル	IT-L：4 時間持続投与	単回投与、回復性 3 日間	14	不適
反復投与毒性					
3 ヵ月間反復大槽内（IT-C）投与毒性、CNS 分布及び薬理試験 [b, c]（0190-09-066）	TPP1 欠損及び正常ダックスフンド	IT-C：ボーラス投与	月 1 回投与、3 箇月間	0, 32	不適
正常及び TPP1 欠損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 [b, d, e, f]（0190-10-077）	TPP1 欠損及び正常ダックスフンド	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、少なくとも 9 箇月間	0, 4, 16	不適
BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルにおける 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験 [b, d, e, f]（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：遅いボーラス投与	隔週、最長 18 箇月間	最高 48 mg	不適
BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルにおける 39 週間脳室内（ICV）持続投与試験 [b, c, d, f]（BMN190-12-027）	TPP1 欠損及び正常ダックスフンド	ICV：4 時間持続投与 IT-L：4 時間持続投与 IT-C：遅いボーラス投与	隔週、最長 6 箇月間	最高 16 mg	不適

ICV：脳室内、IT-C：大槽内、IT-L 腰部髄腔内、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT：野生型（正常）

a) 試験の in-life 部分は、米国食品医薬品局 GLP 基準"Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58"、厚生労働省 GLP 基準厚生省令第 21 号及び経済協力開発機構（OECD）GLP 基準"ENV/MC/CHEM(98)17"に従って実施した。

b) TPP1 欠損ダックスフンドにおける反復投与毒性評価は、2.6.2 項に示した効力を裏付ける試験及び 2.6.4 項に示した TK 評価と組み合わせて実施した。

c) イヌは試験開始時に約 4 箇月齢であった。

d) イヌの CNS 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 ルートを使用した。

e) イヌは試験開始時に約 2.5 箇月齢であった。

f) 過敏症反応を緩和するために、イヌの投与 30 分前にジフェンヒドラミン 2 mg/kg（筋肉内）の前投与を行った。

BMN 190 の非臨床毒性評価には、2 種の非げっ歯類、ダックスフンド及びカニクイザルを使用した。CLN2 患者と類似した疾患背景での毒性を検討するため、TPP1 欠損ダックスフンドを利用した。CLN2 患者では神経変性が急速に進行するため、この疾患動物モデルでは CNS に対

する安全性を、CLN2 疾患の進行と類似した疾患背景に関連して評価することが可能となる。BMN 190 の安全性に関する所見を疾患の進行による所見と区別するために、対照動物として正常ダックスフンドも並行して評価した。CNS 及び全身器官で BMN 190 の酵素活性により急速に除去されるライソゾーム蓄積物質の毒性を明らかにするため、BMN 190 の安全性評価に TPP1 欠損ダックスフンドを組み込んだ。カニクイザルは半直立姿勢をとり、CNS の解剖学的構造及び脳脊髄液の産生がヒトに類似する（Giedd, 1996, Cereb. Cortex）ことから、非病態動物種として毒性試験に使用した。イヌ及びサルの TPP1 はいずれも、ヒトの TPP1 とアミノ酸配列が高度に一致している（イヌ 95%、サル 98%）（Wlodawer, 2003, BMC. Struct. Biol.）。イヌ及びサルは、BMN 190 の細胞への取り込みに重要なカチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CI-M6PR）を発現しており（イヌ及びサルの CI-M6PR は、アミノ酸配列がヒトと比較して、それぞれ 86% 及び 98%一致する）、BMN 190 は細胞内でライソゾームに移送され、酸性環境で活性化される（Coutinho, 2012, Mol. Genet. Metab.）。

非臨床毒性試験では、CNS に薬剤を直接搬送するために、投与経路として脳室内（ICV）、大槽内（IT-C）又は腰部髄腔内（IT-L）投与を行った。ICV 又は IT-L 持続投与では、カテーテル及び投与ポートをそれぞれ側脳室又は腰部脊髄に埋め込んだ。主要な動物試験に使用した ICV カテーテル及びポートは、原理及びデザイン的に臨床で使用される CNS 配送システムと類似している。IT-C 投与では、大槽内にボーラス投与した。ICV 投与試験におけるサル及びダックスフンドの投与量は、試験時の時間最大許容液量、持続投与時間及び可能な BMN 190 の最大濃度を基に設定した。非臨床試験で観察された BMN 190 の CNS 組織半減期、K_{uptake} 率及び脳脊髄液中の薬物動態（PK）を基に、投与レジメンを隔週投与とした。

小児患者集団への長期投与を担保するために、正常及び TPP1 欠損ダックスフンドの長期反復投与試験は幼若動物で実施した。0190-10-077 試験及び BMN190-12-009 試験に使用した動物の月齢は、ICV 及び IT-L カテーテル埋込みの制約から、試験開始時に使用可能な最若の約 2.5 箇月齢であった。疾患の進行及び／又は髄膜炎や閉塞性水頭症等カテーテルの長期間留置に伴う影響のため、動物を安楽死させる必要のある 9～18 箇月間（動物が 11～20.5 箇月齢に到達するまで）、長期間投与を継続した。カテーテル開存の問題は、1) 幼若動物の連続的な成長又は 2) これらの動物の活動レベルに関連する可能性が考えられる。不完全な無菌操作が髄膜炎に関与している可能性が高い。このイヌの投与期間は、ヒトではおおよそ 2～20 歳の期間に相当する（Wood, 2003, Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.）。

成長中の幼若動物に遺伝子組換えタンパク質を ICV カテーテルにより脳脊髄液内へ長期反復投与する際の技術的課題として、良質の非臨床データを得るために特別な技能と注意深いモニタリングが必要である。幼若ダックスフンドを用いる長期間試験では、動物の成長、解剖学的指標の移動及び予想されるカテーテル開存性の欠如に適応するため、複数の CNS 投与経路（ICV、IT-L 及び IT-C）が必要となる。ICV カテーテルが開存を失った場合、IT-L カテーテルにより BMN 190 の投与を継続した。ICV 及び IT-L の両カテーテルが閉塞した場合には、IT-C ボーラス注射により投与を継続した。

TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を反復投与後に、過敏症反応が観察された。イヌはヒト遺伝子組換え ERT 薬の投与に感受性が高いことが知られており、しばしば過敏症反応を示す

（Shull, 1994, Proc Natl Acad Sci USA、Brooks, 1999, Mol Genet Metab）。動物の感受性を抑えるために、投与時間の延長及び／又は BMN 190 投与量の緩徐な増量により、過敏症反応をうまく緩和する投与レジメンが開発された。イヌでは抗 BMN 190 抗体が産生されたにもかかわらず、最長 18 箇月間の投与後に BMN 190 に関連した CNS 又は全身性の組織学的変化などの、免疫複合体の関連した病理変化はみられなかった。それに加えて、イヌでは脳脊髄液及び血漿中に抗 BMN 190 抗体が存在するにもかかわらず、薬理活性が持続した。

190-10-077 試験及び BMN190-12-027 試験では、CLN2 病態の進行がない状態で BMN 190 に関連する毒性を評価するため、正常な TPP1 活性を有する野生型ホモのダックスフンドを組み込んだ。正常及び TPP1 欠損ダックスフンドを用いた長期反復投与試験（0190-10-077、BMN190-12-009 試験及び BMN190-12-027 試験）では、各投与量及び遺伝子型について 1 群の動物数を 3 例とした。TPP1 欠損イヌでは CLN2 患者と類似して、神経疾患の進行が小さなばらつきでよく保持されている。したがって、薬理学的及び毒性学的影響を評価するために、1 群 3 例の動物数で十分である。TPP1 欠損ダックスフンド又はヒト CLN2 患者では、雌雄の臨床経過に差異がないことから、長期間試験では雌雄別の評価を行わなかった。

ICV 投与試験におけるサル及びダックスフンドの最高投与量は、試験開始時の BMN 190 の上限濃度、投与速度及び投与時間を基に設定した。頭蓋内圧への有害作用及び動物の麻酔時間を最小とするよう、投与条件を設定した。脳脊髄液中に持続投与する場合の最高投与量は、ダックスフンドで 48 mg/dose、サルで 20 mg/dose であった。

BMN 190 のカニクイザルにおける単回 ICV 投与毒性及び TK 試験は、米国、OECD 及び日本の GLP 基準に従って実施した。カニクイザルにおける IT-L 単回投与毒性及び TK 試験は、試験施設の標準操作手順書（SOP）に従って実施した。これらのサルを用いた試験は、CNS への薬剤搬送に特化した受託研究機関である[redacted]米国[redacted]で実施した。非 GLP のダックスフンドにおける反復投与試験は、この大動物病態モデルの唯一のコロニーを有する[redacted]で実施した。[redacted]はGLP 適合施設ではないことから、試験は一般的に許容される科学的基準に従って実施した。さらに、[redacted]の試験では、GLP 試験の実施と同様に厳格な文書管理及び試験委託者のモニタリングが実施されている。試験の質及び試験間で病理組織評価の一貫性を保つため、CNS の病理学的評価は神経学を専門とする有資格獣医病理学者が行った。病理組織学的評価の一貫性を保つため、全てのBMN 190 の毒性試験について、同一の病理学者がCNS の病理組織学的検査を実施した。加えて、0190-10-077 試験の数例及び BMN190-12-009 試験の全例の動物について、同一の有資格獣医病理学者が全身器官の広範な病理組織学的検査を行った。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 カニクイザルにおける単回脳室内投与毒性、TK 及び CNS 分布試験並びに 3、7 及び 14 日間回復性試験

（試験番号 0190-09-071、記載箇所 4.2.3.1-1、参考資料）

試験の目的及びデザイン：

BMN 190 をサルに単回脳室内持続投与し、毒性評価及び TK パラメーターの測定、並びに 3、7 及び 14 日間の回復期間における回復性又は毒性所見の持続及び遅発作用の発現を検討する目的で本GLP 試験を実施した。さらに、心血管系パラメーター及びBMN 190 のCNS 分布を検討した。本試験は米国、日本及びOECD のGLP 基準に従って[redacted]で実施した。試験は 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始し、 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。本試験の成績は試験報告書0190-09-071 に記載されており、表2.6.6.2.1.1 に試験デザインを示す。

表 2.6.6.2.1.1: カニクイザルにおける単回脳室内投与毒性、TK 及び CNS 分布試験のデザイン

群	処理	投与量（mg）	投与液濃度（mg/mL）	動物数	剖検時期（投与後時間）
1	溶媒 a)	0	0	3	336
2	BMN 190 b)	5	1.39	3	336
3	BMN 190 c)	14	3.9	3	336
4	BMN 190 d)	20	5.6	3	336
5	溶媒 a)	0	0	2	72（1 例） 168（1 例）
6	BMN 190 e)	14	3.9	3	72
7	BMN 190 e)	14	3.9	3	168

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、ロット番号[redacted]
c) BMN 190、ロット番号[redacted]
d) BMN 190、ロット番号[redacted]
e) BMN 190、ロット番号[redacted]

材料と方法：

試験開始時に3～9歳齢、体重2.98～5.29 kgの中国産未処置カニクイザル（供給：[redacted]）の雌を試験に使用した。表2.6.6.2.1.1 に示す各群の動物に、溶媒又はBMN 190 を投与した。動物にはBMN 190 を持続投与するため左側脳室に、脳脊髄液を連続採取するため腰部脊髄にカテーテル埋め込み手術を施した。核磁気共鳴画像法（MRI）により、目標とする左側脳室のカテーテル埋め込み座標を設定した。イソフルラン麻酔下で頭蓋背部を矢状切開し、開頭してポリウレタンカテーテルを挿入した。脳定位固定法により、側脳室内のカテーテル留置位置を決定した。歯科用アクリル樹脂でカテーテルを頭蓋骨頂に固定し、皮下アクセスポートを接続した末端を肩甲骨部に設置した。[redacted]）を使用した脳室X 線写真で、カテーテル位置を確認した。腰部カテーテル埋め込みのため、L4、L5 又はL6 脊椎突起の位置で切開し、筋肉を切

断して片側椎弓切除によりポリウレタンカテーテルを挿入した。カテーテルを胸部・腰部結合部位まで進め、適切な位置に歯科用アクリル樹脂で固定した。カテーテルの末端を背部とし、脳脊髄液採取のため皮下アクセスポートを接続した。カテーテルを固定する前に脳脊髄液を採取して、位置が適切であることを確認した。動物には、外科手術から BMN 190 又は溶媒の投与まで、少なくとも 7 日間の回復期間を設けた。

動物に BMN 190（BMN 190 3.6 mL 投与後、リン酸緩衝生理食塩液 0.5 mL）又は溶媒（溶媒 3.6 mL 投与後、リン酸緩衝生理食塩液 0.5 mL）を、脳脊髄液中の曝露量が最大となるよう、0.88 mL/時間の割合で約 4 時間かけて単回脳室内持続投与した。この投与速度は、1 時間当たり総脳脊髄液量（約 15 mL）の約 5%を持続投与することに相当する。5 及び 20 mg 投与群の動物には、14 日間の回復期間を設けた。14 mg 投与群の動物には、遅発性作用の発現、持続及び／又は回復性を継続して評価するため、3、7 又は 14 日間の回復期間を設けた。

動物の一般症状若しくは健康状態を毎日、病的状態及び生死を 1 日 2 回観察した。体重を手術日の術前、投与日、観察期間及び回復期間中に週 1 回、並びに剖検日に測定した。摂餌量は術前から開始して、毎日評価した。四肢誘導（I、II、III 誘導）により心電図（ECG 波形及び心拍数）を投与前に 1 回、並びに投与後 1、6 及び 24 時間に記録した。標準的な血液学的検査、血液生化学的検査及び凝固能検査のため、投与前及び剖検時に絶食状態の動物から血液サンプルを採取した。標準的な細胞数計測及び化学的検査のため、投与前、投与後 24 時間及び剖検時に脳脊髄液を採取した。尿検査用サンプルは投与前及び剖検時に採取した。

TK 解析用の血漿及び脳脊髄液を試験 1 日目の投与前、投与後 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72、96、144、168、216、264 及び 336 時間に採取した。BMN 190 のTK 解析は、ELISA 法（血漿及び脳脊髄液中の定量下限［LLOQ］[redacted]ng/mL）を用いて実施した。抗BMN 190 抗体価測定のため、血液及び脳脊髄液サンプルを剖検時に採取した。

溶媒又は BMN 190 の 14 mg を投与した動物は、早期及び遅発性の CNS 毒性の評価、並びに CNS 分布の経時的評価が可能となるよう 4、8 及び 15 日目に剖検した（溶媒：第 1 及び 5 群、BMN 190：第 3、6 及び 7 群）。BMN 190 の 5 又は 20 mg を投与した動物（それぞれ第 2 及び 4 群）は、用量反応性の評価のため 15 日目に剖検した。動物は全身を剖検し、毒性評価のため標準的な組織を採取した。一部の器官（副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、脾臓、胸腺及び甲状腺・上皮小体）は重量を測定した。各動物から採取した標準的な組織は全て、病理組織学標本を作製した。さらに、脳及び脊髄については、CNS の病理組織学的検査及び BMN 190 の分布を検討するため、以下に示すように処理した。

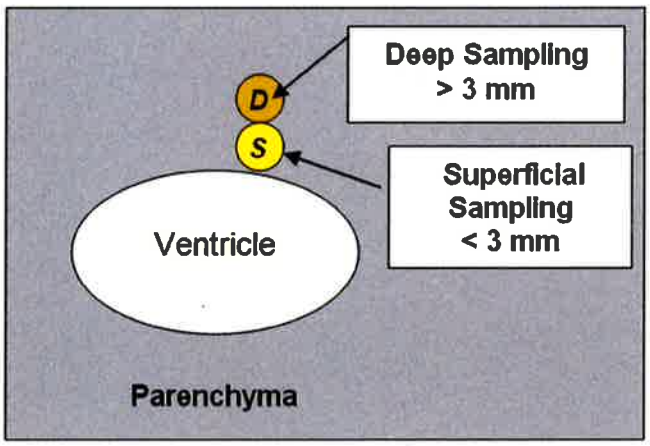
脳は、固定・保存のため冠状に 3 mm の厚さで連続して切断、パラフィン包埋し、5 μm に薄切してヘマトキシリン及びエオシン（一般的な HE 組織染色）で染色した。溶媒対照群及び BMN 190 20 mg/kg 投与群の動物の脳は、Fluoro-Jade B 染色（神経変性検出のため）、ビルショウスキー銀染色（軸索、樹状突起及びニューロフィラメント可視化のため）、並びにグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）免疫染色（星状膠細胞特異的免疫染色）を施した。

脊髄、脊髄の背根神経・背根神経節及び腹根神経は、3 部位で切断し（頸部、胸部中央及び腰部の横断面及び斜断面で評価）、HE 染色を施した。溶媒対照群及び 20 mg/kg 群の脊髄連続切片、並びに背根神経・神経節及び腹根神経の切片もビルショウスキー銀染色を行った。坐骨神

経、脛骨神経及び腓腹神経（三叉神経節）は、縦断切片を HE 染色した。各神経の横断切片を（ミエリン保存のため）オスミウムで後固定、Spurr 樹脂に包埋して、トルイジンブルー染色を施した。CNS の病理組織学的検査は、CNS を専門とする有資格の獣医病理学者が担当した。

脳及び脊髄の解剖学的領域（大脳皮質、線条体、視床、中脳、後頭皮質、延髄及び小脳、並びに頸部、胸部及び腰部脊髄）の一部を使用して、BMN190の組織分布を検討した。図2.6.6.2.1.1に示すように、各解剖学的領域から表面（深さ 3 mm 未満）及び深部（深さ 3 mm 超）組織を 4 × 4 mm 型抜き採取した。表面組織サンプルは脳脊髄液が浸透する基部に位置し、深部組織サンプルは脳脊髄液浸透の末梢部に位置する。組織サンプルをホモジナイズして、ELISA 法（組織ホモジネート中のLLOQ [redacted]ng/mL）によりBMN 190 濃度を測定した。

図 2.6.6.2.1.1: 0190-09-071 試験において脳組織分布解析に使用した組織採取の模式図



BMN 190 組織分布の検討のため、脳の各部位から表面及び深部組織を採取した。表面組織のサンプルは脳脊髄液が浸透する最も近位部に位置し、BMN 190 の注入部位である側脳室、すなわち脳を取り巻く脳脊髄液のコンパートメントから深さ 3 mm 未満の部位である。深部サンプルは脳脊髄液が浸透する最も遠位部に位置し、注入部位である側脳室、すなわち脳を取り巻く脳脊髄液のコンパートメントから深さ 3 mm 超の部位である。

結果：

全ての動物が予定剖検日まで生存した。試験期間を通して BMN 190 投与に関連した一般症状、体重及び摂餌量の変化はみられなかった。BMN 190 に関連した心電図パラメーター［PR 間隔、QRS 持続時間、QT 間隔、補正 QT（QTc）間隔、RR 間隔及び心拍数］の変化は認められなかった。血液学的検査、血液生化学的検査、凝固能検査及び尿検査パラメーターのいずれにおいても、BMN 190 に関連した変化は観察されなかった。脳脊髄液の細胞数計測及び化学的検査で、BMN 190 投与の影響は認められなかった。溶媒対照群を含む全ての群で、投与 24 時間後に脳脊髄液中の白血球（主に好中球）数が一過性に増加したが、BMN 190 投与とは関連がないと考えられた。BMN 190 14 mg を投与した動物の 9 例中 5 例で、投与 24 時間後に統計学的有意差のない、軽度の脳脊髄液中タンパク質及びアルブミンの増加が認められた。この変化に用量反応性は認められなかった。

BMN 190 に関連した絶対・相対器官重量及び剖検所見の変化は認められなかった。脳、脊髄、脊髄神経根、末梢神経及び評価した標準的な組織パネルに BMN 190 に関連した病理組織学的影響はみられなかった。Fluoro-Jade B 染色及びビルショウスキー銀染色では、溶媒対照群を含む全ての群でみられた ICV カテーテルによる機械的損傷に伴う変化以外には、神経壊死又は変性は認められなかった。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 に対する直接投与で予想された影響であり（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）、BMN 190 投与と関連はないと考えられた。GFAP 免疫染色で、BMN 190 に関連した星状膠細胞増加は認められなかった。

BMN 190 の脳脊髄液中 C_{max} は 5、14 及び 20 mg/dose 群で 3.18×10^5、9.68×10^5 及び 1.58×10^6 ng/mL であり、血漿中 C_{max}（1.67×10^3、3.67×10^3 及び 4.94×10^3 ng/mL）と比べて、それぞれ約 200 倍、270 倍及び 320 倍高値であった。BMN 190 の脳脊髄液中濃度は、TPP1 欠損のヒト線維芽細胞で測定したライソゾーム K_{uptake} 値（1.6～4.1 nmol/L、平均値 = 3.1 nmol/L、2.6.2.2.2 項参照）を、注入後 1～3 日間上回って維持された。これにより、BMN 190 が CNS を通して分布し、ライソゾームに取り込まれて活性化されるために、十分な曝露期間が可能となる。脳脊髄液からの消失は、約 3 時間の分布半減期及び 7～24 時間の終末半減期からなる、二相性の動態を示した。脳脊髄液中の BMN 190 濃度は、各群の動物間で大きなばらつきがみられた。脳脊髄液中の TK パラメーターを表 2.6.6.2.1.2、血漿中 TK パラメーターを表 2.6.6.2.1.3 に要約する。試験を通じて、いずれの血漿及び脳脊髄液サンプルでも、抗 BMN 190 抗体は検出されなかった。

表 2.6.6.2.1.2: BMN 190 の単回脳室内投与後の脳脊髄液中 TK パラメーター平均値

群	動物数	投与量 (mg)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (時間)	$t_{1/2}$ (時間)
2	3	5	1.05×10^6 (9.30×10^5)	1.05×10^6 (9.30×10^5)	3.18×10^5 (3.05×10^5)	3.67 (0.289)	7.63 (1.05)
3, 6, 7	9	14	5.77×10^6 (1.11×10^6)	5.77×10^6 (1.11×10^6)	9.68×10^5 (3.23×10^5)	4.08 (0.492)	24.1 (23.6)
4	3 [a)]	20	6.30×10^6 (7.18×10^6)	8.67×10^6	1.58×10^6 (2.21×10^6)	4.17 (0.289)	7.62

AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、C_{max}：最高濃度、T_{max}：最高濃度到達時間、$t_{1/2}$：半減期。数値は平均値（標準偏差）を示す。
a) $AUC_{0-\infty}$及び終末 $t_{1/2}$については、1 例の動物の消失速度定数（λz）が未算定のため N=2。

