メプセヴィ点滴静注液 10mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.1　緒言

アミカス・セラピューティクス株式会社

目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 参考文献 5

略語一覧

CHO	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	中枢神経系
DART	生殖発生毒性
DRF	用量範囲設定
EFD	胚・胎児発生
ERT	酵素補充療法
GAG	グリコサミノグリカン
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GUS	β-グルクロニダーゼ
LSD	ライソゾーム病
MPS	ムコ多糖症
MPS I	ムコ多糖症I型、ハーラー症候群若しくはシャイエ症候群、又はハーラー・シャイエ症候群（α-L-イズロニダーゼ欠損症）
MPS II	ムコ多糖症II型、ハンター症候群（イズロン酸-2-スルファターゼ欠損症）
MPS IVA	ムコ多糖症IVA 型、モルキオ症候群（ガラクトース 6-スルファターゼ欠損症）
MPS VI	ムコ多糖症VI型、マロトー・ラミー症候群（N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ欠損症）
MPS VII	ムコ多糖症 VII 型、スライ症候群（β-グルクロニダーゼ欠損症）
M6P	マンノース 6 リン酸
NZW ウサギ	New Zealand White ウサギ
rhGUS	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ
SD ラット	Sprague Dawley ラット
TK	トキシコキネティクス
UX003	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

UX003（遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ、rhGUS）は遺伝子組換えタンパク質であり、既承認薬がない重度の多系統ライソゾーム病（LSD）であるムコ多糖症 VII 型（MPS VII）に対する酵素補充療法（ERT）薬として開発された。MPS VII 型患者における β-グルクロニダーゼ（GUS）欠損が発見されて以来、30 年以上 MPS に関する研究が行われており、動物試験の報告件数では VII 型が最も多い。このような長年にわたる数多くの非臨床研究の結果が、MPS VII 型患者の治療に遺伝子組換えヒト GUS を使用する研究の科学的根拠となっている。

ムコ多糖症（MPS）は、グリコサミノグリカン（GAG）の段階的分解に関与する酵素の欠損によって生じる遺伝性ライソゾーム病である。ムコ多糖症は各病型で多くの特徴が類似しているが、欠損している酵素や組織への GAG の蓄積によって生じる症状が異なることから、それぞれ明確に分類できる別個の疾患である。MPS VII型（MPS 7 型、スライ症候群）は、β-グルクロニダーゼ（GUS）が欠損している進行性消耗性かつ生命を脅かす極めてまれなライソゾーム病である。MPS VII 型は、ムコ多糖症の中でも非常にまれなタイプであり（推定有病率は 100 万人に 1 人［Orphanet 2019］）。MPS VII 型では、出生時に胎児水腫、又は青年期若しくは成人期に骨疾患やその他の症状を伴う臨床所見を認めることがある。また、特異顔貌、肺疾患、心血管合併症、肝脾腫、関節硬直、低身長、認知障害、多発性異骨症として知られる MPS 骨疾患など MPS で一般的な様々な臨床的特徴が見られる（Neufeld et al. 2001）。MPS VII 型患者のほとんどは、様々な医学的問題により 10～20 歳未満で死亡する（Montano et al. 2016）。MPS VII 型は極めてまれな疾患である上、患者によって症状の発現、重症度及び進行が大きく異なるため、UX003 の臨床開発プログラムは大きな困難を伴うものとなった。

約 20 年に及ぶ非臨床研究において MPS VII 型動物モデルに対する酵素補充療法（ERT）治療薬の有効性が示され、他の 4 つの MPS 型（MPS I 型、MPS II 型、MPS IVA 型及び MPS VI 型）でも ERT 治療薬の効果が認められているが、MPS VII 型を適応とした既承認薬はない。MPS VII 型が極めてまれな疾患であり、従来の臨床試験デザインで必要な症例数や評価項目を設定することは現実的ではないため、治療薬の開発は進んでいない。そのため、UX003（rhGUS）の開発プログラムでは、MPS VII 型患者を対象とした ERT 治療薬の安全性や有効性の調査に、ERT 治療薬に関する広範な非臨床データが反映されるような工夫した。

UX003 は遺伝子組換えヒト GUS であり、外因性の活性 GUS を細胞内ライソゾームに取り込むことで不活性又は欠損した内因性 GUS を補充することを意図している。オリゴ糖鎖上にあるマンノース 6 リン酸（M6P）残基を介して GUS が細胞表面受容体と結合し、GUS の細胞内移行、ライソゾーム及び組織に蓄積した GAG の異化が起こる。

rhGUS の薬理学的活性のエビデンスは *in vitro* 及び *in vivo* 試験で確立されている。rhGUS の細胞内移行は、MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞を用いた *in vitro* 試験で確認されている。MPS VII 型モデルマウスを用いた多くの公表論文では、遺伝子組換え GUS が多くの組織に分布し、ライソゾーム内の GAG 蓄積を大幅に減少又は抑制することが示されている（Vogler et al. 2005, Sly et al. 2006）。

UX003 は安定したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）の遺伝子組換え細胞株を使用して作製した糖タンパク質である。精製した rhGUS はホモ四量体として存在し、各単量体は 629 個のアミノ酸で構成されている。現在の臨床試験用及び市販用の UX003 製剤は、20 mM リン酸一ナトリウム一水和物、135 mM 塩化ナトリウム、20 nM ヒスチジン、0.01%ポリソルベート 20（pH 6.0）

を含む等張溶液に、rhGUS 濃度が 2 mg/mL となるように溶解して製剤化したものである。非臨床安全性評価で使用した試験材料の概要を毒性試験の概要表（第 2.6.7.4 項、表 2.6.7.4.1）に示す。

UX003 を最大 4 mg/kg の用量で隔週静脈内投与する臨床適応用法を裏付けるため、包括的な非臨床プログラムをデザインし、実施した。UX003 の薬理学的活性のエビデンスは *in vitro* 及び *in vivo* 試験で確立されている。UX003 の PK 及び組織分布プロファイルは、MPS VII 型モデルマウス及びラットを用いて評価した。ラット、ウサギ及びサルにおける TK データを追加で収集した。また、MPS VII 型モデルマウスを用いた公表論文では、遺伝子組換え GUS が多くの組織に分布し、ライソゾーム内の GAG 蓄積を大幅に減少又は抑制することが示されている（O'Connor et al. 1998、Sands et al. 1994、Sands et al. 1997、Sands et al. 2001、Vogler et al. 1996、Vogler et al. 2005）。

UX003 を静脈内投与したときの非臨床の毒性特性は、以下の複数の Ultragenyx がスポンサーの非臨床毒性試験で評価した。1) 免疫寛容の MPS VII 型マウスを用いた 8 週間（及び 1 週間の回復期間）の生体内分布試験（UX003-PC001）、2) Sprague Dawley（SD）ラットを用いた急性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC002）、3) 若齢カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC003）、4) SD ラットを用いた用量範囲設定（DRF）試験（UX003-PC007）及びそれに続く受胎能及び胚・胎児発生（EFD）毒性本試験（UX003-PC008）、5) NZW ウサギを用いた DRF 試験（UX003-PC006）及びそれに続く EFD 毒性本試験（UX003-PC009）、6) SD ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する（PPND）試験（GLP 適用、UX003-PC010)。

中枢神経系（CNS）、心血管系及び呼吸器系に対する UX003 の影響を GLP 適用毒性試験（それぞれ UX003-PC002、UX003-PC003 及び UX003-PC004）の安全性薬理評価で評価した。

雌雄の生殖器の評価は、免疫寛容の MPS VII 型マウスを用いた 8 週間（及び 1 週間の回復期間）の生体内分布試験（UX003-PC001）、SD ラットを用いた急性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC002）及び若齢カニクイザルを用いた 26 週間（及び 4 週間の回復期間）の慢性毒性試験（GLP 適用、UX003-PC003）において、標準的な病理組織学的検査により実施した。また、SD ラット及び NZW ウサギを用いた DRF 試験及び静脈内投与による生殖発生毒性（DART）本試験も実施した（SD ラット：UX003-PC007 、UX003-PC008 及び UX003-PC010、NZW ウサギ：UX003-PC006 及び UX003-PC009）。

まとめると、以下に示す詳細な非臨床データ及び既承認の酵素補充療法治療薬に関する先行データから、UX003 が安全に臨床使用できることが裏付けられた。

今回申請する効能又は効果、用法及び用量は以下の通りである。

【申請する効能・効果】

ムコ多糖症 VII 型

【申請する用法・用量】

通常、ベストロニダーゼ（遺伝子組換え）として、1 回体重 kg あたり 4mg を隔週点滴静脈内投与する。

2.6.1.1 参考文献

Montano AM, Lock-Hock N, Steiner RD, Graham BH, Szlago M, Greenstein R, Pineda M, Gonzalez-Meneses A, Coker M, Bartholomew D, Sands MS, Wang R, Giugliani R, Macaya A, Pastores G, Ketko AK, Ezgu F, Tanaka A, Arash L, Beck M, Falk RE, Bhattacharya K, Franco J, White KK, Mitchell GA, Cimbalistiene L, Holtz M, Sly WS. 2016. "Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII)." *J Med Genet* 53 (6):403-18.

Neufeld EF, Muenzer J. 2001. "The Mucopolysaccharidoses." In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, edited by CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly and D Valle, 3421-3452. New York: McGraw-Hill.

O'Connor LH, Erway LC, Vogler CA, Sly WS, Nicholes A, Grubb J, Holmberg SW, Levy B, Sands MS. 1998. "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function." *J.Clin.Invest* 101 (7):1394-1400.

Orphanet. 2019. Prevalence of rare diseases 2019 [cited January 2019]. Available from http://www.orpha.net.

Sands MS, Vogler C, Kyle JW, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Sly WS, Birkenmeier EH. 1994. "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII." *J.Clin.Invest* 93 (6):2324-2331.

Sands MS, Vogler C, Torrey A, Levy B, Gwynn B, Grubb J, Sly WS, Birkenmeier EH. 1997. "Murine mucopolysaccharidosis type VII: long term therapeutic effects of enzyme replacement and enzyme replacement followed by bone marrow transplantation." *J.Clin.Invest* 99 (7):1596-1605.

Sands MS, Vogler CA, Ohlemiller KK, Roberts MS, Grubb JH, Levy B, Sly WS. 2001. "Biodistribution, kinetics, and efficacy of highly phosphorylated and non- phosphorylated beta-glucuronidase in the murine model of mucopolysaccharidosis VII." *J.Biol.Chem.* 276 (46):43160-43165.

Sly WS, Vogler C, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Tan Y, Nishioka T, Tomatsu S. 2006. "Enzyme therapy in mannose receptor-null mucopolysaccharidosis VII mice defines roles for the mannose 6-phosphate and mannose receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 (41):15172-15177.

Vogler C, Levy B, Grubb JH, Galvin N, Tan Y, Kakkis E, Pavloff N, Sly WS. 2005. "Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (41):14777-82.

Vogler C, Sands MS, Levy B, Galvin N, Birkenmeier EH, Sly WS. 1996. "Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in murine mucopolysaccharidosis type VII: impact of therapy during the first six weeks of life on subsequent lysosomal storage, growth, and survival." *Pediatr.Res.* 39 (6):1050-1054.

メプセヴィ点滴静注液 10mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）
2.6.2　薬理試験の概要文

アミカス・セラピューティクス株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 5
2.6.2.1　概要 5
2.6.2.2　*in vitro* 薬理試験 9
2.6.2.2.1　MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞による UX003 の取り込み 9
2.6.2.2.2　MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞における UX003 の半減期 10
2.6.2.3　効力を裏付ける試験 11
2.6.2.3.1　MPS VII 型マウスモデル 11
2.6.2.3.2　免疫寛容 MPS VII 型マウスモデルを用いた rhGUS 試験 15
2.6.2.3.2.1　uGAG と病理組織変化との関係を確認する UX003 の生体内分布試験（効力を裏付ける試験）（UX003-PC001） 15
2.6.2.3.2.2　rhGUS による脳及びその他の組織における GUS 活性及びライソゾーム内 GAG 蓄積の減少 22
2.6.2.3.3　MPS VII 型マウスモデルを用いた rmGUS 試験 30
2.6.2.3.3.1　様々な組織への rmGUS の分布及びライソゾーム内 GAG 蓄積の減少 30
2.6.2.3.3.2　rmGUS による生存期間の延長及び発育の改善 35
2.6.2.3.3.3　rmGUS による表現型、行動及び聴覚機能の改善 38
2.6.2.4　副次的薬理試験 42
2.6.2.5　安全性薬理試験 42
2.6.2.5.1　UX003 を Sprague Dawley ラットに静脈内投与したときの呼吸器系への影響に関する薬理学的評価（UX003-PC004） 45
2.6.2.5.2　SD ラットを用いた単回投与毒性／TK／CNS 安全性薬理試験（UX003-PC002） 45
2.6.2.5.3　若齢カニクイザルに UX003 を静脈内持続投与する 26 週間（及び 4 週間の回復期間）の毒性／TK／心血管系安全性試験（UX003-PC003） 45
2.6.2.6　薬力学的薬物相互作用 46
2.6.2.7　考察及び結論 46
2.6.2.8　参考文献 48

略語一覧

ABR	聴性脳幹反応
BMT	骨髄移植
BW	体重
cDNA	相補的デオキシリボ核酸
CIM6PR	カチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体
CNS	中枢神経系
[redacted]	[redacted]
CTD	コモン・テクニカル・ドキュメント
CV	心血管
DMB	ジメチルメチレンブルー
DS	デルマタン硫酸
ECG	心電図
ERT	酵素補充療法
GAG	グリコサミノグリカン
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GUS	β-グルクロニダーゼ
gus^{mps}/*gus*^{mps}	ムコ多糖症VII型マウス
HS	ヘパラン硫酸
ICH	日米欧医薬品規制調和国際会議
IV; i.v.	静脈内
K_{uptake}	細胞内への最大取り込み量の 50%が得られる酵素濃度
kHz	キロヘルツ
LSD	ライソゾーム病
MEM	最小必須培地
MPS	ムコ多糖症
MPS I	ムコ多糖症I型、ハーラー症候群若しくはシャイエ症候群、又はハーラー・シャイエ症候群（α-L-イズロニダーゼ欠損症）
MPS VII	ムコ多糖症VII型、スライ症候群（β-グルクロニダーゼ欠損症）
M6P	マンノース 6 リン酸
MPS VII/E540A^{TG}	免疫寛容ムコ多糖症 VII 型マウス
NRE	非還元末端
PK	薬物動態
rhGUS	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ

rmGUS	遺伝子組換えマウス β-グルクロニダーゼ
RPE	網膜色素上皮
SD	標準偏差
SD rat	Sprague Dawley ラット
SLC	類洞内皮細胞、表層粘液細胞
$t_{1/2}$	半減期
TK	トキシコキネティクス
uGAG	尿中グリコサミノグリカン
UX003	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　概要

UX003 では、効力を裏付ける試験を 1 件実施し、MPS VII 型マウスモデルにおける UX003 の薬理作用を確認し、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した安全性薬理試験を 3 件実施して、UX003 が中枢神経系（CNS）、心血管（CV）系及び呼吸器系パラメータに及ぼす影響を評価した。

遺伝子組換え β-グルクロニダーゼ（GUS）（遺伝子組換えマウス GUS［rmGUS］及び複数の遺伝子組換えヒト GUS［rhGUS］を含む）の非臨床の薬効薬理は、UX003 の開発前から、MPS VII 型マウスモデルを用いた多くの発表済みの *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で幅広く評価されている。遺伝子組換え GUS は、種類が異なっても同様の薬理作用を示すと考えられる。

本項では、UX003 の細胞内取り込み、半減期及び主な薬力学的作用の裏付けとなる発表済みの *in vitro* 及び *in vivo* 試験、並びに Ultragenyx がスポンサーの効力を裏付ける試験及び GLP 適用安全性薬理試験の要約示す。*in vitro* 試験、薬力学試験及び安全性薬理試験の概要を表 2.6.2.1.1 に示し、続いて各試験の方法、結果及び結論について詳細に述べる。

表 2.6.2.1.1：　非臨床薬理試験の概要

試験の種類	被験物質	試験系		投与方法	投与期間及び投与スケジュール	用量 (mg/kg)	GLP 適用	試験依頼者の試験番号	概要表	CTD 中の該当箇所
薬力学										
in vitro 薬力学試験										
rhGUS の細胞内半減期測定	UX003	MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞		*in vitro*	該当なし	1、2 又は 4 μg/mL	非適用	UGNX-013	NA	第 4.2.2.3 項
効力を裏付ける試験										
rhGUS－uGAG と病理組織変化との関係を確認する生体内分布試験	UX003	ムコ多糖症VII型マウス（MPS 7/E540A^{TG}）10～12 週齢		静脈内ボーラス投与	週 1 回 8 週間	0、0.1、0.25、1、4、20	非適用	UX003-PC001	NA	第 4.2.1.1 項
rhGUS[a]－組織内半減期、分布、蓄積 GAG のクリアランス及び試験依頼者による盲検下病理学的再評価	rhGUS	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540A^{TG}）	4～5 週齢	静脈内ボーラス投与	週 1 回 × 3	0.3、1、2.5 又は 5	非適用	発表論文 (Vogler et al. 2005) [redacted] 参照番号 20022037-1 及び 20022037-2	NA	第 4.3 項
			8～12 週齢		週 1 回 × 13	1、2 又は 4				
			15～16 週齢		3 回/週	20 又は 40				
			15～16 週齢		週 1 回 × 4	20				
rhGUS[a]－PK、分布、蓄積 GAG のクリアランス	rhGUS	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540A^{TG}）		静脈内ボーラス投与	週 1 回 × 3	1	非適用	発表論文 (Sly et al. 2006)	NA	第 4.3 項
rmGUS－組織分布及びライソゾーム内 GAG 蓄積の減少	rmGUS	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	新生児	静脈内ボーラス投与	週 1 回 × 6	3.5-0.28	非適用	発表論文 (Sands et al. 1994)	NA	第 4.3 項
			5 週齢		単回投与	0.28				
rmGUS－生存期間及び発育の改善	rmGUS	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	新生児	静脈内ボーラス投与	週 1 回 × 6（殺処分までの期間は異なる）	3.5-0.28	非適用	発表論文 (Vogler et al. 1996)	NA	第 4.3 項

試験の種類	被験物質	試験系		投与方法	投与期間及び投与スケジュール	用量 (mg/kg)	GLP 適用	試験依頼者の試験番号	概要表	CTD 中の該当箇所
rmGUS－組織分布、ライソゾーム内 GAG 蓄積の減少、発育及び生存期間	rmGUS	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	新生児	静脈内ボーラス投与	週 1 回 × 6、月 1 回 × 11	3.5-0.28	非適用	発表論文 (Sands et al. 1997)	NA	第 4.3 項
			新生児		週 1 回 × 5、その後同系 BMT	3.5-0.28				
			5 週齢		月 1 回（最長 1 年）	0.28				
rmGUS－表現型、行動及び聴覚機能の改善	rmGUS	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	新生児	静脈内ボーラス投与	週 1 回 × 6	3.5-0.28	非適用	発表論文 (O'Connor et al. 1998)	NA	第 4.3 項
rmGUS－脳のライソゾーム内 GAG 蓄積の減少	rmGUS	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	新生児 2 週齢	静脈内ボーラス投与	週 1、2、3、4、5、又は 6 回投与（2 又は 3 例） 0、1、2、3、4、5 又は 6 週目に開始（投与開始までの期間は異なる）	4.0	非適用	発表論文 (Vogler et al. 1999)	NA	第 4.3 項
安全性薬理試験										
中枢神経系（CNS）[b] SD ラットを用いた単回投与毒性／TK／CNS 安全性薬理試験	UX003	Sprague Dawley ラット		IV 持続投与（2 時間）	単回投与	0、6、20	適用	UX003-PC002	第 2.6.3 項、表 2.6.3.4.1	第 4.2.1.3 項

