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）
2.6.4　薬物動態試験の概要文

アミカス・セラピューティクス株式会社

目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文 4
2.6.4.1 概要 4
2.6.4.2 分析法 7
2.6.4.2.1 ラット、ウサギ及びサルの血清中 GUS 活性を測定する薬物動態分析法 8
2.6.4.2.2 ラット、ウサギ及びサルの血清中抗薬物抗体を測定する免疫原性分析法 8
2.6.4.2.3 A280 によるタンパク質濃度の測定（投与液分析） 11
2.6.4.2.4 非還元末端（NRE）法によるマウス血清中及び尿中 GAG 濃度の測定 11
2.6.4.2.5 マウスの尿中総 GAG（uGAG）濃度の測定 12
2.6.4.3 吸収 12
2.6.4.3.1 単回投与後の PK 12
2.6.4.3.1.1 ラット（UX003-PC002） 12
2.6.4.3.1.2 ラット（UX003-PC005） 13
2.6.4.3.2 反復投与後の PK 13
2.6.4.3.2.1 ラット（UX003-PC007） 13
2.6.4.3.2.2 ラット（UX003-PC008） 13
2.6.4.3.2.3 ウサギ（UX003-PC006） 14
2.6.4.3.2.4 ウサギ（UX003-PC009） 14
2.6.4.3.2.5 サル（UX003-PC003） 14
2.6.4.4 分布 16
2.6.4.4.1 MPS VII 型マウスを用いた生体内分布試験（UX003-PC001） 16
2.6.4.4.2 雄 SD ラットにおける 2 時間の単回静脈内持続投与後の UX003 の組織分布（UX003-PC005） 18
2.6.4.4.3 公表済みの MPS VII 型モデルマウスを用いた遺伝子組換え GUS の生体内分布試験 18
2.6.4.4.4 胎盤通過性－マウスを用いた rhGUS の単回投与試験 21
2.6.4.5 代謝 22
2.6.4.6 排泄 22
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 22
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 22
2.6.4.9 考察及び結論 22
2.6.4.10 参考文献 25

略語一覧

4-MU	4-メチルウンベリフェロン
4-MUG	4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド
ADA	抗薬物抗体
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}inf}$	投与後 0 時間から無限大までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
[redacted]	[redacted]
BSA	ウシ血清アルブミン
CDER	医薬品評価研究センター
°C	摂氏温度
C_{max}	最高血中濃度
CNS	中枢神経系
CS	コンドロイチン硫酸
CTD	コモン・テクニカル・ドキュメント
CV	変動係数
DART	生殖発生毒性
DMB	ジメチルメチレンブルー
DRF	用量範囲設定
DS	デルマタン硫酸
EFD	胚・胎児発生
ELISA	酵素免疫測定法
EOI	投与終了
FcRn	胎児性 Fc 受容体
FDA	米国食品医薬品局
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
HPC	高濃度陽性対照
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ
ICH	日米欧医薬品規制調和国際会議
IgG	免疫グロブリン G
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
kDa	キロダルトン
LLOQ	定量下限
LPC	低濃度陽性対照
mg/kg	ミリグラムパーキログラム
mL	ミリリットル
MPC	中濃度陽性対照
MPS	ムコ多糖症
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）
nM	ナノモル
NRE	非還元末端
NZW	New Zealand White ウサギ
OD	光学密度
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PerT-GUS	過ヨウ素酸処理した rhGUS
PK	薬物動態
QOW	隔週
r^2	決定係数
RE	相対誤差
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
SD	標準偏差
SD ラット	Sprague Dawley ラット
$t_{1/2}$	消失半減期
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血中濃度到達時間
TMB	3,3′,5,5′-テトラメチルベンジジン
uGAG	尿中グリコサミノグリカン
UPLC	超高速液体クロマトグラフィー
ULOQ	定量上限
US	米国
UX003	遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ
Vz	分布容積

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　概要

UX003 を静脈内投与したときの非臨床の薬物動態（PK）は、SD ラットを用いた単回投与毒性試験及び中枢神経系安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC002）、並びにカニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験及び心血管系安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC003）でのトキシコキネティクス（TK）評価の一部として測定した。ラット及びウサギを用いた静脈内投与生殖発生毒性（DART）試験（ラット：UX003-PC007 及び UX003-PC008、ウサギ：UX003-PC006 及び UX003-PC009）でも、限定的な TK 採血を行った。雄 SD ラットにおける UX003 の PK 及び組織分布プロファイルは、GLP 非適用の単回投与試験で詳細に評価した（UX003-PC005）。また、複数の発表文献に基づく遺伝子組換えマウス β-グルクロニダーゼ（rmGUS）及び遺伝子組換えヒト β-グルクロニダーゼ（rhGUS）の非臨床 PK 及び生体内分布データの要約を以下に示す。

静脈内投与は臨床適応予定経路であることから、UX003 の影響を評価する単回投与及び反復投与毒性試験では本投与方法（ラット、ウサギ及びサルにおける IV 持続投与）を設定した。非臨床用量（2、6 及び 20 mg/kg）は、MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞における UX003 の K_{uptake} に基づき、最大臨床用量（4 mg/kg）の 5 倍の安全係数となるよう設定した。MPS VII 型患者由来のヒト線維芽細胞で細胞内半減期が約 40 日であったこと（UGNX-013）や、臨床で予定している投与方法を踏まえた上で、反復投与毒性試験は隔週（QOW）投与で実施した。

非臨床 PK 試験及び生体内分布試験の概要表を表 2.6.4.1.1 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 2.6.4.1.1：　UX003／rhGUS／rmGUS の非臨床薬物動態、トキシコキネティクス、及び生体内分布試験の概要

試験の種類	投与経路	動物種／系統	試験番号又は参考文献／	該当概要表	被験物質
吸収					
単回投与：ラット	i.v.	Sprague Dawley ラット	UX003-PC002	第 2.6.5 項、表 2.6.5.3.1	UX003
単回投与：ラット	i.v.	Sprague Dawley ラット	UX003-PC005	第 2.6.5 項、表 2.6.5.3.2	UX003[c] 及び rhGUS[a]
反復投与（DART）TK：ラット	i.v.	Sprague Dawley ラット	UX003-PC007, UX003-PC008	第 2.6.7 項、表 2.6.7.3.1	UX003
反復投与（DART）TK：ウサギ	i.v.	New Zealand White ウサギ	UX003-PC006, UX003-PC009	第 2.6.7 項、表 2.6.7.3.1	UX003
反復投与 TK：サル	i.v.	カニクイザル	UX003-PC003	第 2.6.7 項、表 2.6.7.3.1	UX003
分布					
反復投与：マウス[b]	i.v.	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540A^{TG}）	UX003-PC001	第 2.6.5 項、表 2.6.5.5.1	UX003
単回投与：ラット	i.v.	Sprague Dawley ラット	UX003-PC005	第 2.6.5 項、表 2.6.5.5.2	UX003[c] 及び rhGUS[a]
単回及び反復投与：マウス（新生児及び 5 週齢）	i.v.	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	(Sands et al. 1994)	NA	rmGUS
単回投与：マウス（新生児）	i.v.	MPS VII 型マウス（gus^{mps}/gus^{mps}）	(Vogler et al. 1993)	NA	rmGUS
単回及び反復投与：マウス	i.v.	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540A^{TG}）	(Vogler et al. 2005)	NA	rhGUS[a]

試験の種類	投与経路	動物種／系統	試験番号又は参考文献／	該当概要表	被験物質
単回投与ーマウス（新生児及び成熟雌）	i.v.	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540ATG）	(Grubb et al. 2008a)	NA	rhGUSa
単回投与ーマウス	i.v.	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540ATG）	(Sly et al. 2006)	NA	rhGUSa
単回投与胎盤通過ーマウス（新生児及び成熟雌）	i.v.	MPS VII 型マウス（MPS VII/E540ATG）	(Grubb et al. 2008b)	NA	rhGUSa

[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] 生体内分布は組織抽出物のβ-グルクロニダーゼ（GUS）活性測定により評価した。[c] UX003（rhGUS）ロット番号[redacted]

NA：PK の概要表に記載されていない報告書及び／又は参考文献

2.6.4.2　分析法

非臨床試験で用いた生物学的分析法のうち、ラット、ウサギ及びサルの血清中β-グルクロニダーゼ（GUS）活性及び抗薬物抗体（ADA）の測定で用いる分析法並びに投与液分析で用いる A280 法は、妥当性が確認された方法である。また、MPS VII 型マウスを用いる GLP 非適用試験における GAG 濃度測定に用いた非還元末端（NRE）法（血清及び尿）及びジメチルメチレンブルー（DMB）法（尿）は、妥当性が確認されていなかった。ラット、ウサギ及びサルの血清中 GUS 活性及び ADA の測定法は、最新の FDA 及び業界ガイドライン（FDA［CDER］業界向けガイダンス［2001 年 5 月］：生物学的分析法バリデーション）及び ICH ガイドライン ICH Q2（R1）（分析法バリデーションに関するテキスト［実施方法］）で推奨される分析法のバリデーション及び評価項目の種類に従って妥当性を評価した。UX003 の非臨床試験で用いた測定法の概要を以下に示す（表 2.6.4.2.1）。