表 2.6.6.2.1.3: BMN 190 の単回脳室内投与後の血漿中 TK パラメーター平均値

群	動物数	投与量 (mg)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (時間)	$t_{1/2}$ (時間)
2	3	5	6.54×10^3 (6.04×10^3)	7.59×10^3 (6.28×10^3)	1.67×10^3 (2.05×10^3)	3.83 (0.29)	15.5 (8.06)
3, 6, 7	9	14	1.68×10^4 (4.63×10^3)	1.75×10^4 (4.61×10^3)	3.67×10^3 (2.10×10^3)	4.25 (0.61)	6.16 (2.16)
4	3	20	2.81×10^4 (1.45×10^4)	2.91×10^4 (1.44×10^4)	4.94×10^3 (2.85×10^3)	3.83 (0.29)	6.31 (3.21)

AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、C_{max}：最高濃度、T_{max}：最高濃度到達時間、$t_{1/2}$：半減期。数値は平均値（標準偏差）を示す。

BMN 190 は単回脳室内持続投与により、脳及び脊髄に広く分布した。予想されたとおり、脳の一定領域の表面（深さ 3 mm 未満）から採取した組織サンプルは、深部（深さ 3 mm 超）から採取したサンプルと比べて、BMN 190 濃度が数倍高値を示した。BMN 190 を 14 mg 投与した動物で、BMN 190 の組織内濃度を経時的に評価した結果、脳組織内濃度は溶媒対照群と比べて投与後 3、7 及び 14 日で、それぞれ 1～5.5 倍、1～3.5 倍及び 1～3 倍高かった。脊髄の BMN 190 濃度は投与後 3、7 及び 14 日に、溶媒対照群に対してそれぞれ 8～22 倍、3～6 倍及び 1～2 倍であった。算出した組織内半減期は、ほとんどの CNS 組織で 3～15 日の範囲にあった。表 2.6.6.2.1.4 に BMN 190 の組織内 TK パラメーターを示す。

表 2.6.6.2.1.4: BMN 190 の 14 mg 単回持続脳室内投与後の CNS 組織内 TK パラメーター平均値

脳領域	AUC_{0-t} (ng•day/mg protein)	C_{max} (ng/mg protein)	T_{max} （日）	$t_{1/2}$ （日）
小脳、D	799	70.1	7.0	ND
小脳、S	1029	97.3	3.0	12.2
大脳皮質、D	764	65.3	3.0	87.2 (R^2=0.1579)
大脳皮質、S	1313	156	3.0	8.39
延髄、D	1434	171	3.0	8.71
延髄、S	931	73.1	3.0	60.9
中脳、D	888	72.4	7.0	ND
中脳、S	932	73.1	3.0	60.9
後頭皮質、D	1157	141	3.0	9.32
後頭皮質、S	2028	236	3.0	15.5 (R^2=0.4853)
線条体、D	1406	266	3.0	14.0
線条体、S	1184	124	3.0	12.7
視床、D	1406	266	3.0	3.67
視床、S	1088	90.1	7.0	ND
頸部脊髄	4486	875	3.0	3.1
胸部脊髄	2347	392	3.0	4.56
腰部脊髄	3322	557	3.0	3.51

ND＝明らかではない、D＝深部組織（深さ 3 mm 超）、S＝表面組織（深さ 3 mm 未満）
$t_{1/2}$ の回帰係数は、特に示す場合を除き全て> 0.8000 であった。

結論：

以上より、サルに BMN 190 を 5、14 又は 20 mg/dose の用量で単回脳室内持続投与した結果、毒性学的意義のある所見は認められなかった。ICV カテーテルに関連した炎症性変化が、溶媒対照群を含む全ての動物で観察されたが、投与経路及び方法に起因する予測された所見である。BMN 190 は単回脳室内持続投与により、脳及び脊髄に広く分布した。本試験における無毒性量（NOAEL）は 20 mg/dose と推定され、脳脊髄液中の AUC_{0-t} は 6301848 ng•h/mL、C_{max} は 1578854 ng/mL に相当する。

2.6.6.2.2 BMN 190 のカニクイザルにおける単回腰部髄腔内投与毒性、TK 及び CNS 分布試験

（試験番号 BMN190-11-046、記載箇所 4.2.3.1-2、参考資料）

試験の目的及びデザイン：

BMN 190をカニクイザルに腰部髄腔内に単回持続投与し、毒性評価及びTK パラメーターの測定、並びに3 日間の回復期間における回復性又は毒性所見の持続及び遅発作用の発現を検討する目的でこの非GLP 試験を実施した。さらに、本試験では2.6.4.4.1.3 項で述べたように、単回腰部髄腔内投与によるBMN 190 のCNS 分布について検討した。本試験は[redacted]で、試験施設の SOP に従って実施した。試験は20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始し、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。本試験の成績は試験報告書BMN190-11-046 に記載されており、表2.6.6.2.2.1 に試験デザインを示す。

表 2.6.6.2.2.1: カニクイザルにおける単回腰部髄腔内投与毒性、TK 及び分布試験のデザイン

群	処理	投与量 (mg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数	剖検時期 (投与後時間)
1	BMN 190 a)	14	3.9	3 b)	72

a) BMN 190、ロット番号[redacted]
b) 雄 1 例及び雌 2 例

材料と方法：

試験開始時に15～17 箇月齢、体重 1.71～1.96 kg の中国産未処置カニクイザル（供給：[redacted]）の雌雄を試験に使用した。表2.6.6.2.2.1 に示すように、1 群の動物に BMN 190 を投与した。動物（雌 2 例及び雄 1 例）には、BMN 190 の持続投与及び脳脊髄液の連続的採取を可能とするため、腰椎にカテーテル1 本の埋め込み手術を施した。イソフルラン麻酔下で、腰椎のL4、L5 又はL6 部位で背部を切開して、ポリウレタンカテーテルの挿入を可能とするため、筋肉を切除し片側椎弓切除を行った。カテーテルを胸部・腰部結合部位まで進め、歯科用アクリル樹脂で所定の位置に固定した。被験物質投与及び脳脊髄液採取のため、カテーテルに皮下アクセスポートを接続し末端を背部とした。脳脊髄液を採取してカテーテル位置が適切であることを確認した。動物には、外科手術から BMN 190 投与まで、少なくとも 7 日間の回復期間を設けた。

動物に BMN 190（BMN 190 3.6 mL 投与後、リン酸緩衝生理食塩液 0.5 mL）を 0.88 mL/時間の速度で約 4 時間かけて（総投与量 14 mg）、腰部髄腔内に単回持続投与した。この投与速度は、1 時間当たり総脳脊髄液量（約 15 mL）の約 5%を持続投与することに相当する。毒性所見の回復性、持続又は遅発作用の発現を検討するため、動物を 3 日間の回復期間にわたり観察した。

動物の一般状態を毎日 1 回観察し、臨床的影響、疾病及び／又は死亡の有無を把握した。さらに、病的状態及び死亡については投与後 1 日 2 回確認した。体重は投与日及び剖検の直前に測定した。術前から毎日、摂餌量を定量的にモニターした。標準的な細胞数計測及び化学的検査のため、投与前及び剖検の直前に脳脊髄液を採取した。TK 解析用の脳脊髄液は、投与前、投与後 2 及び 30 分、投与後 1、2、4、8、12、24、36、48 及び 72 時間に採取した。血漿 TK 解析用の血液は投与前、持続投与中の 0.5、1.5 及び 3.5 時間、並びに投与後 2 分、0.5、1、2、4、

8、12、24、36、48 及び 72 時間に採取した。脳脊髄液及び血漿中の BMN 190 濃度は、バリデートされた ELISA 法（脳脊髄液及び血漿中のLLOQ [redacted] ng/mL）を用いて測定した。

動物を試験 4 日目に屠殺し、全身の剖検を実施して毒性評価のため標準的な組織を採取した。各動物から採取した全ての組織について、病理組織学標本を作製した。一部の器官（副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、卵巣、下垂体、精巣・精巣上体、脾臓、胸腺及び甲状腺・上皮小体）は重量を測定した。

脳は 3 mm の厚さで連続して冠状に切断、パラフィン包埋し、5 µm に薄切して HE（標準的な組織染色）及び Fluoro-Jade B（神経変性検出のため）で染色した。脊髄は頸部、胸部中央及び腰部の各横断及び斜断、並びに馬尾のみ横断の 4 部位で切断し、HE 染色を施した。CNS の病理組織学的検査は、CNS を専門とする有資格の獣医病理学者が担当した。

脳及び脊髄の解剖学的領域（大脳皮質、後頭皮質、小脳、線条体、延髄、中脳及び視床、並びに頸部、胸部及び腰部脊髄）の一部を使用して、BMN190の組織分布を検討した。図2.6.6.2.1.1に示すように、各解剖学的領域から表面（深さ 3 mm 未満）及び深部（深さ 3 mm 超）組織を4×4mm型抜き採取した。表面サンプルは脳脊髄液が浸透する基部に位置し、深部サンプルは脳脊髄液浸透の末梢部に位置する。組織サンプルをホモジナイズして、ELISA法（組織ホモジネート中の LLOQ [redacted] ng/mL）により BMN 190 濃度を測定した。

結果：

全ての動物が予定剖検日まで生存した。試験期間を通して BMN 190 投与に関連した一般状態、体重及び摂餌量の変化は認められなかった。脳脊髄液の細胞数計測及び化学的検査で BMN 190 投与の影響はみられなかった。BMN 190 に関連した器官重量及び剖検所見の変化も認められなかった。

3 例の動物全てにおいて、脳及び脊髄を取り巻く髄膜に単核細胞浸潤が観察されたが、外因性タンパク質を脳脊髄液に投与した試験でみられる通常の変化と考えられ（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）、この細胞浸潤は有害所見とは判断されなかった。1 例の雌で病理組織学的変化として、IT-L カテーテルの周囲で軽微な結合組織の線維化が認められた。2 例の雌ではいずれも、カテーテルを挿入した部位の脊髄神経根に神経線維変性が認められた。この所見はカテーテル留置に起因し、BMN 190 に関連した変化ではないと考えられた。

BMN 190 の脳脊髄液中濃度は、C_{max} 平均値（投与後 2 分に 2666881 ng/mL）が血漿中 C_{max}（7762 ng/mL）と比較して約 300 倍高値であった。脳脊髄液中の BMN 190 濃度は、TPP1 欠損のヒト線維芽細胞で測定した K_{uptake} 値（平均値 3.1 nmol/L = 183 ng/mL、2.6.2.2.2 項参照）を、IT-L 投与後約 28 時間上回って維持された。脳脊髄液中 AUC_{0-t} は 10971616 ng•h/mL であった。血漿中 AUC_{0-t} は 37660 ng•h/mL であり、脳脊髄液と比べて約 200 倍低かった。脳脊髄液中及び血漿中 TK パラメーターを表 2.6.6.2.2.2 に要約する。

表 2.6.6.2.2.2: BMN 190 の単回腰部髄腔内投与後の TK パラメーター平均値

マトリックス	投与量 (mg)	N	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (時間)	$t_{1/2}$ (時間)
脳脊髄液	14	3	1.10×10^{7} (1.86×10^{6})	1.10×10^{7} (1.86×10^{6})	2.67×10^{6} (7.03×10^{5})	4.03 (0.00)	14.6 (0.203)
血漿	14	3	3.77×10^{4} (1.03×10^{4})	3.88×10^{4} (1.00×10^{4})	7.76×10^{3} (3.03×10^{3})	4.03 (0.00)	6.26 (1.67)

AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの濃度 - 時間曲線下面積、C_{max}：最高濃度、T_{max}：最高濃度到達時間、$t_{1/2}$：半減期。数値は平均値（標準偏差）を示す。

2.6.4.3 項で詳細に述べたように、BMN 190 は単回 IT-L 持続投与により、CNS の様々な部位に広く分布した。一般に、ある部位の表面（深さ 3 mm 未満）から採取した組織サンプルは、脳脊髄液流に近接しており、深部（深さ 3 mm 超）から採取した組織と比べて、数倍高い BMN 190 濃度を示した。IT-L 投与後の組織内濃度は、ICV 投与後の濃度が高かった線条体、中脳及び視床を除き、ICV 投与後の組織内濃度と同等であった。

結論：

以上より、BMN 190 を 14 mg の用量で約 4 時間かけて腰部髄腔内に単回持続投与した結果、忍容性が良好であり、被験物質に起因する有害所見は認められなかった。IT-L 投与における無毒性量（NOAEL）は 14 mg/dose と推定され、脳脊髄液中の AUC_{0-t} は 1.10×10^{7} ng•h/mL、C_{max} は 2.67×10^{6} ng/mL に相当する。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドにおける 3 ヵ月間反復大槽内投与毒性、CNS 分布及び薬理学的試験

（試験番号 0190-09-066、記載箇所 4.2.1.1-3、参考資料）

試験の目的及びデザイン：

TPP1 欠損ダックスフンド及びその野生型同腹児に、BMN 190 を 3 箇月間毎月、合計 4 回にわたり大槽内投与し、毒性を評価する目的でこの非 GLP 試験を実施した。さらに、本試験ではそれぞれ2.6.2 項及び2.6.4 項で記載したように、BMN 190 の薬力学的作用（PD）及びCNS 分布の特性を明らかにした。本試験は、[redacted]で実施した。試験は施設のSOPに従って実施し、一般的に許容される科学的基準を適用した。試験は 20[redacted] 年[redacted]月[redacted]日に開始し、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に終了した。本試験の成績は試験報告書 0190-09-066 に記載されており、表2.6.6.3.1.1 に試験デザインを示す。

表 2.6.6.3.1.1: TPP1 欠損及び野生型ダックスフンドにおける反復大槽内投与試験のデザイン

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

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT：野生型（正常）

a) 人工脳脊髄液（aCSF：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 ロット番号[redacted]（[redacted]mg/mL）、[redacted]提供

c) 1 回目は BMN 190 23.5 mg を投与、2～4 回目は BMN 190 32 mg を投与

材料と方法：

[redacted]で繁殖・飼育された、4 例の未処置ダックスフンド同腹児（TPP1 欠損の雄イヌ 2 例及び野生型ホモの雌イヌ 2 例）を試験に使用した。動物は試験開始時に 4 箇月齢であり、この月齢ではライソゾームに相当な物質が蓄積するが、CLN2 疾患の臨床徴候が全体的に発現する前と予想される。動物の体重は2.6～4.5 kg の範囲であった。表2.6.6.3.1.1 に示すように動物を4 群（1 例/群）に割り付け、溶媒又はBMN 190 を投与した。

動物に BMN 190 を 23.5 mg/dose（容量 1.7 mL、1 回目）及び 32 mg/dose（容量 2.3 mL、2～4 回目）又は溶媒を、4 箇月齢から毎月、合計 4 回にわたり大槽内（IT-C）に遅いボーラス投与した。各 IT-C 投与の前に動物を終夜絶食し、ブプレノルフィン（0.01 mg/kg 筋肉内投与）及びデクスメデトミジン塩酸塩（5～10 μg/kg 筋肉内投与）を前投与した。流涎の抑制及び心拍数増加のためアトロピン（0.06 mg/kg 皮下投与）、麻酔のためプロポフォール（6 mg/kg、効果発現まで静脈内に遅いボーラス投与）を使用した。動物に気管内チューブを挿管し、無菌的に投与ポートを設置した。投与前及び 4 回の投与後 48 時間、すなわち剖検の直前に、自然流出により脳脊髄液サンプル（1～3 mL）を採取した。

動物には毎週、体重測定を含む身体的検査を行った。全般的な健康状態の把握及び疾患の進行評価の一環として、神経学的検査を週2回、眼科的検査を月1回実施した。脳の形態学的変化を評価するため、動物の生存期間の最終週にMRI検査を行った。血漿中のBMN 190濃度及び抗BMN 190抗体価を測定するため、1回目、3回目及び4回目投与後に血液サンプルを採取した。1回目については、投与前、投与後1、6、24時間及び17日、3回目は投与前、投与後1、6、24時間及び16日、4回目は投与前、投与後1、6、24及び48時間（剖検前）に採取した。抗BMN 190抗体価の分析のため、各投与の直前及び剖検時（4回目の投与後48時間）に脳脊髄液を採取した。血漿及び脳脊髄液中のBMN 190濃度は、ELISA法（血漿中LLOQ[redacted]ng/mL、脳脊髄液中LLOQ[redacted]ng/mL）を用いて測定した。電気化学発光免疫測定法（ECLA）により、採取した血漿及び脳脊髄液中の抗BMN 190抗体価を測定した。

最終投与後48時間で動物を安楽死させ剖検した。体重及び脳重量を測定した。心臓、肺、腎臓、肝臓及び眼球を採取し、病理組織標本を作製した。BMN 190の組織分布を測定するため、各動物から肝臓、心臓、肺、腎臓、小腸、精巣及び骨格筋（大腿二頭筋）を採取した。

CNS組織は、BMN 190の組織分布及び組織学的所見について広く検索した。脳を切除して縦に二分し、各断片を連続した冠状切片に薄切した。脊髄は上部頸髄、頸髄、胸髄及び腰髄に切断した。脳の一断片及び脊髄の各断片から病理組織標本を作製した。組織内のTPP1酵素活性の解析により、BMN 190の生体内分布を検討するため、他方の脳断片からCNS組織のサブセット（小脳、海馬、視床下部、延髄、中脳、後頭皮質、前頭皮質、橋、線条体、側頭葉／頭頂葉皮質、視床、並びに頸髄、胸髄及び腰髄）を採取した。大きな組織については、酵素活性の分布に勾配がみられるか否かを検討するため、図2.6.6.2.1.1に示すように表面（深さ3 mm未満）及び深部（深さ3 mm超）の組織サンプルを採取した。組織をホモジナイズして、TPP1活性を測定した（Sohar, 2000, Clin. Chem.）。

結果：

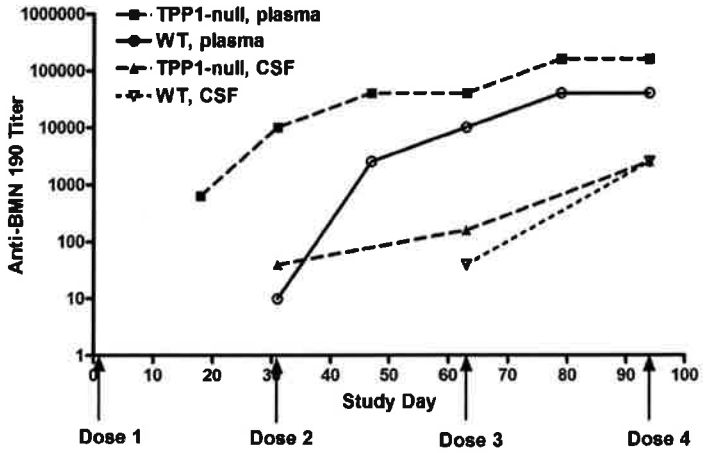
全ての動物が予定剖検日まで生存した。溶媒投与群の動物は、投与に対する反応を示さなかった。BMN 190の反復投与後に、TPP1欠損動物（雄）及び野生型（正常）動物（雌）で、過敏症反応が観察された。過敏症反応に伴う症状として、顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、粘膜蒼白化、嘔吐、頻脈及び血圧低下が観察された。雄のTPP1欠損動物は、2回目の投与後10分以内に症状が発現した。3、4回目のBMN 190投与でも、同様の症状が発現することが予想されることから、溶媒又はBMN 190を投与する全ての動物に、予防としてBMN 190投与の30分前にジフェンヒドラミン(2 mg/kg)を筋肉内投与した。ジフェンヒドラミンの前投与にもかかわらず、雄のTPP1欠損動物で3回目の投与後はより重度の、4回目は遅発性／持続性の過敏症反応が観察された。BMN 190を投与した雌の正常動物は、3回目の投与後のみ過敏症反応を示した。エピネフリン（0.02 mg/kg 静脈内投与）、ジアゼパム（0.5 mg/kg）、ドーパミン及び輸液のボーラス投与により症状管理を行った。TPP1欠損動物とは対照的に、BMN 190を投与した正常動物では、ジフェンヒドラミンを前投与すると過敏症反応は発現しなかった。

ルーチンの身体的検査及び神経学的検査の観察結果は、TPP1欠損動物の病態と一致した。正常動物では、身体的・神経学的検査に変化はみられなかった。MRI検査で、BMN 190に関連した脳の形態学的異常は認められなかった。TPP1欠損動物では、溶媒又はBMN 190を投与した

いずれの動物でも、CLN2 疾患の進行に伴って 7 箇月齢までに、大脳及び小脳の萎縮が類似して認められた。剖検時に BMN 190 に関連した肉眼的所見又は変化はみられなかった。脳、脊髄、心臓、腎臓、肝臓及び肺に、BMN 190 投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。TPP1 欠損動物で観察された病理組織学的所見は全て、CLN2 疾患の進行に伴う変化であった。両 TPP1 欠損動物の十字前回、線条体、視床、中脳、橋、延髄及び脊髄、溶媒を投与した TPP1 欠損動物の後頭回、並びに BMN 190 を投与した TPP1 欠損動物のシルビウス上回／縁回の神経細胞に、ライソゾーム蓄積物質を含んだ細胞質顆粒の病理組織学的変化が観察された。代表的な CNS 炎症である星状膠細胞症が、溶媒を投与した TPP1 欠損動物の十字前回、線条体、中脳及び後頭回、並びに BMN 190 を投与した TPP1 欠損動物の視床に認められた。プルキンエ細胞の欠損で示される神経細胞壊死が、溶媒又は BMN 190 を投与した両 TPP1 欠損動物の小脳に認められた。溶媒又は BMN 190 を投与した正常動物では、星状膠細胞症や神経細胞壊死はみられなかった。投与部位の近傍に所見はみられなかった。

投与後 1 時間で血漿中に BMN 190 が検出され、C_{max} は 2183.31～10878.41 ng/mL であった。血漿中 BMN 190 濃度は、投与後 24 時間で LLOQ 近くまで低下した。BMN 190 を投与した 1 例の正常動物の脳脊髄液では、4 回目の投与後 48 時間で LLOQ をわずかに上回る BMN 190 濃度であった。他のタイムポイント（投与前、1、2、3 及び 4 回目投与後）で採取した、脳脊髄液サンプルで BMN 190 は検出されなかった。BMN 190 を投与した両動物で、1 回目の投与後それぞれ 30 日及び 60 日以内に、血漿及び脳脊髄液中に抗 BMN 190 抗体が検出された（図 2.6.6.3.1.1）。試験期間中にいずれの動物でも抗体価が上昇し、TPP1 欠損動物では正常動物と比べて各タイムポイントで約 10 倍高かった。溶媒を投与した動物では、抗 BMN 190 抗体は検出されなかった。TPP1 欠損動物における抗体価の上昇は、これらの動物の 3 回目及び 4 回目の BMN 190 投与後に発現した過敏症反応の重症度増加と相関が認められた。