試験の種類	被験物質	試験系	投与方法	投与期間及び投与スケジュール	用量 (mg/kg)	GLP 適用	試験依頼者の試験番号	概要表	CTD 中の該当箇所
呼吸器系 UX003 を Sprague Dawley ラットに静脈内投与したときの呼吸器系への影響に関する薬理学的評価	UX003	Sprague Dawley ラット	IV 持続投与（2 時間）	単回投与	0、6、20	適用	UX003-PC004	第 2.6.3 項、表 2.6.3.4.1	第 4.2.1.3 項
心血管（CV）系 [c] UX003 の若齢カニクイザルにおける 26 週間静脈内持続投与（及び 4 週間の回復期間）毒性／TK／心血管系安全性試験	UX003	カニクイザル	IV 持続投与（2 時間）	隔週 1 回 × 26 週間、回復期間 4 週間	0、2、6、20	適用	UX003-PC003	第 2.6.3 項、表 2.6.3.4.1	第 4.2.1.3 項

[a.] この試験で使用した酵素は、Ultragenyx がスポンサーの非臨床及び臨床試験用物質の製造で使用する[redacted]するもので、従来の純化方法と同様の方法で製造したものである。

[b.] SD ラットを用いた単回投与毒性試験及びトキシコキネティクス（TK）測定は、中枢神経系安全性薬理試験と併せて実施した。

[c.] カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験及び TK 評価は、心血管系安全性薬理評価と併せて実施した。rhGUS = 遺伝子組換えヒト GUS、rmGUS = 遺伝子組換えマウス GUS

NA = 概要表に記載されていない報告書及び／又は参考文献

2.6.2.2　*in vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1　MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞による UX003 の取り込み

（CTD 3.2.S.4.2.7）

酵素補充療法（ERT）におけるライソゾーム酵素の様々な組織への送達には、主にカチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体（CIM6PR）を介し、エンドサイトーシス経路で取り込まれた、ライソゾーム酵素の N 結合型糖鎖上に存在するマンノース 6 リン酸（M6P）マーカーが大きく関与している。遺伝子組換えヒト GUS（rhGUS）の M6P に対する親和性の評価では、一連の MPS VII 型線維芽細胞プレートに各濃度の rhGUS を添加して培養する酵素取り込み測定法を用いて、ヒト線維芽細胞における M6P 受容体を介した取り込みを測定する。その後、取り込みの飽和曲線を Michaelis-Menten 式に当てはめて分析する。その測定法の概略を次項に示す。取り込み量は UX003 濃度の上昇とともに速やかに増加し、受容体を介した取り込みに一致する取り込み飽和レベルに達する。UX003（ロット [redacted]、[redacted] 並びに臨床試験ロット GMP1、2、3、4 及び 5）で評価した全体的な K_{uptake} 値は約 [redacted]～[redacted] nM であった（第 3.2.S.4.4 項）。この値は、遺伝子組換えヒトイズロニダーゼの高い取り込み定数（1～2 nM）と十分に一致する（Kakkis et al. 1994）。

UX003 の取り込み量測定法の概略

検体は、β-グルクロニダーゼ欠損線維芽細胞の融合細胞層上に添加する。コントロール群には、細胞への UX003 の取り込みを防ぐため、細胞外受容体の競合的阻害剤として機能するマンノース-6-リン酸（M6P）を添加する。規定のインキュベーション時間の後、細胞を洗浄して細胞外 UX003 を除去し、[redacted]℃ で凍結する。凍結した細胞を室温で解凍して細胞を溶解する。次に、細胞溶解物中の UX003 活性を、CTD 3.2.S.4.2.3 と同じ酵素活性法を使用して測定する。各希釈で M6P 阻害剤コントロールから生成されたシグナルは、細胞表面の非特異的結合を推定するためのバックグラウンドとして使用される。K_{uptake}（絶対的取り込み量）は、Michaelis-Menten モデルをもとに決定される。相対的取り込み量は、サンプルの絶対的取り込み量を参照標準の取り込みとして比較することによって決定される。

設備及び機器

- •蛍光測定用のマイクロプレート読み取り装置
- •データ分析ツール：[redacted]または同等のもの

試薬の調製

- •アッセイ培地（最小必須培地）、無血清、[redacted] µg/mL BSA
- •洗浄バッファー（[redacted] mM 酢酸ナトリウム、[redacted] mg/mL BSA、pH[redacted]）
- •M6P 阻害剤溶液（アッセイ培地中の[redacted] mM D-マンノース 6-リン酸）
- •4-MUG 基質（[redacted]M 酢酸緩衝液中[redacted] mg/mL 4-MUG、[redacted] mg/mL BSA）
- •ストップバッファー（[redacted] M グリシン、[redacted] M 炭酸ナトリウム、pH[redacted]）

[redacted] µL の[redacted] 細胞懸濁液を 96 ウェルプレートの各ウェルに加える。プレートを[redacted]～[redacted] 時間インキュベートする。次に、段階希釈スタンダード、サンプル、及び M6P をプレートに追加する。同時に、すぐに使用できる基質溶液をプレートの各ウェルに加え、[redacted]℃±[redacted]℃ で[redacted] 分±[redacted] 分間インキュベートする。インキュベーション後、[redacted] µL のストップバッファーを添加し、プレートをマイクロプレートリーダー（[redacted]で制御）で直ちに測定する。

2.6.2.2.2　MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞における UX003 の半減期

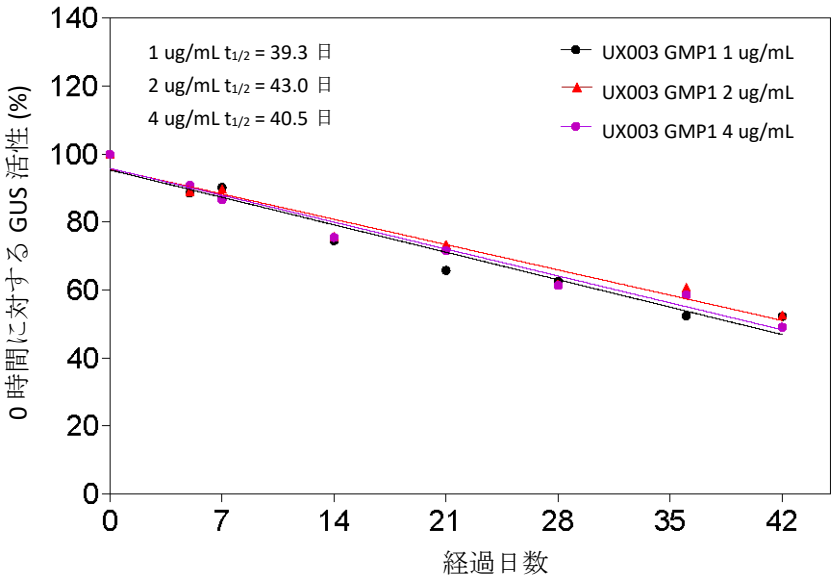
（CTD 4.2.2.3.2、UGNX-013）

GUS は大部分のライソゾーム酵素とは異なり、中性 pH 及びライソゾーム内のいずれでも非常に安定している（UGNX-013）。ライソゾーム内での安定性は、酵素取り込み後の GUS 活性の消失速度を見極める上で重要なパラメータであり、補正後の酵素濃度を維持するために必要な補充療法治療薬の投与頻度を導く主な要素である。異なる動物種では二次的な保護酵素複合体の形成又は内因性プロテアーゼに対する感受性が再現できない場合もあることから、酵素のライソゾーム内安定性は同一動物種のライソゾーム内で最も正確に推定できるはずである（Bielicki et al. 1999）。

ライソゾームに送達された遺伝子組換え酵素の安定性を推定するため、MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞への rhGUS 取り込み後の半減期を測定した。MEM アール培地に 15%ウシ胎児血清を添加して培養した MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞 GM-2784 の融合性単層を、同じ培地で rhGUS（1、2 及び 4 µg/mL）に 37ºC で 21 時間曝露し、大量の rhGUS を導入した。その後、培地を除去し、rhGUS が存在しない培地で 37ºC で培養した。4 時間の回復期間ですべての酵素をライソゾームに送達させた後、35 mm の二重細胞プレート上の細胞を 0、5、7、14、21、28、36 及び 42 日後に採取し、洗浄して冷凍した。これらの細胞を解凍し、1%デソキシコール酸ナトリウムで溶解後、人工基質に 4-メチル-ウンベリフェリル β-D グルクロニドを用いて GUS 活性を測定した。測定データは、0 時間時点に対する各測定時点での活性の残存率としてプロットした。直線回帰方程式に代入して求めた消失速度に基づいて算出した半減期は約 40 日（UGNX-013、図 2.6.2.2.2.1）で、MPS I型におけるイズロニダーゼの半減期（3～5 日）の約 8 倍であった（Kakkis et al. 1994）。

図 2.6.2.2.2.1：　MPS VII 型患者由来ヒト線維芽細胞における UX003 の半減期

1、2 及び 4 ug/mL で導入後の MPSⅦ型線維芽細胞における UX003（GMP1）の半減期



出典：UGNX-013、図 3

2.6.2.3　効力を裏付ける試験

2.6.2.3.1　MPS VII 型マウスモデル

Jackson Laboratory で発見された（Birkenmeier et al. 1989）自然発生 MPS VII 型マウスモデルでは、gus^{mps} 変異と呼ばれる GUS 遺伝子の第 10 エクソンの 1-bp 欠失がホモ接合体であった（Sands et al. 1993）。自然発生 MPS VII 型マウスは非常に幅広く研究されており、形態学的、遺伝子的及び生化学的特徴がヒト MPS VII 型と非常によく似ていることが明らかになっている。MPS VII 型マウスでは、顔面異形、発育遅延、難聴及び行動障害が認められ、寿命が短い。MPS VII 型マウスではグリコサミノグリカン（GAG）のライソゾーム内蓄積が進行しており、脳、眼、骨格、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、皮膚、循環顆粒球を含むあらゆる臓器に障害が見られる。MPS VII 型マウスの臓器、骨格及び脳では、GAG のライソゾーム内蓄積が広範囲に認められる。この MPS VII 型マウスモデルは、骨髄移植、酵素補充療法（ERT）、並びにレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター及びアデノウイルス関連ウイルスベクターを用いる遺伝子治療の有効性を評価する際に広く使用されている（Sly et al. 2001）。

MPS VII 型マウスを用いた初期の ERT 研究では、補体媒介性のアナフィラキシー様反応を惹起する可能性がある緩徐投与ではなく、ボーラス投与が必要と考えられていたため、投与期間は 6 週間に限定されていた（Sands et al. 1994）。マウスでは緩徐投与によりアナフィラキシー様反応の臨床的影響を緩和することが不可能であったため、ERT を長期投与するには免疫寛容マウスが必要であった。Sly は、ヒト GUS に対する免疫寛容を獲得した MPS VII 型マウスを使用する長期の非臨床試験を実現させるために、求核剤が反応する部位（E540A）をアミノ酸置換することによって、rhGUS の相補的デオキシリボ核酸（cDNA）の不活性型変異体を発現するトランスジェ

ニックマウスを作製し、MPS VII 型（gus^{mps}/gus^{mps}）背景マウスと交配させた。

このようにして得られたマウス（MPS VII/E540A^{TG}）は、元々の MPS VII 型（gus^{mps}/gus^{mps}）マウスの臨床的、形態学的、生物学的及び病理組織学的な特徴を保持しているが、変異タンパク質が内因的に存在することによりヒト GUS に対して免疫寛容の状態にある。MPS VII/E540A^{TG} マウスは rhGUS の有効性及び安全性を検討する投与期間が 13 週間にも及ぶ試験で使用されているが、ヒトタンパク質の投与に対する異種間の免疫応答は起こしていない。

MPS VII 型マウスモデルが使用できるようになって以来、酵素補充療法、骨髄移植、幹細胞移植、神経前駆細胞移植、各種ウイルス遺伝子治療など、様々な治療法の研究が進められている（Vogler et al. 2001）。ERT の研究は、遺伝子組換えマウス GUS（rmGUS）のクローン化、発現及び純化により可能となった（Sands et al. 1993）。様々な週齢の MPS VII 型マウスに様々な用法用量で rmGUS を投与する試験が複数実施され、様々な組織による取り込みの最適化、ライソゾーム内 GAG 蓄積に対する効果の評価及びその結果として考えられる臨床的影響の評価が行われた。その後、rhGUS に寛容なトランスジェニックマウス（MPS VII/E540A^{TG}）モデルが開発され、MPS VII 型マウスを用いてヒトタンパク質 rhGUS の作用を評価することが可能になった。

rmGUS 及び UX003 を含む様々な種類の rhGUS を用いた主な試験の概要を表 2.6.2.3.1.1 に示す。また、以降の項では、MPS VII 型モデルにおける組織分布、全身有効性、臨床的影響、血液脳関門通過などの特定の関連データが得られた重要な ERT 試験を選択し、概要を示す。

表 2.6.2.3.1.1： MPS VII 型マウスモデルを用いた酵素補充療法（遺伝子組換え GUS）に関する試験の概要

参考文献	被験物質（マウス系統）	投与時の週齢	動物数	IV 投与量* (mg/kg)	投与頻度	投与終了から殺処分までの期間	効果
UX003-PC001	UX003 (MPS VII/ E540A^{TG})	10～12 週齢	6 例/群	0、0.1、0.25、1、4、20	週 1 回 8 週間	72 時間（0～4 mg/kg 群） 1 週間（20 mg/kg 群）	血清及び尿試料中の疾患特異的なバイオマーカーの減少が認められ、これに比例して、各組織の組織学的検査では細胞質内の空胞変性が減少した。
(Vogler et al. 2005)	rhGUS[a] (MPS VII/ E540A^{TG})	4～5 週齢	2～3 例／群	0.3、1、2.5 又は 5	週 1 回 × 3	1 週間	髄膜蓄積の中等度減少。
		8～12 週齢	4～5 例／群	1、2 又は 4	週 1 回 ×13	1 週間	髄膜並びに頭頂、新皮質及び海馬のニューロン及びグリアにおける GAG 蓄積のクリアランス。肝臓及び腎臓における GAG 蓄積の減少、尿中 GAG 排泄量の減少。
		15～16 週齢	2	20 又は 40	3 回／週	3 日	髄膜を除き、中枢神経系のライソゾーム内 GAG 蓄積に変化なし。
		15～16 週齢	2	20	週 1 回 × 4	1 週間	ニューロン、グリア及び髄膜における GAG 蓄積の減少。
(Sly et al. 2006)	rhGUS (MPS VII/ E540A^{TG})	報告なし	3	0.2 – 6.4	週 1 回 × 3	1 週間	MPS VII モデルマウスの MR 及び CIM6PR による GUS の取り込み。MR は循環血からの速やかな酵素クリアランスに寄与する。7 日目に MR$^{+/-}$の肝臓では総酵素残量が低値であった。
(Sands et al. 1994)	rmGUS (gus^{mps}/gus^{mps})	新生児	5	28,000 U (3.5-0.28)	週 1 回 × 6	1 週間	ニューロンを含むほとんどの組織における GAG 蓄積の減少又は抑制。6 週目には正常マウスとの区別が困難。効果が持続し寿命が延長。
		5 週齢	5	28,000 U (0.28)	単回	1 週間	固定組織マクロファージにおける GAG の減少。臨床的な影響なし。

参考文献	被験物質（マウス系統）	投与時の週齢	動物数	IV 投与量* (mg/kg)	投与頻度	投与終了から殺処分までの期間	効果
(Vogler et al. 1996)	rmGUS (gus^{mps}/gus^{mps})	新生児	8	28,000 U (3.5-0.28)	週 1 回 × 6	14、29、85 及び 150 日目に 2 例ずつ	14 及び 29 日目に脾臓、肝臓、骨髄及び脳におけるライソゾーム内 GAG 蓄積が減少。皮質及び海馬ニューロンを除き、減少効果は実験 85 日までに消失。
			6	28,000 U (3.5-0.28)	週 1 回 × 6	391 日	比較的軽度な MPS VII 型の症状（意識清明、歩行及び被毛がより正常）。体重は正常マウスの 93.2%。骨長は正常マウスの 91.5%。
(Sands et al. 1997)	rmGUS (gus^{mps}/gus^{mps})	新生児	11	28,000 U (3.5-0.28)	週 1 回 × 6、月 1 回 × 11	185 日齢で各群 2 例を殺処分。残りの動物は最終投与の 1 週間後に殺処分	この 2 群のマウスには有意な骨伸長及び生存期間の延長が見られ、1 年時点で正常マウスとの区別が困難となった。この 2 群ではライソゾーム内 GAG 蓄積が大幅に減少した。
		新生児	10	28,000 U (3.5-0.28)	週 1 回 × 5、その後同系 BMT		
		5 週齢	10	28,000 U (0.28)	月 1 回（最長 1 年）		5 週齢で投与を開始した場合、表現型及びライソゾーム内 GAG 蓄積に対する効果は小さかった。
(O'Connor et al. 1998)	rmGUS (gus^{mps}/gus^{mps})	新生児	MPS VII 型 22 例 正常 21 例	28,000 U (3.5-0.28)	週 1 回 × 6	マウスは殺処分せず、モーリスの水迷路試験に供した	表現型の重症度が低く、脳及び耳の病理組織学的所見が改善。学習及び聴覚試験の結果が顕著に改善。
(Vogler et al. 1999)	rmGUS (gus^{mps}/gus^{mps})	新生児～2 週齢	17	16,000 U/g (4.0)	週 1、2、3、4、5 又は 6 回投与（2 又は 3 例） 0、1、2、3、4、5 又は 6 週目に開始	実験 42 日（5 週目に投与を開始した 3 例のみ実験 77 日に殺処分）	投与期間が生後 0 日～6 週目の場合、脳のライソゾーム内 GAG 蓄積が減少。2 週目に投与を開始した場合、脳のライソゾーム内 GAG 蓄積は減少しなかった。 投与開始時の週齢と、軟髄膜、骨芽細胞及び RPE のライソゾーム内 GAG 蓄積との関連は比較的弱かった。

* 用量は rhGUS の特定の活性値（4000 U/μg）に基づいて算出した。

[a] この試験で使用した酵素は、Ultragenyx がスポンサーの非臨床及び臨床試験用物質の製造で使用する[redacted]するもので、従来の純化方法と同様の方法で製造したものである。

RPE = 網膜色素上皮

2.6.2.3.2　免疫寛容 MPS VII 型マウスモデルを用いた rhGUS 試験

2.6.2.3.2.1　uGAG と病理組織変化との関係を確認する UX003 の生体内分布試験（効力を裏付ける試験）

（CTD 4.2.1.1.1、UX003-PC001）

UX003-PC001 試験の目的は、MPS VII/E540A^{TG}マウスに各種用量の UX003 を週 1 回 8 週連続で静脈内投与し、尿中グリコサミノグリカン（uGAG）排泄量とライソゾーム内の病理組織変化の関係を評価することであった。UX003 の投与量は、治療用量以下の 0.1 mg/kg から予定市販用量（4 mg/kg）の 5 倍に相当する 20 mg/kg までとした。この試験では、ヒト MPS VII 型に相当する GUS 欠損動物モデルを用いて、最大 20 mg/kg までの各種用量で UX003 を投与したときの毒性も評価した。