表 2.6.4.2.1：　UX003 の非臨床試験で用いた測定法

測定法	実施施設	方法	動物種	バリデーション状況	バリデーション報告書番号	CTD 中の該当項
rhGUS の薬物動態（PK）	[redacted]	GUS 活性測定法（蛍光ベース）	ラット、ウサギ、サル	バリデーション済み	[redacted]-000675（ラット及びサル） [redacted]-003481（ウサギ）	第 4.2.2.1 項
抗薬物抗体（ADA）	[redacted]	ADA スクリーニング及び ELISA 抗体価測定法	ラット、ウサギ、サル	適格性確認済み、バリデーション済み	[redacted]-001662（ラット及びウサギ） [redacted]-000786（サル）	第 4.2.2.1 項
抗薬物抗体（ADA）	[redacted]	ADA スクリーニング及び ECL 抗体価測定法	ラット、ウサギ	バリデーション済み	[redacted]-14-139-029-REP（ラット） [redacted]-14-139-027-REP（ウサギ）	第 4.2.2.1 項
タンパク質濃度（投与液分析）	[redacted]	A280 分光測定法	緩衝液	バリデーション済み	[redacted]-000668	第 4.2.2.1 項
非還元末端（NRE）を指標とする尿中及び血清中 GAG 濃度	[redacted]	Sensi-Pro 超高速液体クロマトグラフィー質量分析法（UPLC-MS/MS）	マウス	バリデーション未実施（GLP 非適用試験のみで使用）	方法に関する報告書／社内資料なし、UX003-PC001 で報告	第 4.2.2.1
尿中総 GAG 濃度	Ultragenyx	DMB 法	マウス	バリデート未実施（GLP 非適用試験のみで使用）	方法に関する報告書／社内資料なし、UX003-PC001 で報告	第 4.2.2.1 項

ECL = 電気化学発光

DMB = ジメチルメチレンブルー

2.6.4.2.1　ラット、ウサギ及びサルの血清中 GUS 活性を測定する薬物動態分析法

GUS 活性測定法を用いて血清中 UX003 濃度を測定した。血清試料を緩衝液で希釈し、蛍光発生基質の 4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド（4-MUG）を添加して培養した。4-MUG は、内因性及び／又は遺伝子組換え GUS により加水分解され、蛍光物質 4-メチルウンベリフェロン（4-MU）になる。4-MU が発する蛍光量を測定し（励起波長 365 nm、蛍光波長 445 nm）、4-MU の検量線から GUS 量を測定した。1 nM の 4-MUG を 37°C、1 時間で 4-MU に分解するために必要な酵素量を 1 U と定義した。

この測定法の妥当性は、[redacted] がラット及びサルの血清を用いて、直線性（モデル適合度）、定量下限（LLOQ）、定量上限（ULOQ）、真度、精度、特異性、マトリックス干渉及び試料の安定性について確認した。検量線は4パラメータ曲線適合モデル（[redacted] ソフトウェア）により作成した。ウサギ血清の使用に適合するように、本分析法に修正を加えた。バリデーション試験の結果を表 2.6.4.2.1.1 に示す。

バリデーション報告書（ラット及びサル血清：[redacted]-000675、ウサギ血清：[redacted]-003481）は第 4.2.2.1 項に添付した。

表 2.6.4.2.1.1：　ラット、ウサギ及びサルの血清中 UX003 活性の測定に用いた薬物動態の分析法バリデーション結果

パラメータ	サル	ラット	ウサギ
真度（%RE の絶対値）	≤ 9.4%	≤ 8.5%	≤ 6.8%
併行精度（%RSD）	≤ 13.9%	≤ 12.0%	≤ 2.9%
試験間再現精度（%RSD）	≤ 6.8%	≤ 7.7%	≤ 3.7%
直線性	r^2 の範囲：0.996～1.000		
標準物質の逆算値	%RE の範囲：-1.9～+3.3%		
試料の安定性	-80°C で 12 ヵ月		-80°C で 6 ヵ月
最小血清希釈倍率	10 倍	10 倍	10 倍
最大血清希釈倍率	16,000 倍	16,000 倍	100,000 倍
検量線の範囲	1～100 µM	1～100 µM	1～100 µM

出典：[redacted]-000675 及び[redacted]-003481

2.6.4.2.2　ラット、ウサギ及びサルの血清中抗薬物抗体を測定する免疫原性分析法

UX003 の免疫原性は、バリデートされたブリッジング酵素免疫測定法（ELISA）法により、カニクイザルの血清中のアイソタイプを問わない総抗薬物抗体（ADA）を定量することにより評価した。このブリッジング法では、分析対象抗体の二価性を利用する。96 ウェルプレートを非標識の UX003 でコーティングし（4°C、一晩）、1%ウシ血清アルブミン（BSA）でブロックする（4°C、30 分～2 時間）。血清試料（緩衝液で 2 倍に希釈）をビオチン化した UX003 と混合し、その混合物を非標識 UX003 でコーティングした 96 ウェルプレートに添加し、4°C で一晩培養する。培養後、ウェルを洗浄し、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）複合体含有溶液を添加する。最終洗浄後、3,3′,5,5′-テトラメチルベンジジン基質溶液（TMB）（通常、HRP により過酸化水素が加水分解されて酸素ラジカルが発生して酸化され、青色を発する色素体）を添加し、15 分間放置する。抗 UX003 抗体により架橋された標識 UX003 とビオチン標識 UX003 を定量する。抗 UX003 抗体が存在していなければ架橋は形成されず、バックグラウンドシグナルのみが検出される。

サルの血清中 ADA の測定は、非投与サルの血清 16 試料の平均値から算出したフローティングカ

ットポイントを用いて行った。この方法にはスクリーニングと滴定という 2 つの要素がある。正常血清プール試料を加えた 16 ウェルの応答の平均値+5 SD よりも大きい応答が得られた試料をすべて陽性と判定する。陽性シグナルが得られる限界を下回るまで陽性試料を希釈して、陽性を示す最終希釈倍率の逆数を抗体価としてもよい。サル血清中 ADA 測定法の分析法バリデーション報告書（[redacted]000786）を第 4.2.2.1 項に示す。バリデーション試験の概要を表 2.6.4.2.2.1 に示す。

表 2.6.4.2.2.1：　カニクイザルの血清中抗薬物抗体に関するバリデーション報告書の概要

バリデーションパラメータ	結果
併行精度	RSD の最大値：8.0%
試験間再現精度	RSD の最大値：7.7%
真度	盲検化した 20 試料中、すべての試料で正しい結果を得た
感度	ブランク試料の平均値 + 3 x SD = 0.089 OD_{450} 6 つのブランク試料のうち 1 つが陽性と判定された。 LLOQ = 1.56 ng/mL 抗 GUS モノクローナル抗体
範囲	検量線の範囲：1.56～800 ng/mL
直線適合性	r^2 = 1.000
試料の短期安定性、凍結融解安定性	2～8°C で 2 日間 凍結融解を 3 回繰り返す

出典：[redacted]-000786

前述したサル血清中 ADA 測定法で用いたブリッジング法と同一の方法で、ウサギ及びラット血清の ADA スクリーニング法を開発した。この測定法は、ウサギ及びラットを用いた生殖毒性試験での使用における適格性が確認されている。ウサギ及びラット血清中 rhGUS 抗体の定性的検出法の性能を検討する 2 種類の試験を実施した。カットポイントの設定に適した試料を特定するため、ウサギの未処理血清 15 試料及びラットの未処理血清 15 試料のプレスクリーニング試験を 2 回繰り返して行った。高度に非特異的な交差反応（OD 値 > 0.300）を示した試料を除外し、残りのウサギ 10 試料及びラット 8 試料を分析したところ、本測定法に適した感度（陽性反応約 5%、正常血清を加えたウェルの平均応答 + 1.5 SD と定義）を示した。カットオフ設定用に選択したウサギ 10 試料及びラット 8 試料を分注し、-80°C で保管した。

さらに、分注した各試料の一部を用いて、測定法の品質対照の調製に使用する陰性プール血清を調製した。2 つ目の分析では、カットオフ設定用に選択したウサギの未処理血清 10 試料及びラットの未処理血清 8 試料を用いて、この測定法の品質対照を分析した。その結果、すべての品質対照が測定法の判定基準に適合した。このバリデーション前試験の結果から、Method CB-「試験依頼者 169 に対するウサギ及びラット血清中 rhGUS 抗体の定性的検出」法は、生殖毒性試験での使用に適していることが示された。ラット及びウサギ血清中測定法の適格性報告書（[redacted]001662）を第 4.2.2.1 項に示し、バリデーション結果の概要を表 2.6.4.2.2.2 に示す。

DART 試験に用いる免疫原性分析法を [redacted]（[redacted]）でウサギ及びラット血清を用いて新たに開発し、バリデートした。バリデーションデータの概要を表 2.6.4.2.2.2 に示す。

UX003 の免疫原性は、ブリッジング電気化学発光法により、ラット及びウサギ血清中のアイソタイプを問わない総 ADA を定量することにより評価した。このブリッジング法では、抗体分子の二価性を利用する。[redacted]（[redacted]）の Streptavidin Gold 96 ウェルプレートを 3% BSA でブロッキング処理し、調製する。緩衝液中でビオチン化 UX003 とルテニウム化 UX003 の混合物を調製する。ウサギの血清分析では、被験試料及び対照試料を緩衝液中で 10 倍に希釈し、