図 2.6.6.3.1.1: BMN 190 を大槽内投与したイヌにおける脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体価



BMN 190 を投与した両動物の血漿及び脳脊髄液で、抗 TPP1 抗体が検出された。この分析は総抗体量を測定しており、特定の免疫グロブリンアイソタイプを測定したものではない。分析したサンプルは各投与の直前（血漿及び脳脊髄液）、又は 1 回目と 2 回目、2 回目と 3 回目及び 3 回目と 4 回目投与の中間（血漿のみ）で採取した。図中に示した最初のデータより前のタイムポイントで採取したサンプルでは、抗体が検出されなかった。各投与の時点を X 軸に示す。一般に試験期間を通して抗体価が上昇した。各タイムポイントで、BMN 190 を投与した TPP1 欠損動物では、BMN 190 を投与した正常動物と比べて抗体価が約 10 倍高かった。溶媒（人工脳脊髄液）を投与した動物（正常及び TPP1 欠損、データ非表示）のサンプルで、抗体は検出されなかった。WT：野生型（正常）

結論：

BMN 190 を TPP1 欠損及び正常ダックスフンドに 3 箇月間反復して大槽内ボーラス投与した結果、1 例の TPP1 欠損の雄イヌで過敏症反応が持続してみられ、異種タンパク質の反復投与による可能性が高いと考えられた。本試験は主に薬効薬理試験として計画されたことから、試験報告書には無毒性量が記載されていない。しかしながら、全ての投与量で BMN 190 に関連した有害所見がみられなかったことから、NOAEL は投与した最高用量の 32 mg と判断された。

2.6.6.3.2 野生型及び TPP1 欠損ダックスフンドにおける 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理、毒性及びトキシコキネティクス試験

（試験番号 0190-10-077、記載箇所 4.2.1.1-4、参考資料）

試験の目的及びデザイン：

TPP1 欠損及び野生型（正常）ダックスフンドに、BMN 190 を少なくとも 9 箇月間又はTPP1 欠損動物の生涯にわたって2 週間に 1 回、ICV、IT-L 又は IT-C 投与し、毒性評価及びTK パラメーターの測定を行う目的で、この非GLP 試験を実施した。本試験は当初9 箇月間投与の予定であったが、2.6.2.2.5 項で述べたように、BMN 190 を投与した TPP1 欠損動物で疾患進行の遅れ、機能的改善及び生存期間の延長がみられたため、投与期間を最長 4 箇月間延長して約 13 箇月間投与の試験とした。2.6.2 項及び 2.6.4 項に要約したように、本試験ではBMN 190 の薬力学的（PD）作用、薬物動態（PK）及び CNS 分布についても特性を明らかにした。本試験は、[redacted]で実施した。本試験は米国FDA CFR 21 Part 58 に規定

された GLP に準拠していないが、一般的に許容される科学的基準を適用した。試験は 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日～20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に実施した。本試験の成績は試験報告書 0190-10-077 に記載されており、表 2.6.6.3.2.1 に試験デザインを示す。

表 2.6.6.3.2.1: 野生型及び TPP1 欠損イヌにおける 9 ヵ月間反復脳室内投与薬理、毒性及び TK 試験のデザイン

群	遺伝子型	動物数	処理	投与量（mg）	注入時間	投与レジメン
1	WT	4 a)	溶媒 b)	0	2 時間	2 週 1 回、9 箇月間
2	WT	3	BMN 190 c)	4	2 時間	2 週 1 回、9 箇月間
3	WT	3	BMN 190 c, d)	16	4 時間 c)	2 週 1 回、9 箇月間
4	TPP1 欠損	3	溶媒 b)	0	2 時間	2 週 1 回、9 箇月間
5	TPP1 欠損	3	BMN 190 c)	4	2 時間	2 週 1 回、9 箇月間
6	TPP1 欠損	3	BMN 190 c, d)	16	4 時間 c)	2 週 1 回、9 箇月間

TPP1：トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT：野生型（正常）
a) 15 回目の投与後に 1 例を打ち切ったため、他の動物を試験に組み込んだ。
b) 人工脳脊髄液（aCSF：216.5 mmol/L NaCl、0.80 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.40 mmol/L $CaCl_2$、0.80 mmol/L Na_2HPO_4、0.20 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3）
c) BMN 190、ロット番号 [redacted]
d) 16 mg 投与群では 3 及び 4 回目の投与後に過敏症反応が発現したため、この群については注入時間を 2 時間（0.6 mL/時間）から 4 時間（0.3 mL/時間）に延長した。

材料と方法：

[redacted]で繁殖・飼育された未処置の雌雄ダックスフンドを試験に使用した。動物は試験開始時に約2.5 箇月齢であり、体重は雄が1.97～3.0 kg、雌は 2.0～2.5 kg であった。イヌTPP1 活性が正常な 10 例の野生型ホモ動物と、9 例の TPP1 欠損動物を試験に使用した。繁殖コロニーから必要な遺伝子型の動物が得られるに従って試験に組み込み、表 2.6.6.3.2.1 に示すように 6 群に割り付けて BMN 190 又は溶媒（人工脳脊髄液）を投与した。

BMN 190 の注入及び脳脊髄液の連続採取を可能とするため、動物の側脳室にカテーテル及び腰椎に投与ポートの埋め込み手術を施した。MRI により、脳室カテーテルの埋め込み位置を調整した。イソフルラン麻酔下で頭蓋背部を矢状切開し、開頭してポリウレタンカテーテルを挿入した。脳定位固定法により、左又は右側脳室のカテーテル留置位置を決定した。歯科用アクリル樹脂でカテーテルを頭蓋骨頂に固定し、皮下アクセスポートを接続した末端を肩甲骨部とした。[redacted]を使用した脳室 X 線写真及び脳脊髄液の採取により、カテーテルの位置を確認した。腰部カテーテル埋め込みのため、 L4、L5 又はL6 脊椎突起の位置で切開し、筋肉を切断して片側椎弓切除によりポリウレタンカテーテルを挿入した。カテーテルを胸部・腰部結合部位まで進め、適切な位置に歯科用アクリル樹脂で固定した。カテーテルの末端を背部とし、脳脊髄液採取のため皮下アクセスポートを接続した。カテーテルを固定する前に脳脊髄液を採取して、位置が適切であることを確認した。動物には、外科手術から BMN 190 又は溶媒の投与まで、少なくとも 7 日間の回復期間を設けた。

BMN 190 を 2 週間に 1 回、2 時間持続投与により 0.6 mL/時間の速度で投与した。3 回目及び 4 回目の投与中に過敏症反応がみられたことから、これ以降 16 mg 群の注入時間を 4 時間（0.3 mL/時間）に延長した。対照群の動物には、溶媒 1.2 mL を 2 時間かけて注入した。TPP1

欠損動物では、CLN2 疾患が進行し安楽死が必要となる時点まで、あるいは ICV カテーテルの障害により安楽死が必要となるまで投与を行った。TPP1 欠損動物の安楽死が必要となった時点で、対照動物として可能な限り月齢が同等の野生型動物も剖検した。幼若イヌでは、埋め込んだ CNS 投与器具に対する反応と動物の成長及び活動レベルにより、ICV・IT-L カテーテルは使用寿命が限られる。頭蓋骨の成長のため ICV カテーテルの位置が側脳室から移動した場合及び／又はカテーテルの開存性が欠如した場合は、腰部髄腔内（IT-L）注入により可能な限り投与を継続した。ICV・IT-L カテーテルがいずれも使用できない場合には、残りの BMN 190 投与は大槽内（IT-C）ボーラス注射を行った。過敏症反応を緩和するため、1 回目から投与 30 分前にジフェンヒドラミン（2 mg/kg）を筋肉内投与した。投与中又は投与後に、過敏症反応の症状（顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈及び／又は血圧低下）が観察された場合には、ジフェンヒドラミンを 2 mg/kg 追加して筋肉内投与した。

動物の一般状態を少なくとも毎日 1 回観察し、臨床的影響、疾病、病的状態及び死亡の有無を把握した。摂餌量の質的変化を記録した。また、動物の身体的検査及び神経学的検査を、初回投与の前、及び試験期間中は毎週実施した。身体的検査には体重測定を含む。神経学的検査には、疾患進行に伴う神経機能障害パラメーターの評価を含み、2.6.2.2.5 項に詳細を記載した。眼科的検査は月 1 回実施した。疾患の進行及び／又は BMN 190 投与に起因する脳の形態的変化が起きていないか調べるため、1、19 及び 39 週目に MRI を用いて脳容積の測定を行った。

血液学的検査及び血液生化学的検査のため、1 回目（試験 1 週目）、10 回目（19 週目）及び 20 回目（39 週目、約 11 箇月齢）の投与直前に採血を行った。TK 解析用の血液サンプルは 1 回目、10 回目及び 20 回目の投与前、投与開始 1 時間、投与終了時、並びに投与後 0.5、1、4、12、24、48、72、120 及び 168 時間で採取した。TK 解析用の脳脊髄液サンプルは、1 回目及び 10 回目の投与前、投与開始 1 時間、投与終了時、並びに投与後 0.5、1、4、12、24、48、72、120 及び 168 時間に採取した。IT-L カテーテルが閉塞したため、全例から一連のセットとして脳脊髄液サンプルを採取することはできなかった。血漿及び脳脊髄液中の BMN 190 濃度を、ELISA 法（血漿及び脳脊髄液中の LLOQ は、それぞれ[redacted]ng/mL 及び[redacted]ng/mL）により測定した。1 回目、10 回目、20 回目の投与前に採取したサンプル及び他の分析に必要なため採取したサンプルを用いて、血漿及び可能な場合は対応する脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体価を測定した。炎症を示した動物あるいはカテーテル感染の可能性がある動物では、細胞数測定に必要な脳脊髄液を採取した。

野生型動物は 20 回又はそれ以上投与後に、可能な限り月齢が相当する TPP1 欠損動物と一緒に剖検した。認知障害（T 迷路装置への走行不能）、重篤な精神的異常、視覚追跡の喪失、薬物不応性ミオクローヌス及び継続した介助なしの摂食不能として定義される、疾患が終末期に達した時に TPP1 欠損動物を安楽死させた。TPP1 欠損動物の生存期間、すなわち疾患の終末期に達するまでの期間は、薬力学的エンドポイントとしても使用した（2.6.2.2.5 項参照）。

最終投与後 48 時間で、動物を計画屠殺して剖検した。剖検時に全ての動物から、脳、脊髄、心臓、肺、腎臓、肝臓及び眼を採取した。一部の動物（第 1 群の 4 例中 1 例、第 3 群の 3 例中 1 例、第 4 群の 3 例中 1 例及び第 6 群の 3 例中 3 例）については、上記の組織以外に大動脈、子宮頸、結腸、食道、胆嚢、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、卵巣、子宮、膵臓、下垂体、皮

膚／皮下組織、胃、胸腺、甲状腺（両葉）＋上皮小体、気管、膀胱及び精巣を採取した。一部の組織（脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓）は重量を測定した。有資格病理学者による病理組織学的検査のため、採取した全身の組織を全てパラフィン包埋し、薄切してヘマトキシリン及びエオシン（HE）で染色した。

詳細な組織学的検査及び BMN 190 組織分布の評価のため、脳及び脊髄を処理した。脳については、脳器質を 3 mm の厚さで冠状に薄切した。1 枚目及びその後 1 枚置きの切片は、病理組織学的評価のため処理した。2 枚目及びその後 1 枚置きの切片は、BMN 190 の組織分布を評価するため凍結した。組織分布用の切片は、凍結保存する前に大脳皮質、後頭皮質、小脳、線条体、延髄、中脳及び視床から 4 × 4 mm の 2 標本を切り出し、液体窒素で急速凍結した。図 2.6.6.2.1.1 に示すように、これらの標本は BMN 190 の組織浸透を評価する各構造の表面（深さ 3 mm 未満）及び深部（深さ 3 mm 超）の組織サンプルである。病理組織学的検査及び BMN 190 組織分布の評価のため、頸部、胸部及び腰部の脊髄から約 1 cm の切片を採取した（2.6.2.2.5 項参照）。CNS 組織は HE 染色（一般的な組織染色）、並びにグリア線維性酸性タンパク質（GFAP、星状膠細胞のマーカー）及び IBA1（小膠細胞のマーカー）の免疫染色を施した。CNS 及び他組織の病理組織学的検査は、CNS を専門とする有資格の獣医病理学者が担当した。

結果：

途中死亡例として、第 1 群の 4 例中 1 例（雌、野生型、溶媒投与）、第 4 群の 3 例中 2 例（雄 1 例及び雌 1 例、TPP1 欠損動物、溶媒投与）、第 5 群の 3 例中 1 例（雌、TPP1 欠損動物、BMN 190 4 mg 投与）及び第 6 群の 3 例中 2 例（雌、TPP1 欠損動物、BMN 190 16 mg 投与）の合計 6 例が死亡した。途中死亡した各動物の詳細については後述する。これらの死亡例はいずれも BMN 190 と関連がなく、IT-C ボーラス投与の手法で受けた傷害、ICV カテーテルの長期間留置に対する反応及び／又は CLN2 疾患の進行に起因する可能性が高いと考えられる。

溶媒投与群（第 1 群及び 4 群）の 3 例は 9 箇月間の試験期間より早期に途中死亡しており、IT-C ボーラス投与で注射針の不適切な留置に関連する傷害及び／又は CLN2 疾患の進行によると考えられる。3 例全てにおいて、後肢の感覚消失及び起立／正常歩行不能などの、傷害に起因した神経症状が投与直後に観察された。これら 3 例の死亡について、以下に記載する。

- IT-C 投与で受けた傷害のため、溶媒を投与した野生型動物の 1 例（第 1 群、雌）を 29 週目（14 回目の投与後 14 日）に安楽死させた。延髄に局所出血が認められたことから、この診断が支持される。
- 溶媒を投与した TPP1 欠損動物の 1 例（第 4 群、雌）に神経症状が認められ、IT-C 投与で受けた傷害によると考えられたため、31 週目（15 回目の投与後 10 日）に安楽死させた。病理組織学的検査では、CLN2 疾患の進行に伴うライソゾーム蓄積物質の集積及び神経細胞脱落の形態学的変化が観察されたが、投与中に生じた脳幹の障害を示す変化は認められなかった。
- 溶媒を投与した TPP1 欠損動物の 1 例（第 4 群、雄）で認知障害、振戦、歩行異常、運動失調及び四肢麻痺などの神経症状が認められ、CLN2 疾患の進行と考えられたため、30 週目（14 回目の投与後 9 日）に安楽死させた。病理組織学的検査では、カテーテル留置部位

に軽度の炎症、側脳室内又は周囲に脳室炎及び上衣細胞消失等の感染の可能性を示す炎症性変化が認められた。さらに、この動物ではCLN2疾患の進行と一致したライソゾーム蓄積物質の集積及び神経細胞脱落が認められた。

BMN 190投与群の3例は、9箇月間の試験期間以降に死亡した。いずれの死亡例もCNSカテーテルの長期間留置及び／又はCLN2疾患の進行に起因する可能性が高く、BMN 190投与とは関連がないと考えられる。これらの死亡例について、以下に記載する。

- BMN 190 4 mgを投与したTPP1欠損動物の1例(第5群、雌)を、42週目(22回目のBMN 190 4 mg投与後3日)に安楽死させた。この動物はBMN 190のIT-C注射でCNSの傷害を受け、臨床症状では正常な歩行や摂食が不能であった。本例では脳の組織学的変化として、CLN2疾患の進行に伴う蛍光性ライソゾーム蓄積物質の集積及び神経細胞脱落が認められた。投与中の傷害を示す病理組織学的変化はみられなかった。
- BMN 190 16 mgを投与したTPP1欠損動物の1例(第6群、雌)は、前庭疾患、眼振及び四肢麻痺の臨床症状を示したため、53週目(27回目の投与後6日)に安楽死させた。MRI検査により、疾患の終末期と一致する大脳皮質萎縮及び脳室拡大と診断された。剖検では、脳の左側にCLN2疾患の進行を示すと考えられる脳病変が認められた。病理組織学的検査では、CLN2疾患の進行に伴う神経変性に起因する可能性が高い、蛍光性ニューロン及び白質空胞化が観察された。BMN 190投与に関連する病理組織学的変化はみられなかった。
- BMN 190 16 mgを投与したTPP1欠損動物の1例(第6群、雌)は、47週目(23回目の投与後16日)に死亡した。MRI検査により、本例はCNS投与器具及び投与経路に関連した閉塞性水頭症による死亡と考えられた。本例では、CLN2疾患の進行に伴う蛍光性ライソゾーム蓄積物質の小体、神経細胞脱落及び膠細胞増多症のほかに、脳室内・周囲及び脈絡叢の炎症など脳室系の変化が認められた。炎症部位では主に単核細胞(大部分がリンパ球)がみられ、感染が主要因ではない可能性が示唆された。延髄に中等度の出血、星状膠細胞症及び軽度の小膠細胞症が認められたことから、この部位の傷害が示唆された。

これ以外のTPP1欠損動物は全て、認知障害(T迷路装置への走行不能)、重篤な精神的異常、視覚追跡の喪失、薬物不応性ミオクローヌス及び継続した介助なしの摂食不能として定義される、疾患の終末期に達した時に安楽死させた。他の野生型動物は全て、可能であればTPP1欠損動物の投与期間に合わせて安楽死させた。

- 溶媒を投与した野生型動物(第1群)の雌2例及び雄1例、BMN 190 4 mgを投与した野生型動物(第2群)の雄2例及び雌1例、16 mgを投与した野生型動物(第3群)の雄1例及び雌2例は、月齢が相当する対照動物としてTPP1欠損動物の投与期間に合わせて剖検した。
- 溶媒を投与したTPP1欠損動物(第4群)の雄2例は、疾患が終末期に達した(ミオクローヌス、認知障害、威嚇瞬き反応消失、運動失調及び振戦などの臨床症状)ため安楽死させた。
- 4 mgを投与したTPP1欠損動物(第5群)の雄2例は、疾患が終末期に達した(運動失調、威嚇瞬き反応消失、固有感覚障害、振戦及びミオクローヌスなどの臨床症状)ため安楽死

させた。

- 16 mg を投与した TPP1 欠損動物（第 6 群）の雌 1 例は、疾患が終末期に達した（歩行障害、ミオクローヌス、振戦、運動失調及び威嚇瞬き反応消失）ため安楽死させた。

試験に用いた全動物について、安楽死させた理由を表 2.6.6.3.2.2 に示す。

表 2.6.6.3.2.2: 0190-10-077 試験において動物を安楽死させた理由

	安楽死の理由				
投与群（n＝3）	月齢相当 a)	医原性傷害 b)	水頭症	髄膜炎	CLN2 疾患の終末期進行 c)
野生型、溶媒（第 1 群） d)	雌 2/雄 1	雌 1	—	—	N/A
野生型、4 mg（第 2 群）	雄 2/雌 1	—	—	—	N/A
野生型、16 mg（第 3 群）	雄 1/雌 2	—	—	—	N/A
TPP1 欠損、溶媒（第 4 群）	N/A	雌 1	—	—	雄 2
TPP1 欠損、4 mg（第 5 群）	N/A	雌 1	—	—	雄 2
TPP1 欠損、16 mg（第 6 群）	N/A	—	雌 1	雌 1	雌 1

N/A：該当しない、M：雄、F：雌
a) 野生型の対照動物は、疾患が終末期に達した TPP1 欠損動物とほぼ同じ月齢で安楽死させた。
b) IT-C ボーラス投与での不適切な注射針挿入位置により、CNS の医原性傷害が引き起こされた。
c) 認知障害（T 迷路装置への走行不能）、重篤な精神的異常、視覚追跡の喪失、薬物不応性ミオクローヌス及び継続した介助なしの摂食不能として定義される。
d) 第 1 群は代替動物 1 例を含む（n＝4）。

TPP1 欠損及び野生型動物で、BMN 190 投与に関連した体重、体重増加量、血液学的検査及び血液生化学的検査の変化はみられなかった。第 2 群の動物（野生型、BMN 190 4 mg）の 3 例中 1 例、第 4 群の動物（TPP1 欠損、溶媒）の 3 例中 2 例、第 5 群の動物（TPP1 欠損、BMN 190 4 mg）の 3 例中 2 例及び第 6 群の動物（TPP1 欠損、BMN 190 16 mg）の 3 例中 3 例では、カテーテル感染が疑われた 1 回又はそれ以上の時点で採取した脳脊髄液中で、BMN 190 投与ではなく ICV カテーテルの長期間留置に起因する混合型髄液細胞増加が観察された。

第 3 群（野生型、BMN 190 16 mg）の 3 例中 2 例、第 6 群（TPP1 欠損、BMN 190 16 mg）の全例の動物で、BMN 190 16 mg の反復投与により 3 及び 4 回目の投与後（5～7 週目）に、軽度ないし中等度の過敏症反応が観察された。顔面浮腫、耳介・顔面の紅斑、蕁麻疹、血圧低下、下痢及び嘔吐などの症状が認められた。これらの症状は持続投与の開始直後、若しくは終了後に発現した。ジフェンヒドラミン（2 mg/kg、筋肉内）の投与により症状が軽減し、投与後 24 時間では完全に消失した。16 mg 投与群の投与時間を 2 時間から 4 時間に延長することにより、過敏症反応の発現頻度及び程度が軽減した。この過敏症反応は、異種のヒトタンパク質をイヌに持続投与した際の反応と考えられた。

遺伝子型あるいは処置に関係なく全ての動物で 1 回又は反復投与により、BMN 190 投与よりむしろ ICV/IT-L カテーテルに関連する炎症反応を示す症状として、頸部知覚過敏、腰部知覚過敏、髄液細胞増加及び／又は ICV/IT-L カテーテル周囲の浮腫が観察された。これらの反応は明らかな用量又は時間的関連なしに発現し、投与後 24 時間以内に解消した。これらの反応は溶媒対照群を含む全ての群で発現し、BMN 190 ではなく CNS に埋め込んだカテーテルに起因する可能性が高い（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。BMN 190 の目的としない作用、あるいは過剰な薬

理作用を示す臨床症状は観察されなかった。さらに、BMN 190 が TPP1 欠損動物で 2.5 箇月齢までに蓄積された可能性のある、ライソゾーム蓄積物質を除去することに起因する毒性作用はみられなかった。