この試験では最初、10～12 週齢の雌雄トランスジェニック（MPS VII/E540A^{TG}）マウス計 42 例を使用した。マウスを 7 群（6 例／群、回復群を含む）に振り分け、UX003 を 0（溶媒対照）、0.1、0.25、1、4、又は 20 mg/kg の投与量で週 1 回、最長 8 週連続静脈内投与した。4 mg/kg を投与した回復群のマウスでは、1 週間の休薬による回復性を評価した。すべての動物について定期的に健康状態／死亡を観察し、一般状態観察を毎日、体重測定を週 1 回行った。uGAG 分析のために尿を週 2 回（各投与日の 48 時間及び 144 時間後）採取した。1～6 群のマウスは、実験 8 週の最終投与から約 72 時間後に殺処分した。7 群（4 mg/kg）の休薬動物は、実験 8 週の最終投与から 1 週間後に殺処分した。すべての動物から採取した血液は、血液生化学的検査及び血液学的検査用に必要に応じて処理した。血液及び尿試料は、GUS 活性評価及び uGAG 分析（非還元末端（NRE）及びジメチルメチレンブルー（DMB）法による GAG 分析）にも使用した。ライソゾーム内 GAG 蓄積の病理組織学的スコアリング分析及び UX003 の組織分布評価のため、剖検時に各動物の 8 つの器官（肋骨、肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓、心臓及び大腿四頭筋）から試料を採取し、処理した。以下に示す一連の組織を用いて毒性に関する病理組織学的分析も行った。組織の独立盲検分析を行うため、固定した組織標本を [redacted] に送付した。安全性関連データの要約を第 2.6.6.3.1.2 項に示す。

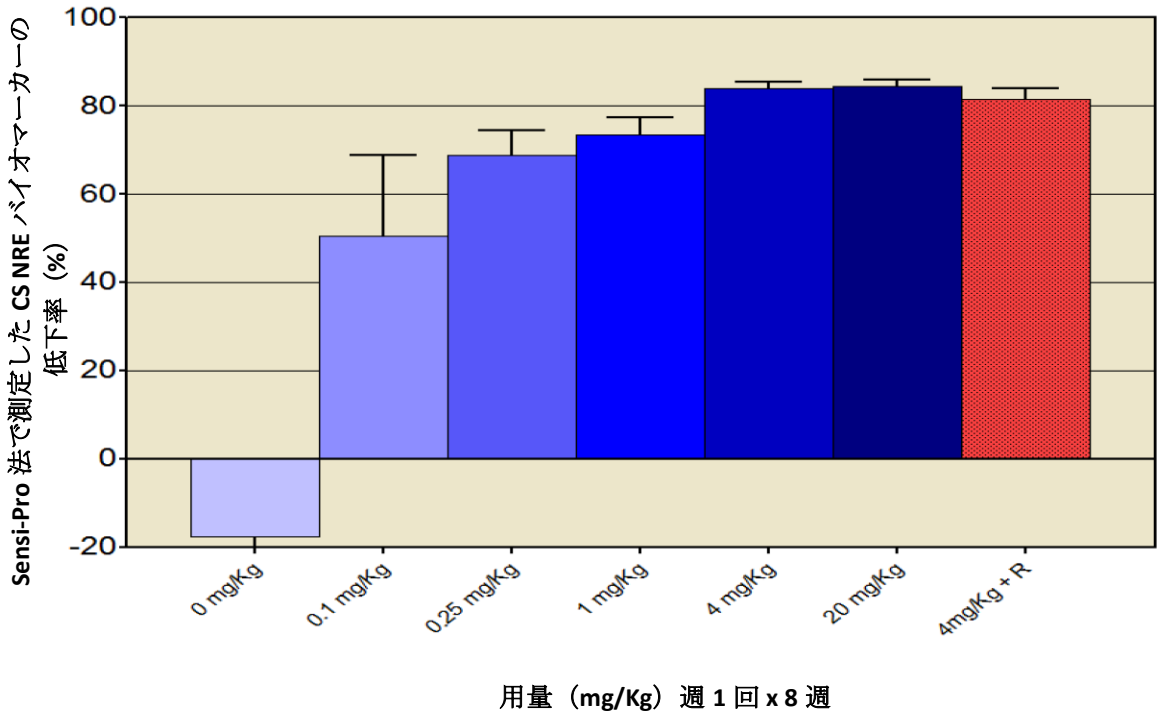
予想どおり、UX003 は様々な組織に分布しており、ERT に関する動物試験で常に観察されるように、一部の組織では他の組織に比べ著明に多くの酵素が蓄積していた。実験 8 週の最終投与から約 48 時間後に採取した組織試料のほとんどで組織中の UX003 濃度が用量依存的に増加していた。20 mg/kg 群では、肝臓（約 900 U/mg）、脾臓（約 600 U/mg）及び副腎（約 400 U/mg）で活性値（U/mg）が最も高く、脳組織（約 0.7 U/mg）が最も低かった。この結果は、同じ用量を投与した先行試験（Vogler et al. 2005）の結果と同程度であった。UX003 4 mg/kg 群では組織中の活性が 1 週間の回復期間後も維持されていた。対照群の血清、心臓、脳及び前立腺で、低値ではあるが活性が認められていることから、この系統のマウスでは内因性 GUS 産生能がある程度維持されていることが示唆される。

GAG 濃度は 2 種類の方法で測定した。1 つ目は、従来の DMB ベースの測定法で、尿中クレアチニン濃度で補正した尿中総 GAG 濃度が測定できる。この方法では、異常な GAG 高値と正常に排泄された少量の GAG を合わせた総 GAG 濃度が測定できるため、GAG 値が背景値を超えて大幅に上昇している場合に用いることができる。2 つ目の方法は、ライソゾーム曝露から誘導される特定の化学的性質のために GAG から遊離した NRE の二糖構造を解析する技術（Sensi-Pro 法とも呼ばれ、ARUP Laboratories［Salt Lake City, Utah, US］で実施）に基づいて、ライソゾーム内の異常な GAG 濃度を特異的に測定する方法であった。この NRE 法では、ヘパラン硫酸（HS）及

びデルマタン硫酸（DS）の NRE に存在する遊離二糖部分を特異的に解析して GAG 濃度を測定する。

血清中及び尿中の疾患特異的な NRE 法を用いて GAG 濃度を分析した結果、UX003 群のマウスでは GAG 濃度の大幅にかつ一貫した低下が認められた。8 週間の UX003 投与後の尿中総 NRE 二糖は、用量依存的に低下した（図 2.6.2.3.2.1.1 参照）。一方、本試験で用いた MPS VII 型マウス群の正常 GAG の背景値は、先行試験で用いた MPS VII 型コロニーマウスに比べ高かったため、DMB 測定法は有用ではなかった。本試験で用いた MPS VII 型マウス（MPS VII/E540A^{TG}）の尿中 GAG 濃度は、DMB 法で測定した場合、正常対照群の非投与動物で認められた値の 2 倍未満であった。

図 2.6.2.3.2.1.1：　尿中 GAG 濃度（NRE 法）のベースラインからの用量依存的な低下（ベースライン値に対する割合として示す）

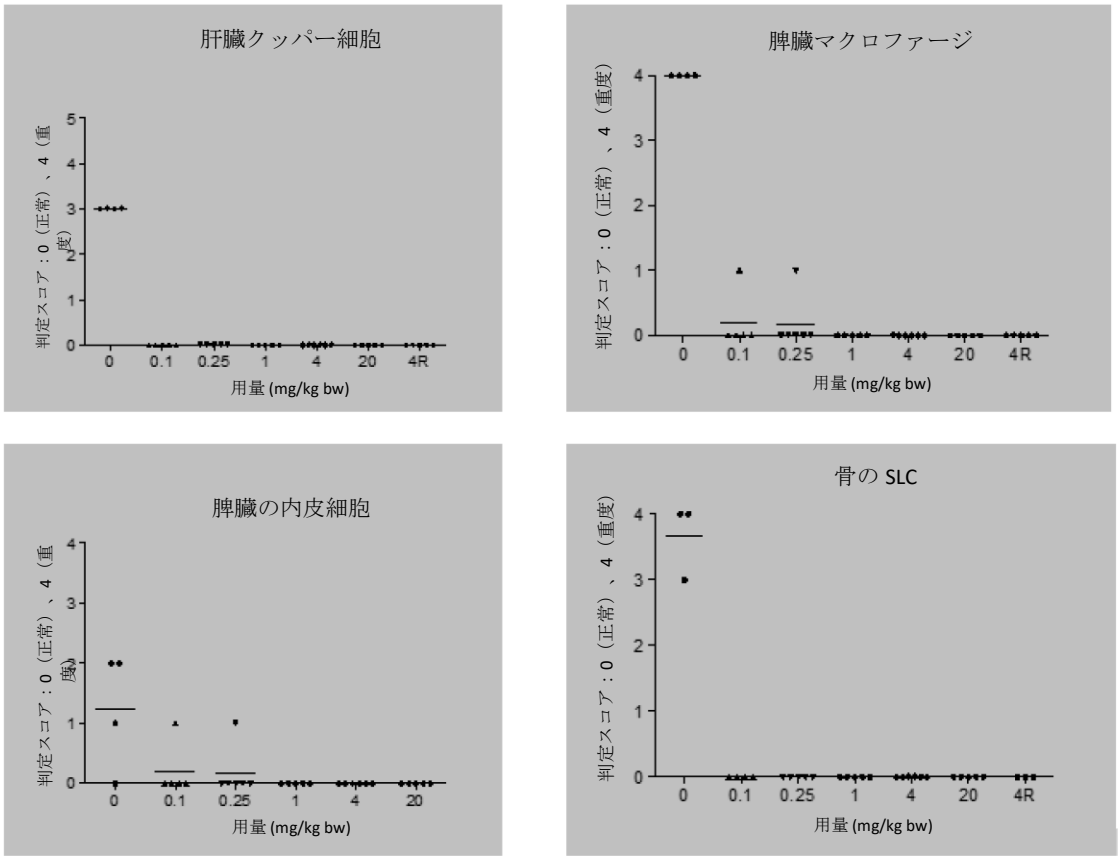


出典：UX003-PC001、図 3（第 4.2.1.1 項）

この尿中 GAG 濃度（NRE 法）のデータから、UX003 の用量を低治療量から飽和レベルまで増量すると、それに伴い尿中 GAG 排泄量が減少することが示された。また、4 mg/kg と 20 mg/kg で尿中 GAG 濃度が同程度に低下していたことから、4 mg/kg が有効性の限度に近いと考えられた。*in vivo* における rhGUS の半減期の長さと一致して、4 mg/kg を投与したマウスでは回復期間後も尿中 GAG 濃度の低値が維持されていた。

細胞質内の空胞変性は、本試験で用いた MPS VII/E540A^{TG} マウスで見られる未分解 GAG のライソゾーム蓄積と関連している。UX003 の投与により、評価したほぼすべての組織で細胞質内の空胞変性が減少したようであった。灌流が豊富な臓器の組織マクロファージ又は内皮細胞など、最も治療が容易な組織では、UX003 の投与を 0.1 mg/kg（試験した最低用量）で開始すると、多くの場合、細胞質内の空胞変性が用量依存的に減少した（図 2.6.2.3.2.1.2）。

図 2.6.2.3.2.1.2：　MPS VII 型マウスモデルで UX003 投与後に認められた高灌流組織におけるライソゾーム内 GAG 蓄積の減少



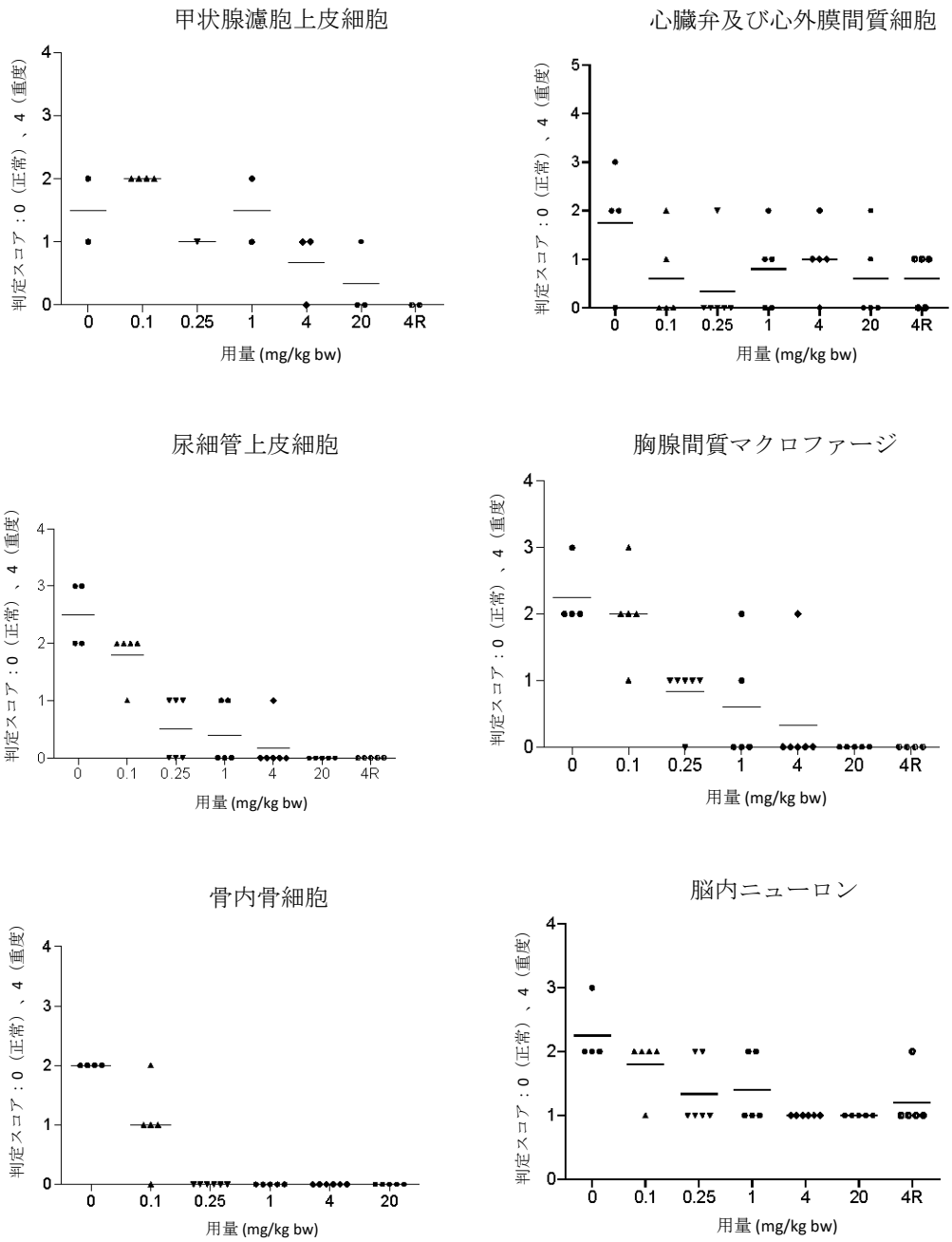
SLC = 類洞内皮細胞

出典：UX003-PC001、付録 6（第 4.2.1.1 項）

灌流度の低い組織（尿細管、結合組織又はニューロン）の場合、ライソゾーム内 GAG 蓄積を減少させるためには UX003 を高用量で投与する必要があったが、病理組織スコアは用量依存的に低下した（図 2.6.2.3.2.1.3）。非投与群の判定スコアは、先行試験の結果ほど高くなかった。概して、MPS VII 型マウスでは、用量が 1 mg/kg を超えると効果が頭打ちになり、4 mg/kg から 20 mg/kg ではほぼ横ばいであった。Vogler の既報によると、驚くべきことに脳内ニューロンで効果が認められており（Vogler et al. 2005）、成熟マウスでも少量の rhGUS が血液脳関門を通過できることが示唆された。

特定の種類の脳組織細胞を除き、組織及び組織成分で認められたほとんどの細胞質内空胞変性は、4 mg/kg の UX003 投与から 1 週間の回復期間後も元の状態に戻っていないようであった。このことは、線維芽細胞における UX003 の半減期の長さと一致しており、MPS VII 型で隔週投与を行うことの根拠となるものである。一方、他の MPS 型では線維芽細胞における UX003 の半減期は 3～5 日と短く、最大の効果を得るには週 1 回の投与が必要であると思われた。

図 2.6.2.3.2.1.3：　MPS VII 型マウスモデルで UX003 投与後に認められた低灌流組織におけるライソゾーム内 GAG 蓄積の用量比例的な減少



出典：UX003-PC001、付録 6（第 4.2.1.1 項）

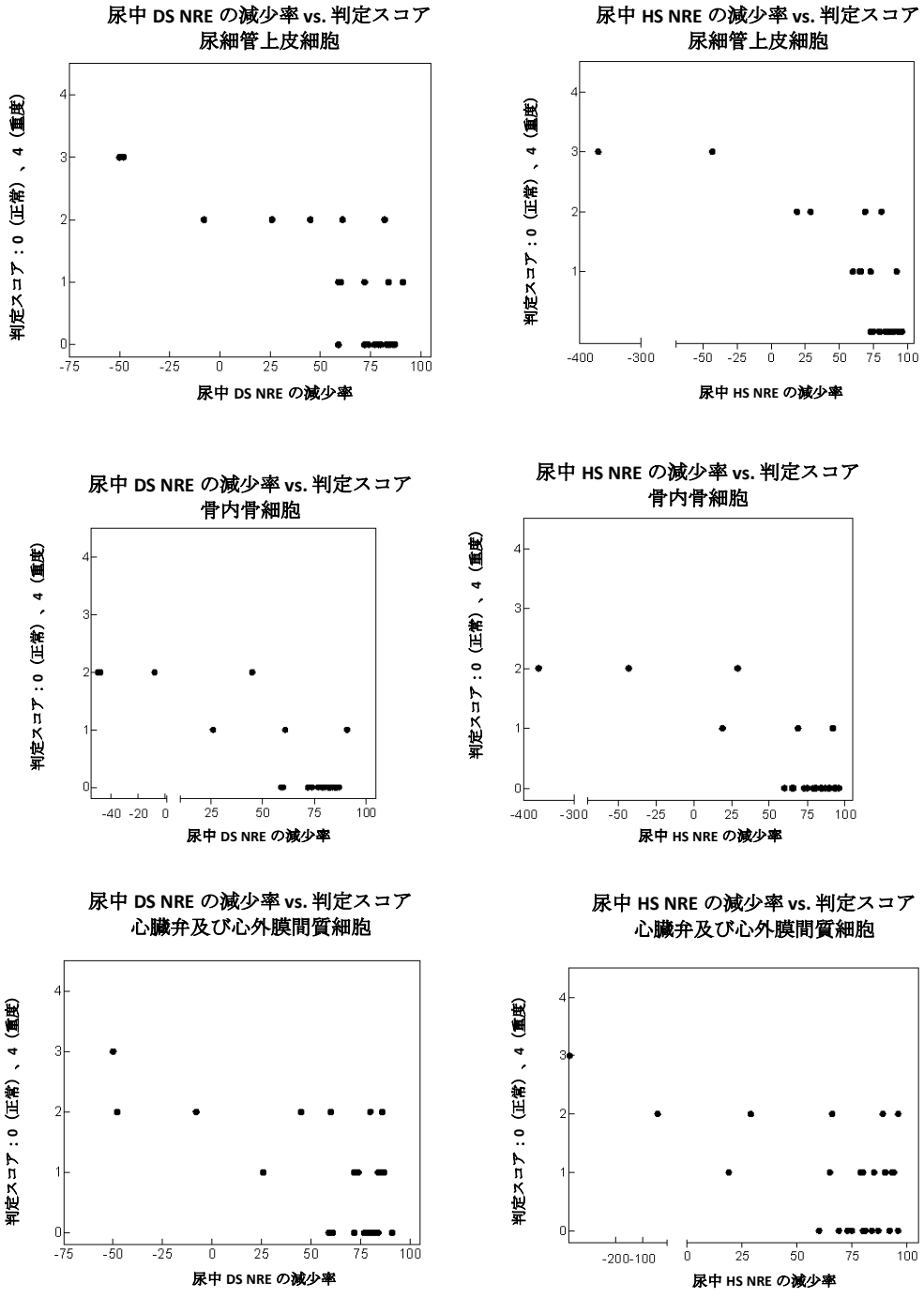
注目すべき点として、本試験で用いた MPS VII 型マウスでは、Vogler の試験（Vogler et al. 2005）の MPS VII 型マウスに比べ、病理学的変化が軽度であった。空胞変性が軽度になるとライソゾーム内 GAG 蓄積の識別が困難になるが、本試験で認められた変性は識別可能な範囲であった。多くの組織で GAG 蓄積及び rhGUS による蓄積量の減少が認められたが、骨及び肝細胞（データ示さず）の 2 つの組織では空胞変性が認められなかった、又はすべての用量で安定した活性値が示された。骨に蓄積が認められず、肝細胞に変化が認められなかった点は、この 2 種類の組織で蓄積及び蓄積量の減少が示された先行試験の結果と矛盾する（Vogler et al. 2005）。病理医がライソゾームと間違える可能性がある腫脹したミトコンドリアが肝細胞で認められたことから、この結果は固定の際のアーチファクトと考えられる。