ビオチン化 UX003 とルテニウム化 UX003 の混合物とともに前培養した後、ストレプトアビジンでコーティングした [redacted] プレートの複製ウェルに添加する。ラットの血清分析では、被験試料と対照試料を緩衝液中で 80 倍に希釈して前培養する。被験試料及び対照試料を室温で約 1 時間培養後にウェルを吸引洗浄し、各ウェルにリード緩衝液を添加する。プレートを短時間振盪させた後、[redacted] プレートリーダーで読み取る。抗 UX003 抗体により架橋されたプレートに結合したビオチン化 UX003 とルテニウム標識 UX003 を定量する。抗 UX003 抗体が存在していなければ架橋は形成されず、バックグラウンドシグナルのみが検出される。

スクリーニング試験で陽性シグナルが検出された試料は、確認試験で抗 UX003 抗体の特異性を調べる。確認試験の手順は、試料を UX003 と前培養する点を除けば、スクリーニング試験と同じである。前培養後、前述の方法で試料を分析する。UX003 を血清試料に添加したときに測定シグナルが妨害された場合（妨害レベルについては表 2.6.4.2.2.2 を参照）、試料は UX003 抗体陽性である。

その後、陽性試料の抗体価を測定し、試料から希釈系列を作成する。抗体価のカットポイントを上回るシグナルを示した最終陽性希釈倍率をもって抗体価とする。抗体価曲線分析でプラトー効果が認められなかったことから、抗体価のカットポイントは、ウサギ及びラットの血清分析におけるスクリーニングカットポイントと同一とする。バリデーション報告書（ラット血清：[redacted]-14-139-029-REP、ウサギ血清：[redacted]-14-139-027-REP）を第 4.2.2.1 項に示す。

表 2.6.4.2.2.2：　[redacted] で実施したラット及びウサギ血清中 ADA 測定法のバリデーション結果の概要

バリデーションパラメータ	ラット	ウサギ
最小希釈倍率（MRD）	1:80	1:10
スクリーニングカットポイント	正常ラットから採取した血清 30 試料を用いて試験を実施した。補正係数を用いたフローティングカットポイントを 22 RLU[a] とした。	正常ウサギから採取した血清 29 試料を用いて試験を実施した。補正係数を用いたフローティングカットポイントを 31 RLU[a] とした。
確認カットポイント	妨害率 39.7%	妨害率 42.5%
特異度	ラットの IgG 過剰産生は測定シグナルに影響しない。	ウサギの IgG 過剰産生は測定シグナルに影響しない。
感度	スクリーニング試験：18.5 ng/mL	スクリーニング試験：6.68 ng/mL、確認試験：16 ng/mL
選択性	未添加試料の 80%超が、スクリーニングカットポイント未満のシグナルを示した。添加試料の 80%超がカットポイントを超えるシグナルを示した。	未添加試料の 80%超が、スクリーニングカットポイント未満のシグナルを示した。添加試料の 80%超がカットポイントを超えるシグナルを示した。
溶血性評価	溶血試料への滴定による LPC[b] シグナルへの影響は認められなかった。	溶血試料への滴定による LPC[b] シグナルへの影響は認められなかった。
頑健性	[redacted] Streptavidin プレートの 2 ロット間の CV：1.7～10.7%	[redacted] Streptavidin プレートの 2 ロット間の CV：1.1～ 9.2%
薬物耐性	HPC[c] 及び MPC[d] は 20 µg/mL で、LPC は 1.25 µg/mL で耐性が認められた。	HPC[c] 及び MPC[d] は 20 µg/mL で耐性が認められた。LPC は 2.5 µg/mL で耐性が認められた。
プロゾーン（フック）効果	極めて高濃度（320 µg/mL）の陽性対照でプロゾーン（フック）効果が検出された。	プロゾーン（フック）効果は検出されなかった。

バリデーションパラメータ	ラット	ウサギ
滴定法の直線性	3 倍の希釈系列で HPC、MPC 及び LPC に対する試験を行った。抗体価は SPC 値に比例した。高濃度 > 中濃度 > 低濃度	3 倍の希釈系列で HPC、MPC 及び LPC に対する試験を行った。抗体価は SPC 値に比例した。高濃度 > 中濃度 > 低濃度
試験間再現精度	スクリーニング試験：CV 14.5～19.6% 確認試験：CV 0.1～10.6%	スクリーニング試験：CV 9.1～15.6% 確認試験：CV 0.7～7.8%
併行精度	CV 10.9～18.2%	CV 4.1～10.4%
短期安定性	室温で 23 時間 24 分、2～8°C で 47 時間 22 分安定であった。	室温で 23 時間 47 分、2～8°C で 47 時間 22 分安定であった。
凍結／融解安定性	-20 及び-80°C での凍結／融解サイクルを 9 回繰り返して安定であった。	-20 及び-80°C での凍結／融解サイクルを 9 回繰り返して安定であった。
バリデーション報告書番号	[redacted]-14-139-029-REP	[redacted]-14-139-027-REP

[a] RLU = 相対発光量

[b] LPC = 低濃度陽性対照

[c] HPC = 高濃度陽性対照

[d] MPC = 中濃度陽性対照

2.6.4.2.3　A280 によるタンパク質濃度の測定（投与液分析）

280 nm の紫外線吸光度から UX003 溶液中のタンパク質濃度を求める測定法を開発した。この測定法は Beer の法則に基づくものである。280 nm での吸光度測定及び定量的アミノ酸分析によるタンパク質濃度測定から算出した UX003 のモル吸光係数は、$6.34 \times 105\ M^{-1} \times cm^{-1}$ であった。この値を UX003 四量体の分子量 298863.6 Da/mol で除すと、質量吸光係数は $2.12\ (mg/mL)^{-1}\ cm^{-1}$ となる。したがって、この方法で得られるタンパク質濃度は、UX003 のタンパク質骨格と関連している。投与液分析に使用するためこの測定法をバリデートし、精度、真度及び直線性の判定基準すべてに適合した（[redacted]000668）。

表 2.6.4.2.3.1：　A280 によるタンパク質濃度測定法のバリデーション結果の概要

バリデーションパラメータ	結果
併行精度	CV 1.44～3.66 %
試験間再現精度	CV 0.89～7.5 %
希釈	8 希釈系列の CV 4.48%
直線性	濃度の線形回帰分析（予測濃度との比較）の結果は 0.9999。
真度	RE 1.0～8.4% CV 0.5～9.71%
感度及び定量限界	検出限界 OD = 0.003 定量下限 0.025 mg/mL、定量上限 2 mg/mL
バリデーション報告書	[redacted]-000668

2.6.4.2.4　非還元末端（NRE）法によるマウス血清中及び尿中 GAG 濃度の測定

血清中及び尿中 GAG 濃度（NRE 法）分析は、複数の異常なライソゾーム蓄積マーカーを選択的に検出するバリデートされていない Sensi-Pro 診断システムを用いて行う（Lawrence et al. 2012）。この方法では、GAG が酵素的に脱重合し、糖鎖の非還元末端から特有の単糖、二糖、三糖を遊離する。遊離した単糖及びオリゴ類には、MPS VII 型患者で認められるライソゾーム酵素欠損症

に特有の構造が見られる。この測定法では、蛍光マーカーを用いてオリゴ糖を誘導体化し、MS/MS 検出器を使用した超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）により、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸（CS）及びデルマタン硫酸（DS、CS 及び DS は結果をまとめて報告）を定量する。UPLC-MS/MS データを使用すれば、MPS VII 型患者に特有の遊離オリゴ糖の組成を定量的に分析することができる。

2.6.4.2.5　マウスの尿中総 GAG（uGAG）濃度の測定

uGAG は、バリデートされていないジメチルメチレンブルー（DMB）法を用いて測定した。簡潔に説明すると、5 µL のマウスの尿を 35 µL の水と混合した後、ギ酸／ギ酸ナトリウム緩衝液中で 1 mL の 35 µM DMB と混合した。試料をボルテックスミキサーで撹拌し、その直後に分光光度計（509 nm）で光学密度（OD）を測定した。uGAG の濃度は、10～40 µg/mL の DS の検量線と比較して測定した。クレアチニンは、5 µL のマウスの尿と 95 µL の水を 1 mL のアルカリ性ピクリン酸（ピクリン酸：0.2 M NaOH、1：1）と混合して測定した。室温で 15 分間培養後、490 nm で OD を測定した。クレアチニン濃度は、1～10 mg/dL のクレアチニンの検量線と比較して測定した。尿中 GAG 濃度は、クレアチニン 1 mg あたりの µg（µg/mg クレアチニン）で表して標準化した（Grubb et al. 2008a）。

2.6.4.3　吸収

2.6.4.3.1　単回投与後の PK

2.6.4.3.1.1　ラット（UX003-PC002）

UX003 の PK は、SD ラットを用いた単回投与毒性／TK 測定／中枢神経系（CNS）安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC002 試験）で評価した。この試験で評価した TK パラメータの要約を以下の表 2.6.4.3.1.1.1 に示す。約 8 週齢のラットに、事前に留置したカテーテルから UX003 を 2 時間単回静脈内持続投与した。この試験では、本試験群（1～3 群、雌雄各 6 例／群）及び TK 測定群（4～6 群、雌雄各 4 例／群）を設定した。投与群 1 及び 4（0 mg/kg、溶媒対照群）のラットには、カテーテルから調製緩衝液を 2 時間静脈内持続投与した。投与群 2 及び 5 では UX003 6 mg/kg、3 及び 6 群では UX003 20 mg/kg を前述と同様の方法で投与した。