剖検時に器官重量及び肉眼的所見の変化はみられなかった。明確に BMN 190 の作用を示す、CNS の病理組織学的所見は認められなかった。病理組織学的検査では、BMN 190 又は溶媒の投与後に全ての野生型及び TPP1 欠損動物で、脳室系の近傍、脊髄並びにカテーテル留置経路に接する組織で炎症が認められた。炎症は溶媒対照群でも観察されたことから、BMN 190 による変化ではなく、ICV カテーテルの留置に起因すると考えられた。BMN 190 投与に関連すると考えられる CNS の組織学的所見は、カテーテル留置経路に沿って局在しており、表 2.6.6.3.2.3 に示した。上衣細胞消失は、少なくとも一部は反復 ICV 投与によるものと考えられた。この変化は、おそらく異種ヒトタンパク質の投与及びそれに伴う炎症のため、BMN 190 を投与した動物で一層顕著であった。TPP1 欠損動物における軽微な程度の上衣細胞消失が、有害作用を誘発する可能性は低いと考えられる。この変化は溶媒対照群でもみられたが、用量反応性はないものの BMN 190 を投与した動物で脳室炎が一層顕著であった。カテーテル留置経路に沿って、おそらく BMN 190 に関連する浮腫及び細胞外液が認められたが、観察された重篤度では有害作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。BMN 190 を投与した部位と同側の脳で、主にリンパ球からなる血管周囲細胞浸潤が認められた。これらの BMN 190 に関連する所見は、タンパク性被験物質の長期間 ICV 投与でみられる通常の変化である（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。

表 2.6.6.3.2.3: 脳室内投与後の脳の組織学的変化のまとめ

所見	群	1	2	3	4	5	6
	遺伝子型及び処理	野生型溶媒	野生型 BMN 190 4 mg	野生型 BMN 190 16 mg	TPP1 欠損溶媒	TPP1 欠損 BMN 190 4 mg	TPP1 欠損 BMN 190 16 mg
上衣細胞消失、側脳室	頻度	1/4	3/3	1/3	1/3	2/3	2/3
	平均重篤度	0.4	4.0	0.33	0.67	2.0	2.0
脳室炎	頻度	0/4	1/3	0/3	1/3	2/3	2/3
	平均重篤度	0	0.33	0	0.33	1.33	1.0
カテーテル留置経路浮腫、細胞外液	頻度	0/4	1/3	1/3	0/3	1/3	0/3
	平均重篤度	0	0.67	1.0	0	1.0	0
血管周囲細胞浸潤、同側性	頻度	0/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3
	平均重篤度	0	2.0	0.67	0.33	0	0

脳における組織学的所見の頻度及び平均重篤度を示す。重篤度のスケールは以下のとおり。
1：ごく軽微、2：軽微、3：軽度、4：中等度、5：重度

これらの脳の組織学的変化は、一般に 16 mg を投与した動物と比べて BMN 190 4 mg を投与した野生型及び TPP1 欠損動物で所見が重篤であり、用量反応性は認められなかった。TPP1 欠損動物の投与量 16 mg では、投与量 4 mg と比べて重篤度が低下したのは、BMN 190 が CLN2 疾患の進行を緩和し、炎症を軽減する効果による可能性が考えられる。また、試験の進行に伴うカテーテルデザイン及び手術手技の改善（4 mg を投与した動物は、16 mg を投与した動物より先に試験に組み込んだ）、及び／又は 16 mg 投与では長い投与時間（16 mg 投与の 4 時間に対して、4 mg 投与は 2 時間）を用いたことによる可能性も考えられる。

全ての TPP1 欠損動物で、CNS 組織に CLN2 疾患の進行に伴う組織学的変化が観察された。このような組織学的変化として、ライソゾーム蓄積物質の集積に起因する蛍光性の空胞形成、神経細胞脱落、神経線維変性及び神経膠細胞症が認められた。前頭葉でみられた CLN2 疾患に関連する組織学的所見を表 2.6.6.3.2.4 に示す。

表 2.6.6.3.2.4: TPP1 欠損動物の前頭葉における CLN2 疾患関連所見のまとめ

所見	群	4	5	6
	遺伝子型	TPP1 欠損		
	処理	溶媒	BMN 190 4 mg	BMN 190 16 mg
	剖検時年齢（週）	39～47（平均 42）	51～58（平均 54）	56～67（平均 62）
神経細胞の蛍光性空胞形成	頻度	3/3	3/3	3/3
	平均重篤度	3.33	3.33	3.0
神経細胞脱落	頻度	2/3	3/3	2/3
	平均重篤度	1.33	2.33	1.0
神経線維変性、白質	頻度	1/3	0/3	1/3
	平均重篤度	0.33	0	0.67
神経膠細胞症	頻度	3/3	3/3	2/3
	平均重篤度	2.33	2.0	2.0

TPP1 欠損動物における、CLN2 疾患進行に関連した病理組織学的変化の頻度及び重篤度を示す。
重篤度のスケールは以下のとおり。1：ごく軽微、2：軽微、3：軽度、4：中等度、5：重度

野生型の対照群で観察された CNS の組織学的変化は、CLN2 疾患に関連した変化がみられないことを除き、おおむね TPP1 欠損動物と類似していた。野生型動物の組織学的所見として、脳室周囲及びカテーテル留置経路の炎症、上衣細胞消失並びにリンパ球浸潤が認められた。これらの所見の重篤度は、野生型動物と TPP1 欠損動物で同程度であった。野生型動物では、ライソゾーム蓄積物質の蛍光性顆粒、大脳及び小脳の神経細胞脱落、又は小脳神経膠症やプルキンエ細胞脱落のような、CLN2 疾患の進行を示す変化は認められなかった。BMN 190 又は溶媒を投与した TPP 欠損動物及び野生型動物の病理組織学的検査では、明白な CNS の炎症がみられたが、結果として臨床症状（頸部知覚過敏、腰部知覚過敏、髄液細胞増加及び／又は ICV/IT-L カテーテル周囲の浮腫）が軽微又はみられなかった。

心臓、肺、腎臓、肝臓、大動脈、子宮頸、結腸、食道、胆嚢、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、卵巣、子宮、膵臓、下垂体、皮膚／皮下組織、胃、胸腺、甲状腺、上皮小体、気管、膀胱及び精巣には、BMN 190 に関連する病理組織学的所見は認められなかった。観察された所見はいずれも薬剤に起因する変化ではなく、未投薬のイヌに通常みられる所見あるいは正常なイヌの生理的過程でみられる所見であり、偶発的な所見と考えられた。

野生型動物を TPP1 欠損動物と一緒に使用する利点は、CNS に投与した BMN 190 による CNS 及び生命維持に不可欠な器官（心臓、肺、肝臓及び腎臓）に対する毒性変化を、CLN2 疾患の進行による変化と分けて特性を明らかに出来ることである。野生型動物の血液学的検査及び血液生化学的検査では、BMN 190 投与に関連する所見はみられなかった。HE 染色による標準的な CNS の病理組織学的検査に加えて、神経学的な影響を検討するため特殊染色（星状膠細胞のマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質［GFAP］、及び小膠細胞症のマーカーである IBA1 の免疫組織化学染色）を実施した。BMN 190 に関連した星状膠細胞症、小膠細胞症、若しくは

CNS の形態学的変化はみられなかった。野生型動物には、BMN 190 に関連する毒性所見は観察されなかった。

脳脊髄液中の最高 BMN 190 濃度は ICV 持続投与の終了時近くで観察され、16 mg 投与（平均 1.46×10^6 ng/mL）では 4 mg 投与（平均 4.73×10^5 ng/mL）と比べて約 3 倍高かった。脳脊髄液からの BMN 190 の排出は二相性若しくは三相性の動態を示し、4 mg 及び 16 mg の両投与量で投与終了後 168 時間以内に BMN 190 の大部分が脳脊髄液中から消失した。野生型及び TPP1 欠損動物の脳脊髄液中 BMN 190 の TK プロファイルは両投与量で類似しており、投与時の CLN2 疾患進行状況は脳脊髄液中 BMN 190 の TK に影響しないことが示唆された。脳脊髄液中の TK パラメーター平均値を、投与量及び投与回数に分けて表 2.6.6.3.2.5 に示す。

表 2.6.6.3.2.5: BMN 190 の脳脊髄液中 TK パラメーターのまとめ [a)]

投与量 (mg)	投与回数	N [b)]	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (時間)	$t_{1/2}$ (時間)	V_z (mL)	CL (mL/h)
4	1	2	1.88×10^6 (5.98×10^5)	1.88×10^6 (5.98×10^5)	4.73×10^5 (2.46×10^5)	2.75 [2.5, 3]	10.2 (5.34)	35.9 (27.9)	2.25 (0.717)
16	1	6	6.45×10^6 (3.45×10^6)	6.45×10^6 (3.45×10^6)	1.46×10^6 (9.13×10^5)	3 [2.5, 5]	5.86 (3.39)	56.3 (95.8)	6.14 (9.52)
16	10	2	1.52×10^7 (1.49×10^7)	1.52×10^7 (1.49×10^7)	2.29×10^6 (2.71×10^6)	6.5 [5, 8]	2.71 (0.0184)	7.92 (7.78)	2.02 (1.98)

AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、C_{max}：最高濃度、T_{max}：最高濃度到達時間、$t_{1/2}$,：半減期、V_z：終末相に基づく分布容積、CL：クリアランス

a) 平均値及び（標準偏差）を示す、T_{max} は中央値及び［最小値, 最大値］を示した。

b) PK 解析用の脳脊髄液サンプルは、4 mg 投与群の 6 例については 1 回目の投与後に 2 例から採取し、10 回目の投与後は採取しなかった（0 例）。16 mg 投与群の 6 例については 1 回目投与後に 6 例、10 回目の投与後は 2 例から採取した。脳脊髄液の採取困難又は IT-L カテーテル閉塞のため、全ての動物からサンプルを採取することはできなかった。

BMN 190 は ICV 投与後に血漿中でも、脳脊髄液中と比べて最大 100～1000 倍低い濃度で検出された。血漿中 BMN 190 濃度は持続投与の終了時近くでピークに達し、16 mg 投与では 4 mg 投与と比べて約 3～4 倍高値であった。血漿からの BMN 190 の排出は二相性若しくは三相性の動態を示し、両投与量で投与終了後 80 時間以内に BMN 190 の大部分が血漿中から消失した。TK パラメーター平均値を、投与量及び投与回数に分けて表 2.6.6.3.2.6 に示す。

表 2.6.6.3.2.6: BMN 190 の血漿中 TK パラメーターのまとめ [a)]

投与量 (mg)	投与回数	N	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (時間)	$t_{1/2}$ (時間)	V_z (mL)	CL (mL/h)
4	1	6 [b)]	1.85×10^3 (1.90×10^3)	1.89×10^3 (1.89×10^3)	5.27×10^2 (6.95×10^2)	2 [1, 2]	10.4 (13.9)	7.33×10^4 (1.29×10^5)	3.51×10^3 (1.95×10^3)
4	10	3 [c)]	3.80×10^1 (5.04×10^1)	7.92×10^1 (2.83×10^1)	1.71×10^1 (2.34×10^1)	2 [1, 6]	8.12 (9.90)	7.69×10^5 (9.96×10^5)	5.39×10^4 (1.93×10^4)
16	1	6	5.15×10^3 (1.91×10^3)	5.18×10^3 (1.91×10^3)	1.78×10^3 (9.07×10^2)	2.25 [2, 6]	8.97 (1.89)	5.15×10^4 (4.23×10^4)	3.69×10^3 (2.06×10^3)
16	10	4 [d)]	1.42×10^3 (2.69×10^3)	-- (--)	1.68×10^2 (3.09×10^2)	8 [4, 8]	-- (--)	-- (--)	-- (--)
16	20	3 [e)]	7.25×10^1 (2.30×10^1)	1.74×10^2 (--)	1.81×10^1 (5.52×10^0)	4 [4, 4.5]	9.75 (--)	1.29×10^6 (--)	9.19×10^4 (--)

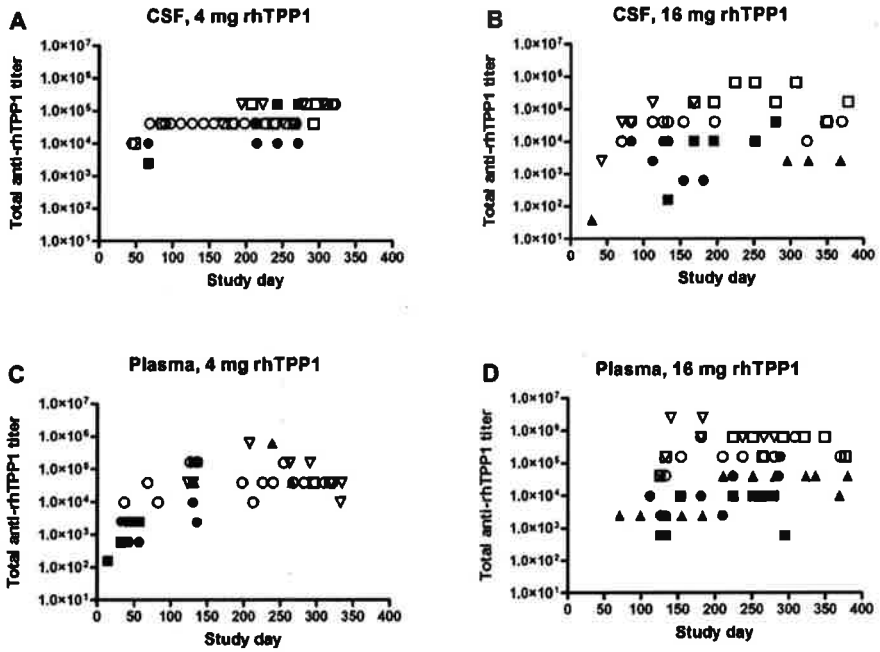
AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、C_{max}：最高濃度、T_{max}：最高濃度到達時間、$t_{1/2}$：半減期、V_z：分布容積、CL：クリアランス

a) 平均値及び（標準偏差）を示す、T_{max} は中央値［最小値, 最大値］を示した。
b) 脳脊髄液サンプル採取のための IT-L カテーテルが閉塞したため、脳脊髄液より多くの解析用血漿サンプルを採取した。
c) $AUC_{0-\infty}$、$t_{1/2}$、V_z 及び CL については、消失速度定数（λz）が未算定のため N = 2。
d) $AUC_{0-\infty}$、$t_{1/2}$、V_z 及び CL については、消失速度定数（λz）が未算定のため N = 0。10 回目投与後の PK データが得られた 16 mg 投与群の 1 例の動物については、10 回目投与を IT-C ボーラス注射により行ったため、要約統計量の算出に含まれない。
e) $AUC_{0-\infty}$ 及び $t_{1/2}$ については、消失速度定数（λz）が未算定のため N = 1。

2.6.4.4.2.2 項で記載したように、剖検時に全ての CNS 組織サンプルで BMN 190 が検出された。CNS 組織中の平均濃度は、4 mg と 16 mg を投与した動物で同等であった。一般に、ある CNS 構造の表面組織は深部組織より BMN 190 濃度が高かった。BMN 190 の濃度は、大脳皮質、小脳及び海馬など、脳脊髄液流に極めて接近した CNS の部位で高い傾向もみられた。動物の個体間で組織濃度に大きな変動がみられた。4 mg 投与群では、剖検時に 6 例中 5 例の動物で、少なくとも 1 組織は BMN 190 濃度が定量限界以下であった。16 mg 投与群では、剖検時に 6 例中 3 例の動物で、少なくとも 1 組織は BMN 190 濃度が定量限界以下であった。

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、抗 BMN 190 抗体が検出された（図 2.6.6.3.2.1）。血漿中の抗 BMN 190 抗体は、初回投与 14 日後に初めて抗体価 100～200 で検出された。血漿中の抗 BMN 190 抗体は時間と共に 100 日目頃まで増加し、その後、試験期間中は抗体価 1000～100000 で維持された。抗 BMN 190 抗体は、脳脊髄液中でも初回投与 29 日後に初めて検出された。脳脊髄液及び血漿中で、抗体価の範囲は同程度であった。

図 2.6.6.3.2.1: BMN 190 を投与したダックスフンドにおける脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体価



BMN 190 の 4 mg（A 及び C）又は 16 mg（B 及び D）を 2 週間に 1 回、反復投与した時の脳脊髄液（A 及び B）及び血漿（C 及び D）中で測定した抗 BMN 190 抗体価を示す。電気化学発光免疫測定法により、抗体価を測定した。TPP1 欠損動物をオープンの記号（○、□、▽）、野生型動物はクローズの記号（●、■、▲）で示す。脳脊髄液／血漿中抗体価の各投与量で、各動物を同じシンボルでプロットして識別した。BMN 190 を反復投与した動物から、初回投与後おおむね 1～2 箇月以内に、脳脊髄液及び血漿中で抗 BMN 190 抗体が検出された。
rhTPP1：遺伝子組換えヒトトリペプチジルペプチダーゼ 1（BMN 190）

結論：

以上より、BMN 190 の投与により過剰な薬理反応や標的器官の毒性はみられなかった。BMN 190 を少なくとも 9 箇月間反復 ICV/IT-L/IT-C 投与した結果、以下の 4 所見が認められた。1) CNS カテーテル留置経路及び注入部位に隣接した投与器具に関連する炎症、2) 野生型及び TPP1 欠損動物で反復投与後に血漿及び脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体を検出、3) 異種ヒトタンパク質の反復投与による過敏症反応、及び 4) 反復投与により、脳脊髄液中の BMN 190 濃度は明らかに維持されるが血漿中曝露量は低下、及び CNS 組織の用量依存的な薬剤分布。CNS カテーテルに隣接した部位の炎症は、溶媒対照群を含む全ての動物で観察され、CNS に対する薬剤の直接投与では予期された結果である（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。イヌでは異種ヒトタンパク質に対する過敏症反応が予測され、抗 BMN 190 抗体の産生に関連する可能性が考えられる。本試験では、BMN 190 投与に関連したライソゾーム蓄積物質の急速な除去や全身的な標的器官毒性は観察されなかった。本試験における早期死亡例は全て、BMN 190 投与に関連する死亡というより、むしろ疾患の進行、医原性傷害及び／又は CNS 投与器具の長期間留置に対する

反応に起因する死亡であった。BMN 190 を隔週で少なくとも 9 箇月間、脳脊髄液中に投与した本試験の NOAEL は 16 mg/dose であった。

2.6.6.3.3 BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルを用いた 44 週間隔週脳室内持続投与試験

（試験番号 BMN190-12-009、記載箇所 4.2.1.1-5、参考資料）

試験の目的及びデザイン：

TPP1 欠損ダックスフンドに動物の生涯にわたり、BMN 190を48 mgの用量で隔週投与（ICV 持続投与、IT-L 持続投与及び／又はIT-C ボーラス注射）し、毒性評価、脳脊髄液・血漿TK、免疫原性及びCNS の薬剤分布を検討する目的で、この非GLP 試験を実施した。また、2.6.2 項及び2.6.4項で述べたように、本試験では薬力学的作用及び薬物動態についても評価した。本試験では、0190-10-077 試験で行った解析を高用量で継続した。試験は[redacted]で実施した。この試験は米国FDA CFR21 Part 58に規定されたGLP に準拠していないが、一般的に許容される科学的基準を適用した。本試験の動物実験（in-life）部分を 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始し、20[redacted]年[redacted] 月[redacted]日に試験全体が完了した。本試験の成績は試験報告書 BMN190-12-009 に記載した。

材料と方法：

[redacted]で繁殖・飼育された、未処置の TPP1 欠損ダックスフンド 3 例を試験に使用した。動物は試験開始時に約 2.5 箇月齢（[redacted]動物実験委員会で許容される最若月齢）であり、体重が2.65 kg（雄P）、1.5 kg（雌 U）及び 2.15 kg（雌 M）であった。表2.6.6.3.3.1 に示すように動物を1 群に割り付け、BMN 190 を投与した。

表 2.6.6.3.3.1: ダックスフンド CLN2 モデルにおける 44 週間隔週脳室内持続投与試験のデザイン

群	遺伝子型	動物数	処理 a), b)	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 18 箇月間

a) 溶媒、人工脳脊髄液（216.5 mmol/L NaCl、0.80 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.40 mmol/L $CaCl_2$、0.80 mmol/L Na_2HPO_4、0.20 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3）
b) BMN 190、ロット番号[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 2.6.6.3.3.2 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 = 6 箇月間、動物 P = 9 箇月間、動物 U = 18 箇月間

2.6.6.3.2 項に記載したように、脳定位固定法を用いて動物にカテーテル及び投与ポートの埋め込み手術を施した。BMN 190 の持続投与のためカテーテル 1 本を側脳室に、脳脊髄液の連続採取のため他の 1 本を腰椎に、それぞれ埋め込んだ。BMN 190 を 2 週間に 1 回、4 時間持続投与により 0.42 mL/時間の速度で投与した。CNS カテーテルに対する反応のため、安楽死処置が必要となるまで投与を継続した。頭蓋骨の成長のため側脳室から ICV カテーテルの位置が移動した場合及び／又はカテーテルの開存性が欠如した場合は、腰部髄腔内（IT-L）注入により可能な限り投与を継続した。ICV・IT-L カテーテルがいずれも機能を失った場合には、残りの BMN 190 投与は大槽内（IT-C）ボーラス注射を行った。異種ヒトタンパク質の反復投与による

過敏症反応を軽減するため、投与 30 分前にジフェンヒドラミンを 2 mg/kg 筋肉内投与した。投与中又は投与後に、過敏症反応を示す症状（顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈及び／又は血圧低下）が観察された場合には、ジフェンヒドラミンを 2 mg/kg 追加して筋肉内投与した。

表 2.6.6.3.3.2 に示すように、動物に BMN 190 を 2 週間に 1 回投与した。注入速度 0.42 mL/時間の 4 時間持続投与とし、その後、リン酸緩衝生理食塩液でフラッシュした（注入速度 0.6 mL/時間で 45 分間）。動物には、BMN 190 の初回及び／又は 2 回目の ICV 投与を 48 mg の用量で行った。2 回目又は 3 回目の投与中に発現した過敏症反応を緩和するため、投与量を 2 mg に減量し、その後、動物が BMN 190 に対する耐性を獲得するに従い、徐々に 48 mg の投与量まで増加した。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塩酸塩（5 µg/kg、筋肉内）を投与し、投与中鎮静を保った。

表 2.6.6.3.3.2: BMN190-12-009 試験における BMN 190 の投与履歴

投与回数	動物番号 1（雄 P）	動物番号 2（雌 M）	動物番号 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