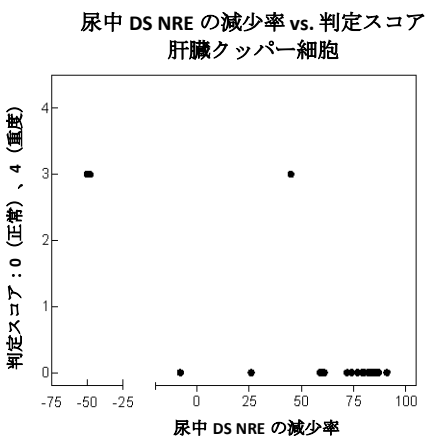
NRE 法で測定した尿中 GAG 排泄量の変化から、ライソゾーム中の病理組織変化をどの程度予測できるかを評価するため、尿中の HS 及び DS の NRE と病理組織スコアを比較した。NRE 法により測定した各動物の尿中 GAG 濃度の低下を、ベースラインからの変化率として算出した。非投与下では多くのマウスで尿中 GAG 濃度（NRE 法）が大幅に増加し、グラフ表示ではマイナスの減少率となった。次に、この尿中 GAG 濃度の変化に対し、各マウスの病理組織スコアをプロットした（図 2.6.2.3.2.1.4）。

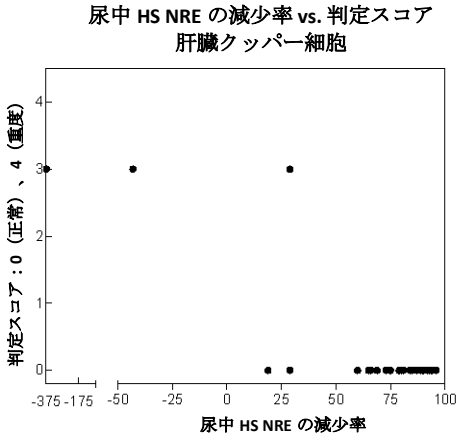
判定スコアは、DS と HS 両方の尿中 GAG 濃度が低下するとスコアも低下するという一貫したパターンが認められた。尿中 GAG 濃度の低下率が低い、又は尿中 GAG 濃度が増加している場合、判定スコアは高かった。最も治療が困難と考えられる尿細管上皮細胞、骨細胞、表層粘液細胞（SLC）、心臓などの組織では、尿中 GAG 濃度（NRE 法）が 50%以上低下した場合のみスコアは 0（正常）と判定された。心臓弁膜などの組織でスコアが 0 となったマウスは多かったが、一部のマウスでは GAG 減少率が 50%を超えても完全に消失することはなかった。肝臓クッパー細胞又は脾臓マクロファージなどの細胞は概して蓄積量が減少しやすく、尿中 GAG 濃度が 50%以上低下した動物のスコアはほぼすべてで 0 となった。

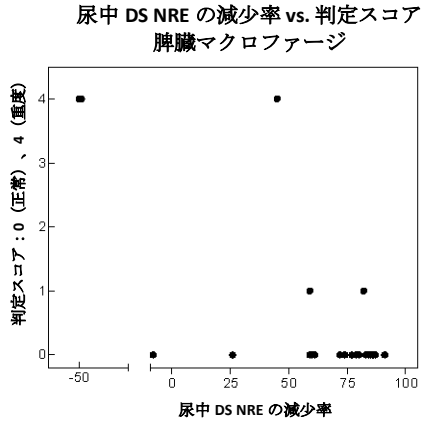
図 2.6.2.3.2.1.4 は尿中 GAG 濃度の低下率と病理組織変化に強い比例関係があることを示しており、特に MPS VII 型患者で障害が認められる最も重要な組織（骨、心臓弁など）でこの関係が顕著であった。最も治療が容易な組織では、尿中 GAG 濃度の低下率が低くても GAG が完全に消失する場合が多かったが、尿中 GAG 濃度のダイナミックレンジは十分に広く、治療がより困難な他の組織について予測値を示すことができた。なお、X 軸が長くなり、尿中 GAG 濃度がマイナスの低下を示しているのは、一部の対照で GAG 濃度が増加したためである。

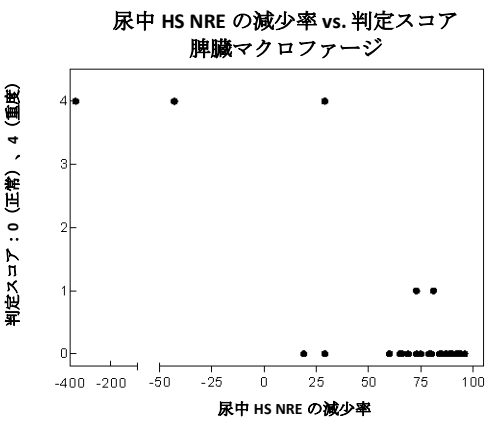
図 2.6.2.3.2.1.4：　各用量で UX003 を投与した MPS VII 型マウスにおける尿中 GAG 濃度（NRE：DS vs. HS）の低下と病理組織スコアの関係

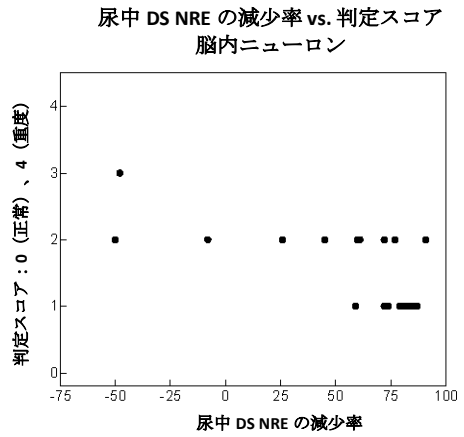


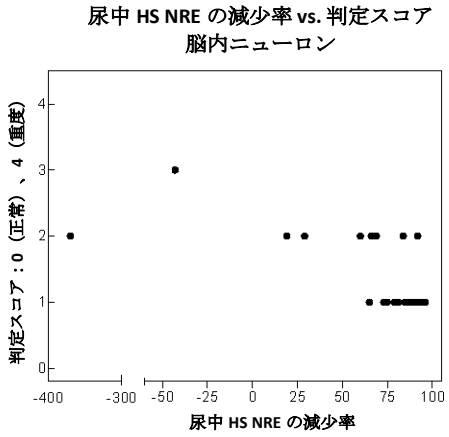












出典：UX003-PC001、付録 9（第 4.2.1.1 項）

結論として、尿中 GAG 濃度（NRE 法）が低下するは、様々な組織の病理が改善と関連し、最も治療が困難な組織においては用量比例的に尿中 GAG 濃度が低下を示した。骨や脳などでは GAG 蓄積の顕著な減少が認められたことから、UX003 が MPS VII 型で見られる様々な重大な症状の治療に有効であることが示唆された。尿中 GAG 濃度は予後と強く相関していることが示されたことから、治療の妥当性の評価及び治療の調整の指針となることが示唆された。また、効果は 4～20 mg/kg の用量（species scaling の調整なし）で横ばいであったことから、申請予定用量である 4 mg/kg 隔週投与の妥当性が裏付けられ、臨床試験 UX003-CL201 における用量漸増範囲及び申請予定用量の設定根拠として妥当である。さらに、1 週間の回復期間後も観察された治療効果は消失しなかったことから、MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞における rhGUS の半減期の長さから考えると、2 週間は酵素作用が持続すると思われた。

これらの結果は、同様の予後予測を示した MPS I型イヌモデルにおいて尿中総 GAG 濃度を検討した拡大試験（Dickson et al. 2008）の結果と一致していた。MPS I型イヌモデルを用いたこの試験では、酵素の送達効率を低下させる抗体が存在すると、尿中 GAG 濃度の低下レベルが低くなり、病理組織変化の改善がより少なくなることも示された。これらのデータから、MPS VII 型患者に対する酵素補充療法の有効性評価に、尿中 GAG 濃度を用いることの妥当性が裏付けられた。

2.6.2.3.2.2　rhGUS による脳及びその他の組織における GUS 活性及びライソゾーム内 GAG 蓄積の減少

（Vogler et al. 2005）

後述の第 2.6.2.3.3 項に要約した各試験では、MPS VII 型マウスに 0 日齢から rmGUS を固定用量で静脈内ボーラス投与すると、疾患の病理学的な所見が減少し、学習、記憶及び聴覚障害をある程度回避できることが示された。しかしながら、脳内ニューロンのライソゾーム内 GAG 蓄積の減少は、rmGUS の投与を 2 週齢以下で開始した動物のみに認められた。投与開始が 2 週齢以降になると、中枢神経系の新皮質及び海馬錐体ニューロンに治療効果は見られなかった。Vogler が実施した試験（Vogler et al. 2005）では、MPS VII 型成熟マウスに以前の試験で用いた用量よりも高い用量でかつ長期間 rhGUS を投与した場合、rhGUS が血液脳関門を通過できるかどうかが検討された。これらの試験では、rhGUS に寛容な MPS VII/E540A^{TG}成熟マウスが使用されたことから、異種タンパク質に対する潜在的な異種間免疫応答が生じることなく長期的な投与が可能であった。

MPS VII 型マウスを 4 つの群に振り分け、rhGUS の静脈内ボーラス投与を週 1 回又は隔週 1 回で最長 13 週間行った。I群（10 例）の動物には 0.3～5 mg/kg を週 1 回 3 週間、第II群（14 例）には 1～4 mg/kg を週 1 回 13 週間、第III群（4 例）には 20 mg/kg 又は 40 mg/kg を隔日で 3 回、第IV群（2 例）には 20 mg/kg を週 1 回で 4 週間投与した。動物はすべて最終投与の 3～7 日後に安楽死させた（Vogler et al. 2005）。MPS VII 型マウスの中枢神経系ライソゾーム内 GAG 蓄積に対するこれらの投与の結果を表 2.6.2.3.2.2.1 に示す。

rhGUS 4 mg/kg を週 1 回 13 週間投与した群では、最終投与から 7 日後の脳の野生型 rhGUS 活性は平均で 1.38%であった。これは酵素欠損の是正に有効と考えられる値である（表 2.6.2.3.2.2.1）。この群では、髄膜並びに頭頂、新皮質及び海馬のニューロン及びグリアにおける GAG 蓄積のクリアランスも認められた。20 mg/kg を週 1 回 4 週間投与した群では、脳の酵素濃度の高値が認められ、野生型 rhGUS 活性は平均 2.5%で、ニューロン、グリア及び髄膜の GAG 蓄積は減少していた。海馬のニューロンでは変化は認められなかった。最大 5 mg/kg を週 1 回 3 週間投与した群の脳の酵素濃度はさらに低く、髄膜の GAG 蓄積の減少は中等度で、新皮質及び海馬のニューロン

では変化は認められなかった。この結果、rhGUS 濃度の増加と脳のライソゾーム内 GAG 蓄積の減少は、投与量と投与期間の両方に相関していることが示された。

表 2.6.2.3.2.2.1：　rhGUS 投与後の中枢神経系におけるライソゾーム内 GAG 蓄積の減少

群	GUS 用量 (mg/kg)	投与回数 (回)	累積投与量 (mg/kg)	投与間隔 (日)	動物数	野生型 GUS 活性 (%)	髄膜及び血管周囲	グリア	頭頂新皮質ニューロン	海馬ニューロン
I	0.3	3	0.9	7	3	0.3	↓	NC	NC	NC
	1	3	3.0	7	2	0.4	↓	NC	NC	NC
	2.5	3	7.5	7	2	0.3	+/-から↓	NC	NC	NC
	5	3	15	7	3	0.7	↓から↓↓	NC から +/-	NC	NC
II	1	13	13	7	4	0.92	↓から↓↓	NC	NC	NC
	2	13	26	7	5	1.21	↓↓から↓↓↓	NC から ↓	NC から↓	NC
	4	13	52	7	5	1.38	↓↓↓	↓↓	↓から↓↓	NC から↓
III	20	3	60	2	2	NA	↓から↓↓	NC	NC	NC
	40	3	120	2	2	NA	↓から↓↓↓	NC	NC	NC
IV	20	4	80	7	2	2.5	↓↓から↓↓↓	↓	↓↓	NC

脳の野生型 GUS 値は 16.7 ± 2 U/mg protein であった。非投与 MPS VII/E540A^{TG}マウスの野生型 rhGUS 活性は 0.37%であった。この値は最終投与から 1 週間後の値である。+/-：蓄積のごく軽度の減少／限局的な場合もある、↓：細胞質内空胞変性の軽度減少、↓↓：細胞質内空胞変性の中等度減少、↓↓↓：細胞質内空胞変性の顕著な減少／本質的に正常、NC：蓄積に変化なし、NA：該当なし。

出典：Vogler et al.2005, 表 2

最終投与から 1 週間後に測定した他の様々な臓器の酵素値から、各群で用量依存的な GUS 活性の増加が認められた（表 2.6.2.3.2.2.2）。

表 2.6.2.3.2.2.2：　rhGUS 投与後の組織中 GUS 活性

群	用量 (mg/kg)	投与回数 (回)	肝臓	脾臓	心臓	腎臓	骨	骨髄	筋肉	眼
I	0	3	0.35 ± 0.08	0.41 ± 0.36	0.053 ± 0.030	0.04 ± 0.02	0.39 ± 0.05	-	-	0.019 ± 0.004
			0.2	*0.1*	*0.25*	*0.03*	*0.39*	-	-	*0.39*
	0.3	3	13.29 ± 4.15	1.63 ± 0.61	0.36 ± 0.12	0.39 ± 0.15	1.27 ± 0.03	-	-	0.074 ± 0.027
			7.2	*0.5*	*1.72*	*0.36*	*7.27*	-	-	*1.5*
	1.0	2	41.88 ± 14.76	4.49 ± 1.63	0.83 ± 0.05	0.64 ± 0.1	3.57 ± 0.56	-	-	0.126 ± 0.025
			22.6	*7.5*	*4.0*	*0.6*	*3.6*	-	-	*2.6*
	2.5	2	96.02 ± 5.44	44.38 ± 24.5	2.16 ± 0.09	3.18 ± 1.18	11.78 ± 0.03	-	-	0.166 ± 0.049
			51.9	*74.7*	*10.4*	*2.9*	*11.8*	-	-	*3.4*
	5.0	3	211.8 ± 121	63.83 ± 22.3	3.36 ± 1.29	5.47 ± 2.98	8.66 ± 4.75	-	-	0.231 ± 0.024
			114	*21.2*	*16.2*	*5.1*	*8.7*	-	-	*4.7*
II	0		0.31 ± 0.02	0.096 ± .016	0.023 ± 0.023	0.06 ± 0.01	-	0.044 ± 0.024	0.024 ± .010	0.056 ± .023
			0.17	*0.03*	*0.1*	*0.06*	-	*0.03*	*0.48*	*1.1*
	1	4	65.1 ± 28.4	19.0 ± 9.7	1.10 ± 0.35	1.71 ± 1.07	-	6.30 ± 2.84	0.64 ± 0.38	0.19 ± .006
			35.2	*6.3*	*5.3*	*1.58*	-	*3.91*	*12.9*	*3.9*
	2	5	108 ± 25.9	132 ± 105	1.78 ± 0.70	3.69 ± 1.14	-	14.34 ± 9.62	0.81 ± 0.43	0.28 ± .08
			58.4	*43.9*	*8.6*	*3.42*	-	*8.9*	*16.4*	*5.7*
	4	5	230 ± 31.3	113 ± 52	4.18 ± 2.09	7.83 ± 1.13	-	46.44 ± 20.51	2.04 ± 1.56	0.60 ± .23
			124	*37.5*	*20.1*	*7.25*	-	*28.8*	*41.2*	*12.3*
IV	20	2	975 ± 442	374 ± 38	11.5 ± 1	20 ± 1.9	-	173 ± 25	2.95 ± 1.16	1.26 ± 0.39
			527	*124*	*55.3*	*18.5*	-	*107*	*60.0*	*25.8*
WtB6	-	4	185 ± 11.9	301 ± 26.6	20.8 ± 12.5	108 ± 7.5	100 ± 18	161 ± 35	4.95 ± 1.80	4.88 ± 0.68

データは平均値± SD で示す。野生型（Wt）GUS 活性の比率は斜体で示した。-：該当なし

出典：Vogler et al.2005, 表 3

rhGUS 4 mg/kg を週 1 回 13 週間投与した群では、肝臓、腎臓及び尿でも GAG 値の用量依存的な減少が認められた（表 2.6.2.3.2.2.3）。

表 2.6.2.3.2.2.3：　rhGUS（1、2 及び 4 mg/kg）投与から 13 週間後の組織中及び尿中 GAG 濃度

用量 (mg/kg)	肝臓		腎臓		尿	
	µg GAG/mg total protein*	減少率 (%)	µg GAG/mg total protein*	減少率 (%)	µg GAG/mg creatinine*	減少率 (%)
0	13.12 ± 1.50	NA	17.04 ± 4.41	NA	1178 ± 118	NA
1	5.69 ± 0.79	57	12.11 ± 3.64	29	885 ± 356	25
2	5.21 ± 1.18	60	9.24 ± 3.85	46	641 ± 178	46
4	4.33 ± 1.25	67	8.76 ± 3.08	49	816 ± 31	31

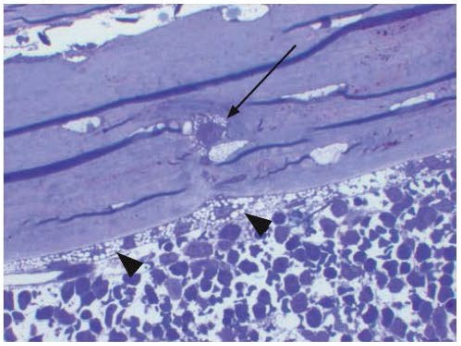
NA：該当なし、* ± SD

出典：Vogler et al. 2005、表 4

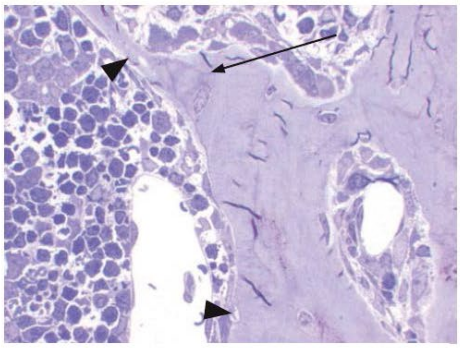
本試験で使用した病理スライドは、Ultragenyx が入手し、[redacted] による盲検下評価に供した（[redacted] 20022037-1 及び 20022037-2）。