TK 測定用の血清試料の採取は、実験 1 日の投与前、並びに投与後約 2 分、10 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間及び 8 時間時点で行った。

各投与群で投与開始後 2.03 時間で GUS 活性がピークに達した。GUS 活性曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max}）は、雌では用量比例的であったが、6～20 mg/kg 群の雄では用量比例値をわずかに上回っていた。雌の曝露量は雄に比べわずかに低かった。

表 2.6.4.3.1.1.1： SD ラットにおける TK パラメータ（UX003-PC002 試験）

投与群	投与量 (mg/kg)	性別	$AUC_{0\text{-}t}$ [a] (hr*U/mL)	C_{max} [a] (U/mL)	C_{max} [a] (nM)
4	0	M	1360 ± 56.8	161	0.138
		F	1060 ± 93.4	127	0.109
5	6	M	116,000 ± 26,100	82,900	71.2
		F	99,400 ± 1300	75,800	65.2
6	20	M	534,000 ± 46,000	418,000	359
		F	385,000 ± 18,100	294,000	253

AUC0-t：投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（線形台形法により算出）、C_{max}：最高血中濃度、[a] 平均値（± SE）

出典：UX003-PC002、表 2.1

2.6.4.3.1.2 ラット（UX003-PC005）

UX003 の PK は、雄 SD ラットを用いた単回投与試験（GLP 非適用、UX003-PC005 試験）でも評価した。UX003 又は Sly が用いた研究用グレードの rhGUS（ロット 43/44）を 2 時間単回静脈内持続投与した。本項では UX003 の PK データのみを示す。この試験では 3 群（投与群 1～3：雄ラット 5 例／群）を設定した。溶媒対照とした投与群 1（0 mg/kg）のラットには生理食塩水、投与群 2 のラットには約 2 mg/kg の rhGUS（UX003、ロット番号 [redacted]、原薬ロット [redacted]）、投与群 3 のラットには約 2 mg/kg の rhGUS（ロット番号 [redacted]）を投与した。薬物動態分析用の血清試料を、投与前、投与開始から 2、10、30、60 及び 120 分後、並びに投与終了（EOI）から 2、10、30、60、120、240、480 及び 1440 分（24 時間）後に採取した。この試験で評価した UX003 の PK パラメータを表 2.6.4.3.1.2.1 に示す。

表 2.6.4.3.1.2.1： 雄 SD ラットに UX003 を単回静脈内投与したときの各 PK パラメータの平均値（UX003-PC005）

	Cmax (U/mL)	Cmax (nM)	$AUC_{0\text{-}t}$ (h*U/mL)	$AUC_{0\text{-}inf}$ (h*U/mL)	半減期 (h)	クリアランス (min*U/mL)/(mg/kg)	Vz (U/mL)/(mg/kg)
UX003 2 mg/kg	14800	13.26	18700	18800	1.1	1.84^6	0.000181

出典：UX003-PC005、表のデータは付録 3 の表 3 から引用

2.6.4.3.2 反復投与後の PK

2.6.4.3.2.1 ラット（UX003-PC007）

SD ラットを用いた用量範囲設定発生毒性試験（UX003-PC007）で、UX003 の限定的な PK 評価を行った。TK 測定用の血清試料（最大 20 mg/kg 投与後）は、投与前（実験 6 日）及び投与終了時（実験 21 日）に採取した。試験デザイン及び TK データの詳細は第 2.6.6.6.1.1 項に示す。

2.6.4.3.2.2 ラット（UX003-PC008）

GLP 適用の受胎能／胚・胎児発生（EFD）毒性併合本試験で、交配前の雌雄 SD ラット及び雌では着床から主要器官形成期（着床から硬口蓋閉鎖）にかけて UX003 を反復静脈内投与した。

ラット（TK 測定用の雌雄各 3 例）を各投与群にランダムに割り付け、溶媒（調製緩衝液）又は

UX003 2、6 若しくは 20 mg/kg を、投与容量を 10 mL/kg で一定に保ちながら 30 分静脈内投与した。雄ラットでは全例に対し、週 1 回投与を交配前 4 週間と交配期 2 週間の計 6 週間行った（週 1 回投与を 7 回）。雌ラットでは、交配前 2 週間は週 1 回（週 1 回投与を 3 回）投与し、妊娠期には妊娠 6、9、12、15 及び 18 日に投与した。血清中 UX003 濃度をサンドウィッチ ELISA 法で測定した。

詳細な TK データは第 2.6.6.6.1.2 項に示す。全体として、UX003 の生体内分布に明らかな性差は認められず、反復投与では ADA が認められたことから、すべての UX003 投与群で血清中 UX003 濃度が顕著に低下し、雌雄ともに用量依存的に消失半減期が短縮したと考えられた。しかしながら、中用量及び高用量群の雄ラットでは、試験開始（実験 1 日）及び終了日（実験 29 日）における EOI 後 0.5 時間時点の UX003 濃度は同程度であると思われたことから、これらの用量群では ADA の影響が小さかったことが示された。妊娠ラットでは、ADA の存在により妊娠期間中は UX003 濃度が低下しており、いずれの用量群でもプールした胎児血は ADA 陽性であった。

2.6.4.3.2.3　ウサギ（UX003-PC006）

New Zealand White（NZW）ウサギを用いた用量範囲設定（DRF）発生毒性試験（UX003-PC006）で、UX003 の限定的な PK 評価を行った。TK 測定用の血清試料（最大 20 mg/kg 投与後）は、投与前（妊娠 6 日）及び投与終了時（妊娠 29 日）に採取した。試験デザイン及び TK データの詳細は第 2.6.6.6.1.3 項に示す。

2.6.4.3.2.4　ウサギ（UX003-PC009）

NZW ウサギを用いた胚・胎児発生試験の TK 群で、主要器官形成期（着床から硬口蓋閉鎖まで）に UX003 を反復静脈内投与したときの PK を評価した。

ウサギ（TK 測定用の雌雄各 3 例）を各投与群にランダムに割り付け、溶媒（調製緩衝液）又は UX003 2、6 若しくは 20 mg/kg を、投与容量を 10 mL/kg で一定に保ちながら 30 分静脈内投与した。妊娠例では、妊娠 6、9、12、15 及び 18 日に投与した。

詳細な TK データは第 2.6.6.6.1.4 項に示す。UX003 の最高血清中濃度（C_{max}）は、対照群を除くすべての投与群で経時的に低下した。経時的な C_{max} の低下から、血清中に ADA が生した可能性が示唆された。UX003 投与群のみ、妊娠 18 及び 29 日（最終）の母体及び胎児の試料中に ADA が認められた。

2.6.4.3.2.5　サル（UX003-PC003）

カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性及び心血管系安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC003）で UX003 の PK を評価した。若齢サル（1.5～2 歳齢）に、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。投与群 1（0 mg/kg）のサルには、調製緩衝液の静脈内持続投与（カテーテルから 2 時間投与）を隔週で 26 週間行った。

TK 測定用の血清試料の採取は、実験 1 日及び最終投与日（実験 169 日）の投与前並びに投与後約 2 分、10 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間及び 8 時間時点で行った。さらに、実験 29、57、85、113 及び 141 日の投与終了（EOI）から 30 分後にも TK 測定用の血清試料を採取した。回復期間終了時（実験 211 日）にも TK 測定用の血清試料を採取した。

試験デザインの詳細は第 2.6.6.3.2 項に示す。6 ヵ月定期報告の最終報告書の実験 1 日及び実験 169 日の PK データを以下の表 2.6.4.3.2.5.1 に示す。

表 2.6.4.3.2.5.1：　カニクイザルを用いた試験で評価した PK パラメータ（UX003-PC003 試験）

実験 1 日

投与群	投与量 (mg/kg)	性別	AUC_{0-t} (hr*U/mL)	T_{max} [a] (hr)	C_{max} (U/mL)	C_{max} (nM)
1	0	雌	701 ± 169	2.17 (2.03 - 10.0)	84.5 ± 16.4	0.073 ± 0.014
		雄	721 ± 519	4.00 (2.17 - 10.0)	89.1 ± 59.8	0.077 ± 0.051
2	2	雌	40,100 ± 1750	2.03 (2.03 - 2.03)	23,700 ± 1050	20.4 ± 0.90
		雄	33,300 ± 5720	2.03 (2.03 - 2.03)	17,400 ± 1270	15.0 ± 1.09
3	6	雌	236,000 ± 54,600	2.03 (2.03 - 2.03)	146,000 ±28,900	126 ± 24.9
		雄	152,000 ± 8060	2.03 (2.03 - 2.17)	95,800 ±22,000	82.4 ± 18.9
4	20	雌	1,620,000 ± 255,000	2.03 (2.03 - 2.03)	910,000 ± 104,000	783 ± 89.4
		雄	1,810,000 ± 355,000	2.03 (2.03 - 2.17)	1,050,000 ± 119,000	903 ± 102