2.6.6.3.2 項に記載したように、毎週、動物に身体的検査及び神経学的検査を行った。CLN2 疾患の進行を示す神経学的症状、BMN 190 の影響及び CNS カテーテルの影響について評価した。間接検眼鏡検査に続いて細隙灯顕微鏡検査など、眼科的検査を月 1 回実施した。6、8、10 及び 12 箇月齢で瞳孔の対光反射を検査した。網膜電図は毎月記録した。眼病変が認められた場合には、それぞれの眼科的検査の少なくとも 1 週間後に眼底の状態をデジタル眼底カメラで記録した。疾患の進行及び／又は BMN 190 投与に起因する脳の形態的変化が起きていないか調べるために、1、19 及び 39 週目に MRI を用いて脳容積の測定を行った。血液学的検査及び血液生化学的検査のため、各動物から試験中に 5～9 回（ほぼ隔月で）採血を行った。検査した臨床病理学パラメーターを表 2.6.6.3.3.3 に示す。さらに、心筋トロポニン I の測定のため、試験の 16、25、33、38、42、51、61、67 及び 77 週目に血清サンプルを採取した。

表 2.6.6.3.3.3: BMN190-12-009 試験で検査した臨床病理学パラメーター

血液学的検査	血液生化学的検査
血漿タンパク	ブドウ糖
白血球数	尿素窒素
赤血球数	クレアチニン
血色素量	ナトリウム
ヘマトクリット	カリウム
平均赤血球容積（MCV）	塩素
平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）	総 CO_2
平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）	アニオン・ギャップ
血小板数	アルブミン
分葉核球	総タンパク
桿状核球	グロブリン
リンパ球	カルシウム
単球	無機リン
好酸球	コレステロール
好塩基球	総ビリルビン
網状赤血球数	アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）
	アルカリホスファターゼ（ALP）
	γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）
	心筋トロポニンI

TK 解析用の脳脊髄液サンプルは IT-L カテーテルを通して採取した。1 回目の投与では 3 例中 2 例の動物から、持続投与の開始直前、投与中間点、投与終了直後並びに投与終了後 0.5、1、4、12、24、48、72、120 及び 168 時間で脳脊髄液を採取した。TK 解析用の血液サンプルは、頸静脈又はそれ以外の末梢静脈の穿刺により採取した。1 回目の投与では、BMN 190 48 mg を投与した全 3 例の動物から、持続投与の開始直前、投与中間点、投与終了直後並びに投与終了後 0.5、1、4、12、24、48、72、120 及び 168 時間で連続して血液サンプルを採取した。

抗 BMN 190 抗体検出用のサンプルとして、初回の ICV 投与前日、2、3、4、5、10、15 及び 20 回目の投与開始直前及び剖検時に、頸静脈穿刺により血液 1 mL を採取した。血液サンプルを抗凝固剤としてK_2EDTA を含む遠沈管に注入し、[redacted]のガイドラインに従って遠心分離して血漿を採取した。初回のICV 投与前、2、3、4、5、10、15 及び20 回目の投与開始直前及び剖検時に、可能な限り抗BMN 190 抗体検出用の脳脊髄液（300 µL）を採取した。

血漿及び脳脊髄液中の BMN 190 濃度を、ELISA 法（血漿及び脳脊髄液中の LLOQ は、それぞれ[redacted]ng/mL 及び[redacted]ng/mL）で測定した。血漿及び脳脊髄液中の BMN 190 を定量するために、rhTPP1 の酵素前駆体に特異的な ELISA 法を使用した。TK パラメーターは[redacted]米国[redacted]を使用して算出した。炎症を示した動物あるいはカテーテル感染の可能性がある動物では、必要に応じて細胞数測定のため脳脊髄液を採取した。

ICV カテーテルに対するCNS の反応（髄膜炎、閉塞性水頭症）が、[redacted]動物実験委員会により安楽死が必要と判断された時点で動物を安楽死させた。出生から安楽死までの期間を、動物の寿命と定義した。安楽死の時点で動物P と動物U は疾患の進行を示す臨床症状がみられたが、いずれの動物も2.6.2.2.5 項で定義したような疾患の終末期までには進行していなかった。安楽死処置は最終投与の12 日後（動物M）又は13 日後（動物P 及び動物U）に行った。脳を剔出して重量を測定した。脳のほかに以下の神経系組織を採取した：頸髄、胸髄、腰髄、坐骨神経、腓腹神経及び視神経を付けた眼球。

病理組織学的検査のため、脳を除いた上記組織の代表的サンプルを 10%中性緩衝ホルマリン（NBF）で固定し、これ以外のサンプルは-80℃で凍結保存した。脳は器質をトリミングして 3 mm の厚さで冠状にスライスした。凍結又は固定したサンプルを得るために、直径 4 mm の生検パンチを用いてこれらの切片から選定した脳の部位を採取した。組織分布用の切片は、凍結する前に大脳皮質、後頭皮質、小脳、線条体、延髄、中脳及び視床から 4 × 4 mm の 2 標本を切り出し、液体窒素で急速凍結した。図 2.6.6.2.1.1 に示すように、これらの標本は BMN 190 の組織分布を評価する各構造の表面（深さ 3 mm 未満）及び深部（深さ 3 mm 超）の組織サンプルである。病理組織学的検査及び BMN 190 の組織分布を評価するため、頸部、胸部及び腰部脊髄から約 1 cm の切片を採取した。残余の脳切片は 10% NBF で固定して、病理組織学的検査に供した。脳のスライスから作製した脳組織切片は、ヘマトキシリン及びエオシン染色（一般的な組織染色）、並びにグリア線維性酸性タンパク質（GFAP、星状膠細胞のマーカー）及び IBA1（小膠細胞のマーカー）の免疫染色を施した。脳、心臓、腎臓、肝臓、肺及び脾臓は重量を測定した。

次表に示す非 CNS 組織の代表サンプルを採取し、10% NBF で固定した。

大動脈	卵巣（2）
子宮頸	膵臓
結腸	下垂体
精巣上体（2）	前立腺
食道	精嚢
胆嚢	皮膚／皮下組織
心臓	脾臓
腎臓	胃
病変部位	精巣（2）
肝臓	胸腺
肺	甲状腺（2 葉）及び上皮小体
下顎リンパ節	気管
腸間膜リンパ節	膀胱
骨格筋（大腿四頭筋）	子宮

これらの組織をパラフィン包埋、薄切及び HE 染色して病理組織学的検査に供した。CNS 及びその他の全身組織は全て、有資格の獣医病理学者が病理組織学的検査を行った。

結果：

試験期間中にCLN2疾患の終末期に達した動物はなく、イヌでCNS投与器具を長期間使用したことに起因する合併症のため、全ての動物を安楽死させた。動物Mを36週齢、動物Pを49週齢、動物Uを88週齢で安楽死させた。動物Mは36週齢の時点で、活動性低下、緩徐呼吸、瞳孔反射の低下、垂直性眼振、威嚇瞬き反応の消失及び体弛緩を示した。この動物は髄膜炎に伴う閉塞性水頭症と診断され、脳ヘルニアの疑いがあり緊急の剖検が必要であった。動物Pは47週齢時にMRIで閉塞性水頭症と診断され、脳ヘルニアが疑われた。本例は49週齢で剖検した。動物Uは、87週齢時にMRIで脳ヘルニアが疑われ水頭症と診断された。本例は88週齢で安楽死させた。動物UはCLN2疾患の終末期には達していなかったが、疾患の神経学的症状は他の2例の動物よりも疾患の進行を示していた。全3例の死因は、主にCNS投与器具の長期間留置に関連しており、CLN2疾患の進行やBMN 190の影響ではなかった。

体重、体重増加量、あるいは血液学的検査や血液生化学検査パラメーターのいずれにおいても、BMN 190に関連した変化や傾向はみられなかった。また、眼科的検査、対光反射あるいは網膜電図のパラメーターにも、BMN 190に関連した変化や傾向はみられなかった。動物P及びUでは、それぞれ試験26週目（36週齢）及び33週目（43週齢）から、正常値の範囲0～0.5 ng/mLを超えて血清心筋トロポニンIが上昇した。これら2例の動物では、これ以降の試験期間で心筋傷害を示すこのマーカーが、最高で正常な高参照値の約 4 倍までおおむね上昇した。CLN2疾患は基本的にCNSの障害であるが、CNSでの疾患進行が緩和するならば、病態が他の器官に現れることが予想される。心筋トロポニンIの上昇は心臓でのCLN2疾患進行により引き起こされ、この所見はヒトの CLN2 患者で報告されており（Fukumura, 2012, Dev. Med. Child Neurol.）、BMN 190に関連する変化ではないと考えられる。BMN 190を投与した野生型のイヌでは、トロポニンの上昇は観察されていない。溶媒を投与したTPP1欠損動物は、おそらく心臓の疾患が現れる前にCNSでのCLN2疾患の進行により死亡したため、トロポニン上昇を示さなかった。トロポニンが上昇した2例のTPP1欠損ダックスフンドでは、心電図波形に相当する変化はみられなかった。動物Uは心臓の病理組織学的検査でごく軽微な筋線維変性が認められたが、この動物では寿命が大幅に延長しており、CLN2 疾患の進行に関連する可能性が疑われた。動物 P の心臓に組織学的変化はみられなかった。脳脊髄液の細胞数や化学的検査で、BMN 190に関連した影響は認められなかった。動物でカテーテルに起因する反応が疑われた場合に、脳脊髄液の細胞数計測及び化学的検査を実施した。全ての動物で1回又はそれ以上の回数で、脳脊髄液の混合型細胞増加がみられた。

BMN 190 48 mgの反復投与により、全例で2回目（3週目）又は3回目（5週目）のICV投与中及び投与後に、軽度～中等度の過敏症反応が観察された。顔面浮腫、耳介・顔面の紅斑、頻脈、呼吸促迫、蕁麻疹、血圧低下、下痢及び嘔吐などの症状が観察された。これらの症状は持続投与の開始後間もなく、又は終了直後に発現した。これらの反応は、おそらくイヌに異種のヒトタンパク質を投与したことに対する反応と考えられ、投与後24時間以内に完全に消失した。表2.6.6.3.3.2に示したように、投与量を2 mgに減量して徐々に48 mgまで戻すことにより、効果的に動物をBMN 190から脱感作し、過敏症反応が繰り返し発現することを防止した。

剖検時に器官重量及び肉眼的所見の変化はみられなかった。BMN 190 の特有な作用を示す、病理組織学的所見は認められなかった。病理組織学的検査により、脳の形態学的変化、星状膠細胞症、小膠細胞症並びに ICV カテーテル留置経路及び脳室近傍の変化が明らかとなった。おそらく BMN 190 投与に関連する CNS の組織学的所見は、タンパク質を側脳室に持続投与した場合に予測される変化（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）と一致する。

2 例の動物（動物 M 及び P）は、カテーテル留置経路及び脳室系内／周囲（主に ICV カテーテルと同側の側脳室）で中等度～重度の炎症性変化が認められた。動物 M ではおそらく脳室周囲の炎症に伴う広範な脳浮腫が認められ、カテーテル留置経路の顕著な炎症、星状膠細胞症、小膠細胞症並びにカテーテル留置経路に隣接する線条体で壊死もみられた。動物 P では星状膠細胞症、小膠細胞症及び脳浮腫など、カテーテル留置経路及び脳室周囲の顕著な炎症性変化が認められた。動物 U はカテーテル留置経路に顕著な限局性の炎症性変化がみられたが、脳室系の変化は他の 2 例の動物と比べて影響が小さかった。動物 U はカテーテル留置経路の反応が限局的で脳室の炎症がみられなかった結果、この動物は CNS 投与器具に対する反応のため安楽死が必要となるまで長期間生存した可能性が考えられる。

3 例全ての動物で観察された炎症反応は、投与したタンパク質に対する非特異的な反応であり、BMN 190 の存在が炎症反応に寄与している可能性が考えられる。しかし、BMN 190 の影響を長期反復投与による変化、動物モデルにおける CLN2 疾患の進行に伴う形態学的変化、及び薬剤投与器具の設置／存在／維持に起因する変化と区別することは不可能である（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。病理組織学的検査により、全ての動物で CLN2 疾患の進行を示す変化が認められた。このような変化として、深部大脳皮質の星状膠細胞症、神経細胞消失及び蛍光性ライソゾーム蓄積物質の集積（Awano, 2006, Mol. Genet. Metab）が観察された。おそらく長い生存期間のため、これらの形態学的変化は概して動物 U で最も顕著であった。

心臓、肺、腎臓、肝臓、大動脈、子宮頸、結腸、食道、胆嚢、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、卵巣、子宮、膵臓、下垂体、皮膚／皮下組織、胃、胸腺、甲状腺、上皮小体、気管、膀胱及び精巣など、検査した他のいずれの器官でも、BMN 190 に関連した病理組織学的所見は観察されなかった。認められたいずれの所見も投薬に関連する変化ではなく、未処置のイヌで通常みられる所見、又は正常なイヌの生理的過程と一致する所見であり、偶発的所見と考えられた。動物 U でごく軽微な筋線維変性の心臓所見が観察され、生存期間が大幅に延長したこの動物では、CLN2 疾患進行との関連が考えられた。

初回の ICV 投与中及び投与後に採取した脳脊髄液の TK 分析により、持続投与の終了時近くで脳脊髄液中の BMN 190 濃度が最高値に達することが明らかとなった。BMN 190 の脳脊髄液からの消失は二相性の動態を示し、BMN 190 の大部分が投与終了後 168 時間以内に脳脊髄液中から排出された。脳脊髄液中の TK パラメーターを表 2.6.6.3.3.4 に示す。

表 2.6.6.3.3.4: BMN 190 の初回 48 mg 脳室内持続投与後の脳脊髄液中 TK パラメーター

動物	T_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	$t_{1/2}$ (時間)	CL (mL/h)	V_z (mL)
M	4.50	1.99×10^6	1.08×10^7	10.8×10^6	5.39	4.43	34.4
P	5.00	1.56×10^6	1.03×10^7	10.3×10^6	7.78	4.64	52.1
N	2	2	2	2	2	2	2
平均値	4.75	1.78×10^6	1.06×10^7	1.06×10^7	6.59	4.54	43.3
標準偏差	0.354	3.08×10^5	3.52×10^5	3.52×10^5	1.69	0.151	12.5
最小値	4.50	1.56×10^6	1.03×10^7	1.03×10^7	5.39	4.43	34.4
中央値	4.75	1.78×10^6	1.06×10^7	1.06×10^7	6.59	4.54	43.3
最大値	5.00	1.99×10^6	1.08×10^7	1.08×10^7	7.78	4.64	52.1
%CV	7.44	17.4	3.33	3.33	25.7	3.33	28.9

T_{max}：最高濃度到達時間、C_{max}：最高濃度、AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、$t_{1/2}$：半減期、CL：クリアランス、V_z：分布容積
PK 分析用の脳脊髄液サンプルは 1 回目の投与では 3 例中 2 例の動物から採取したが、10 回目の投与では 3 例のいずれからも採取しなかった。脳脊髄液採取の技術的困難あるいはカテーテルの開存性が失われたため、全ての動物から計画どおりサンプルを採取することはできなかった。

BMN 190 は ICV 投与後に血漿中からも検出され、C_{max} は脳脊髄液中と比べて 2、3 オーダー低いレベルであった。血漿中の TK パラメーターを表 2.6.6.3.3.5 に示す。

表 2.6.6.3.3.5: BMN 190 の初回 48 mg 脳室内持続投与後の血漿中 TK パラメーター

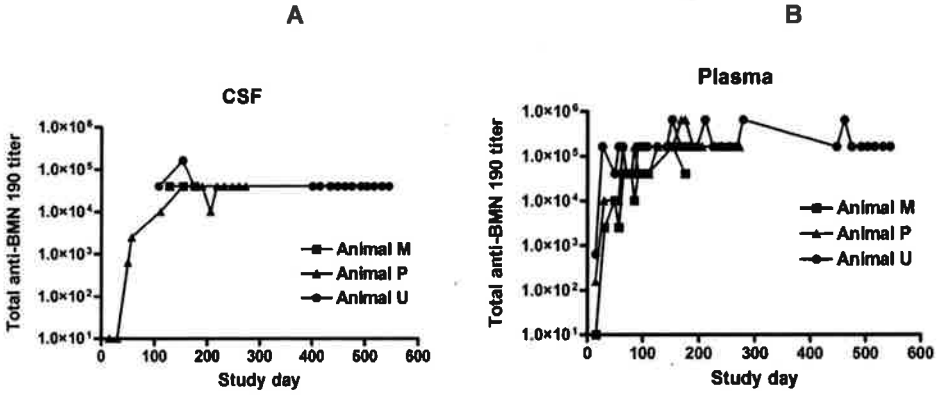
動物	T_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	$t_{1/2}$ (時間)	CL (mL/h)	V_z (mL)
M	4.00	7910	44000	44000	26.1	1090	41100
P	4.00	3760	21700	21700	20.5	2210	65100
U	4.50	11100	54900	54900	22.2	874	27900
N	3	3	3	3	3	3	3
平均値	4.17	7.60×10^3	4.02×10^4	4.02×10^4	22.9	1390	44700
標準偏差	0.289	3.69×10^3	1.69×10^4	1.69×10^4	2.91	716	18900
最小値	4.00	3.76×10^3	2.17×10^4	2.17×10^4	20.5	874	27900
中央値	4.00	7.91×10^3	4.40×10^4	4.40×10^4	22.2	1090	41100
最大値	4.50	1.11×10^4	5.49×10^4	5.49×10^4	26.1	2210	65100
%CV	6.93	48.5	42.1	42.0	12.7	51.5	42.2

T_{max}：最高濃度到達時間、C_{max}：最高濃度、AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、$t_{1/2}$：半減期、CL：クリアランス、V_z：分布容積

BMN 190 を投与した全ての動物の血漿及び脳性髄液中で、抗 BMN 190 抗体が検出された（図 2.6.6.3.3.1）。血漿及び脳脊髄液中では、それぞれ初回投与後 4 週目及び 8 週目に抗 BMN 190 抗体が初めて検出された。抗体価及び抗体の産生率は全ての動物で類似しており、全動物の全ての測定ポイントにおける血漿及び脳脊髄液中の平均抗体価は、それぞれ 123,950 及び 33,522 であった。脳脊髄液中の平均抗体価は血漿中より 3.6 倍低値であった。最大抗体価と 2 回目及び／又は 3 回目の持続投与後に発現した過敏症反応に相関はみられなかった。血漿及び脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体価は試験期間を通じて維持されたが、これが BMN 190 の薬理作用に影響

することはないようであった。脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体パラメーターを、それぞれ表 2.6.6.3.3.6 及び表 2.6.6.3.3.7 に示す。

図 2.6.6.3.3.1: 脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体価



TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を 48 mg までの用量で 2 週間に 1 回反復投与後に測定した、脳脊髄液（A）及び血漿（B）中の総抗 BMN 190 抗体価。電気化学発光免疫測定法により抗体価を測定した。

表 2.6.6.3.3.6: 脳脊髄液中の抗 BMN 190 抗体パラメーターのまとめ

	測定ポイント数	抗体価平均値	抗体価中央値	抗体価最小値 a)、最大値（ピーク値）	ピーク抗体価観察日
動物 M	4	30720	40960	< 10、40960	128
動物 P	15	23425	40960	< 10、40960	154
動物 U	15	46421	40960	< 10、163840	153
平均値 b)	--	33522	40960	< 10、81920	145

a) アッセイの最小希釈倍率（1:10）で抗体サンプルの抗体価が検出されなかった場合は、結果を< 10 と表示した。< 10 の結果は、値 0 として要約統計量を算出した。
b) 全動物の要約統計量の平均値（N = 3）。

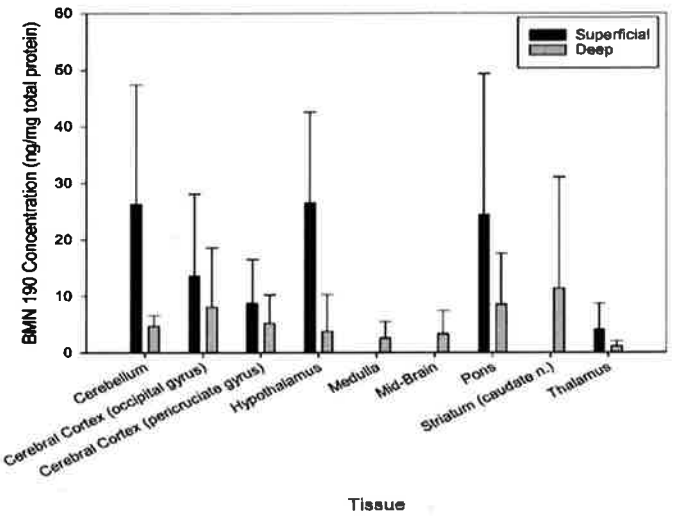
表 2.6.6.3.3.7: 血漿中の抗 BMN 190 抗体パラメーターのまとめ

	測定ポイント数	抗体価平均値	抗体価中央値	抗体価最小値 a)、最大値（ピーク値）	ピーク抗体価観察日
動物 M	14	34012	40960	< 10、163840	154
動物 P	24	141233	163840	< 10、655360	169
動物 U	35	196606	163840	< 10、655360	153
平均値 b)	--	123950	122880	< 10、491520	159

a) アッセイの最小希釈倍率（1:10）で抗体サンプルの抗体価が検出されなかった場合は、結果を< 10 と表示した。< 10 の結果は値 0 として要約統計量を算出した。
b) 全動物の要約統計量の平均値（N = 3）。

安楽死後に様々な CNS 組織中の BMN 190 濃度を定量した。剖検時には、様々な CNS 組織にわたって BMN 190 が広く分布し、図 2.6.6.3.3.2 の標準偏差にみられるように動物間で大きな変動が認められた。

図 2.6.6.3.3.2: BMN 190 の脳室内／髄腔内投与後のダックスフンド脳組織中の BMN 190 平均濃度



BMN 190 の脳室内／髄腔内投与後の TPP1 欠損ダックスフンド（N = 3）表面及び深部脳組織中の BMN 190 平均濃度。エラーバーは標準偏差を示す。

結論：

結論として、BMN 190 を最大 48 mg の用量で長期投与した結果、過大な薬理作用や標的器官毒性はみられなかった。病理組織学的検査では、CNS カテーテル及び投与部位の近傍で炎症が観察された。イヌに異種のヒトタンパク質を投与したことに起因する過敏症反応は、投与量を減量し、耐性を獲得するに従って徐々に 48 mg まで戻すことにより軽減した。過敏症反応が軽減する間も抗体価の上昇が続いたが、脳脊髄液及び血漿中の最初の抗 BMN 190 抗体発現と過敏症反応に相関がみられた。本試験では、急速なライソゾーム蓄積物質の除去、又は全身的な器官毒性のいずれかに起因する BMN 190 の毒性は観察されなかった。本試験でみられた全ての死亡例は、BMN 190 投与に関連する死亡とするより、むしろ CNS 投与器具の長期間留置によるものであった。本試験における NOAEL は 48 mg/dose であった。