盲検下での病理評価の全体的な結果として、rhGUS の投与により、ほとんどの組織でライソゾーム内 GAG 蓄積が広範かつ用量依存的に減少することが示された。肝臓では、rhGUS の投与により、クッパー細胞及び胆管上皮細胞における細胞質内空胞の平均スコアが大幅に減少し、最低用量（1 mg/kg）で減少が最大となった。脾臓では、マクロファージ（赤脾髄類洞内の網内系細胞を含む）、リンパ球様細胞、血管及び固有平滑筋線維並びに内皮細胞で細胞質内空胞の減少が認められた。投与群（4 mg/kg）では、非投与群に比べ、血管の平滑筋線維及び内皮細胞におけるライソゾーム内 GAG 蓄積の減少が認められた。心臓では、rhGUS の投与により、心筋細胞の細胞質内空胞に明らかな減少は認められなかったものの、大動脈平滑筋細胞、弁及び心外膜間質細胞、並びに血管の平滑筋線維及び内皮細胞では細胞質内空胞の減少が認められ、マクロファージでは大幅に減少していた。眼では、網膜の神経節細胞層及び内外網状層、角膜内皮細胞、角膜実質細胞、視神経のシュワン細胞並びに角膜において、rhGUS の投与による細胞質内空胞の明らかな減少は認められなかった。しかしながら、強膜間質細胞、網膜色素上皮細胞、血管平滑筋線維及び内皮細胞では、rhGUS の投与により細胞質内空胞の減少が見られた。各器官の切片を光学顕微鏡で観察し、細胞質内空胞変性の観点からライソゾーム内の GAG 蓄積について評価した。主な画像を以下に示す（図 2.6.2.3.2.2.1）。さらに、盲検下で再評価した病理組織スコアと用量との相関を以下のグラフに示す（図 2.6.2.3.2.2.2）。

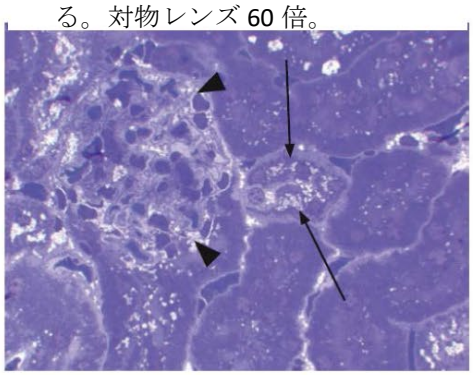
図 2.6.2.3.2.2.1：　MPS VII 型マウスにおける rhGUS 投与後の病理組織の改善



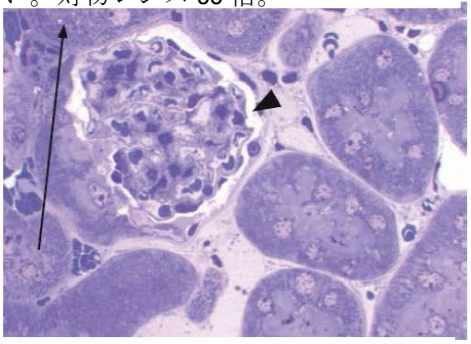
動物 2050（0 mg/kg）。骨（肋骨）。骨細胞（矢印）及び類洞内皮細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



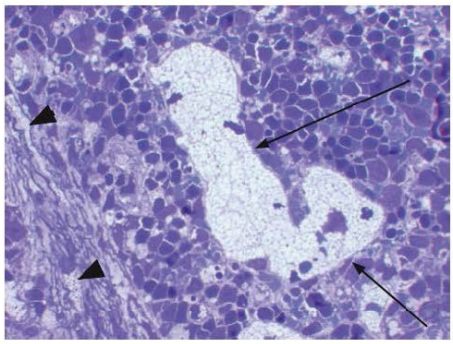
動物 2067（4 mg/kg）。骨（肋骨）。骨細胞（矢印）に細胞質内空胞を認めるが、類洞内皮細胞（矢頭）には認めない。対物レンズ 60 倍。



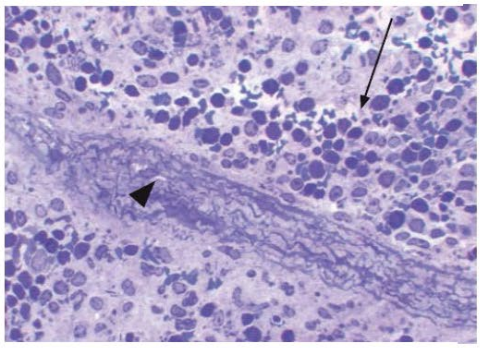
動物 2050（0 mg/kg）。腎臓。尿細管上皮細胞（矢印）及び壁側上皮細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



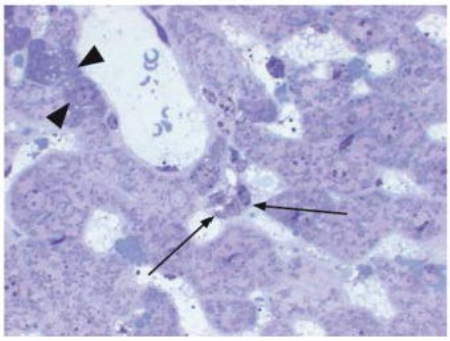
動物 2064（4 mg/kg）。腎臓。尿細管上皮細胞（矢印）及び壁側皮細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



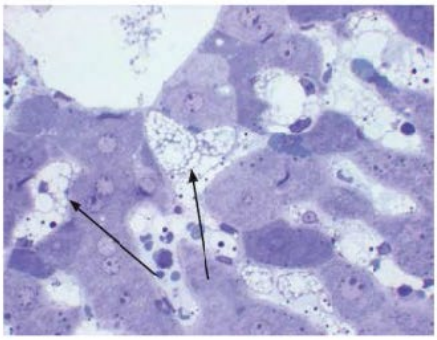
動物 2053（0 mg/kg）。脾臓。マクロファージ（網内系細胞）（矢印）及び固有平滑筋細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



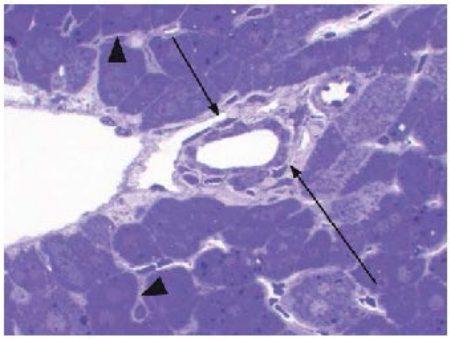
動物 2064（4 mg/kg）。脾臓。マクロファージ（網内系細胞）（矢印）及び固有平滑筋細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



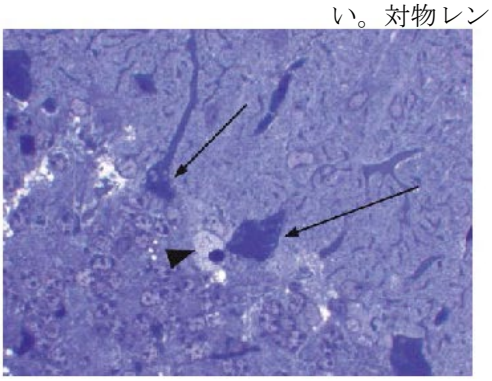
動物 2053（0 mg/kg）。肝臓。胆管上皮細胞（矢印）及び肝細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



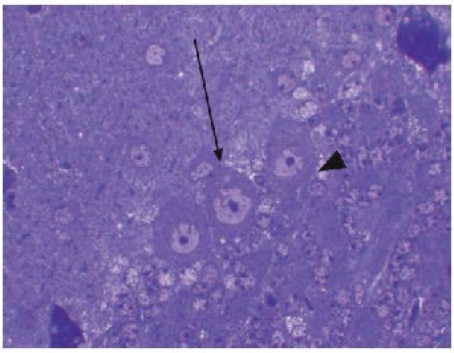
動物 2053（0 mg/kg）。肝臓。クッパー細胞（矢印）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



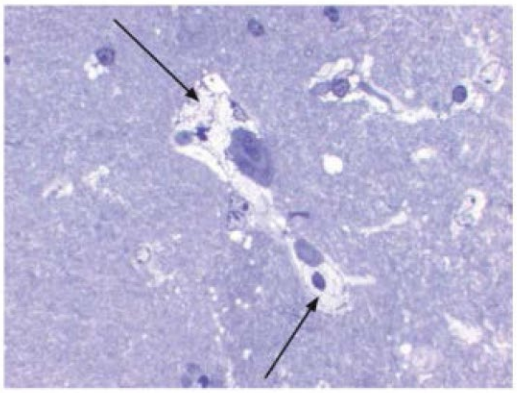
動物 2066（4 mg/kg）。肝臓。胆管上皮細胞（矢印）及びクッパー細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認めない。対物レンズ 60 倍。



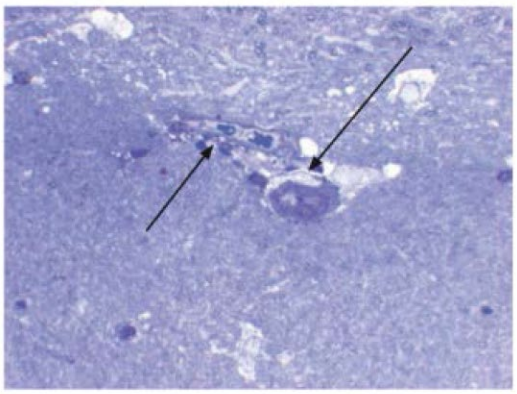
動物 2053（0 mg/kg）。脳（小脳）。ニューロン（プルキンエ細胞）（矢印）及び血管周囲細胞（矢頭）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



動物 2064（4 mg/kg）。脳（小脳）。血管周囲細胞（矢印）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。



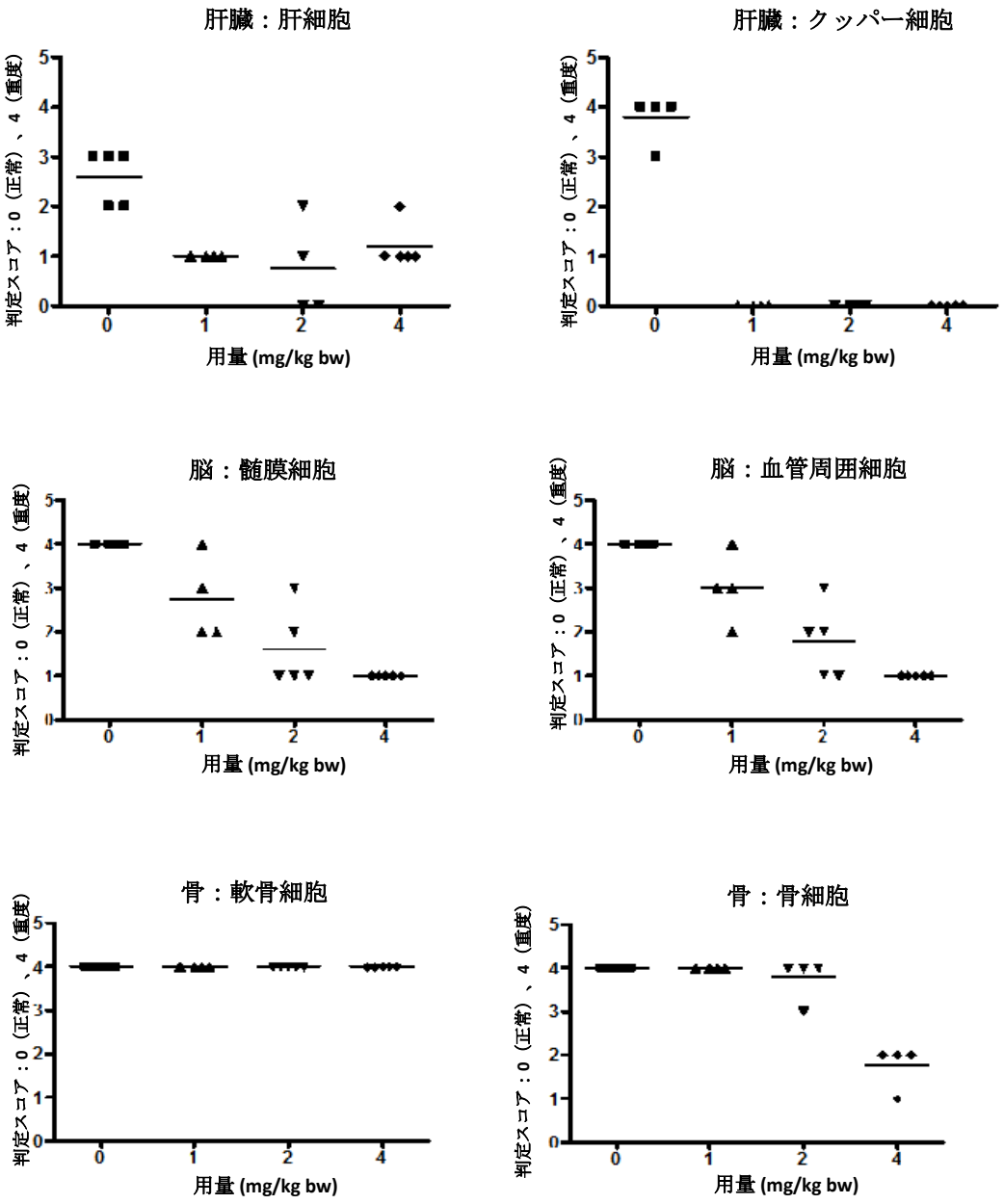
動物 2053（0 mg/kg）。脳（小脳）。血管周囲細胞（矢印）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。

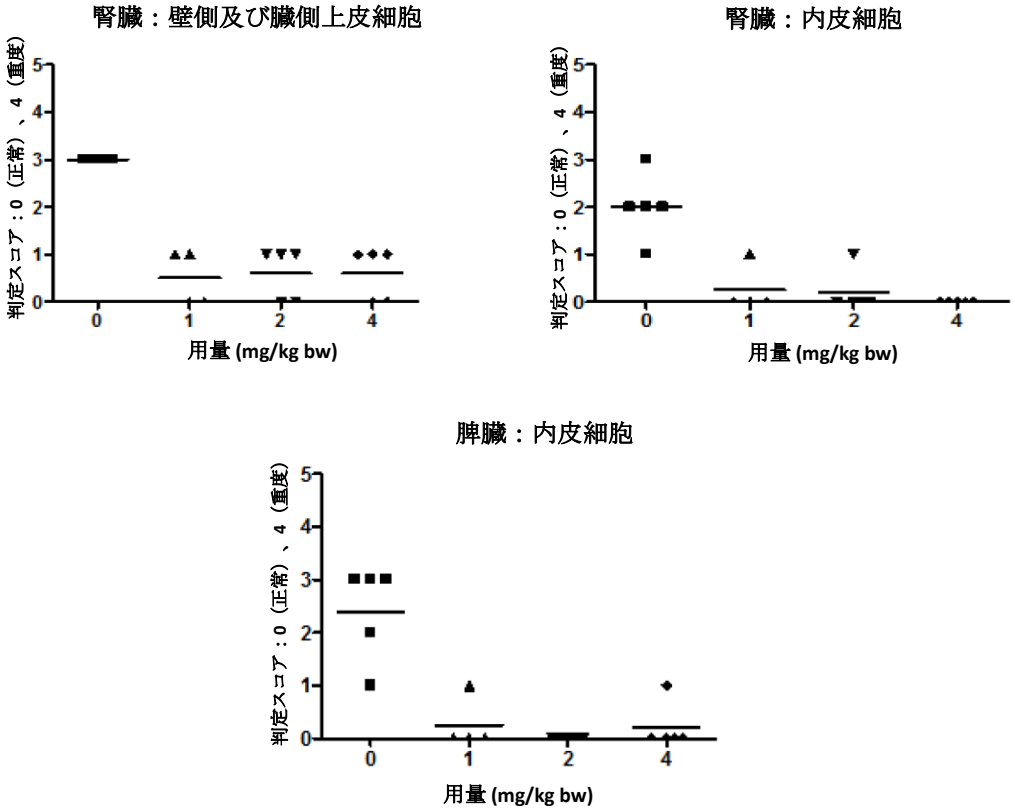


動物 2064（4 mg/kg）。脳（小脳）。血管周囲細胞（矢印）に細胞質内空胞を認める。対物レンズ 60 倍。

出典：20022037-2 試験、付録 1

図 2.6.2.3.2.2.2：　免疫寛容 MPS VII 型マウスに rhGUS を 13 週間投与後の病理組織スコアと用量との相関





出典：Vogler et al. 2005 並びに [redacted] 参照番号 20022037-1 及び 20022037-2 で収集されたデータを基に作成

まとめると、本試験の結果から、MPS VII/E540A^{TG}成熟マウスに rhGUS を十分な高用量で十分な期間投与すると、rhGUS は様々な組織に送達され、血液脳関門を通過し、それに応じて脳のライソゾーム内 GAG 蓄積が減少することが示された。脳内の GUS 濃度が高いほど中枢神経系の GAG 蓄積のクリアランスが高かった。概して、rhGUS 濃度の増加とそれに伴うライソゾーム内 GAG 蓄積の減少は、rhGUS の投与量と投与期間の両方に相関していることが示された。

上記の結果から、著しい神経学的損傷を来す前に MPS VII 型患者に rhGUS を投与すれば、神経認知機能に有益な効果がある可能性が裏付けられた。また、MPS I型イヌモデルを用いた研究（Dickson et al. 2008）を踏まえると、高用量（4 mg/kg）かつ長期の投与は、酵素の血液脳関門輸送に影響を及ぼすと考えられる。

2.6.2.3.3　MPS VII 型マウスモデルを用いた rmGUS 試験

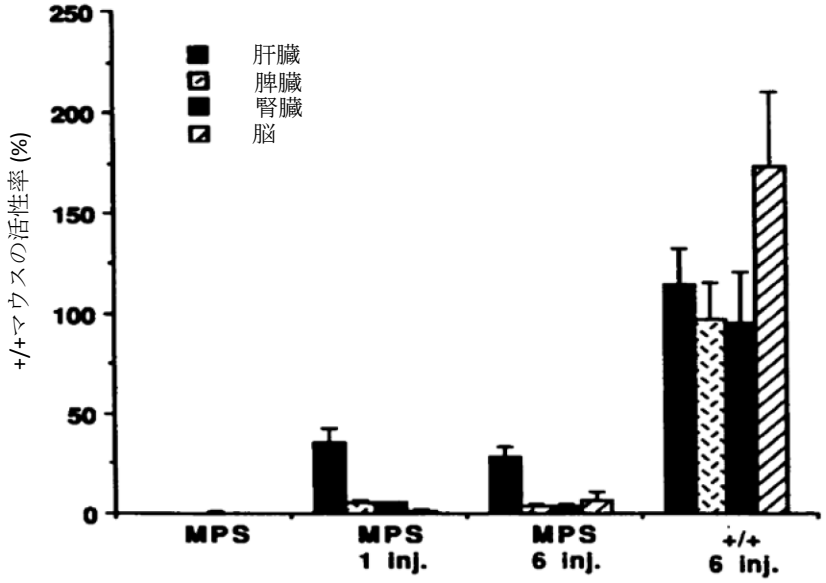
2.6.2.3.3.1　様々な組織への rmGUS の分布及びライソゾーム内 GAG 蓄積の減少

(Sands et al. 1994)

rmGUS（28,000 U、7 µg）を MPS VII 型マウス（5 例）に 0 日齢から週 1 回 6 週間静脈内投与、又は 5 週齢時に単回静脈内投与した（Sands et al. 1994）。対照として、MPS VII 型マウス 2 例（rmGUS 非投与群）に希釈緩衝液の静脈内投与を週 1 回 6 週間行い、正常ホモ接合性マウス 2 例に rmGUS 投与群と同様の方法で投与を行った。単回投与から 1 週間後及び週 1 回投与の 6 回目の投与から 1 週間後に、肝臓、脾臓、腎臓及び脳で rmGUS 活性が検出された（図 2.6.2.3.3.1.1）。