出典：UX003-PC003 試験、表のデータは付録 14 のテキストテーブル 5 から引用

実験 169 日

投与群	投与量 (mg/kg)	性別	AUC_{0-t} (hr*U/mL)	T_{max} [a] (hr)	C_{max} (U/mL)	C_{max} (nM)	R_{AUC} [b]
1	0	雌	834 ± 313	10.0 (2.03 - 10.0)	96.4 ± 34.4	0.083 ± 0.03	1.16 ± 0.202
		雄	617 ± 332	2.50 (2.17 - 6.00)	77.6 ± 39.1	0.067 ± 0.034	0.959 ± 0.221
2	2	雌	34,700 ± 13,700	2.03 (2.03 - 2.03)	25,500 ± 9220	21.9 ± 7.93	0.856 ± 0.317
		雄	63,400 ± 33,900	2.03 (2.03 - 2.03)	44,000 ± 19,100	37.8 ± 16.4	1.84 ± 0.706
3	6	雌	465,000 ± 206,000	2.03 (2.03 - 2.03)	256,000 ± 74,800	220.0 ± 64.3	1.99 ± 0.903
		雄	278,000 ± 26,200	2.03 (2.03 - 2.03)	174,000 ± 16,300	150.0 ± 14.0	1.83 ± 0.243
4	20	雌	3,460,000 ± 591,000	2.03 (2.03- 2.17)	1,630,000 ± 131,000	1400 ± 113	2.21 ± 0.710
		雄	3,980,000 ± 821,000	2.03 (2.03 - 2.17)	1,780,000 ± 168,000	1530 ± 144	2.23 ± 0.541

AUC_{0-t}：投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（線形台形法により算出）、$AUC_{0-\infty}$：投与後 0 時間から無限大までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血中濃度

[a] 中央値(最小値-最大値)

[b] R_{AUC} = 実験 169 日の AUC_{0-t}/実験 1 日の AUC_{0-t}

出典：UX003-PC003 試験、表のデータは付録 14 のテキストテーブル 6 から引用

GUS 活性は投与開始後 2.03 時間でピークに達した。雌雄とも GUS 活性曝露量（AUC_{0-t} 及び C_{max}）が用量比例値を上回った。実験 169 日の曝露量は概して実験 1 日の曝露量の 2 倍となり、AUC_{0-t} の蓄積係数は 0.856～2.23 であった。UX003 の曝露量に顕著な性差は認められなかった。

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　MPS VII 型マウスを用いた生体内分布試験（UX003-PC001）

UX003 の生体内分布は、第 2.6.2.3.2.1 項で述べたとおり、MPS VII 型マウス（UX003-PC001）の組織抽出物の酵素活性測定により評価した。

ライソゾーム酵素のヨウ素化に伴うアルカリ性条件により酵素が変性することから、酵素分析法は放射標識酵素試験よりも優れている（社内資料）。

MPS VII/E540A$_{TG}$マウス（6 例／群、試験開始時 10～12 週齢、剖検時 18～20 週齢）に、0（溶媒対照：PBS）、0.1、0.25、4 又は 20 mg/kg の用量で UX003 を週 1 回 8 週間静脈内投与した（計 8 回投与）。この試験では、uGAG のベースライン値を測定するため、開始時に尿試料を採取した。8 週間の投与終了後 48 及び 144 時間時点で尿を採取した。8 週間の投与の最終投与から 48 時間後に、回復群のマウスを除き、すべてのマウスを安楽死させ、組織試料を採取した。回復群（6 例／群、4 mg/kg 投与）には他の群と同様の試験投与を行うが、最終投与から 48 時間及び 144 時間後の uGAG 蓄積を評価するため、最終投与から 1 週間後に安楽死させた。全例から採取した組織試料（肋骨、肺、肝臓、腎臓、脳、脾臓、心臓及び四頭筋）を用いて、[redacted]の獣医病理学者が、細胞質内の空胞変性を指標とするライソゾーム蓄積及び酵素活性を盲検下で評価、解析した。

予想どおり、rhGUS 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はるか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、脾臓及び副腎で活性値（U/mg）が最も高く、脳組織が最も低かった。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。組織試料は灌流することなく処理したため、全投与群の組織中の活性値は、血清中の活性値とある程度関連していると考えられる。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。さらに、6 例の野生型 C57 BL/6 マウス（雌雄各 3 例）からも組織を採取し、ERT 組織と同様の方法で処理した。組織抽出物の GUS 及びタンパク質濃度を測定した。GUS 濃度に大きな性差が認められなかったことから、各組織のデータは雌雄でまとめて 1 つの値とした（以下の表 2.6.4.4.1.1 及び表 2.6.4.4.1.2）。MPS VII 型マウスに UX003 を投与した結果、ほとんどの組織で GUS 濃度が用量依存的に増加した。

表 2.6.4.4.1.1：　UX003 による 8 週間の ERT 後の rhGUS 活性（U/mg）

組織	UX003 の用量 (mg/kg)				
	0	1	4	20	WT B6 マウス
副腎	0.18	96	303	1131	267
肝臓	0.01	86	285	2848	221
脾臓	0.01	120	462	1948	398
脳	0.02	0.1	0.2	0.7	17
肺	0.02	5.8	17	58	61
精巣	0.02	0.6	4.4	54	81
骨	0.04	20	29	25	149
筋肉	0.00	1.0	3.5	4.2	4.39
胸腺	0.13	1.2	4.1	22	203
卵巣／子宮	0.04	2.8	4.8	52	166
甲状腺	0.07	2.0	5.1	32	64
心臓	0.14	1.9	13	63	7.0
腎臓	0.02	1.9	6.7	103	229
前立腺	0.06	0.5	3.2	11	180
血清 (u/mL)	0.35	0.7	1.9	13	45.3

出典：UX003-PC001 試験報告書、表 1

表 2.6.4.4.1.2：　UX003 による 8 週間の ERT 後の rhGUS 活性（正常値に対する比率）

組織	UX003 の用量 (mg/kg)				
	0	1	4	20	WT B6 マウス (U/mg)
副腎	0.07	36.0	113.5	424	267
肝臓	0.00	38.9	129.0	1289	221
脾臓	0.00	30.2	116.1	489	398
脳	0.12	0.6	1.2	4	17
肺	0.03	9.5	27.9	95	61
精巣	0.02	0.7	5.4	67	81
骨	0.03	13.4	19.5	17	149
筋肉	0.00	22.8	79.7	96	4.39
胸腺	0.06	0.6	2.0	11	203
卵巣／子宮	0.02	1.7	2.9	31	166
甲状腺	0.11	3.1	8.0	50	64
心臓	2.00	27.1	185.7	900	7.0
腎臓	0.01	0.8	2.9	45	229
前立腺	0.03	0.3	1.8	6	180
血清 (u/mL)	0.77	1.5	4.2	29	45.3

出典：UX003-PC001 試験報告書、表 2

UX003 がほとんどの組織に分布していたことを示す他の所見として、検査した組織及び組織成分のほとんどで細胞質内の空胞変性が減少していた。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。肝臓や脾臓など、組織マクロファージが存在する主要器官の軟部組織では低用量でも蓄積の減少が認められたが、低灌流組織では高用量投与が必要であった。

2.6.4.4.2　雄 SD ラットにおける 2 時間の単回静脈内持続投与後の UX003 の組織分布（UX003-PC005）

第 2.6.4.3.1.2 項で述べたとおり、UX003-PC005 試験では、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、脳及び肺における UX003 の組織分布プロファイルも評価した。剖検時に組織を採取し、各組織から組織抽出物を作製して GUS 及びタンパク質濃度を測定した。表 2.6.4.4.2.1 に示すとおり、UX003 を投与したラットの組織中 GUS 濃度は、ほとんどの組織で生理食塩水を投与したラットに比べ高かった。

灌流が豊富で、ライソゾーム酵素を十分に取り込む特徴がある肝臓や脾臓などでは GUS 濃度が最も高かった。低灌流組織（脳など）のデータは、特に内因性の GUS 活性が背景にある場合は解釈が難しくなる。しかしながら、MPS VII 型欠損マウスを用いた各種試験の結果から、これらの組織でも一定量の GUS は取り込まれると考えられる。

表 2.6.4.4.2.1：　雄 SD ラットにおける UX003 の単回静脈内投与後の組織中の平均 GUS 濃度（U/mg tissue）（UX003-PC005）

	対照（生理食塩水）	UX003 (2 mg/kg)
肝臓	1370.8	2428.8
脾臓	1775.8	2343.4
心臓	48.2	70.4
腎臓	278.6	291.2
脳	27.2	28.2
肺	307.8	337.4

出典：表のデータは UX003-PC005 の付録 2 から引用

2.6.4.4.3　公表済みの MPS VII 型モデルマウスを用いた遺伝子組換え GUS の生体内分布試験

MPS VII 型モデルマウスを用いた多くの試験で、rmGUS 及び rhGUS が多くの GUS 欠損組織に分布することが示されている。これらの試験の要約を以下に示し、主要試験の詳細を第 2.6.2.3 項に示す。

rmGUS を静脈内投与したときの組織分布、並びに rmGUS の投与による病理組織及びライソゾーム蓄積への影響は、5 週齢時に 28,000 U を単回静脈内投与、又は 0 日齢から 28,000 U を週 1 回で 6 週間静脈内投与した MPS VII 型マウスで評価した（Sands et al. 1994）。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。単回投与後の GUS 活性は、正常 GUS 活性の 35%（肝臓）、3～5%（脾臓）、3～5%（腎臓）、1%（脳）であった。週 1 回投与を 6 回行ったマウスの組織でも同程度の GUS 活性が認められたが、脳では 7%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。この試験の詳細な要約は第 2.6.2.3.3.1 項に示す。