2.6.6.3.4 BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルを用いた 39 週間脳室内持続投与試験

（試験番号 BMN190-12-027、記載箇所 4.2.1.1-6、参考資料）

試験の目的及びデザイン：

TPP1 欠損及び野生型（正常）ダックスフンドに、BMN 190 を 16 mg の用量で 4 箇月齢から投与（ICV 持続投与、IT-L 持続投与又は IT-C ボーラス注射）を開始して、毒性及び脳脊髄液／血漿中 TK の特徴を明らかにすることを目的として、この非 GLP 試験を実施した。また、2.6.2.2.7 項に要約したように、BMN 190 の一次的な薬力学的（PD）作用を評価した。

本試験では 0190-10-077試験で行った解析を、開始時期を遅らせて継続した（0190-10-077 試験の2.5箇月齢に対して、4箇月齢から開始）。4 箇月齢の開始時期は、CLN2 患者で BMN 190 の投与を開始するヒトの年齢（3～5 歳）に相当する。試験は[redacted]

[redacted]で実施した。この試験は米国FDA CFR 21 Part 58に規定されたGLPに準拠していないが、一般的に許容される科学的基準を適用した。本試験の動物実験（in-life）部分を20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に開始し、20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に試験全体が完了した。本試験の成績は試験報告書BMN190-12-027に記載した。

材料と方法：

未処置のTPP1欠損及び野生型ダックスフンド（[redacted]）の各3例を本試験に使用した。動物は試験開始時に約4箇月齢であり、体重が4.8～5.6 kg（雄4例）及び3.9～4.7 kg（雌2例）であった。表2.6.6.3.4.1に示すように動物を2群に割り付け、BMN 190を投与した。

表 2.6.6.3.4.1: BMN 190 のダックスフンド CLN2 モデルを用いた 39 週間脳室内投与試験のデザイン

群	遺伝子型	動物数	処理 a), b)	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

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、ロット番号[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、投与量を減量し、表2.6.6.3.4.2に示すように徐々に増量した。
d) おおよその投与期間は、動物Jが6箇月間、動物Aj・An・Tが5箇月間、動物Cが4箇月間、動物Mが2箇月間であった。

2.6.6.3.2項に記載したように、脳定位固定法を用いて動物にICVカテーテルの埋め込み手術を施した。BMN 190の持続投与及び脳脊髄液の連続採取が可能となるよう、側脳室及び腰椎にそれぞれ1本カテーテルを埋め込んだ。BMN 190を2週間に1回、脳室に届くまで（通常35分前後）は0.6 ml/時間の速度、その後投与終了までは0.3 mL/時間の速度で、4時間持続投与した。持続投与終了直後、カテーテルのラインを洗浄するため、リン酸緩衝生理食塩液でフラッシュした（0.6 mL/時間 45分間）。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塩酸塩（5 μg/kg、筋肉内）を投与し、投与中鎮静を保った。

動物に隔週で5～13回BMN 190を投与した。CNSカテーテルに対する反応のため、安楽死処置が必要となるまで投与を継続した。頭蓋骨の成長のため側脳室からICVカテーテルの位置が移動した場合及び／又はカテーテルの開存性が欠如した場合は、腰部髄腔内（IT-L）注入により可能な限り投与を継続した。ICV及びIT-Lカテーテルがいずれも機能を失った場合には、残りのBMN 190投与は大槽内（IT-C）ボーラス注射を行った。異種ヒトタンパク質の反復投与による過敏症反応を軽減するため、投与30分前にジフェンヒドラミンを2 mg/kg筋肉内投与した。投与中又は投与後に、過敏症反応を示す症状（顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈及び／又は血圧低下）が観察された場合には、ジフェンヒドラミンを2 mg/kg追加して筋肉内投与した。

最初の2回はBNM 190を16 mgの用量で動物にICV投与した。2回目の投与から一部の動物で持続投与に対する反応が発現した。このような反応として、振戦、発熱、頻脈、呼吸促迫及び血圧上昇が観察された。これらの反応は最終的に全ての動物で発現し、予定した期間の投

与が不可能であった。BMN 190 に対する耐性を誘導する試みとして、反応を示した動物には投与量を減量して残りの投与を行った。しかし、溶媒を投与した動物でも過敏症反応が継続した。試験施設の動物実験委員会の要請により投与を中止したため、本試験は予定した期間の投与が継続できなかった。表 2.6.6.3.4.2 に各動物の毎回の投与量及び投与経路を示す。

表 2.6.6.3.4.2: BMN190-12-027 試験の動物における BMN 190 の投与履歴

投与回数	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	--	--	--	--	--

ICV：脳室内投与、IT-C：大槽内投与、IT-L：腰部髄腔内投与、WT：野生型（正常）、--：投与せず、0 mg：溶媒（人工脳脊髄液）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。

2.6.6.3.2 項に記載したように、毎週、動物に身体的検査及び神経学的検査を行った。CLN2 疾患の進行を示す神経学的症状、BMN 190 の影響及び CNS カテーテルの影響について評価した。間接検眼鏡検査に続いて細隙灯顕微鏡検査など、眼科的検査を月 1 回実施した。1 回目の投与以降、毎月、網膜電図を記録した。該当する場合は 6、8 及び 10 箇月齢で対光反射を検査した。網膜の CLN2 疾患進行をモニターするため、該当する場合は 6、8 及び 10 箇月齢で光干渉断層撮影を実施した。眼病変が認められた場合には、それぞれの眼科的検査の少なくとも 1 週間後に眼底の状態をデジタル眼底カメラで記録した。疾患の進行及び／又は BMN 190 投与に起因する脳の形態的変化が起きていないか調べるために、約 2、6.5、11 及び 12 箇月齢で MRI を用いて脳室と総脳容積を定量的に測定した。各動物について心電図をほぼ隔月で評価した（各動物で 3～4 回）。血液学的検査及び血液生化学的検査のため、各動物から試験中に 5～8 回、ほぼ隔月で採血を行った。検査した臨床病理学パラメーターを表 2.6.6.3.4.3 に示す。また、CLN2 疾患の進行による心機能の減退を評価するため、心筋トロポニン I 測定用の血清サンプルを毎月採取した。

表 2.6.6.3.4.3: BMN190-12-027 試験で検査した臨床病理学パラメーター

血液学的検査	血液生化学的検査	凝固能検査
血漿タンパク	ブドウ糖	プロトロンビン時間
白血球数	尿素窒素	活性化部分トロンボプラスチン時間
赤血球数	クレアチニン	
血色素量	ナトリウム	
ヘマトクリット	カリウム	
平均赤血球容積（MCV）	塩素	
平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）	総 CO_2	
平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）	アニオン・ギャップ	
血小板数	アルブミン	
分葉核球	総タンパク	
桿状核球	グロブリン	
リンパ球	カルシウム	
単球	無機リン	
好酸球	コレステロール	
好塩基球	総ビリルビン	
網状赤血球数	アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）	
	アルカリホスファターゼ（ALP）	
	γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）	
	心筋トロポニン I	

TK 解析用の脳脊髄液サンプルは IT-L カテーテルを通して採取した。1 回目の投与では 6 例中 2 例の動物から、持続投与の開始直前、投与中間点、投与終了直後、並びに投与終了後 0.5、1、4、12、24、48、72、120 及び 168 時間で脳脊髄液を連続して採取した。残りの 4 例は投与後 24 時間のみ脳脊髄液を採取した。1 回目及び 5 回目の投与では、TK 解析用の血液サンプルを頸静脈又はそれ以外の末梢静脈の穿刺により、持続投与の開始直前、投与中間点、投与終了直後並びに投与後 0.5、1、4、12、24、48、72、120 及び 168 時間で連続して採取した。1 回目の投与後は全 6 例の動物から血液サンプルを採取し、5 回目の投与では 6 例中 2 例から採取した。

血漿及び脳脊髄液中のBMN 190 濃度を、ELISA 法（血漿及び脳脊髄液中の LLOQ は、それぞれ[redacted]及び[redacted]ng/mL）で測定した。血漿及び脳脊髄液中のBMN 190 を定量するため、rhTTP1 の酵素前駆体に特異的な ELISA 法を使用した。TK パラメーターは[redacted]を使用して算出した。炎症を示した動物あるいはカテーテル感染の可能性がある動物では、必要に応じて細胞数測定のため脳脊髄液を採取した。

抗BMN 190 抗体検出用のサンプルとして、初回ICV 投与の前、6 及び 12 回目の投与開始直前、並びに妥当な場合は剖検時に頸静脈穿刺により血液 1 mLを採取した。血液サンプルを抗凝固剤としてK_2EDTA を含む遠沈管に注入し、[redacted]のガイドラインに従って遠心分離して血漿を採取した。可能な場合は初回ICV 投与の前、5回目及び10回目の投与開始直前、並びに妥当な場合は剖検時に、抗BMN 190 抗体検出用の脳脊髄液（300 µL）を採取した。

TPP1 欠損動物は、2.6.6.3.1 項に記載したような、CLN2 疾患の進行が終末期に達した時に安楽死させた。野生型動物は可能な場合には、TPP1 欠損動物と月齢が相当する対照動物として安楽死させた。出生から安楽死までの期間を生存期間と定義した。

剖検時に脳を剔出して重量を測定した。脳のほかに以下の中枢神経組織を採取した：頸髄、胸髄、腰髄、坐骨神経、腓腹神経及び視神経を付けた眼球。病理組織学的検査のため、脳を除いた上記組織の代表的サンプルを 10% NBF で固定した、これ以外のサンプルは-80℃で凍結保存した。脳は器質をトリミングして 3 mm の厚さで冠状にスライスした。凍結又は固定したサンプルを得るために、直径 4 mm の生検パンチを用いてこれらの切片から選定した脳の部位を採取した。組織分布用の切片は、凍結する前に大脳皮質、後頭皮質、小脳、線条体、延髄、中脳及び視床から 4 × 4 mm の 2 標本を切り出し、液体窒素で急速凍結した。図 2.6.6.2.1.1 に示すように、これらの標本は BMN 190 の組織分布を評価する各構造の表面（深さ 3 mm 未満）及び深部（深さ 3 mm 超）の組織サンプルである。病理組織学的検査及び BMN 190 の組織分布を評価するため、頸部、胸部及び腰部脊髄から約 1 cm の切片を採取した。残余の脳切片は 10% NBF で固定して、病理組織学的検査に供した。脳のスライスから作製した脳組織切片は、ヘマトキシリン及びエオシン染色（一般的な HE 組織染色）、並びにグリア線維性酸性タンパク質（GFAP、星状膠細胞のマーカー）及び IBA1（小膠細胞のマーカー）の免疫染色を実施した。

脳、心臓、腎臓、肝臓、肺及び脾臓は重量を測定した。次表に示す非 CNS 組織の代表サンプルを採取し、10% NBF で固定した。

副腎（2）	投与部位	精嚢
大動脈	空腸	皮膚／皮下組織
盲腸	病変部位	骨髄を含む胸骨
子宮頸	下顎リンパ節	胃
結腸	腸間膜リンパ節	精巣（2）
十二指腸	乳腺（雌）	胸腺
精巣上体（2）	骨格筋（大腿四頭筋）	甲状腺（2 葉）及び上皮小体
食道	卵巣（2）	脛骨（近位成長板）
骨髄を含む大腿骨（関節面／遠位端）	膵臓	舌
	下垂体	気管
胆嚢	前立腺	膀胱
回腸	直腸	子宮
	唾液腺［顎下腺（2）］	膣

これらの組織を採取し、病理組織学的検査に備えて保存した。全ての CNS 組織並びに心臓、肺、肝臓、腎臓及び脾臓について、有資格の獣医病理学者が病理組織学的検査を行った。

結果：

TPP1 欠損動物は全て、CLN2 疾患の進行が終末期に達するまで試験で維持した。野生型の対照動物は、TPP1 欠損動物と同じ月齢又は投与終了後に安楽死させた。体重、体重変化、心電図あるいは血液学的・臨床生化学的パラメーターに、BMN 190 に関連した変化又は傾向は認められなかった。全ての血液学的パラメーターは正常な参照値の範囲内にあった。TPP1 欠損の 1 例（動物 An）で、心筋トロポニンが約 10 箇月齢から安楽死の時点まで、正常値の範囲（0～0.5 ng/mL）からわずかに上昇した。野生型動物では、心筋トロポニンは正常範囲内で維持された。2.6.6.3.2 項で記載したように、心筋細胞の損傷を示すこのマーカーの上昇は、心臓における CLN2 疾患の進行と関連する可能性が高く、BMN 190 に関連した変化ではないと考えられた。トロポニン上昇を示したこの動物では、心臓への影響を示す心電図波形又は心臓組織の変化はみられなかった。

試験期間中、これ以外の血液生化学的パラメーターは全て正常値の範囲内にあった。動物にカテーテルに関連する反応が疑われた場合には、脳脊髄液の化学的パラメーター及び細胞数を検査した。全ての動物で、ICV カテーテルに対する反応と考えられる、脳脊髄液の混合型細胞増加が 1 回又はそれ以上認められた。

剖検時に器官重量及び肉眼的所見の変化はみられなかった。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。野生型動物ではカテーテル留置経路の炎症反応はみられず、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。疾患に関連する変化は主に大脳皮質及び小脳で発現し、各動物で病変の程度及び分布が一致した。TPP1 欠損動物の 1 例（動物 An）は、軽度の線維化、神経膠症及び単核細胞浸潤、並びに軽い脳室周囲炎など、ICV カテーテル留置経路で軽微から軽度の炎症が認められた。他の TPP1 欠損動物 2 例では、神経膠症、単核細胞浸潤及び軽い脳室周囲炎など、ICV カテーテルに伴う変化は重度ではなかった。

本試験でみ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。本試験では、病理組織学的所見はいずれの動物でも顕著ではなく、野生型動物より TPP1 欠損動物に多くみられ、有害所見ではなかった。

心臓、肺、腎臓、肝臓及び脾臓には、BMN 190 に関連した病理組織学的所見は認められなかった。いずれの所見も薬剤関連性ではなく、無処置動物で通常みられる所見、又は正常なイヌの生理的プロセスと一致する所見であり偶発的と考えられた。

初回 ICV 投与後の脳脊髄液の TK 解析では、持続投与の終了時近くで脳脊髄液中の BMN 190 濃度が最高値に達することが明らかとなった。脳脊髄液からの BMN 190 の排出は二相性の動態に従うと思われ、持続投与終了から 168 時間以内に大部分が消失した。脳脊髄液中の TK パラメーターを表 2.6.6.3.4.4 に示す。

表 2.6.6.3.4.4: BMN 190 の単回 16 mg 脳室内持続投与後の脳脊髄液中 TK パラメーター

動物 a)	T_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	$t_{1/2}$ (時間)	CL (mL/h)	V_z (mL)
C	5.00	1.58×10^6	9.77×10^6	9.77×10^6	3.61	1.64	8.54
M	4.50	9.67×10^5	4.85×10^6	4.85×10^6	10.9	3.30	51.7
N	2	2	2	2	2	2	2
平均値	4.75	1.27×10^6	7.31×10^6	7.31×10^6	7.24	2.47	30.1
標準偏差	0.354	4.35×10^5	3.48×10^6	3.48×10^6	5.13	1.17	30.5
最小値	4.50	9.67×10^5	4.85×10^6	4.85×10^6	3.61	1.64	8.54
中央値	4.75	1.27×10^6	7.31×10^6	7.31×10^6	7.24	2.47	30.1
最大値	5.00	1.58×10^6	9.77×10^6	9.77×10^6	10.9	3.30	51.7
%CV	7.44	34.1	47.6	47.6	70.8	47.6	101

T_{max}：最高濃度到達時間、C_{max}：最高濃度、AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの脳脊髄液中濃度 - 時間曲線下面積、$t_{1/2}$：半減期、CL：クリアランス、V_z：分布容積

a) TK 解析用の脳脊髄液サンプルは、1 回目の投与後に 6 例中 2 例の動物（いずれも野生型）から採取した。

BMN 190 は ICV 投与後に血漿中からも検出され、脳脊髄液中の測定よりも C_{max} で 2～3 オーダー低い濃度であった。BMN 190 の血漿中濃度は、ICV 持続投与の終了近くで最高値に達した。血漿中からの BMN 190 の排出は二相性の動態に従うと思われ、持続投与終了から 72 時間以内に BMN 190 の大部分が消失した。初回 ICV 投与後には、BMN 190 の脳脊髄液中濃度は血漿中濃度と比べて約 100～1000 倍高かった。血漿中の TK プロファイルは野生型と TPP1 欠損動物で類似していた。血漿中の TK パラメーターを表 2.6.6.3.4.5 に示す。

表 2.6.6.3.4.5: BMN 190 の初回 16 mg 脳室内持続投与後の血漿中 TK パラメーター

動物	T_{max} (時間)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	$t_{1/2}$ (時間)	CL (mL/h)	V_z (mL)
Aj	5.00	6.21×10^2	2.85×10^3	2.88×10^3	9.08	5560	72900
An	4.50	6.63×10^2	2.67×10^3	2.69×10^3	7.38	5950	63300
C	4.00	2.81×10^2	2.73×10^3	2.77×10^3	7.57	5770	63000
J	4.00	6.20×10^2	4.22×10^3	4.26×10^3	18.4	3750	99500
M	4.00	4.85×10^2	2.08×10^3	2.11×10^3	9.65	7590	106000
T	4.50	3.10×10^2	2.24×10^3	2.25×10^3	6.04	7120	62000
N	6	6	6	6	6	6	6
平均値	4.33	4.97×10^2	2.80×10^3	2.83×10^3	9.68	5960	77700
標準偏差	0.408	1.67×10^2	7.59×10^2	7.66×10^2	4.45	1340	19700
最小値	4.00	2.81×10^2	2.08×10^3	2.11×10^3	6.04	3750	62000
中央値	4.25	5.52×10^2	2.70×10^3	2.73×10^3	8.33	5860	68100
最大値	5.00	6.63×10^2	4.22×10^3	4.26×10^3	18.4	7590	106000
%CV	9.42	33.6	27.1	27.1	45.9	22.6	25.4

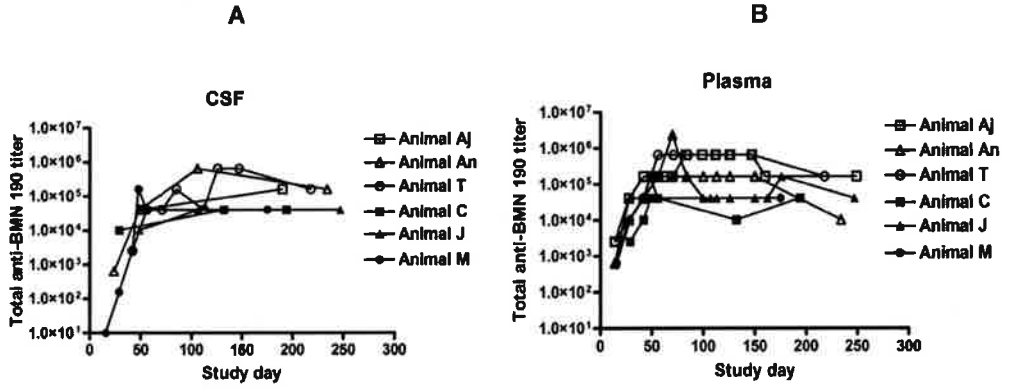
T_{max}：最高濃度到達時間、C_{max}：最高濃度、AUC_{0-t}：時間 0 から最終定量可能時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：時間 0 から無限時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積、$t_{1/2}$：半減期、CL：クリアランス、V_z：分布容積

BMN 190 を投与した全ての動物の血漿及び脳脊髄液中で、抗 BMN 190 抗体が検出された（図 2.6.6.3.4.1）。脳脊髄液では、TPP1 欠損動物の初回投与後 2 週目、野生型動物の初回投与後 6 週目に抗 BMN 190 抗体が初めて検出された。脳脊髄液中の平均抗体価は、野生型動物と比べて

TPP1 欠損動物が 5.7 倍高く、全てのタイムポイントを通じた平均抗体価は、TPP1 欠損動物が 145,470、野生型動物は 25,202 であった。

血漿中では、TPP1 欠損及び野生型動物で初回投与後 2 週目に初めて、抗 BMN 190 抗体が検出された。血漿中の平均抗体価は、野生型動物と比べて TPP1 欠損動物で 7.6 倍高く、全てのタイムポイントを通じた平均値は、TPP1 欠損及び野生型動物でそれぞれ 330,771 及び 43,021 であった。一旦抗体が産生されると、脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体価は、全ての動物でその後の試験期間中維持された。TPP1 欠損動物の脳脊髄液中の平均抗体価は血漿中抗体価と比べて 2.2 倍低く、野生型動物の脳脊髄液中抗体価は血漿中抗体価と比べて 1.7 倍低かった。脳脊髄液及び血漿中の抗 BMN 190 抗体パラメーターを、それぞれ表 2.6.6.3.4.6 及び表 2.6.6.3.4.7 に示す。

図 2.6.6.3.4.1: 抗 BMN 190 抗体価（脳脊髄液及び血漿）



TPP1 欠損（オープン記号）及び野生型（クローズド記号）ダックスフンドに、BMN 190 を 16 mg までの用量で 2 週間に 1 回反復投与後に測定した、脳脊髄液（A）及び血漿（B）中の総抗 BMN 190 抗体価。電気化学発光免疫測定法により抗体価を測定した。

表 2.6.6.3.4.6: 脳脊髄液中の抗体パラメーターのまとめ

TPP1 欠損動物	測定ポイント数	抗体価平均値	抗体価中央値	抗体価最小値 [a]、最大値（ピーク値）	ピーク抗体価観察日
動物 Aj	3	68267	40960	< 10, 163840	190
動物 An	5	172160	40960	< 10, 655360	106
動物 T	9	195982	40960	< 10, 655360	126
平均値 [b]		145470	40960	< 10, 491520	141
野生型（WT）動物	測定ポイント数	抗体価平均値	抗体価中央値	抗体価最小値 [a]、最大値（ピーク値）	ピーク抗体価観察日
動物 C	6	17067	10240	< 10, 40960	132
動物 J	4	23040	25600	< 10, 40960	107
動物 M	7	35500	2560	10, 163840	48
平均値 [b]		25202	12800	< 10, 81920	96

a) アッセイの最小希釈倍率（1:10）で抗体サンプルの抗体価が検出されなかった場合は、結果を< 10 と表示した。< 10 の結果は、値 0 として要約統計量を算出した。
b) 全動物の要約統計量の平均値（N = 3）。