週 1 回投与の 6 回目の投与後の組織中の rmGUS 活性値は、正常マウスの 28%（肝臓）、3～5%（脾臓）、3～5%（腎臓）及び 7%（脳）であった。単回投与後の組織中活性値は、正常マウスの 35%（肝臓）、3～5%（脾臓）、3～5%（腎臓）及び 1%（脳）であった。対照の MPS VII 型マウスの GUS 活性値は検出下限未満で、正常マウスの組織でも、脳を除き、検出可能な活性の増加は認められなかった。本試験の結果、4 つの組織における GUS 活性は、0 日齢から 6 回の週 1 回投与を行った場合と、5 週齢時に単回投与した場合とで同様であったが、注目すべき例外として、0 日齢から 6 回の週 1 回投与を行ったマウスの脳の GUS 活性値は、5 週齢時に単回投与したマウスの 7 倍であった。

図 2.6.2.3.3.1.1：　rmGUS 投与 MPS VII 型マウスと非投与 MPS VII 型マウスの組織中 GUS 活性の平均値

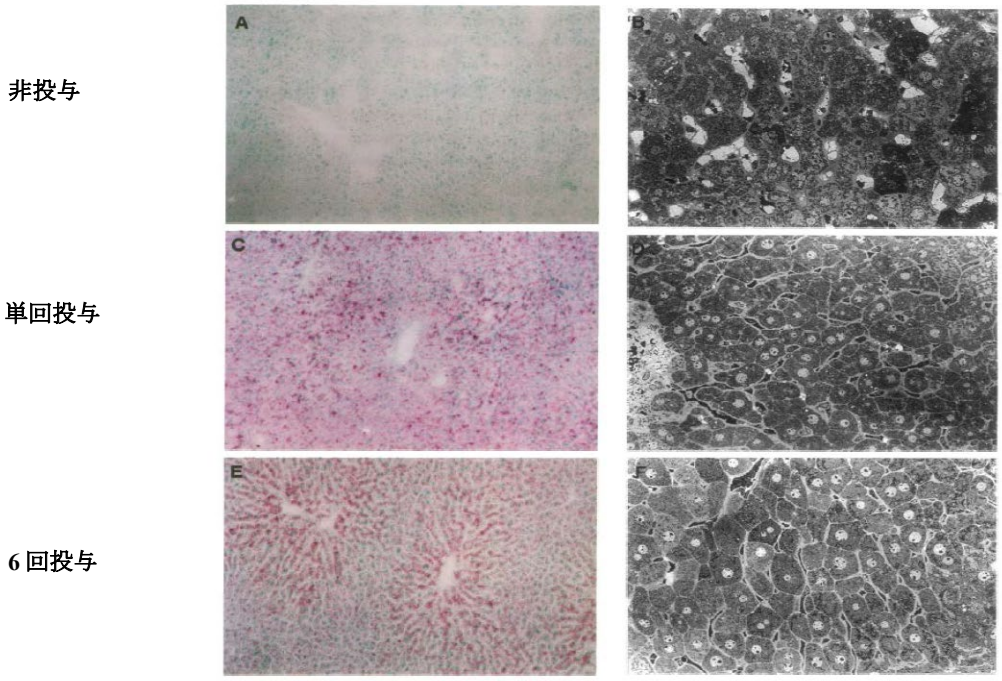


単回投与（MPS、1 inj.）又は 6 回投与（MPS、6 inj.）から 1 週間後の肝臓、脾臓、腎臓及び脳における GUS 活性値を+/+マウスの正常値に対する比率として示す。値は各群 5 例の GUS 活性の平均値である。エラーバーは ± SD を示す。

出典：Sands et al.1994、図 1

上記と同じマウスを用いて rmGUS 分布の顕微鏡的な観察及びライソゾーム内 GAG 蓄積に対する効果について検討した。非投与の成熟 MPS VII 型マウスの肝臓では組織化学的な GUS の検出は認められず（図 2.6.2.3.3.1.2 A）、クッパー細胞及び肝細胞の細胞質では多くのライソゾームが膨張していた（図 2.6.2.3.3.1.2 B）。単回投与から 1 週間後に、変異マウスの肝臓で GUS が組織化学的に検出された（図 2.6.2.3.3.1.2 C）。クッパー細胞は肝細胞に比べ強く染色されており、肝臓全体に均一に分布していた。単回投与例では、肝細胞とクッパー細胞の両方でライソゾームの膨張が顕著に減少していた、又は消失していた（図 2.6.2.3.3.1.2 D）。週 1 回投与を 6 回行ったマウスと、5 週齢時に単回投与したマウスでは肝臓の GUS の分布像が異なっていた。週 1 回投与を 6 回行ったマウスでは、クッパー細胞に比べ肝細胞で GUS が広く分布しており、肝小葉では GUS が帯状に認められ、末梢部に比べ中央部で多く分布していた（図 2.6.2.3.3.1.2 E）。この群のマウスの洞内皮細胞では、ライソゾームの膨張が顕著に減少していた（図 2.6.2.3.3.1.2 F）。

図 2.6.2.3.3.1.2：　肝臓における GUS 活性の分布及び LSD に対する rmGUS の効果



（A）MPS VII 型マウスの肝臓では組織化学染色による GUS 活性を認めない。（B）非投与変異マウスでは洞内皮細胞に顕著な空胞変性を認める。（C）rmGUS 28,000 U 単回投与後の変異マウスの肝臓では帯状ではなく均一に分散した GUS 活性を認める。（D）洞内皮細胞では、rmGUS の単回投与後でもライソゾームの膨張が顕著に減少している。（E）週 1 回投与を 6 回行った群では、クッパー細胞及び肝細胞で GUS 活性を認め、肝小葉では GUS は帯状に分布しており、末梢部よりも中央部で活性が高い。(F) 週 1 回投与を 6 回行った群では、洞内皮細胞のライソゾームの膨張が顕著に減少している。（A、C 及び E）ナフトール-AS-BI-β-グルクロニダーゼ、62.5 倍；（B、D 及び F）トルイジンブルー、242 倍

出典：Sands et al. 1994、図 3

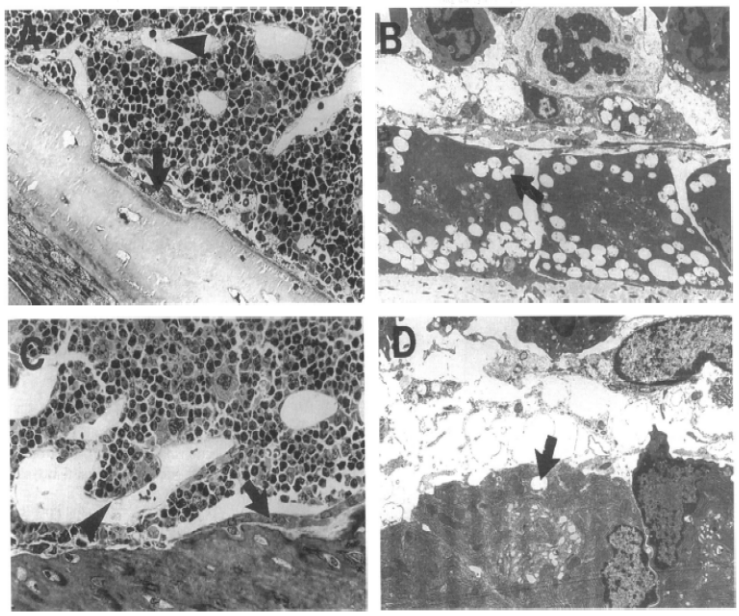
rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、単回投与でも反復投与でも脾臓のライソゾーム内 GAG 蓄積の顕著なクリアランスが認められた（データ示さず）。rmGUS を反復投与したマウスでは、心臓及び腎臓の間質細胞、糸球体臓側上皮細胞、並びに網膜色素上皮細胞におけるライソゾーム内 GAG 蓄積が、非投与 MPS VII 型マウスに比べ減少していた（データ示さず）。しかしながら、感度の低い組織化学分析（酵素開裂後に発色基質を使用）では、6 回投与後でも心臓及び腎臓の GUS 活性は検出されなかった。角膜間質線維芽細胞及び大動脈中膜細胞では、週 1 回 6 回投与後でも依然としてライソゾーム内に GAG が認められた。

反復投与後では、顕微鏡（図 2.6.2.3.3.1.3）及び X 線画像（図 2.6.2.3.3.1.4）で骨に部分的な改善が認められた。非投与マウスでは、骨の内部の骨芽細胞に細胞質内空胞が顕著に認められ（図 2.6.2.3.3.1.3A）、洞内皮細胞にはライソゾーム膨張が多く認められた（図 2.6.2.3.3.1.3 B）。rmGUS 投与を週 1 回 6 回行ったマウスでは、骨芽細胞及び洞内皮細胞におけるライソゾーム膨張が少なかった（それぞれ図 2.6.2.3.3.1.3 C 及び図 2.6.2.3.3.1.3 D）。

図 2.6.2.3.3.1.3：　6 週間の rmGUS 投与後の骨芽細胞における LSD の減少

非投与

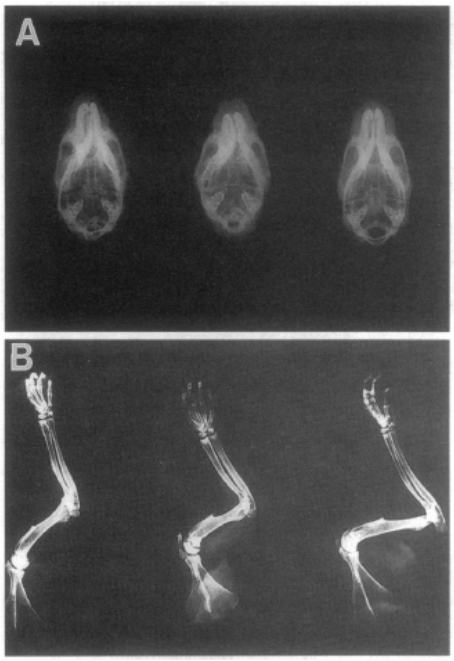
6 回投与



（A 及び B）変異マウスの皮質骨内の骨芽細胞（矢印）に細胞質内空胞を多く認める。洞内皮細胞（矢頭）にも多くのライソゾームの膨張を認める。（C 及び D）6 回の rmGUS 投与後では、骨芽細胞（矢印）に小さな細胞質内空胞をごく少数認めるのみで、洞内皮細胞（矢頭）にライソゾームの膨張は認めない。（A 及び C）トルイジンブルー、242 倍；（B）酢酸ウラニル、クエン酸鉛、2680 倍；（D）酢酸ウラニル、クエン酸鉛、3484 倍

出典：Sands et al. 1994、 図 4

図 2.6.2.3.3.1.4：　rmGUS 投与後の X 線画像所見の改善



（A）rmGUS 投与 MPS VII 型マウス（左）、非投与 MPS VII 型マウス（中央）及び正常マウス（右）の頭蓋骨。（B）rmGUS 投与 MPS VII 型マウス（左）、非投与 MPS VII 型マウス（中央）及び正常マウス（右）の上腕骨及び橈骨・尺骨

出典：Sands et al. 1994、 図 5

rmGUS の静脈内ボーラス投与を 0 日齢から週 1 回で 6 週間行った場合、上衣、軟髄膜、血管周囲細胞及び特定のニューロン群でライソゾーム内 GAG 蓄積の減少が認められた（データ示さず）。しかしながら、プルキンエ細胞及びグリア細胞には依然としてライソゾーム内に GAG 蓄積が認められ、対照とした rmGUS 非投与の MPS VII 型マウスで認められた所見と区別がつかないほどであった（データ示さず）。5 週齢時に rmGUS の単回投与を行ったマウスでは、投与のタイミングが CIM6PR 発現のダウンレギュレーション（血液脳関門経由の取り込みが減少する）後であったため、中枢神経系におけるすべてのニューロン群でライソゾーム内 GAG 蓄積の減少は認められなかった。この生物学的現象はのちに Vogler によって確認され、高用量かつ長期投与であれば 5 週齢以降に投与を開始しても MPS VII 型の脳ライソゾーム内蓄積に有効であることが示された（Vogler et al. 2005）。

一般状態の変化として、0 日齢から週 1 回の rmGUS 投与を 6 回行った MPS VII 型マウスの体重はほぼ正常で、顔面異形が減少しており、6 週齢の正常マウスとの区別が困難であった。しかしながら、5 週齢時に単回投与を行ったマウスの 1 週間後の表現型は同週齢の非投与 MPS VII 型マウスと同一であった。rmGUS による早期の ERT は、骨格系などの多くの治療が困難な組織に対しても十分な治療効果を示した。

2.6.2.3.3.2　rmGUS による生存期間の延長及び発育の改善

（Vogler et al. 1996）

MPS VII 型（gus^{mps}/gus^{mps}）マウスに rmGUS を 0 日齢から 6 週間投与すると、生存期間が延長し、発育が改善することが明らかになっている。rmGUS（28,000 U、7 μg）を MPS VII 型マウス（14

例）に 0 日齢から週 1 回 6 週間静脈内ボーラス投与した（Vogler et al. 1996）。対照として、rmGUS 非投与のマウス 4 例を設定した。rmGUS を週 1 回 6 週間静脈内ボーラス投与した結果、固定組織のマクロファージ系で少なくとも 14 日間 GUS 活性が認められた（表 2.6.2.3.3.2.1）。

表 2.6.2.3.3.2.1：　0 日齢から rmGUS を投与後の GUS 活性の消失並びに β-ヘキソサミニダーゼ及び α-ガラクトシダーゼの二次的上昇（正常値に対する比率の平均として表示）

酵素	rmGUS の最終投与からの日数					非投与マウス
	7*	14	85	150	365	
β-グルクロニダーゼ						
肝臓	27.8	3.8	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
脾臓	3.5	0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
腎臓	3.3	NT†	NT	NT	<0.1	<0.1
脳	6.7	NT	NT	NT	<0.1	<0.1
β-ヘキソサミニダーゼ						
肝臓	103	548	1429	2472	2948	2404
脾臓	155	75	281	181	154	204
腎臓	184	NT	NT	NT	637	395
脳	386	NT	NT	NT	259	226
α-ガラクトシダーゼ						
肝臓	150	146	454	634	809	533
脾臓	153	69	207	152	167	156
腎臓	148	NT	NT	NT	854	771
脳	219	NT	NT	NT	240	233

* 同じ方法で投与を行った先行試験の試験群のデータ（8）。

† NT：未実施

PEDIATRIC RESEARCH

出典：Vogler et al. 1996

GUS 活性の経時的な消失並びに α-ガラクトシダーゼ及び β-ヘキソサミニダーゼの代償性のリバウンド上昇（表 2.6.2.3.3.2.1）と、固定組織におけるマクロファージ系のライソゾーム内 GAG 蓄積の形成は相関していた。MPS VII 型マウスでは、ライソゾーム内に GAG が蓄積すると、α-ガラクトシダーゼやβ-ヘキソサミニダーゼなどの他のライソゾーム酵素のアップレギュレーションが代償的に誘導されるが、これらのライソゾーム酵素は ERT により減少する（Sands et al. 1994）。

rmGUS の最終投与から 29 日後における骨のライソゾーム内 GAG 蓄積は、非投与群と同様であった。最終投与から 85 日後では、固定組織のマクロファージ系、髄膜及び脳のグリアでも、非投与群と同程度の蓄積が認められた。rmGUS の投与から 1 年後では、蓄積の減少がわずかに確認できた皮質ニューロンを除き、すべての部位で非投与群と同程度の蓄積が認められた（表 2.6.2.3.3.2.2）。

表 2.6.2.3.3.2.2：　rmGUS 投与後のライソゾーム内 GAG 蓄積の減少（同週齢の非投与 MPS VII 型マウスとの比較）

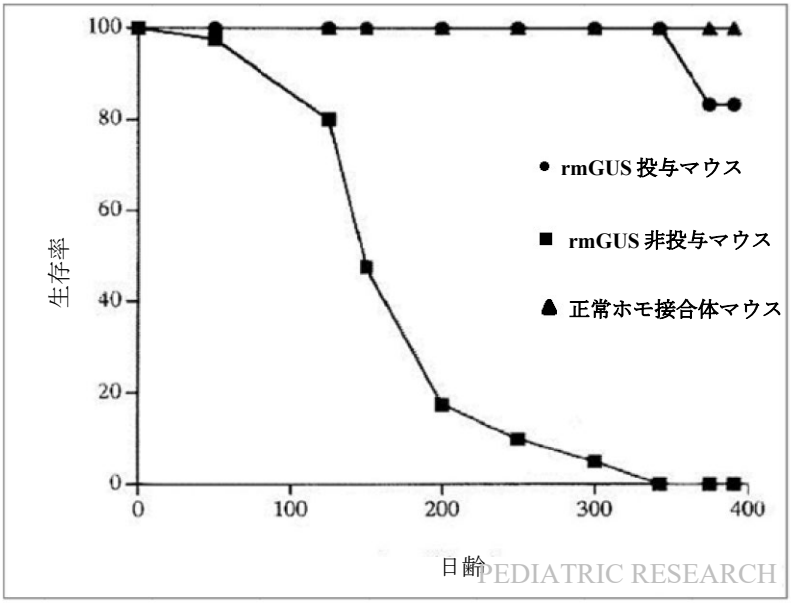
	rmGUS の最終投与からの日数				
臓器	14	29	85	150	365
脾臓					
洞内皮細胞	↓↓↓	↓↓↓	NC	NC	NC
肝臓					
洞内皮細胞	↓↓	↓↓	NC	NC	NC
骨					
骨芽細胞	↓	NC	NC	NC	NC
骨細胞	↓	NC	NC	NC	NC
骨髄洞内皮細胞	↓	NC	NC	NC	NC
骨髄細胞	↓↓↓	↓↓↓	NC	NC	NC
脳					
髄膜	↓↓↓	↓↓↓	NC	NC	NC
皮質ニューロン	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
海馬ニューロン	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
プルキンエ細胞	NC	NC	NC	NC	NC
グリア	↓↓	↓↓	NC	NC	NC

*↓↓↓：正常マウスと区別できないほどのライソゾーム内 GAG 蓄積の顕著な減少、↓↓：同週齢の MPS VII 型マウスとの比較で中等度の減少、↓：同週齢の MPS VII 型マウスとの比較で軽度の減少。群内のすべての動物で認められていない場合もある、NC：変化なし。同週齢の非投与 MPS VII 型マウスと同程度の蓄積が認められる

出典：Vogler et al. 1996

マウスに rmGUS を 6 週間投与後、365 日間観察した結果、非投与 MPS VII 型マウスに比べ、生存期間が延長し、体が大きく、顔面及び骨格の変形が軽度であった。非投与 MPS VII 型マウスは通常 5～7 ヵ月齢で死亡するが、rmGUS を 6 週間投与したマウスは最終投与から 1 年後（実験 391 日）に殺処分した（図 2.6.2.3.3.2.1）。正常ホモ接合体マウスの生存期間は通常 1 年を超える。

図 2.6.2.3.3.2.1：　非投与 MPS VII 型及び野生型マウスと比較した rmGUS 投与後の生存期間の延長



出典：Vogler et al. 1996

長期生存例は、表現型の点では依然として MPS VII 型マウスとして区別できたが、外見に顕著な改善が見られ、より意識清明で、歩行及び被毛がより正常であった。投与中止から 1 年後の体重は正常マウスの 93.2%で、骨長は正常マウスの 91.5%であった。一方、非投与 MPS VII 型成熟マウス（最高 218 日齢）の体重は正常マウスの 1.2%で、骨長は正常マウスの 85.2%であった。rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、非投与 MPS VII 型マウスに比べ、体重と骨長のいずれにも顕著な改善が認められた（体重：$p < 0.01$、骨長：$p < 0.025$）。