Vogler は、新生児の MPS VII 型マウスに rhGUS 3.5 mg/kg（28,000 U）を単回静脈内投与したときの組織分布を評価している（Vogler et al. 1993）。投与 1 時間後の GUS 活性は、正常活性値の 31%にとどまった脳を除き、評価したすべての器官で正常値と同等又はそれ以上であった。骨、脳、心臓、固定組織マクロファージなど、MPS VII 型で病変を来す主な部位で組織化学的に GUS が検出された。各種器官における rhGUS の半減期は 1.5～4.5 日であった。

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、脳及びその他の組織への送達の障壁を克服することができるかどうかを検討するため、rhGUS の組織分布が評価された。マウスに各種用法・用量（最大 20 mg/kg）で rhGUS を静脈内投与し、最終投与から 7 日後に組織中の rhGUS 活性を測定した。最終投与から 1 週間後、脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、骨、筋肉及び眼で、用量依存的な rhGUS の増加が認められた。この試験の詳細な要約は第 2.6.2.3.2.2 項に示す。

rhGUS の静脈内ボーラス投与直後の生体内分布を評価した試験では、MPS VII 型マウスを用いて rhGUS 4 mg/kg を尾静脈内に持続投与した（Grubb et al. 2008a）。投与後 48 時間時点で組織中の rhGUS 活性を測定した。脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺、筋肉、骨及び眼では、野生型マウスで認められた活性値の 1.4～482%に相当する GUS 活性が検出された（表 2.6.4.4.3.1）。

表 2.6.4.4.3.1：　rhGUS 投与 48 時間後の組織中 GUS 活性（U/mg、平均値 ±SD）

組織	WT B6 の値 n = 4*	MPS VII 型 + rhGUS n = 2†	WT に対する比率
脳	16.7 ± 2	0.23 ± 0.005	1.4
肝臓	185 ± 11.9	892 ± 45.5	482
脾臓	301 ± 26.6	558 ± 54	185
心臓	20.8 + 12.5	13.0 ± 1.8	63
腎臓	108 ± 7.5	11.9 ± 0.19	11
肺	NDφ	5.1 ± 0.4	--
筋肉	4.95 ± 1.80	1.2 ± 0.07	24
骨 + 骨髄	161 ± 35	75.6 ± 17	47
眼	4.88 ± 0.68	0.90±0.52	18

* Vogler et al. (2005)のデータ
† 平均値 ± 範囲で示した値
φ 未実施
出典：（Grubb et al. 2008a）、表 3

Sly の試験では、9 例の MPS VII/E540A$_{TG}$ マウスに rhGUS 0.4、1.5 又は 6.4 mg/kg を投与し（各用量 3 例）、その後採取した複数の組織で rhGUS 活性を評価した（Sly et al. 2006）。単回静脈内ボーラス投与から 24 時間後、脳、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺、筋肉及び骨で、用量依存的に GUS 活性が認められた（表 2.6.4.4.3.2）。

表 2.6.4.4.3.2：　rhGUS 投与 24 時間後の組織中 GUS 活性（U/mg）

組織*	用量 (mg/kg)	組織中濃度 $MR^{+/+}$
脳	0.4	0.10 ± 0.05
	1.6	0.14 ± 0.04
	5.4	0.34 ± 0.17
肝臓	0.4	87.6± 12.4
	1.6	381 ± 20.3
	6.4	1,577 ±211
脾臓	0.4	19.9 ±2.2
	1.6	145 ± 15
	6.4	890 ± 298
心臓	0.4	2.9 ± 1.2
	1.6	6.8 ±2.9
	6.4	27.5 ± 6.3
腎臓	0.4	3.1 ± 1.5
	1.6	8.2 ± 3.2
	6.4	19.9 ± 3.9
肺	0.4	4.0 ± 1.4
	1.6	10.2 ± 5
	6.4	33.2 ± 15
筋肉	0.4	0.57 ± 0.19
	1.6	1.02 ± 0.54
	6.4	2.70 ±1.77
骨（骨髄を含む）	0.4	8.4 ± 6.1
	1.6	35.0 ± 24
	6.4	198 ± 137
血漿 (U/mL)	0.4	1.41 ± 0.51
	1.6	7.75 ± 4.25
	6.4	36.6 ± 26.5

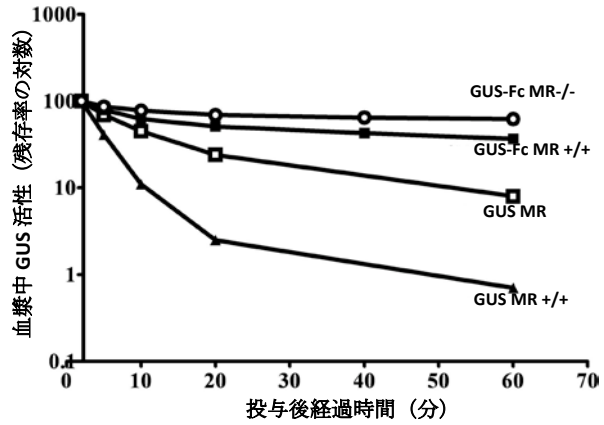
* 灌流して血中の酵素を除去した後で組織を採取した。

出典：Sly et al. 2006、表 2

2.6.4.4.4　胎盤通過性－マウスを用いた rhGUS の単回投与試験

MPS VII 型妊娠マウスに 380,000 U（3～5 mg/kg）を静脈内投与し、rhGUS の PK プロファイル及び rhGUS-Fc 融合キメラタンパク質を評価した（Grubb et al. 2008b）。この試験の目的は、GUS 活性の血漿クリアランスにおけるマンノース受容体（MR）の役割を評価することであった。さらに、rhGUS-Fc が胎児性 Fc 受容体（FcRn）を介して胎盤を通過し、胎児の循環血中に移行するかどうかも評価した。MPS VII 型 $MR^{+/+}$及び $MR^{-/-}$マウスに rhGUS を静脈内持続投与したときの GUS 及び Fc-GUS の血漿クリアランスを図 2.6.4.4.4.1 に示す。

図 2.6.4.4.4.1：　MPS VII 型 MR+/+及び MR-/-マウスに rhGUS を静脈内持続投与したときの GUS 及び GUS-Fc 活性の血漿クリアランス



出典：Grubb et al. 2008b、図 2

$MR^{+/+}$マウスに GUS を投与したときの血漿からの消失半減期（$t_{1/2}$）は 1.7 分であった。$MR^{-/-}$マウスでは、MR がクリアランスに関与しないため、血漿からのクリアランスはかなり遅かった（$t_{1/2}$ = 19 分）。投与後の GUS-Fc（GUS と免疫グロブリン Fc 受容体の融合タンパク質）のクリアランスは、$MR^{+/+}$マウスでも $MR^{-/-}$マウスでも GUS のクリアランスに比べかなり遅かった（$t_{1/2}$ はそれぞれ 36 分及び 72 分）。これらのクリアランス速度は、マウスへのボーラス投与時の酵素の高いピーク値に関連している。

MPS VII 型 $MR^{+/+}$及び $MR^{-/-}$マウスに、GUS、GUS-Fs 又は PerT-GUS（マンノース受容体又はマンノース 6 リン酸受容体では細胞に取り込むことができない過ヨウ素酸処理した rhGUS）を静脈内投与したときの血漿中 GUS 活性の胎盤通過を表 2.6.4.4.4.1 に示す。

表 2.6.4.4.4.1：　胎生 17 及び 18 日に各種投与を行った複数の母動物から出生した MPS VII 型新生児における血漿中 GUS 活性

条件	母動物の合計数	新生児の合計数	生後 1 日目の新生児における血漿中 GUS（U/mL）
MR+/+ + PBS	2	2	2.5 ± 2.5
MR+/+ + GUS	2	6	4.5 ± 4.8
MR+/+ + GUS-Fc	2	10	2166 ± 802
MR-/- + PBS	2	6	2.4 ± 1.4
MR-/- + GUS	1	6	2.93 ± 0.99
MR-/- + GUS-Fc	7	17	4927 ± 2110
MR-/- + PerT-GUS	2	8	15 ± 8.7

出典：Grubb et al. 2008b、表 2

上記の結果から、GUS-Fc を投与した $MR^{+/+}$及び $MR^{-/-}$妊娠マウスから、血漿中 GUS 活性の高い MPS VII 型$^{-/-}$の児が誕生したことが示された。血漿中濃度の平均値はそれぞれ 2,166 及び 4,927 U/mL であった。一方、タグのない GUS を投与した母動物の新生児の血漿中 GUS 濃度は、緩衝液のみを投与した母動物の MPS VII 型$^{-/-}$新生児で認められた残存濃度（2.4～4.8 U/mL）を上回らず低値であった。したがって、タグのない GUS の胎盤通過は基本的に認められなかった。妊娠例の循環血中に GUS-Fc がとどまる期間が長いことのみに起因して胎盤通過が生じるという可能性を除外するため、循環血中にとどまる時間が長い（$t_{1/2}$＝約 18 時間）PerT-GUS を投与した。これらの母動物の MPS VII 型$^{-/-}$新生児でも、血漿中の GUS 量はごくわずかであった。したがって、胎盤通過はキメラ GUS-Fc の Fc タグに依存していることが認められた。