表 2.6.6.3.4.7: 血漿中の抗体パラメーターのまとめ

TPP1 欠損動物	測定ポイント数	抗体価平均値	抗体価中央値	抗体価最小値 a)、最大値（ピーク値）	ピーク抗体価観察日
動物 Aj	15	297813	163840	< 10, 655360	83
動物 An	12	280547	163840	< 10, 2321440	70
動物 T	10	413952	655360	< 10, 655360	56
平均値 b)		330771	327680	< 10, 1210720	70
野生型（WT）動物	測定ポイント数	抗体価平均値	抗体価中央値	抗体価最小値 a)、最大値（ピーク値）	ピーク抗体価観察日
動物 C	8	18240	10240	< 10, 40960	49
動物 J	15	68309	40960	< 10, 163840	56
動物 M	7	42514	40960	< 10, 163840	48
平均値 b)		43021	30720	< 10, 122880	51

a) アッセイの最小希釈倍率（1:10）で抗体サンプルの抗体価が検出されなかった場合は、結果を< 10 と表示した。< 10 の結果は、値 0 として要約統計量を算出した。
b) 全動物の要約統計量の平均値（N = 3）。

結論：

結論として、本試験では CLN2 患者の約 3～5 歳齢に相当する動物で BMN 190 の投与を開始した結果、安全性に係わる所見は認められなかった。BMN 190 の薬理作用の過剰発現に関連した毒性、集積したライソゾーム蓄積物質の急速な除去、又は全身的な器官毒性は観察されなかった。本試験における死亡例は、全て CLN2 疾患の進行又は CNS 投与器具の長期間留置に起因し、BMN 190 による死亡ではないと考えられた。本試験は主に薬効薬理試験として計画されたことから、試験報告書には無毒性量が記載されていない。しかしながら、全ての投与量で BMN 190 に関連した有害所見がみられなかったことから、NOAEL は投与した最高用量の 16 mg と判断された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

BMN 190 の遺伝毒性試験は実施しなかった。BMN 190 はその化学的構造及び作用機序から、遺伝毒性は予測されない。BMN 190 はグリコシル化ヒト遺伝子組換え酵素であり、酵素前駆体として投与される。BMN 190 は CI-M6PR によってライソゾームに取り込まれ、活性化されることが認識されている。BMN 190 は pH 5 でのみ活性化され、したがってライソゾーム区画以外での薬理活性は予測されない。BMN 190 は核内への進入又は DNA との相互作用が予測されないことから、遺伝毒性のリスクは非常に低いと考えられる。

2.6.6.5 がん原性試験

内因性ペプチド及びタンパク質に関する ICH S1A 及び S6 ガイドラインの推奨に従い、BMN 190 のがん原性試験は実施しておらず、今後も計画していない。

実際、BMN 190 はその作用機序から、がん原性は予測されない。BMN 190 は免疫修飾物質ではなく、DNA 結合又は細胞増殖作用は予想されない。BMN 190 は不活性な酵素前駆体として投与され、ライソゾーム取り込み後活性化される。酵素活性は、BMN 190 が蓄積物質を分解するライソゾームに限って発現する。

また、非臨床試験からヒトにおけるがん原性のリスクに関する結論を導くことはできないが、ダックスフンドを使用した反復投与毒性試験の病理組織学的検査では、がん原性のリスクを示す所見は認められなかった（2.6.6.3 項及び 2.6.6.9 項参照）。

なお、BMN 190 は幼児期の早期に発症し、急速に進行して死に至る CLN2 の治療を目的とする薬剤であり、現在、本邦では承認された治療法がない。早期にこれら患者の治療法が利用できることが極めて重要であり、このような場合には ICH S1A ガイドラインに示されるように、長期がん原性試験は必要とされない。

CLN2 患者における BMN 190 の長期投与時の安全性は、現在実施中の臨床試験及び市販後調査により評価する予定である。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

CLN2 患者は早期に死亡し寿命が短いため、生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施しなかったが、サルの単回 ICV 投与毒性試験で、投与後 3、7 及び 14 日目に投与部位の病理組織学的検査を実施した。当該試験では、溶媒対照群を含む全ての群で認められた、ICV カテーテルの直接的な物理的刺激に伴う神経細胞の壊死及び炎症以外に、影響はみられなかった。本所見は BMN 190 に関連した所見とは考えられなかった。ダックスフンドの 9 ヵ月間反復 ICV 投与試験でも、投与部位で脳の病理組織学的評価を行った。CNS への直接投与及び CNS 投与器具を留置したことから、溶媒対照群を含む全ての動物でカテーテル留置経路の炎症が認められた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 免疫毒性

反復投与毒性試験の病理組織学的検査で免疫系に及ぼす影響を評価した結果、影響は認められなかった。

2.6.6.8.2 不純物

毒性試験概要表（2.6.7 項）の表 2.6.7.4.1「被験物質一覧」に示すように、特記すべき不純物は存在しなかったため、不純物の毒性試験は実施していない。

2.6.6.9 考察及び結論

BMN 190 の非臨床試験プログラムによって、小児 CLN2 患者への BMN 190 の 4 時間 ICV 持続投与による長期投与が支持される。このプログラムでは、CNS 及び他の想定される標的器官の完全な評価を含む、BMN 190 の毒性プロファイルの特徴を明らかにした。小児 CLN2 患者への投与を担保するため、慢性反復投与試験（0190-10-077 試験及び BMN190-12-009 試験）では、投与可能な最も若い月齢 2.5 箇月齢の幼若イヌを使用した。また、0190-09-066 試験及び BMN190-12-027 試験は、ヒト CLN2 患者の 3～5 歳に相当する 4 箇月齢で BMN 190 投与を開始した。BMN 190 の全ての反復投与試験で、非 CNS 組織のみならず CNS の広範な病理組織学的検査を実施した。TPP1 欠損ダックスフンドを用いた毒性試験では、ライソゾーム内物質の蓄積と除去、カテーテルに起因する所見、BMN 190 曝露と反応の関係、及び所見の回復性について特徴が明らかとなった。TPP1 欠損動物と正常な対照動物を使用することによって、CLN2 疾患の進行過程（Awano, 2006, Mol. Genet. Metab）及び正常な CNS のバックグラウンドで、BMN 190 関連の影響を評価することが可能であった。溶媒対照群を設置することによって、BMN 190 の曝露／非曝露の条件下で、CLN2 疾患に関連する変化を評価することが可能であった。これによって、疾患の進行による影響と BMN 190 投与に関連する影響及び投与器具に起因する影響を区別することが可能であった。BMN 190 の ICV 持続投与を行ったカニクイザル及びダックスフンドの試験では、臨床で使用する 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。これらの試験では、BMN 190 に関連する標的毒性あるいは非標的毒性はみられなかった。

サルに BMN 190 を ICV 又は IT-L 持続投与した、単回投与毒性、トキシコキネティクス（TK）及び CNS 分布試験を 2 試験実施した。サルに BMN 190 の 0、5、14 及び 20 mg を ICV 投与し最長 14 日間の回復期間を設けた、単回投与毒性及び TK 試験（0190-09-071 試験）では、CNS あるいは他の器官で BMN 190 に関連する変化は認められなかった。3、7 及び 14 日間の複数の回復期間を設けることによって、BMN 190 を 14 mg 単回投与後、早期及び後期に発現する CNS 所見又は神経毒性を経時的に評価することが可能であった。回復期間を通して、BMN 190 に関連した CNS 又は全身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 BMN 190 投与と関連がなく、CNS に投与器具を長期間留置することによって生じる予想された変化であった（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。BMN 190 を 20 mg 投与したサルでは、脳脊髄液中（平均 1.58×10^6 ng/mL）の最大曝露量が血漿中（4.94×10^3 ng/mL）よりも高かった。

ほとんどの CNS 組織内半減期は 3～15 日の範囲にあった。サルの ICV 投与では、IT-L 投与と比べて、特に脳室に隣接した脳の深部でより完全な BMN 190 の CNS 組織分布が観察されたことから、臨床では IT-L 投与より ICV 持続投与を行うことが支持される。全例で脳及び脊髄を取り巻く髄膜に単核細胞浸潤が観察されたが、タンパク質製剤を CNS に直接投与した場合にみられる通常の変化と考えられた。BMN 190 を 14 mg IT-L 投与したサルの単回投与毒性及び TK 試験では、BMN 190 に関連する所見は観察されなかった。NOAEL は ICV 投与の最高用量 20 mg/dose と考えられた。

4 箇月齢の正常及び TPP1 欠損ダックスフンドに月 1 回 BMN 190 を 32 mg 投与した、3 ヵ月間反復投与予備試験（0190-09-066 試験）では、BMN 190 の安全性及び CNS での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 の反復投与後に、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、3 箇月間投与後に溶媒及び BMN 190 いずれの投与でも、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、並びに小脳でプルキンエ細胞の欠損を含む神経細胞壊死など、疾患の進行が認められた。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 投与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の影響もみられなかった。BMN 190 を投与した全ての動物で、血漿中で 1 回目の投与後 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、これ以降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、反復投与で発現した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。本試験における NOAEL は 32 mg と判断された。

9 ヵ月間反復投与試験（0190-10-077 試験）では、2.5 箇月齢の正常及び TPP1 欠損ダックスフンドに、溶媒、BMN 190 の 4 及び 16 mg を 2 週間に 1 回 ICV 投与（約 2～4 時間）した。BMN 190 に関連した死亡例はなく、正常及び TPP1 欠損動物の体重、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。したがって、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みられなかった。溶媒投与群の 3 例（正常動物及び TPP1 欠損動物）は、9 箇月の試験期間より早期に途中死亡しており、IT-C ボーラス投与で注射針の不適切な留置に関連する傷害及び／又は CLN2 疾患の進行による死亡と考えられた。CLN2 疾患の進行が予想される 9 箇月間の試験期間以降に死亡した BMN 190 投与群の 3 例の死因は、IT-C ボーラス投与で注射針の不適切な留置に関連する傷害及び／又は CLN2 疾患の進行と考えられた。いずれの死亡例も BMN 190 投与とは関連がなかった。BMN 190 の 16 mg 反復投与後に、正常及び TPP1 欠損動物で軽度～中等度の過敏症反応が観察された。動物で過敏症反応が発現した時期に、抗 BMN 190 抗体が初めて血漿及び脳脊髄液中で検出された。ジフェンヒドラミンの前投与及び投与時間を 2 時間から 4 時間に延長することによって、ほとんどの過敏症反応を軽減することができた。正常及び TPP1 欠損動物の全例で BMN 190 又は溶媒投与後に、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、血管周囲の細胞浸潤を特徴とする炎症が認められた。この炎症性変化は BMN 190 と関連がないと考えられた。BMN 190 を投与した正常及び 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、試験期間中は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。正常動物と比べて 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。TPP1 欠損動物で異種のヒト TPP1（BMN 190）を投与した場合に、イヌ TPP1 を発現する野生型動物と比べて全体的に高い抗体価が観察されたのは、TPP1 欠損動物ではイヌ TPP1 タンパク質が発現しないことが原因として考えられる。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（BMN 190-12-009 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のみられないことが一層明らかとなった。死亡例は全て、ICV カテーテルに対する CNS の反応（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。全例で 2 又は 3 回目の BMN 190 の 48 mg 投与後に、軽度～中等度の過敏症反応が観察された。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みられた。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みられなかった。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みられなかった。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。野生型の正常動物では軽度の細胞浸潤、小膠細胞症及び IT-L カテーテル経路の炎症が認められたが、ICV カテーテル留置経路に影響はみられず、脳及び脳室系は正常であった。TPP1 欠損動物では、CLN2 疾患の進行に伴う CNS の病理組織学的変化が認められた。TPP1 欠損動物の 1 例では、軽度の線維化、神経膠症及び単核細胞浸潤、並びに軽い脳室周囲炎など、ICV カテーテル留置経路で軽微～軽度の炎症が認められたが、他の 2 例では神経膠症、単核細胞浸潤及び軽い脳室周囲炎など、ICV カテーテルに伴う変化は重度ではなかった。

TPP1 欠損ダックスフンドに BMN 190 を 9 箇月間又はそれ以上の期間投与後に、ライソゾーム蓄積物質の除去との関連を示唆する毒性変化は観察されなかった。本試験における NOAEL は 16 mg と判断された。

BMN 190 の脳脊髄液中濃度は血漿中濃度よりも 100～1000 倍高く、ICV 持続投与後に BMN 190 の大部分は脳脊髄液中で検出された。BMN 190 の全身曝露量は CNS の曝露量よりも低かったが、全身器官の毒性評価が可能であった。BMN 190 の ICV 投与後に、いずれの器官でも BMN 190 に関連した毒性変化はみられなかった。また、不活性な酵素前駆体である BMN 190 は、カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（CI-M6PR）によってライソゾームに取り込まれ、そこで、195 アミノ酸残基の 20 kDa プロペプチド片が酸性環境で切り出されて、46 kDa

の活性酵素が産生される（Sleat, 1997, Science、Wlodawer, 2003, BMC. Struct. Biol.）。BMN 190 は生理的 pH で活性が低いことから、BMN 190 の全身曝露が過剰な薬理作用を発現する可能性は低いと考えられる。

以上のように、BMN 190 の非臨床毒性試験における主要な所見は、サル及びイヌでみられた投与器具に起因する CNS カテーテル近傍の炎症、及びイヌに異種のヒトタンパク質を反復投与したことによる過敏症反応であった。CNS カテーテル近傍の炎症は溶媒対照群を含む全例で認められ、CNS に異物の投与器具を長期間留置することで予想された結果である（Butt, 2011, Toxicol. Pathol.）。ヒトの ERT 薬をイヌに投与した場合に過敏症反応は一般的にみられ（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関連している可能性が高い。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。また、イヌでは脳脊髄液及び血漿中に抗 BMN 190 抗体が存在したにもかかわらず薬理作用が維持された。

ヒトとダックスフンドの脳重量比 20:1 に基づいて、ヒト等価用量（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。イヌの試験（190-12-009 試験）の NOAEL 48 mg に 20 を乗じて、HED は 960 mg と算定される。

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

2.6.7　毒性試験概要表

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

Proprietary and Confidential

目次

2.6.7 毒性試験概要表 3
2.6.7.1 毒性試験一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 4
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 9
2.6.7.5 単回投与毒性試験 10
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 13
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 23
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 23
2.6.7.10 がん原性試験 23
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 23
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 23
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 23
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 23
2.6.7.15 新生児を用いた試験 23
2.6.7.16 局所刺激性試験 23
2.6.7.17 その他の毒性試験 23

表目次

表 2.6.7.1.1: 毒性試験一覧表 3
表 2.6.7.2.1: トキシコキネティクス試験の一覧表 4
表 2.6.7.3.1: 試験番号 0190-09-071 5
表 2.6.7.3.2: 試験番号 BMN190-11-046 5
表 2.6.7.3.3: 試験番号 0190-10-077 6
表 2.6.7.3.4: 試験番号 BMN190-12-009 7
表 2.6.7.3.5: 試験番号 BMN190-12-027 8
表 2.6.7.4.1: 非臨床試験に使用した被験物質一覧 9
表 2.6.7.5.1: 単回投与毒性試験 10
表 2.6.7.6.1: 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
表 2.6.7.7.1: セロイドリポフスチン症 2 型ダックスフンドモデルにおけるトリペプチジルペプチダーゼ 1 脳室内投与による酵素補充療法 13
表 2.6.7.7.2: CLN2 ダックスフンドモデルにおける BMN 190 の 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験 19

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1.1: 毒性試験一覧表

被験物質：BMN 190

試験の種類	動物種及び系統	投与方法	投与期間（頻度）	投与量（mg）	GLP 適用	実施施設	試験期間	試験番号	CTD 記載箇所
単回投与毒性試験	サル／カニクイザル	ICV（4 時間持続投与）	単回投与	0, 5, 14, 20	GLP 適用 [a]	[redacted] 米国 [redacted]	[redacted]	0190-09-071	4.2.3.1-1
単回投与毒性試験	サル／カニクイザル	IT-L（4 時間持続投与）	単回投与	14	GLP 非適用	[redacted] 米国 [redacted]	[redacted]	BMN190-11-046	4.2.3.1-2
反復投与毒性試験	イヌ／ダックスフンド	IT-C（遅いボーラス投与）	3 箇月間（月 1 回投与）	0, 32	GLP 非適用	[redacted] 米国	[redacted]	0190-09-066	4.2.1.1-3
反復投与毒性試験	イヌ／ダックスフンド	ICV（4 時間持続投与）	9 箇月間（隔週投与）	0, 4, 16	GLP 非適用	[redacted] 米国	[redacted]	0190-10-077	4.2.1.1-4
反復投与毒性試験	イヌ／ダックスフンド	ICV（4 時間持続投与）	最長 18 箇月間（隔週投与）	48	GLP 非適用	[redacted] 米国	[redacted]	BMN190-12-009	4.2.1.1-5
反復投与毒性試験	イヌ／ダックスフンド	ICV（4 時間持続投与）	6 箇月間（隔週投与）	16	GLP 非適用	[redacted] 米国	[redacted]	BMN190-12-027	4.2.1.1-6

ICV = 脳室内、IT-L = 腰部髄腔内、IT-C = 大槽内

a) 本試験の in-life 部分は、米国食品医薬品局 GLP 基準（Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58）、厚生労働省 GLP 基準厚生省令第 21 号「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」、及び経済協力開発機構 GLP 基準（ENV/MC/CHEM(98)17）に準拠して実施した。

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2.1: トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：BMN 190

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg）	GLP 適用	試験番号	CTD 記載箇所
単回投与毒性試験	サル	ICV （4 時間持続投与）	0, 5, 14, 20	GLP 適用 a)	0190-09-071	4.2.3.1-1
単回投与毒性試験	サル	IT-L （4 時間持続投与）	14	GLP 非適用	BMN190-11-046	4.2.3.1-2
反復投与毒性試験	イヌ	IT-C （遅いボーラス投与）	0, 32	GLP 非適用	0190-09-066	4.2.1.1-3
反復投与毒性試験	イヌ	ICV （4 時間持続投与）	0, 4, 16	GLP 非適用	0190-10-077	4.2.1.1-4
反復投与毒性試験	イヌ	ICV （4 時間持続投与）	48	GLP 非適用	BMN190-12-009	4.2.1.1-5
反復投与毒性試験	イヌ	ICV （4 時間持続投与）	16	GLP 非適用	BMN190-12-027	4.2.1.1-6

ICV = 脳室内、IT-L = 腰部髄腔内、IT-C = 大槽内

a) 本試験の in-life 部分は、米国食品医薬品局 GLP 基準（Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58）、厚生労働省 GLP 基準厚生省令第 21 号「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」、及び経済協力開発機構 GLP 基準（ENV/MC/CHEM(98)17）に準拠して実施した。

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3.1: 試験番号 0190-09-071

被験物質：BMN 190

試験番号 0190-09-071	サル単回投与試験	ICV 持続投与（約 4 時間）	
	脳脊髄液		
投与量（mg/kg）	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
5	1045149 ± 929796	317559 ± 304675	7.63± 1.05
14	5770165 ± 1112249	968479 ± 323425	24.1 ± 23.6
20	6301848 ± 7178918	1578854 ± 2212286	7.62 a)
	血漿		
投与量（mg/kg）	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
5	6543 ± 6038	1673 ± 2051	15.5 ± 8.06
14	16760 ± 4631	3669 ± 2104	6.16 ± 2.16
20	28126 ± 14521	4938 ± 2846	6.31 ± 3.21

ICV = 脳室内
a) 1 例は終末相半減期を算出できなかった。

表 2.6.7.3.2: 試験番号 BMN190-11-046

被験物質：BMN 190

試験番号 BMN190-11-046	サル単回投与試験	IT-L 持続投与（4 時間）	
	脳脊髄液		
投与量（mg/kg）	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
14	10971616 ± 1859862	2666881 ± 703233	14.6 ± 0.203
	血漿		
投与量（mg/kg）	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
14	37660 ± 10290	7762 ± 3027	6.26 ± 1.67

IT-L = 腰部髄腔内

表 2.6.7.3.3: 試験番号 0190-10-077

被験物質：BMN 190

試験番号 0190-10-077		イヌ反復投与試験	ICV 持続投与（4 時間）	
		脳脊髄液		
投与量（mg/kg）	投与回数	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
4	1	1.88×10^{6} (5.98×10^{5})	4.73×10^{5} (2.46×10^{5})	10.2 (5.34)
16	1	6.45×10^{6} (3.45×10^{6})	1.46×10^{6} (9.13×10^{5})	5.86 (3.39)
	10	1.52×10^{7} (1.49×10^{7})	2.29×10^{6} (2.71×10^{6})	2.71 (0.0184)
		血漿		
投与量（mg/kg）	投与回数	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
4	1	1850 (1900)	527 (695)	10.4 (13.9)
	10	38.0 (50.4)	17.1 (23.4)	8.12 (9.90)
16	1	5150 (1910)	1780 (907)	8.97 (1.89)
	10	6500 (11600)	1500 (2980)	-- (--)
	20	72.5 (23.0)	18.1 (5.52)	9.75 (--)

値は平均値（標準偏差）を示す。

表 2.6.7.3.4: 試験番号 BMN190-12-009

被験物質：BMN 190

試験番号 BMN190-12-009		イヌ反復投与試験	ICV 持続投与（4 時間）	
		脳脊髄液 a)		
投与量（mg/kg）	投与回数	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
48	1	1.06×10^{7} (3.52×10^{5})	1.78×10^{6} (3.08×10^{5})	6.59 (1.69)
		血漿		
投与量（mg/kg）	投与回数	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
48	1	4.02×10^{4} (1.69×10^{4})	7.60×10^{3} (3.69×10^{3})	22.9 (2.91)

値は平均値（標準偏差）を示す。
AUC_{0-t} = 時間 0 から最終定量可能時間までの濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高濃度、$t_{1/2}$ = 半減期
a) 1 回目の投与後 3 例中 2 例から薬物動態解析用の脳脊髄液サンプルを採取したが、10 回目の投与後は 3 例とも脳脊髄液の採取ができなかった。脳脊髄液の採取が技術的に困難であったこと、あるいはカテーテルの開存が失われたため、全例から計画した時点で脳脊髄液を採取することはできなかった。

表 2.6.7.3.5: 試験番号 BMN190-12-027

被験物質：BMN 190

試験番号 BMN190-12-027		イヌ反復投与試験	ICV 持続投与（4 時間）	
		脳脊髄液 a)		
投与量（mg/kg）	投与回数	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
16	1	7.31×10^{6} (3.48×10^{6})	1.27×10^{6} (4.35×10^{5})	7.24 (5.13)
		血漿		
投与量（mg/kg）	投与回数	AUC_{0-t}（ng•h/mL）	C_{max}（ng/mL）	$t_{1/2}$（時間）
16	1	2.80×10^{3} (7.59×10^{2})	4.97×10^{2} (1.67×10^{2})	9.68 (4.45)