最終投与から 29 日後には、骨のライソゾーム内 GAG 蓄積が非投与マウスと同程度認められたが、短期の rmGUS 投与により骨の発育が顕著に改善し、形態学的な異常所見（異形成）は 1 年時点で減少していた。このことは、発育速度の速い骨格における GAG 分解を改善するには新生児期に投与を開始して骨の GUS 濃度を高めることが重要であり、また、早期の GUS 投与は長期にわたり骨の発育に効果的であることが示唆された（Vogler et al. 1996）。

2.6.2.3.3.3　rmGUS による表現型、行動及び聴覚機能の改善

（O'Connor et al.1998)

MPS VII 型（gus^{mps}/gus^{mps}）マウスに rmGUS を 0 日齢から 6 週間投与した結果、表現型の重症度の改善、脳及び耳における病理組織の改善、聴覚障害の大幅に改善が認められ、空間見当識学習検査の結果も非投与マウスに比べ大幅に改善した。

rmGUS（28,000 U、7 µg）を MPS VII 型マウス（12 例）及び正常マウス（11 例）に 0 日齢から週 1 回 6 週間静脈内ボーラス投与、又は緩衝液を MPS VII 型マウス（10 例）及び正常マウス（10 例）0 日齢から週 1 回 6 週間静脈内ボーラス投与した。動物はすべて 12 週齢で殺処分した（O'Connor et al. 1998）。

rmGUS を 6 週間投与後のマウスでは、MPS VII 型の表現型（低身長症及び顔側貌の扁平化を特徴とする）が正常マウスと同程度であった。また、rmGUS 非投与 MPS VII 型マウスに比べ、体が

大きく、骨長が長く、顔面異形が軽度であった。試験終了時（マウスは約 12 週齢）でも、より正常な表現型が依然として認められた（図 2.6.2.3.3.3.1）。

図 2.6.2.3.3.3.1：　rhGUS 投与 MPS VII 型マウスの表現型の改善

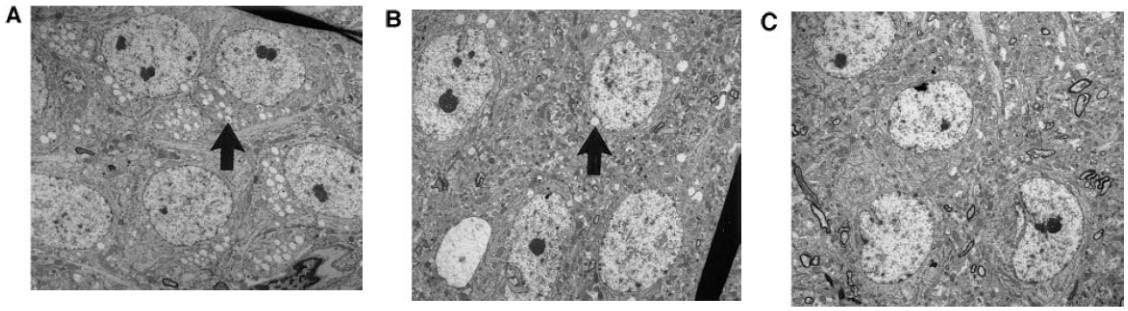


rmGUS 非投与 MPS VII 型マウス（左）、rmGUS 投与 MPS VII 型マウス（中央）、rmGUS 非投与正常マウス（右）

出典：O'Connor et al.1998、図 1

表現型の改善のほか、0 日齢から rmGUS を投与した MPS VII 型マウスでは、脳内ニューロンを含む多くの組織でライソゾーム内 GAG 蓄積の減少を示す組織学的所見が認められた。rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、非投与 MPS VII 型マウスに比べ、新皮質ニューロンにおけるライソゾーム膨張及び GAG 蓄積が減少、又は認められなかった（図 2.6.2.3.3.3.2）。

図 2.6.2.3.3.3.2：　rhGUS 投与 MPS VII 型マウスのニューロンにおけるライソゾーム内 GAG 蓄積の減少



（A）rmGUS 非投与の MPS VII 型マウスのニューロンにライソゾーム膨張を認める。（B）rmGUS 投与 MPS VII 型マウスの同様の脳領域におけるニューロンではライソゾーム膨張の顕著な減少を認める。（C）rmGUS 投与正常マウスのニューロンではライソゾーム内に蓄積を認めない（A～C、14003 倍、酢酸ウラニル-クエン酸鉛）。

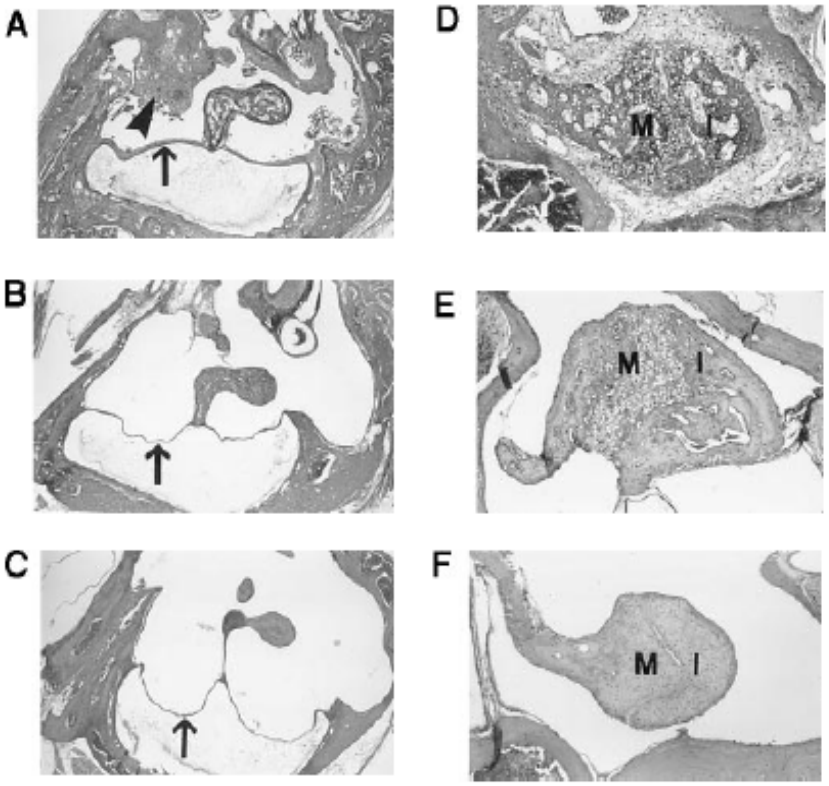
出典：O'Connor et al. 1998、図 5

脳のライソゾーム内 GAG 蓄積の減少と精神機能の改善に関連性が認められた。精神機能はモーリスの水迷路試験で評価した。この空間見当識学習検査では、隠れたプラットフォームを発見する方法を考え出す（習得）能力、プラットフォームの位置を覚える（探索）能力、プラット

フォームの本来の位置を再学習する（再学習）能力及び新たな位置にある隠れたプラットフォームを発見する方法を考え出す（再配置）能力を評価する。rmGUS 投与 MPS VII 型マウスと非投与の MPS VII 型マウスでは、モーリスの水迷路試験の全フェーズで待ち時間に有意差（$p < 0.05$）が認められた（データ示さず）。この試験のすべてのフェーズにおいて rmGUS 投与 MPS VII 型マウスの成績が非投与 MPS VII 型マウスを上回ったことから、様々な高次精神機能障害の一部が rmGUS の投与によって減少又は予防されることが示唆された。rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、モーリスの水迷路試験で改善が認められたが、これは脳の特定のニューロンのライソゾーム内 GAG 蓄積の減少と相関している。酵素補充療法によってライソゾーム内の GAG 蓄積が中枢神経系から完全に除去されるわけではないが、rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは新皮質ニューロンでライソゾーム内蓄積が減少していた。新皮質が空間記憶に関与していることは明らかにされている。皮質に病巣があるラットでは、モーリスの水迷路試験で評価可能な重大な障害がある（Kolb et al. 1983）。したがって、rmGUS 投与 MPS VII 型マウスの新皮質ニューロンにおけるライソゾーム内蓄積の減少により、空間学習機能が改善したといえる。

rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、耳の病理組織の顕著な改善が認められたが、個体によって改善度は異なり、一部のマウスではライソゾーム内に蓄積した GAG は完全に消失していなかった（図 2.6.2.3.3.3.3）。rmGUS 投与 MPS VII 型マウス（図 2.6.2.3.3.3.3 B 及び E）では、非投与 MPS VII 型マウス（図 2.6.2.3.3.3.3 A 及び D）に比べ、小骨の形成異常が軽減しており、中耳炎及び中耳粘膜肥厚が少なく（矢頭）、鼓膜（矢印）が薄かった。また、非投与 MPS VII 型マウスでは、ツチ骨（*M*）及びキヌタ骨（*I*）が肥厚した粘膜で被包されていた（図 2.6.2.3.3.3.3 D）。一方、rmGUS 投与 MPS VII 型マウスのツチ骨及びキヌタ骨（図 2.6.2.3.3.3.3 E）には同様の関節疾患が認められるが、非投与 MPS VII 型マウス（図 2.6.2.3.3.3.3 F）に比べ、血管周囲の小腔の拡大が少なく、小骨は粘膜に捕捉されていなかった。

図 2.6.2.3.3.3.3：　rmGUS 投与 MPS VII 型マウスにおける耳の病理組織の改善

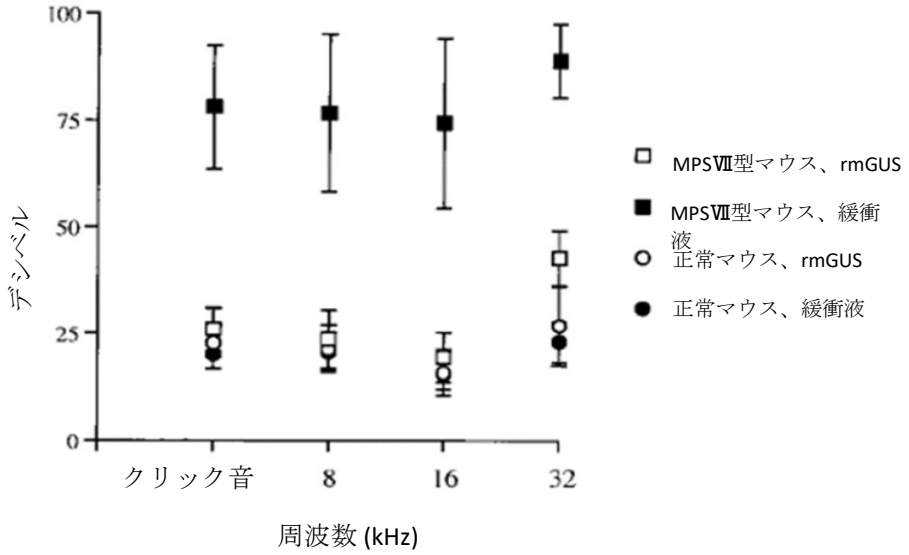


（A、D）rmGUS非投与MPS VII型マウス。（B、E）rmGUS投与MPS VII型マウス。（C、F）rmGUS非投与正常マウス。H&E 染色。A～C：16 倍、D～F：39 倍

出典：O'Connor et al. 1998、図 7

rmGUS 投与 MPS VII 型マウスの聴覚機能を聴性脳幹反応（ABR）により評価した結果、聴覚機能の相応な改善が認められた。rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、非投与 MPS VII 型マウスに比べ、聴性脳幹反応の誘発に必要なデシベル値の有意な低下が認められた（p = 0.001、O'Connor et al. 1998、図 2.6.2.3.3.3.4）。広帯域（0～≥ 16 kHz）又は特定（8 及び 16 kHz）の周波数で ABR を誘発するために必要なデシベル値は、rmGUS 投与 MPS VII 型マウス、非投与正常マウス及び rmGUS 投与正常マウスで非常に類似していた。32 kHz の場合、rmGUS 投与 MPS VII 型マウスでは、ABR の閾値が 2 つの正常群のマウスに比べ高かったが、非投与の MPS VII 型マウスと比べると低かった。非投与 MPS VII 型マウスで ABR の特徴的な波形を得るには、いずれの周波数でも 60 dB を上回る刺激が必要であった（O'Connor et al. 1998）。

図 2.6.2.3.3.3.4：　rmGUS 投与 MPS VII 型マウスの聴性脳幹反応（ABR）の改善



出典：O'Connor et al. 1998、 図 6

2.6.2.4　副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.5　安全性薬理試験

UX003 の GLP 適用安全性薬理コアバッテリー試験を ICH S7A に準拠して実施した。これらの試験では、SD ラットを用いた呼吸器系への影響の評価（UX003-PC004、第 4.2.1.3 項）、SD ラットを用いた単回投与毒性試験（GLP 適用、UX003-PC002、第 4.2.1.3 項）の一部として実施した中枢神経系（CNS）及び心血管（CV）系への影響の評価及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（GLP 適用、UX003-PC003、第 4.2.1.3 項）を実施した。UX003 を最大 20 mg/kg で投与しても呼吸器系、CNS 及び CV 系に対する有害作用は認められなかった。

上記試験の要約を以下（表 2.6.2.5.1）に示し、試験報告書を第 4.2.1.3 項に示す。

表 2.6.2.5.1： UX003 の安全性薬理試験の概要

試験の種類／試験依頼者の試験番号／試験名	動物種	投与経路	投与方法及び期間	用量 (mg/kg)	性別／動物数	所見
呼吸器系 UX003-PC004 UX003 を Sprague Dawley ラットに静脈内投与したときの呼吸器系への影響に関する薬理学的評価	SD ラット	IV 持続投与（2 時間）	実験 1 日に単回投与	群 1 = 0 群 2 = 6 群 3 = 20	群 1 = 雄 6 例 群 2 = 雄 6 例 群 3 = 雄 6 例	• プレチスモグラフィーデータ：投与後 240 時間まで、換気パラメータ（1 回換気量、呼吸数、毎分換気量）に UX003 による重要な影響は認められなかった。 • 体重：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 一般状態：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 投与の翌日に動物を安楽死させた。
中枢神経系（CNS）[a] UX003-PC002 SD ラットを用いた単回投与毒性／TK／CNS 安全性薬理試験	SD ラット	IV 持続投与（2 時間）	実験 1 日に単回投与	群 1 = 0 群 2 = 6 群 3 = 20	群 1 = 雌雄各 6 例（本試験） ＋雌雄各 4 例（TK） 群 2 = 雌雄各 6 例（本試験） ＋雌雄各 4 例（TK） 群 3 = 雌雄各 6 例（本試験） ＋雌雄各 4 例（TK）	• 中枢神経系（機能観察総合評価）：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 体重：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 一般状態：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。

試験の種類／試験依頼者の試験番号／試験名	動物種	投与経路	投与方法及び期間	用量 (mg/kg)	性別／動物数	所見
心血管（CV）系 [b] UX003-PC003 UX003 の若齢カニクイザルにおける 26 週間静脈内持続投与（及び 4 週間の回復期間）毒性／TK／心血管系安全性試験	若齢カニクイザル（1.5～2 歳齢）	IV 持続投与（2 時間）	隔週 1 回 x 26 週 + 回復期間 4 週間	群 1 = 0 群 2 = 2 群 3 = 6 群 4 = 20	群 1 = 雄 5 例（本試験 3 例 + 回復 2 例）及び雌 5 例（本試験 3 例 + 回復 2 例） 群 2 = 雄 3 例 + 雌 3 例 群 3 = 雄 3 例 + 雌 3 例 群 4 = 雄 5 例（本試験 3 例 + 回復 2 例）及び雌 5 例（本試験 3 例 + 回復 2 例）	• 実験 1、85 及び 155 日、並びに回復期間の最終週に記録した心電図（24 時間）：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 体重及び摂餌量：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 一般状態：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。 • 外観検査：UX003 投与に関連した変化は認められなかった。

[a.] ラットを用いた単回投与毒性試験及び TK 評価は、中枢神経系安全性薬理試験と併せて実施した。

[b.] カニクイザルを用いた 26 週間慢性毒性試験及び TK 評価は、心血管系安全性薬理評価と併せて実施した。

2.6.2.5.1　UX003 を Sprague Dawley ラットに静脈内投与したときの呼吸器系への影響に関する薬理学的評価（UX003-PC004）

覚醒 SD ラットを用いた呼吸器系安全性薬理試験（GLP 適用、UX003-PC004）において、UX003 を静脈内投与したときの呼吸器系への影響を評価した。試験報告書は第 4.2.1.3 項に示す。

本試験の目的は、雄 SD ラットに UX003 の静脈内持続投与を 2 時間行ったときの呼吸器系への薬理学的作用を評価することであった。雄 SD ラット 18 例（約 9 週齢、体重 200～300 g）を 3 つの投与群（各群 6 例）に振り分け、溶媒対照（調製緩衝液）又は UX003 を 6 mg/kg 若しくは 20 mg/kg の投与量（総投与容量 10 mL/kg）で 2 時間単回投与した。各個体の体重を測定した。すべての動物の健康状態及び死亡の有無を 1 日 2 回確認した。ラットに「ヘッドアウト式」プレチスモグラフを装着し、換気パラメータ（1 回換気量、呼吸数及び毎分換気量）を投与前 30 分間、2 時間投与の開始から投与終了後 30 分まで連続的に、並びに投与終了後 24 時間及び 240 時間時点で 30 分間測定した。試験終了時に生存例を安楽死させた。

試験期間中、死亡及び UX003 投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。UX003 を 6 mg/kg 又は 20 mg/kg の投与量で単回経口投与した結果、投与後 240 時間まで、換気パラメータ（1 回換気量、呼吸数、毎分換気量）に UX003 による重要な影響は認められなかった。UX003 を投与したラットの観察所見は、投与前に認められた所見又は同時対照群で認められた所見と同様であった。

結論として、UX003 を 6 mg/kg 又は 20 mg/kg の投与量で 2 時間静脈内単回投与しても、投与後 240 時間まで雄 SD ラットの呼吸器系に変化は認められなかった。

2.6.2.5.2　SD ラットを用いた単回投与毒性／TK／CNS 安全性薬理試験（UX003-PC002）

UX003 を静脈内投与したときの CNS への影響を、SD ラットを用いた単回投与毒性／トキシコキネティクス（TK）測定／CNS 安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC002）で評価した。TK 及び毒性試験データについては第 2.6.6.2.1 項で検討する。試験報告書は第 4.2.1.3 項に示す。

約 8 週齢の SD ラットに、カテーテルから UX003 を 2 時間単回静脈内持続投与した。群 1（0 mg/kg）のラットには、同様の方法で調製緩衝液を投与した。投与容量はすべての動物で 10 mL/kg とした。UX003 曝露後の神経毒性を評価するため、本試験で 1～3 群に振り分けた動物を対象に機能観察総合評価（FOB 法）を実施した。FOB 法では、ホームケージでの観察、オープンフィールドでの観察、握力測定、着地時開脚度、テールフリック試験などを実施して CNS への影響を評価した。FOB 法の観察は、試験前、実験 1 日の投与後 10～30 分及び 24 時間時点、並びに実験 13 日に実施した。

本試験の一部として実施した安全性薬理評価の結果、ラットに UX003 を最大 20 mg/kg（最高用量）で投与しても CNS への影響はないことが示された。

2.6.2.5.3　若齢カニクイザルに UX003 を静脈内持続投与する 26 週間（及び 4 週間の回復期間）の毒性／TK／心血管系安全性試験（UX003-PC003）

UX003 を静脈内投与したときの心血管系への影響は、若齢カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験（及び 4 週間の回復期間）／TK／CV 系安全性薬理併合試験（GLP 適用試験、UX003-PC003）で評価した。TK 及び毒性試験データについては第 2.6.6.3.2 項で検討する。試験報告書は第 4.2.1.3 項に示す。