2.6.4.5　代謝

代謝に関する試験は実施していない。ICH S6（R1）ガイダンスによれば、バイオテクノロジー応用医薬品の期待される代謝は、小さなペプチド及び各アミノ酸への分解である。したがって、その代謝経路は一般によく分かっている。一般の医薬品で実施される従来の生体内変化を調べる試験は必要ない。

2.6.4.6　排泄

排泄又は物質収支に関する試験は実施していない。UX003 の分子量（約 332 kDa のホモ四量体）を考えると、腎排泄の可能性は低いと考えられる。UX003 異化経路の最終代謝産物（アミノ酸）は、内因性アミノ酸の細胞内プールに取り込まれ、一部は排泄されると考えられる。

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

UX003 は内因性ヒト酵素の遺伝子組換え型であり、チトクローム P450 酵素による代謝を受けないことから、P450 が関与する薬物相互作用は生じないと考えられる。したがって、薬物動態学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

2.6.4.9　考察及び結論

UX003 を静脈内投与したときの非臨床の PK は、ラットを用いた単回投与毒性／TK／中枢神経系安全性薬理併合試験（GLP 適用）、カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性／心血管系安

全性薬理併合試験（GLP 適用）並びに SD ラット及び NZW ウサギを用いた生殖発生毒性試験などの毒性試験の一部として測定した。雄 SD ラットにおける UX003 の PK 及び組織分布プロファイルは、GLP 非適用の単回投与試験で詳細に評価した（UX003-PC005）。非臨床試験で用いた生物学的分析法は、ラット、ウサギ及びサルの血清中 GUS 活性及び抗薬物抗体（ADA）の測定で用いる妥当性が確認された分析法、投与液分析で用いる A280 法及び MPS VII 型マウスを用いる GLP 非適用試験において NRE 法（血清及び尿）及びジメチルメチレンブルー（DMB）法（尿）で測定した GAG 値の分析に用いる妥当性が確認されていない分析法であった。

ラットの単回投与試験（GLP 適用、UX003-PC002）では、各投与群で投与開始後 2.03 時間で GUS 活性がピークに達した。GUS 活性曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max}）は、雌では用量比例的であったが、6～20 mg/kg 群の雄では用量比例値をわずかに上回っていた。雌の曝露量は雄に比べわずかに低かった。20 mg/kg 群（最高用量群）の雄雌ラットの C_{max} はそれぞれ推定 359 nM 及び 253 nM であった。雄ラットの単回投与（2 mg/kg）PK 試験（GLP 非適用、UX003-PC005）における GUS 活性の平均 C_{max} は 14,800 U/mL（13.26 nM）、平均 $AUC_{0\text{-}t}$ は 18,700 h*U/mL、平均 $AUC_{0\text{-}inf}$ は 18800 h*U/mL であった。消失半減期（$t_{1/2}$）の平均値は 1.1 時間、クリアランスは 1.84 $\times 10^{-6}$ (min*U/mL)/(mg/kg)、Vz は 0.000181 (U/mL)/(mg/kg)であった。

カニクイザルの 26 週間反復投与毒性及び心血管系安全性薬理併合試験（GLP 適用、UX003-PC003）で実験 1 及び 169 日の投与後に実施した TK 測定の結果、各投与群の GUS 活性は投与開始後 2.03 時間でピークに達した。GUS 活性曝露量（$AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max}）は用量依存的に増加したが、2～20 mg/kg 群では雌雄ともに用量比例値を上回っていた。実験 169 日の曝露量は概して実験 1 日の曝露量の 2 倍となり、$AUC_{0\text{-}t}$ の蓄積係数は 0.856～2.23 であった。UX003 の曝露量に顕著な性差は認められなかった。実験 169 日における 20 mg/kg/dose 群（最高用量群）の雄雌サルの C_{max} は、それぞれ推定で 1,530 nM 及び 1,400 nM であった。

SD ラット及び NZW ウサギの DRF 試験及び静脈内投与による DART 試験（SD ラット：UX003-PC007 及び UX003-PC008、NZW ウサギ：UX003-PC006 及び UX003-PC009）では、ラットにおいて UX003 の生体内分布に明らかな性差は認められず、反復投与では ADA が認められたことから、特に低用量群では血清中 UX003 濃度が顕著に低下し、雌雄ともに用量依存的に消失半減期が短縮したと考えられた。しかしながら、中用量及び高用量群の雄ラットでは、試験開始（実験 1 日）及び終了日（実験 29 日）における投与終了（EOI）後 0.5 時間時点の UX003 濃度は同程度であると思われたことから、これらの用量群では ADA の影響が小さかったことが示された。妊娠ラットでは、ADA の存在により妊娠期間中は UX003 濃度が低下しており、いずれの用量群でもプールした胎児血は ADA 陽性であった。これらの試験では ADA が検出され、妊娠動物の UX003 曝露量に影響を及ぼしたと考えられた。

MPS VII 型モデルマウスを用いた多くの試験では、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、肺などの多くの GAG 蓄積組織に分布することが確認されている（Vogler et al. 2005）、（Grubb et al. 2008a）、（Sly et al. 2006）、（UX003-PC005 試験）。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）。

全体的に見て、UX003 は酵素補充療法治療薬に典型的な PK プロファイル（つまり血清中消失半減期が短い）を示すが、組織分布が認められ、組織内の消失半減期は長い。これらのデータと線維芽細胞における取り込みデータを合わせると、臨床での隔週投与は実施可能である。

2.6.4.10 参考文献

Grubb JH, Vogler C, Levy B, Galvin N, Tan Y, Sly WS. 2008a. "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.

Grubb JH, Vogler C, Tan Y, Shah GN, MacRae AF, Sly WS. 2008b. "Infused Fc- tagged beta-glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105 (24):8375- 8380.

Lawrence R, Brown JR, Al-Mafraji K, Lamanna WC, Beitel JR, Boons GJ, Esko JD, Crawford BE. 2012. "Disease-specific non-reducing end carbohydrate biomarkers for mucopolysaccharidoses." *Nat Chem Biol* 8 (2):197-204.

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, 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 M, Higgins A, Levy B, Grubb J, Birkenmeier EH, Sly WS. 1993. "Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in the newborn mucopolysaccharidosis type VII mouse." *Pediatr Res* 34 (6):837-40.

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）
2.6.5　薬物動態試験概要表

アミカス・セラピューティクス株式会社

Table of Contents

2.6.5 PHARMACOKINETIC TABULATED SUMMARIES 3
2.6.5.1 Pharmacokinetics Overview 3
2.6.5.3 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose 6
2.6.5.5 Pharmacokinetics: Organ Distribution 8
2.6.5.6 List of References 11

List of Abbreviations

AUC	area under the plasma concentration-time curve
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to the time of last measurable concentration
C_{max}	maximum plasma concentration
CTD	common technical document
GLP	Good Laboratory Practice
GUS	beta-glucuronidase
gus^{mps}/gus^{mps}	MPS VII Mouse
h, hr	hour(s)
IV, i.v.	Intravenous(ly)
mg/kg	milligrams per kilogram
MPS VII	mucopolysaccharidosis type VII, Sly Syndrome (beta-glucuronidase deficiency)
PBS	phosphate buffered saline
rhGUS	recombinant human beta-glucuronidase; rh-β-glucuronidase
rmGUS	recombinant murine beta-glucuronidase
T_{max}	time to maximum plasma concentration
USP	United States Pharmacopeia
UX003	recombinant human beta-glucuronidase; rh-beta-glucuronidase; rhGUS

2.6.5 Pharmacokinetic Tabulated Summaries

2.6.5.1 Pharmacokinetics Overview

Table 2.6.5.1.1: Pharmacokinetics Overview
Test Article: UX003[a]/rhGUS

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Absorption					
Single dose – rat	Sprague Dawley rat	IV[b] infusion	[redacted]	UX003-PC002	Module 4.2.2.2
Single dose – rat [c]	Sprague Dawley rat	IV[b] infusion, 2 hrs	[redacted], [redacted], ([redacted]	UX003-PC005 [c] ([redacted] 13D0152S-X01)	Module 4.2.2.2
Distribution					
Tissue distribution - mouse	MPS7 Mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV[b] administration (slow bolus), once weekly for 8 weeks	[redacted]	UX003-PC001	Module 4.2.2.3
Tissue distribution - rat [c]	Sprague Dawley rat	IV[b]	[redacted] ([redacted]	UX003-PC005 [c] ([redacted] 13D0152S-X01)	Module 4.2.2.3
Tissue distribution (brain) - mouse	MPS7 mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV[b]	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	(Vogler et al. 2005)	Module 4.3

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Tissue distribution - mouse (newborn and mature females)	MPS7 mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV[b]	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	(Grubb, Vogler, Levy, et al. 2008)	Module 4.3
Tissue distribution - mouse	MPS7 mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV[b]	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	(Sly et al. 2006)	Module 4.3
Placental Transfer – mouse (newborn and mature females)	MPS7 mouse (MPS VII/E540A^{TG})	IV[b]	St. Louis University School of Medicine, St. Louis, MO	(Grubb, Vogler, Tan, et al. 2008)	Module 4.3
Metabolism					
No relevant metabolism studies to report					
Excretion					
No relevant excretion studies to report					
Pharmacokinetic Drug Interactions					
No relevant drug interaction studies to report					

[a] Animals in studies listed were dosed with UX003 except for study UX003-PC005 and the published studies in the MPS VII mouse, in which animals were dosed with rhGUS

[b] IV=Intravenous

[c] Animals in this study received UX003 (Lot # [redacted]) or rhGUS (Lot # [redacted]).