値は平均値（標準偏差）を示す。

AUC_{0-t} = 時間 0 から最終定量可能時間までの濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高濃度、$t_{1/2}$ = 半減期

a) 1 回目の投与後 6 例中 2 例（いずれも TPP1+/+）の動物から薬物動態解析用の脳脊髄液サンプルを採取したが、5 回目及び 10 回目の投与後は 6 例とも脳脊髄液の採取ができなかった。脳脊髄液の採取が技術的に困難であったこと、あるいはカテーテルの開存が失われたため、全例から計画した時点で脳脊髄液を採取することはできなかった。

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7.4.1: 非臨床試験に使用した被験物質一覧

被験物質：BMN 190

バッチ番号	純度（%）[a]	規格設定された不純物	試験番号	試験の種類
申請規格	NA	NA	NA	NA
[redacted] c)	[redacted]	同定されていない	0190-08-034	イヌ単回投与試験（IT-C）
[redacted] c)	[redacted]	同定されていない	0190-09-066	イヌ反復投与試験（IT-C）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	0190-09-071	サル単回投与試験（ICV）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	0190-09-071	サル単回投与試験（ICV）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	0190-09-071	サル単回投与試験（ICV）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	0190-09-071	サル単回投与試験（ICV）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	BMN190-11-046	サル単回投与試験（IT-L）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	BMN190-10-077	イヌ反復投与試験（ICV）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	BMN190-10-077	イヌ反復投与試験（ICV）
[redacted] b)	[redacted]	同定されていない	BMN190-10-077	イヌ反復投与試験（ICV）
[redacted] d)	[redacted]	同定されていない	BMN190-12-009	イヌ反復投与試験（ICV）
[redacted] e)	[redacted]	同定されていない	BMN190-12-027	イヌ反復投与試験（ICV）

ICV = 脳室内、IT-L = 腰部髄腔内、IT-C = 大槽内、NA = 該当なし
a) サイズ排除クロマトグラフィーによる純度
b) 研究で製造した被験物質
c) [redacted] で製造した被験物質
d) BioMarin 社のプロセス開発で製造した被験物質
e) BioMarin 社で臨床用製剤として製造した被験物質

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 2.6.7.5.1: 単回投与毒性試験

被験物質：BMN 190

動物種／系統	投与方法 (溶媒/投与形態)	投与量 (mg)	性別及び 動物数/群	最大非致死量 (mg)	概略の致死量	特記すべき所見	試験番号	CTD 記載箇所
サル／ カニクイザル	ICV (4 時間持続投与) (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)	0 5 14 20	3F（0 mg） 3F（5 mg） 3F（14 mg） 3F（20 mg） 2F（0 mg） 3F（14 mg） 3F（14 mg）	20	20 mg 超	なし	0190-09-071 [a, b]	4.2.3.1-1
サル／ カニクイザル	IT-L (4 時間持続投与) (人工脳脊髄液/ 216.5 mmol/L NaCl、 0.80 mmol/L $MgSO_4$、 3.01 mmol/L KCl、 1.40 mmol/L $CaCl_2$、 0.80 mmol/L Na_2HPO_4、 0.20 mmol/L NaH_2PO_4、 pH 7.3)	14	1M/2F	14	14 mg 超	なし	BMN190-11-046	4.2.3.1-2

ICV = 脳室内、IT-L = 腰部髄腔内、F = 雌、M = 雄

a) 本試験の in-life 部分は、米国食品医薬品局 GLP 基準（Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58）、厚生労働省 GLP 基準厚生省令第 21 号「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」、及び経済協力開発機構 GLP 基準（ENV/MC/CHEM(98)17）に準拠して実施した。

b) 第 1、2、3 及び 4 群（それぞれ 0 mg、5 mg、14 mg 及び 20 mg）は各群雌 3 例で構成され、15 日目に剖検した。第 5 群（0 mg）は雌 2 例で構成され 1 例は 4 日目、他の 1 例は 8 日目に剖検した。第 6 及び 7 群は雌 3 例で構成され、それぞれ 4 日目及び 8 日目に剖検した。

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6.1: 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

被験物質：BMN 190

動物種／系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量（mg）	性別及び動物数/群 [a]	無毒性量 [b]	特記すべき所見	試験番号	CTD 記載箇所
イヌ／ダックスフンド	IT-C（ボーラス投与）（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）	3 箇月間（合計 4 回投与）	0 0 32 32	1F 1M 1F 1M	32 mg	TPP1 欠損及び WT ダックスフンドに BMN 190 を反復投与した結果、アナフィラキシー様反応が観察された。この反応に伴う症状として、顔面浮腫、紅斑、蕁麻疹、嘔吐、頻脈及び血圧低下が観察された。血漿及び脳脊髄液中で抗 BMN 190 抗体が検出された。	0190-09-066	4.2.1.1-3

IT-C = 大槽内、F = 雌、M = 雄、TPP1 = トリペプチジルペプチダーゼ 1、WT = 野生型（正常）

a) 0190-09-066 試験は合計 4 群で構成される。第 1 群は溶媒を投与した雌 WT 動物 1 例、第 2 群は溶媒を投与した雄 TPP1 欠損動物 1 例、第 3 群は BMN 190 を投与した雌 WT 動物 1 例、及び第 4 群は BMN 190 を投与した雄 TPP1 欠損動物 1 例でそれぞれ構成される。

b) 本試験の無毒性量は申請者が決定した。

表 2.6.7.6.1: 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

被験物質：BMN 190

動物種／系統	投与方法（溶媒/投与形態）	投与期間	投与量（mg）	性別及び動物数/群 [a]	無毒性量 [b]	特記すべき所見	試験番号	CTD 記載箇所
イヌ／ダックスフンド	ICV（4 時間持続投与）（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 $MgCl_2•6H_2O$、1.4 mmol/L $CaCl_2•2H_2O$、pH 6.5）	6 箇月間（隔週投与）	16 16	1F/2M 1F/2M	16 mg	2 回目の投与から一部の動物で過敏症反応が発現した。この反応に伴う症状として、振戦、発熱、頻脈、呼吸促迫及び血圧上昇が観察された。全例で脳脊髄液の混合型細胞増加が 1 回又はそれ以上認められた。この変化は ICV カテーテルに対する反応と考えられた。 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 の病理組織学的変化が認められた。疾患に関連する変化は主に大脳皮質及び小脳で発現し、各動物で病変の程度及び分布が一致した。 被験物質に関連すると解釈される形態学的変化はほとんどみられず、機能消失に伴って予想される細胞変化及び形態学的変化の程度又は分布に関連がみられないことから、有害所見と考えられる変化はなかった。	BMN190-12-027	4.2.1.1-6

CLN2 = セロイドリポフスチン症 2 型、ICV = 脳室内、F = 雌、M = 雄、WT = 野生型（正常）

a) BMN190-12-027 試験は合計 2 群で構成される。第 1 群は BMN 190 を投与した TPP1 欠損動物の雄 2 例及び雌 1 例、第 2 群は BMN 190 を投与した WT 動物の雄 2 例及び雌 1 例で構成される。

b) 本試験の無毒性量は申請者が決定した。

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7.7.1: セロイドリポフスチン症 2 型ダックスフンドモデルにおけるトリペプチジルペプチダーゼ 1 脳室内投与による酵素補充療法

被験物質：BMN 190

報告書の題名: Intracerebroventricular Tripeptidyl Peptidase 1 Enzyme Replacement Therapy in a Dachshund Model of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2

動物種/系統: イヌ/ダックスフンド

投与期間: 9 箇月間以上
（被験物質を隔週で投与した）

試験番号 0190-10-077[a)]

投与開始月齢: 2.5 箇月齢

休薬期間（回復期間）: 該当なし

CTD における記載箇所: 4.2.1.1-4

初回投与年月日: 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

投与方法: 隔週、脳室内（ICV）4 時間持続投与

GLP 適用: 非適用

最終投与年月日: 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

溶媒/投与形態: 人工脳脊髄液/ 216.5 mmol/L NaCl、0.80 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.40 mmol/L $CaCl_2$、0.80 mmol/L Na_2HPO_4、0.20 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3

特記事項: なし

無毒性量: 16 mg

a) 本試験は[redacted]米国[redacted]で実施した。本試験は米国食品医薬品局の GLP 基準（CFR 21 Part 58）に準拠していないが、一般的に許容される科学的基準を適用して実施した。

表 2.6.7.7.1: セロイドリポフスチン症 2 型ダックスフンドモデルにおけるトリペプチジルペプチダーゼ 1 脳室内投与による酵素補充療法（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	0		4		16	
遺伝子型	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-
動物数	4	3	3	3	3	3
トキシコキネティクス:[a, b]						
AUC_{0-t}（ng•h/mL）						
脳脊髄液[c]						
投与 1 回目	N/A		1.88×10^{6} (5.98×10^{5})		6.45×10^{6} (3.45×10^{6})	
投与 10 回目	N/A		N/A		1.52×10^{7} (1.49×10^{7})	
血漿						
投与 1 回目	N/A		1.85×10^{3} (1.90×10^{3})		5.15×10^{3} (1.91×10^{3})	
投与 10 回目	N/A		3.80×10^{1} (5.04×10^{1})		1.42×10^{3} (2.69×10^{3})	
投与 20 回目	N/A		N/A		7.25×10^{1} (2.30×10^{1})	
C_{max}（ng/mL）						
脳脊髄液[c]						
投与 1 回目	N/A		4.73×10^{5} (2.46×10^{5})		1.46×10^{6} (9.13×10^{5})	
投与 10 回目	N/A		N/A		2.29×10^{6} (2.71×10^{6})	
血漿						
投与 1 回目	N/A		5.27×10^{2} (6.95×10^{2})		1.78×10^{3} (9.07×10^{2})	
投与 10 回目	N/A		1.71×10^{1} (2.34×10^{1})		1.68×10^{2} (3.09×10^{2})	
投与 20 回目	N/A		N/A		1.81×10^{1} (5.52×10^{0})	
T_{max}（時間）						
脳脊髄液[c]						
投与 1 回目	N/A		2.75 [2.5, 3]		3 [2.5, 5]	
投与 10 回目	N/A		N/A		6.5 [5, 8]	

表 2.6.7.7.1: セロイドリポフスチン症 2 型ダックスフンドモデルにおけるトリペプチジルペプチダーゼ 1 脳室内投与による酵素補充療法（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	0		4		16	
遺伝子型	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-
トキシコキネティクス: [a, b)]						
T_{max}（時間）						
血漿						
投与 1 回目	N/A		2 [1, 2]		2.25 [2, 6]	
投与 10 回目	N/A		2 [1, 6]		8 [4, 8]	
投与 20 回目	N/A		N/A		4 [4, 4.5]	
CL（mL/h）						
脳脊髄液 [c)]						
投与 1 回目	N/A		2.25 (0.717)		6.14 (9.52)	
投与 10 回目	N/A		N/A		2.02 (1.98)	
血漿						
投与 1 回目	N/A		3.51×10^3 (1.95×10^3)		3.69×10^3 (2.06×10^3)	
投与 10 回目 [d, e)]	N/A		5.39×10^4 (1.93×10^4)		- (-)	
投与 20 回目	N/A		N/A		9.19×10^4 (-)	
V_z（mL）						
脳脊髄液 [c)]						
投与 1 回目	N/A		35.9 (27.9)		56.3 (95.8)	
投与 10 回目	N/A		N/A		7.92 (7.78)	
血漿						
投与 1 回目	N/A		7.33×10^4 (1.29×10^5)		5.15×10^4 (4.23×10^4)	
投与 10 回目 [d, e)]	N/A		7.69×10^5 (9.96×10^5)		- (-)	
投与 20 回目	N/A		N/A		1.29×10^6 (-)	

表 2.6.7.7.1: セロイドリポフスチン症 2 型ダックスフンドモデルにおけるトリペプチジルペプチダーゼ 1 脳室内投与による酵素補充療法（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	0		4		16	
遺伝子型	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-
トキシコキネティクス: [a, b)]						
$t_{1/2}$（時間）						
脳脊髄液 [c)]						
投与 1 回目	N/A		10.2 (5.34)		5.86 (3.39)	
投与 10 回目	N/A		N/A		2.71 (0.0184)	
血漿						
投与 1 回目	N/A		10.4 (13.9)		8.97 (1.89)	
投与 10 回目 [d, e)]	N/A		8.12 (9.90)		- (-)	
投与 20 回目 [f)]	N/A		N/A		9.75 (-)	
抗体価: 脳脊髄液						
投与前の抗体頻度	0/4	0/3	0/3	0/1 [g)]	0/3	0/3
試験中の抗体頻度	0/4	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
抗体価の範囲:	0	0	10240-163840	160-163840	40-40960	2560-655360
抗体価: 血漿						
投与前の抗体頻度	0/4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
試験中の抗体頻度	0/4	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
抗体価の範囲:	0	0	160-163840	10240-655360	160-163840	10240-2621440

表 2.6.7.7.1: セロイドリポフスチン症 2 型ダックスフンドモデルにおけるトリペプチジルペプチダーゼ 1 脳室内投与による酵素補充療法（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	0		4		16	
遺伝子型	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-	WT	TPP1 -/-
特記すべき所見						
早期死亡例						
医原性損傷	1/4	1/3	-	1/3	-	-
水頭症	-	-	-	-	-	1/3
髄膜炎	-	-	-	-	-	1/3
一般症状観察						
アナフィラキシー様反応	0/4	0/3	2/3	0/3	3/3	3/3
体重変化	-	-	-	-	-	-
摂餌量	-[h)]	-[h)]	-[h)]	-[h)]	-[h)]	-[h)]
神経学的検査	-	N/A	-	N/A	-	N/A
眼科的検査	-	N/A	-	N/A	-	N/A
認知機能検査（T 迷路試験）	-	N/A	-	N/A	-	N/A
臨床病理学的検査	-	-	-	-	-	-
器官重量	-	-	-	-	-	-
病理組織学的検査						
上衣細胞消失、側脳室	1/4	1/3	3/3	2/3	1/3	2/3
平均重篤度	0.4	0.7	4.0	2.0	0.3	2.0
脳室炎	-	1/3	1/3	2/3	-	2/3
平均重篤度	-	0.3	0.3	1.3	-	1.0
カテーテル経路浮腫、細胞外液	-	-	1/3	1/3	1/3	-
平均重篤度	-	-	0.7	1.0	1.0	-
血管周囲細胞浸潤、同側性	-	1/3	2/3	-	1/3	-
平均重篤度	-	0.3	2.0	-	0.7	-

- = 特記すべき所見なし、N/A = 該当なし
WT = 野生型（正常）、TPP1-/- = TPP1 欠損、AUC_{0-t} = 時間 0 から最終定量可能時間までの脳脊髄液中又は血漿中濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高濃度、T_{max} = 最高濃度到達時間、$t_{1/2}$ = 半減期、V_z = 終末相に基づく分布容積、CL = クリアランス
脳の病理組織学的検査所見は発現頻度及び平均重篤度を示す。重篤度のスコアは以下のとおりである。1 = ごく軽微、2 = 軽微、3 = 軽度、4 = 中等度、5 = 重度
a) 値は平均値(標準偏差)を示す。T_{max} は中央値[最小値, 最大値]を示す。
b) 溶媒を投与した動物は、トキシコキネティクスパラメーターを算出しなかった。
c) 4 mg 投与群では、1 回目の投与後は 6 例中 2 例から薬物動態解析用の脳脊髄液サンプルを採取したが、10 回目の投与後は 6 例とも採取ができなかった。16 mg 投与群では、1 回目の投与後は全 6 例、10 回目の投与後は 6 例中 2 例から脳脊髄液を採取した。脳脊髄液の採取が技術的に困難であったこと、あるいは IT-L カテーテルの開存が失われたため、全例から脳脊髄液を採取することはできなかった。
d) 4 mg 投与群の $t_{1/2}$、V_z 及び CL については、消失速度定数（λz）が未算定のため N = 2。
e) 16 mg 投与群の $t_{1/2}$、V_z 及び CL については、消失速度定数（λz）が未算定のため N = 0。10 回目投与後の PK データが得られた 16 mg 投与群の 1 例については、10 回目の投与を IT-C ボーラス注射で行ったため、要約統計量の算出に含まれない。
f) 16 mg 投与群の $t_{1/2}$ については、消失速度定数（λz）が未算定のため N = 1。
g) 投与前は 1 例のみ抗体に関するデータが得られた。
h) CLN2 疾患が終末期に至った動物は飼料摂取ができないため、データから除外した。

表 2.6.7.7.2: CLN2 ダックスフンドモデルにおける BMN 190 の 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験

被験物質：BMN 190

報告書の題名: Forty-Four Week Biweekly Intracerebroventricular (ICV) Infusion Study of BMN 190 in a Dachshund Model of CLN2

動物種/系統: イヌ/ダックスフンド

投与開始月齢: 2.5 箇月齢

初回投与年月日: 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

最終投与年月日: 20[redacted]年[redacted]月[redacted]日

投与期間: 6～18 箇月間
（被験物質を隔週で投与した）

休薬期間（回復期間）: 該当なし

投与方法: 隔週、脳室内（ICV）4 時間持続投与

溶媒/投与形態: 人工脳脊髄液/ 216.5 mmol/L NaCl、0.80 mmol/L $MgSO_4$、3.01 mmol/L KCl、1.40 mmol/L $CaCl_2$、0.80 mmol/L Na_2HPO_4、0.20 mmol/L NaH_2PO_4、pH 7.3

試験番号 BMN190-12-009 a)

CTD における記載箇所: 4.2.1.1-5

GLP 適用: 非適用

特記事項: なし

無毒性量: 48 mg

a) 本試験は[redacted]米国[redacted]で実施した。本試験は米国食品医薬品局の GLP 基準（CFR 21 Part 58）に準拠していないが、一般的に許容される科学的基準を適用して実施した。

表 2.6.7.7.2: CLN2 ダックスフンドモデルにおける BMN 190 の 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	**48**
遺伝子型	**TPP1 -/-**
動物数	3
トキシコキネティクス:[a)]	
AUC_{0-t}（ng•h/mL）	
脳脊髄液[b)]	
投与 1 回目	1.06×10^{7} (3.52×10^{5})
血漿	
投与 1 回目	4.02×10^{4} (1.69×10^{4})
C_{max}（ng/mL）	
脳脊髄液[b)]	
投与 1 回目	1.78×10^{6} (3.08×10^{5})
血漿	
投与 1 回目	7.60×10^{3} (3.69×10^{3})
T_{max}（時間）	
脳脊髄液[b)]	
投与 1 回目	4.75 (0.354)
血漿	
投与 1 回目	4.17 (0.289)
CL（mL/h）	
脳脊髄液[b)]	
投与 1 回目	4.54 (0.151)
血漿	
投与 1 回目	1390 (716)
V_z（mL）	
脳脊髄液[b)]	
投与 1 回目	43.3 (12.5)
血漿	
投与 1 回目	44700 (18900)
$t_{1/2}$（時間）	
脳脊髄液[b)]	
投与 1 回目	6.59 (1.69)
血漿	
投与 1 回目	22.9 (2.91)
抗体価: 脳脊髄液	
投与前の抗体頻度	0/3
試験中の抗体頻度	3/3
最大抗体価の範囲	40960 - 163840
最大抗体価までの平均日数	145

表 2.6.7.7.2: CLN2 ダックスフンドモデルにおける BMN 190 の 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	**48**
遺伝子型	**TPP1 -/-**
動物数	3
抗体価: 血漿	
投与前の抗体頻度	0/3
試験中の抗体頻度	3/3
最大抗体価の範囲	163840 - 655360
最大抗体価までの平均日数	159
特記すべき所見	
早期死亡例	
水頭症	3/3
髄膜炎	1/3
脳ヘルニア	3/3
一般症状観察	
アナフィラキシー様反応	3/3
体重	-
神経学的検査	N/A
眼科的検査	N/A
認知機能検査（T 迷路試験）	N/A
臨床病理学的検査	-
器官重量	-
病理組織学的検査	
ICV カテーテル経路	
炎症	3/3
平均重篤度	3.33
星状膠細胞症	3/3
平均重篤度	4.00
小膠細胞症	3/3
平均重篤度	2.67
壊死	1/3
平均重篤度	0.33
大脳	
星状膠細胞症	3/3
平均重篤度	3.33
小膠細胞症	3/3
平均重篤度	2.33
線条体	
星状膠細胞症	3/3
平均重篤度	3.67
小膠細胞症	3/3
平均重篤度	3.33

表 2.6.7.7.2: CLN2 ダックスフンドモデルにおける BMN 190 の 44 週間隔週脳室内（ICV）持続投与試験（続き）

被験物質：BMN 190

隔週投与量（mg）	**48**
遺伝子型	**TPP1 -/-**
動物数	3
病理組織学的検査	
脳室	
拡張	3/3
平均重篤度	3.00
上衣細胞消失	3/3
平均重篤度	4.00
脳室内/ 脳室周囲	
炎症	3/3
平均重篤度	3.67
大脳	
白質浮腫	3/3
平均重篤度	2.67

- = 特記すべき所見なし、N/A = 該当なし
TPP1-/- = TPP1 欠損、AUC_{0-t} = 時間 0 から最終定量可能時間までの脳脊髄液中又は血漿中濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高濃度、T_{max} = 最高濃度到達時間、$t_{1/2}$ = 半減期、V_z = 終末相に基づく分布容積、CL = クリアランス
脳の病理組織学的検査所見は発現頻度及び平均重篤度を示す。重篤度のスコアは以下のとおりである。
1 = ごく軽微、2 = 軽微、3 = 軽度、4 = 中等度、5 = 重度
a) 値は平均値及び(標準偏差)を示す。
b) 1 回目の投与後は 3 例中 2 例から薬物動態解析用の脳脊髄液サンプルを採取したが、10 回目の投与後は 3 例とも脳脊髄液の採取ができなかった。脳脊髄液の採取が技術的に困難であったこと、あるいはカテーテルの開存が失われたため、全例から計画した時点で脳脊髄液を採取することはできなかった。

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

試験は実施していない。

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

試験は実施していない。

2.6.7.10 がん原性試験

試験は実施していない。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施していない。

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

試験は実施していない。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

試験は実施していない。

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

試験は実施していない。

2.6.7.15 新生児を用いた試験

試験は実施していない。

2.6.7.16 局所刺激性試験

試験は実施していない。

2.6.7.17 その他の毒性試験

試験は実施していない。