若齢サル（1.5～2 歳齢）は、予測される患者集団の年齢及び小児集団を対象とした他の ERT 薬による過去の経験を踏まえて選択した。群 2（2 mg/kg）、群 3（6 mg/kg）及び群 4（20 mg/kg）のサルには、UX003 の静脈内持続投与（カテーテルから 2 時間投与）を隔週で 26 週間行った。群 1（0 mg/kg）のサルには、同様の方法及び期間で調製緩衝液を投与した。投与容量は、投与前の直近の体重に基づいて個体ごとに設定した。群 1～4 のサルの心電図（ECG）を試験前に 1 回（24 時間）、実験 1、85 及び 155 日、並びに回復期間最終週（24 時間）に記録し、テレメトリージャケットを介して収集される四肢誘導IIを観察した。実験 1、85 及び 155 日の投与日に、椅子に拘束する 3 時間以上前及び持続投与終了から 20 時間以上継続して ECG 波形を収集した。ECG の評価は認定 Veterinarian Cardiologist が行った。

すべての動物の健康状態及び死亡の有無を 1 日 1 回観察した。2 時間の静脈内持続投与中は常時、投与後は定期的に観察した。投与日以外は、ケージサイドの観察を 1 日 1 回以上行った。

ECG パラメータ（RR、PR、QRS、QT 及び QTca）に変化は認められなかったことから、UX003 を最大 20 mg/kg で投与しても CV 系への影響はないことが示された。

2.6.2.6　薬力学的薬物相互作用

ERT 治療薬は他の薬物と薬力学的相互作用を起こさないと考えられることから、薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.7　考察及び結論

UX003 の薬理学的活性のエビデンスは *in vitro* 及び *in vivo* 試験で確立されている。UX003 の細胞内移行は、MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞を用いた *in vitro* 試験で確認されている。MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞による UX003 の取り込みは、K_{uptake} 値が約 [redacted]～[redacted] nM となると飽和状態になる（第 3.2.S.4.4 項）。この取り込み能の高さは、他の遺伝子組換えヒト酵素補充療法治療薬と同様である（例えば、rh-イズロニダーゼでは 1～2 nM）。MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞における UX003 の細胞内半減期は約 40 日であり（UGNX-013、第 4.2.2.3 項）、イズロニダーゼ（細胞内半減期 3～5 日）などの他の MPS 関連のライソゾーム酵素の約 8 倍に相当する（Kakkis et al. 1994）。

UX003 の分解作用はライソゾームに限られ、極めて特異的であった。GUS はデルマタン硫酸鎖、コンドロイチン硫酸鎖及びヘパラン硫酸鎖の末端に存在するグルクロニダーゼ残基を特異的に開裂するのみで、例えば、1 個のヒドロキシル基の位置が異なるイズロニダーゼ残基を開裂することはない。GUS は GAG 鎖の内部のグルクロニド基を開裂しないことから、分解経路にあるすべての酵素が関与しなければ GAG を分解することはできない（Neufeld et al. 2001）。GUS 活性に最適な pH は 3.5～4.5 であり、血漿の pH に近い pH 7 では活性が大幅に低下する。したがって、ライソゾーム外部での GUS の GAG 分解能は低い。

尿中 GAG 濃度と病理組織改善の相関性を確認するため、免疫寛容 MPS VII 型マウスを用いた試験を実施した。UX003 の 8 週間の静脈内投与後に血清及び尿試料中の疾患特異的なバイオマーカーの減少が認められ、これに比例して、各組織の組織学的検査では細胞質内の空胞変性が減少した。UX003 の忍容性は、予定臨床用量である 4 mg/kg の 5 倍に相当する 20 mg/kg（試験の最高用量）でも良好であった。

MPS VII 型マウスモデルを用いた多くの公表論文では、遺伝子組換え GUS が多くの組織に分布し、ライソゾーム内の GAG 蓄積を大幅に減少又は抑制することが示されている（O'Connor et al.

1998）、（Sands et al. 1994）、（Sands et al. 1997）、（Sands et al. 2001）、（Vogler et al. 1996）、（Vogler et al. 2005）。rhGUS は、脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、骨、肺などの多くの GUS 欠損組織に分布することが確認されている（Vogler et al. 2005）、（Grubb et al. 2008）、（Sly et al. 2006）。ERT によるライソゾーム内の GAG 蓄積の減少は、病理学的に顕著な改善及び臨床的なベネフィットと相関しており、骨発達、発育、認知能力、聴覚、免疫機能、生存期間などが長期にわたって顕著に改善する（Sands et al. 1997）、（Sands et al. 2001）、（Vogler et al. 1996）。また、高用量の rhGUS を投与した MPS VII 型マウスでは、rhGUS の血液脳関門の通過が認められたほか、広範囲で rhGUS の分布が見られ、これに応じて脳を含むほぼすべての組織においてライソゾーム内 GAG 蓄積が減少した。rhGUS 濃度の増加とライソゾーム内 GAG 蓄積量の減少は、rhGUS の投与量と投与期間に依存していた（Vogler et al. 2005）。MPS VII 型マウスの組織を病理組織学的に評価した結果、GUS による GAG クリアランスの増加に関連した病理学的な影響は認められなかった。

UX003 を静脈内投与したときの非臨床安全性薬理は、SD ラット及び若齢カニクイザルに UX003 を最大 20 mg/kg の用量で投与した GLP 適用 *in vivo* 試験（ラット呼吸器系安全性薬理試験、ラット単回投与毒性／TK／CNS 安全性薬理併合試験、若齢カニクイザル 26 週間反復投与毒性／TK／CV 安全性薬理併合試験）で評価した。これらの試験の結果、UX003 を 20 mg/kg（最高用量）で投与しても中枢神経系、心血管系及び呼吸器系の安全性薬理パラメータに対する影響はないことが示された。

2.6.2.8 参考文献

Bielicki J, Crawley AC, Davey RC, Varnai JC, Hopwood JJ. 1999. "Advantages of using same species enzyme for replacement therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI." *J Biol Chem* 274 (51):36335-43.

Birkenmeier EH, Davisson MT, Beamer WG, Ganschow RE, Vogler CA, Gwynn B, Lyford KA, Maltais LM, Wawrzyniak CJ. 1989. "Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with beta- glucuronidase deficiency." *J.Clin.Invest* 83 (4):1258-1266.

Dickson P, Peinovich M, McEntee M, Lester T, Le S, Krieger A, Manuel H, Jabagat C, Passage M, Kakkis ED. 2008. "Immune tolerance improves the efficacy of enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I." *J Clin Invest* 118 (8):2868-76.

Grubb JH, Vogler C, Levy B, Galvin N, Tan Y, Sly WS. 2008. "Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (7):2616-2621.

Kakkis ED, Matynia A, Jonas AJ, Neufeld EF. 1994. "Overexpression of the human lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase in Chinese hamster ovary cells." *Protein Expr Purif* 5 (3):225-32.

Kolb B, Sutherland RJ, Whishaw IQ. 1983."A comparison of the contributions of the frontal and parietal association cortex to spatial localization in rats." *Behav.Neurosci.* 97 (1):13-27.

Neufeld EF, Muenzer J. 2001. "The Mucopolysaccharidoses." In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, edited by CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly and D Valle, 3421-3452. New York: McGraw-Hill.

O'Connor LH, Erway LC, Vogler CA, Sly WS, Nicholes A, Grubb J, Holmberg SW, Levy B, Sands MS. 1998. "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function." *J. Clin. Invest* 101 (7):1394-1400.

Sands MS, Birkenmeier EH. 1993."A single-base-pair deletion in the beta- glucuronidase gene accounts for the phenotype of murine mucopolysaccharidosis type VII." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90 (14):6567-6571.

Sands MS, Vogler C, Kyle JW, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Sly WS, Birkenmeier EH. 1994. "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII." *J. Clin. Invest* 93 (6):2324-2331.

Sands MS, Vogler C, Torrey A, Levy B, Gwynn B, Grubb J, Sly WS, Birkenmeier EH. 1997. "Murine mucopolysaccharidosis type VII: long term therapeutic effects of enzyme replacement and enzyme replacement followed by bone marrow transplantation." *J. Clin. Invest* 99 (7):1596-1605.

Sands MS, Vogler CA, Ohlemiller KK, Roberts MS, Grubb JH, Levy B, Sly WS. 2001. "Biodistribution, kinetics, and efficacy of highly phosphorylated and non- phosphorylated beta-glucuronidase in the murine model of mucopolysaccharidosis VII." *J. Biol. Chem.* 276 (46):43160-43165.

Sly WS, Vogler C, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Tan Y, Nishioka T, Tomatsu S. 2006. "Enzyme therapy in mannose receptor-null mucopolysaccharidosis VII mice defines roles for the mannose 6-phosphate and mannose receptors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (41):15172-15177.

Sly WS, Vogler C, Grubb JH, Zhou M, Jiang J, Zhou XY, Tomatsu S, Bi Y, and Snella EM. 2001. "Active site mutant transgene confers tolerance to human beta- glucuronidase without affecting the phenotype of MPS VII mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98 (5):2205-2210.

Vogler C, Barker J, Sands MS, Levy B, Galvin N, Sly WS. 2001. "Murine mucopolysaccharidosis VIL: impact of therapies on the phenotype, clinical course, and pathology in a model of a lysosomal storage disease." *Pediatr Dev Pathol* 4 (5):421-33.

Vogler C, Levy B, Galvin NJ, Thorpe C, Sands MS, Barker JE, Baty J, Birkenmeier EH, Sly WS. 1999. "Enzyme replacement in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to beta-glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy." *Pediatr Res* 45 (6):838-44.

Vogler C, Levy B, Grubb JH, Galvin N, Tan Y, Kakkis E, Pavloff N, Sly WS. 2005. "Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc Natl*

Acad Sci U S A 102 (41):14777-82.

Vogler C, Sands MS, Levy B, Galvin N, Birkenmeier EH, Sly WS. 1996. "Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in murine mucopolysaccharidosis type VII: impact of therapy during the first six weeks of life on subsequent lysosomal storage, growth, and survival." *Pediatr.Res.* 39 (6):1050-1054.

メプセヴィ点滴静注液 10mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）
2.6.3　薬理試験概要表

アミカス・セラピューティクス株式会社

Table of Contents

2.6.3 PHARMACOLOGY TABULATED SUMMARIES....3
2.6.3.1 Pharmacology Overview....3
2.6.3.4 Safety Pharmacology....6
2.6.3.5 List of References....8

List of Abbreviations

CNS	central nervous system
[redacted]	[redacted]
CTD	common technical document
CV	cardiovascular
ECG	electrocardiogram
EOI	end of infusion
FOB	Functional Observational Battery
GLP	Good Laboratory Practice
GUS	beta-glucuronidase
gus^{mps}/gus^{mps}	MPS VII Mouse
IV, i.v.	Intravenous(ly)
MPS VII	mucopolysaccharidosis type VII, Sly Syndrome (beta-glucuronidase deficiency)
rhGUS	recombinant human beta-glucuronidase; rh-β-glucuronidase
rmGUS	recombinant murine beta-glucuronidase
SD rat	Sprague-Dawley rat
UX003	recombinant human beta-glucuronidase; rh-beta-glucuronidase; rhGUS

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summaries

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Table 2.6.3.1.1: Pharmacology Overview

Test Article: rhGUS/UX003

Type of Study	Test Article	Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Reference/Study Number	Location in CTD
In vitro Pharmacodynamics							
rhGUS Intracellular Half-Life Determination	UX003	Human MPS VII fibroblasts	In vitro	No	Research Laboratory, Ultragenyx Pharmaceutical Inc., The Buck Institute, Novato, CA	UGNX-013	Module 4.2.2.3
Primary Pharmacodynamics							
rhGUS – Biodistribution Study to Confirm Relationship Between uGAG and Tissue Pathology	UX003	MPS7 Mouse (MPS VII/E540A^{TG}) 10-12 wks	IV administration (slow bolus), once weekly for 8 weeks	No	[redacted]	UX003-PC001	Module 4.2.1.1
rhGUS [a] – Tissue half-life, Distribution, Storage Clearance, and Blinded Pathology Reassessment at [redacted] by Sponsor	rhGUS	MPS7 Mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV, bolus	No	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	Publication (Vogler et al. 2005)	Module 4.3
						[redacted] 20022037-1 and 20022037-2	Module 4.2.3.2
rhGUS [a] –PK, Distribution, Storage Clearance	rhGUS	MPS7 Mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV, bolus	No	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	Publication (Sly et al. 2006)	Module 4.3

Type of Study	Test Article	Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Reference/Study Number	Location in CTD
Safety Pharmacology							
Central Nervous System (CNS)[b] A Single-dose Toxicity, Toxicokinetic and CNS Safety Pharmacology Study in SD Rats	UX003	Sprague Dawley Rat	IV infusion, 2 hrs	Yes	[redacted]	UX003-PC002 ([redacted] Testing Facility Study No. 20022900 Final Report)	Module 4.2.1.3
Respiratory[d] A Pharmacological Assessment of the Effect of UX003 on the Respiratory System of the Sprague Dawley Rat following Intravenous Administration	UX003	Sprague Dawley Rat	IV infusion, 2 hrs	Yes	[redacted] Canada	UX003-PC004 ([redacted] Testing Facility Study No. 694491 Final Report)	Module 4.2.1.3
Cardiovascular (CV)[c] A 26-Week Toxicity, Toxicology and Cardiovascular Safety Study of UX003 by Intravenous Infusion Administration in Juvenile Cynomolgus Monkeys with a 4 Week Recovery Period	UX003	Cynomolgus Monkey	IV infusion, 2 hrs biweekly for 26 weeks	Yes	[redacted]	UX003-PC003 ([redacted] Testing Facility Study No. 20022902 Final Report)	Module 4.2.1.3

[a] The enzyme in this study was produced from the same master cell bank that is used to produce material for Ultragenyx sponsored nonclinical and clinical studies, by comparable traditional purification method.
[b] The single-dose toxicity and toxicokinetic (TK) study in SD rat was conducted in combination with the CNS safety pharmacology assessment.
[c] The 26-week chronic toxicity and TK study in cynomolgus monkey was conducted in combination with the CV safety pharmacology assessment.
rhGUS: Recombinant Human GUS
[d]GLP = Studies were conducted in compliance with United States FDA and OECD GLPs

Table 2.6.3.1.2: Pharmacology Overview

Test Article: rmGUS[a]

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP[d] Compliance	Testing Facility	Reference/Study Number	Location in CTD
In vitro Pharmacodynamics						
No in vitro pharmacodynamics studies conducted with rmGUS						
Primary Pharmacodynamics						
rmGUS - Tissue Distribution and Lysosomal Storage Reduction	MPS7 Mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV, bolus	No	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	Publication (Sands et al. 1994)	Module 4.3
rmGUS - Survival and Growth Improvement	MPS7 Mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV, bolus	No	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	Publication (Vogler et al. 1996)	Module 4.3
rmGUS - Tissue Distribution, Lysosomal Storage Reduction, Growth and Survival	MPS7 Mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV, bolus	No	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	Publication (Sands et al. 1997)	Module 4.3
rmGUS – Improvement in Phenotype, Behavior and Auditory Function	MPS7 Mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV, bolus	No	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	Publication (O'Connor et al. 1998)	Module 4.3
rmGUS –Lysosomal Storage Reduction in Brain	MPS7 Mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV, bolus	No	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	Publication (Vogler et al. 1999)	Module 4.3
Safety Pharmacology						
No safety pharmacology studies conducted with rmGUS						

[a]rmGUS: Recombinant Murine GUS

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Table 2.6.3.4.1: Safety Pharmacology

Test Article: UX003

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a] Compliance	Study Number
CNS	Rats, SD	IV infusion, 2 hrs	0, 6, 20	Main Study (Groups 1-3): 6M and 6F	Animals were evaluated for Functional Observation Battery (FOB) endpoints to include home cage, open field, grip strength, foot splay, and tail flick evaluations during Prestudy, on Day 1 at 30 ± 10 minutes End of Infusion (EOI), on Day 2 at 24 ±1 hours EOI, and on Day 13. No UX003-related changes in any of the physical examination measurements occurred during this study. All of the findings were comparable to the control group and/or of a normal frequency for laboratory-housed rats at this facility under similar study conditions and not considered UX003 related. The fluctuations in numerical parameters, some of which were statistically significant, were within the range of variation commonly observed in laboratory-housed rats at this facility undergoing similar study procedures.	Yes	UX003-PC002
Respiratory	Rats, SD	IV infusion, 2 hrs	0, 6, 20	6M	Following a single intravenous administration of UX003 at doses of 6 and 20 mg/kg, no significant UX003-related effects were observed on the ventilatory parameters (tidal volume, respiratory rate, and derived minute volume) up to 240 hours post dose. The observations for the treated animals were predominantly comparable to the pretreatment values or to the concurrent control. There was an apparent slight decrease in both absolute and baseline adjusted respiratory rate and minute volume during the 2 hour infusion of the 6 mg/kg dose. These decreases are considered to be incidental and unrelated to the UX003 treatment as there was no dose level relationship present with no change being noted during or following the 20 mg/kg dose. Occasional isolated statistically significant changes were noted. However, as	Yes	UX003-PC004

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin	Doses[a] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a] Compliance	Study Number
					these were sporadic, transient in nature and non-dose dependent, they were considered incidental, due to normal biological variability and unrelated to the administration of UX003.		
Cardio-vascular	Cyno-molgus Monkey	IV infusion, 2 hrs, every other week	0, 2, 6, 20	Main study groups: 3M and 3F Recovery groups: 2M and 2F	There were no UX003-related changes in electrocardiography (ECG) parameters and all the ECGs evaluated in this study were qualitatively considered normal for cynomolgus monkeys. No test article abnormalities in rhythm or waveform morphology were found at any dose level based on comparison of predose and postdose ECG recordings. There were no changes in ECG parameters (RR, PR, QRS, QT, or QTca) resulting from UX003 administration. All animals exhibited anticipated diurnal patterns with prolonged RR and QT interval during lights-out photoperiod (approximately 6 hours postdose), indicating decreased heart rate similar to prestudy evaluations. Although variation existed across groups regarding RR and QT intervals prestudy which were maintained throughout the dosing phase, individual animal rate corrections (QTca) indicated that there were no effects of UX003 on ventricular repolarization at any dose level.	Yes	UX003-PC003

[a]GLP = Studies were conducted in compliance with United States FDA and OECD GLPs

2.6.3.5 List of References

O'Connor LH, Erway LC, Vogler CA, Sly WS, Nicholes,A, Grubb J, Holmberg SW, Levy B, Sands MS. 1998. "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function." *J.Clin.Invest* 101 (7):1394-1400.

Sands, S, Vogler C, Kyle JW, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Sly WS, Birkenmeier EH. 1994. "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII." *J.Clin.Invest* 93 (6):2324-2331.

Sands MS, Vogler C, Torrey A, Levy B, Gwynn B, Grubb J, Sly WS, Birkenmeier EH. 1997. "Murine mucopolysaccharidosis type VII: long term therapeutic effects of enzyme replacement and enzyme replacement followed by bone marrow transplantation." *J.Clin.Invest* 99 (7):1596-1605.

Sly WS, Vogler C, Grubb JH, Levy B, Galvin N, Tan Y, Nishioka T, Tomatsu S. 2006. "Enzyme therapy in mannose receptor-null mucopolysaccharidosis VII mice defines roles for the mannose 6-phosphate and mannose receptors." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 (41):15172-15177.

Vogler C, Levy B, Galvin NJ, Thorpe C, Sands MS, Barker JE, Baty J, Birkenmeier EH, Sly WS. 1999. "Enzyme replacement in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to beta-glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy." *Pediatr Res* 45 (6):838-44.

Vogler C, Levy B, Grubb JH, Galvin N, Tan Y, Kakkis E, Pavloff N, Sly WS. 2005. "Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (41):14777-82.

Vogler C, Sands MS, Levy B, Galvin N, Birkenmeier EH, Sly WS. 1996. "Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in murine mucopolysaccharidosis type VII: impact of therapy during the first six weeks of life on subsequent lysosomal storage, growth, and survival." *Pediatr.Res.* 39 (6):1050-1054.