Table 2.6.5.1.2: Pharmacokinetics Overview

Test Article: rmGUS[a]

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Absorption					
No relevant absorption studies conducted					
Distribution					
Tissue distribution – mouse (newborn)	MPS7 mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV[b]	St. Louis University N/School of Medicine, St. Louis, MO	(Vogler et al. 1993)	Module 4.3
Tissue distribution – mouse (newborn & 5 weeks)	MPS7 mouse (gus^{mps}/gus^{mps})	IV[b]	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	(Sands et al. 1994)	Module 4.3
Metabolism					
No relevant metabolism studies to report					
Excretion					
No relevant excretion studies to report					
Pharmacokinetic Drug Interactions					
No relevant drug interaction studies to report					

[a] rmGUS= Recombinant mouse GUS
[b] IV=Intravenous

2.6.5.3 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose

Table 2.6.5.3.1: Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose

Test Article: UX003

Location in CTD: Module 4.2.2.2
Study number: UX003-PC002[a]

Species	**Rat**		
Group #	**#4**	**#5**	**#6**
Gender (M/F) / Number of Animals	4M/4F	4M/4F	4M/4F
Feeding Condition	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (Saline)		
Method of Administration	IV[b] infusion, 2 hrs	IV[b] infusion, 2 hrs	IV[b] infusion, 2 hrs
Dose (mg/kg)	0	6	20
Sample	Serum (**Timepoints:** Predose, 2 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min , 240 min and 480 min post end of infusion.)		
Assay	Beta-glucuronidase Activity	Beta-glucuronidase Activity	Beta-glucuronidase Activity
PK Parameters			
Group mean AUC_{0-t} (hr*U/mL)	1360 ± 56.8/1060 ± 93.4	116,000 ± 26,100/99,400 ± 1300	534,000 ± 46,000/385,000 ± 18,100
Group mean C_{max} (U/mL)	161/127	82,900/75,800	418,000/294,000
Tmax (h)	4/0	2.03/2.03	2.03/2.03

[a] This study was conducted under GLP
[b] IV=Intravenous

Table 2.6.5.3.2: Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose

Test Article: UX003

Location in CTD: Module 4.2.2.2
Study number: UX003-PC005[a]

Species	**Rat**		
Group #	**#1**	**#2[b]**	**#3[b]**
Gender (M/F) / Number of Animals	5M	5M	5M
Feeding Condition	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	0.9% Sodium Chloride for Injection, USP (Saline)		
Method of Administration	IV[c] infusion, 2 hrs	IV[c] infusion, 2 hrs	IV[c] infusion, 2 hrs
Dose (mg/kg)	0	~2 [d]	~2 [d]
Sample	Serum (**Timepoints:** Predose, 2 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min post infusion start; and 2 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min, and 1440 min (24 hrs) post end of infusion.)		
Assay	Beta-glucuronidase Activity	Beta-glucuronidase Activity	Beta-glucuronidase Activity
PK Parameters			
Group mean AUC_{0-t} (hr*U/mL); (CV%)	N/A	18,700 (15.7)	5,580 (19.9)
Group mean C_{max} (U/mL); (CV%)	N/A	14,800 (10.4)	4,300 (44)
Tmax (h); (CV%)	N/A	0	0.0133 (136.9)
Half-life (h); (CV%)	N/A	1.1 (50.5)	0.967 (27.8)

[a] This study was not conducted under GLP
[b] Group #2 received UX003 (Lot#) [redacted], Group #3 received rhGUS (Lot [redacted])
[c] IV=Intravenous
[d] Nominal total dose (per kg body weight) was based on the average weight of animals in each group.

2.6.5.5 Pharmacokinetics: Organ Distribution Table

2.6.5.5.1: Pharmacokinetics: Organ Distribution

Test Article: UX003

Location in CTD: Module 4.2.2.3
Study number: UX003-PC001[a]

Species	**Mice**				
Gender (M/F) / Number of Animals	6 mice per group[b]; Group 1: 3M and 3F; Group 2: 3M and 3F; Group 3: 4M and 2F; Group,4: 4M and 2F ; Group 5: 4M and 2F ; Group 6: 5M and 1F ; Group 7: 4M and 2F				
Feeding Condition	Fed				
Vehicle/Formulation	Phosphate Buffered Saline (PBS)				
Method of Administration	IV[c] bolus				
Dose (mg/kg)	Group 1: 0; Group 2: 0.1; Group 3: 0.25; Group,4: 1 ; Group 5: 4 ; Group 6: 20 ; Group 7: 4				
Radionuclide	Non-labeled UX003				
Assay	Beta-glucuronidase Activity				
Sampling time	Groups 1-6: 48 hrs post final dose; Group 7: 1 week post final dose				
	Dose UX003 mg/kg				
Tissues/organs[d]	**0**	**1**	**4**	**20**	**WT B6 mice[b]**
Adrenal Gland	0.18	96	303	1131	267
Liver	0.01	86	285	2848	221
Spleen	0.01	120	462	1948	398
Brain	0.02	0.1	0.2	0.7	17
Lung	0.02	5.8	17	58	61
Testis	0.02	0.6	4.4	54	81
Bone	0.04	20	29	25	149
Muscle	0.00	1.0	3.5	4.2	4.39
Thymus	0.13	1.2	4.1	22	203
Ovary/Uterus	0.04	2.8	4.8	52	166

Location in CTD: Module 4.2.2.3
Study number: UX003-PC001[a]

Species	**Mice**				
Gender (M/F) / Number of Animals	6 mice per group[b]; Group 1: 3M and 3F; Group 2: 3M and 3F; Group 3: 4M and 2F; Group,4: 4M and 2F ; Group 5: 4M and 2F ; Group 6: 5M and 1F ; Group 7: 4M and 2F				
Feeding Condition	Fed				
Vehicle/Formulation	Phosphate Buffered Saline (PBS)				
Method of Administration	IV[c] bolus				
Dose (mg/kg)	Group 1: 0; Group 2: 0.1; Group 3: 0.25; Group,4: 1 ; Group 5: 4 ; Group 6: 20 ; Group 7: 4				
Radionuclide	Non-labeled UX003				
Assay	Beta-glucuronidase Activity				
Sampling time	Groups 1-6: 48 hrs post final dose; Group 7: 1 week post final dose				
	Dose UX003 mg/kg				
Tissues/organs[d]	**0**	**1**	**4**	**20**	**WT B6 mice[b]**
Thyroid	0.07	2.0	5.1	32	64
Heart	0.14	1.9	13	63	7.0
Kidney	0.02	1.9	6.7	103	229
Prostate	0.06	0.5	3.2	11	180
Serum(u/ml)	0.35	0.7	1.9	13	45.3

[a] This study was conducted under GLP
[b] Additionally, tissues were collected from 6 wild type C57 BL/6 mice (3 males, 3 females) and processed in the same manner as the ERT tissues. GUS and protein assays were performed on the extracts
[c] IV=Intravenous
[d] Since there were no major differences in the GUS levels between males and females, data for each tissue was combined into a single value. Tissue samples were not perfused prior to processing

Table 2.6.5.5.2:Pharmacokinetics: Organ Distribution

Test Article: UX003

Location in CTD: Module 4.2.2.3
Study number: UX003-PC005[a]

Species	**Rat**		
Gender (M/F) / Number of Animals	5M/ group		
Feeding Condition	Fed		
Vehicle/Formulation	Saline		
Method of Administration	IV infusion ; 2 hour		
Dose (mg/kg)	Group 1: 0; Group 2: 2 mpk (lot # [redacted]); Group 3: 2 mpk (Lot# [redacted])		
Radionuclide	Non-labeled UX003		
Assay	Beta-glucuronidase Activity		
Sampling time	24 hours post end of infusion		
	Dose UX003 mg/kg		
Tissues/organs[e]	**0**	**2[c]**	**2[d]**
Liver	1370.8	2428.8	1921.4
Spleen	1775.8	2343.4	1698.8
Heart	48.2	70.4	55.2
Kidney	278.6	291.2	290.8
Brain	27.2	28.2	23.4
Lung	307.8	337.4	349.6

[a] This study was conducted non-GLP
[b] IV=Intravenous
[c] Dosed with UX003 lot # [redacted]
[d] Dosed with UX003 lot # [redacted]
[e] Since there were no major differences in the GUS levels between males and females, data for each tissue was combined into a single value. Tissue samples were not perfused prior to processing

2.6.5.6 List of References

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.

Grubb JH, Vogler C, Tan Y, Shah GN, MacRae AF, Sly, WS. 2008. "Infused Fc-tagged beta-glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105 (24):8375-8380.

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.

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 murinemucopolysaccharidosis VII." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (41):14777-82.

Vogler C, Sands M, Higgins A, Levy B, Grubb J, Birkenmeier EH, Sly WS. 1993."Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in the newborn mucopolysaccharidosis typeVII mouse." *Pediatr Res* 34 (6):837-40.