

ボックスゾゴ[®]皮下注用 0.4mg
ボックスゾゴ[®]皮下注用 0.56mg
ボックスゾゴ[®]皮下注用 1.2mg

2.4 非臨床試験の概括評価

BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価	5
2.4.1 緒言.....	5
2.4.1.1 適応症	5
2.4.1.2 BMN 111 の原薬及び製剤特性.....	6
2.4.2 非臨床試験計画概略.....	7
2.4.2.1 動物種を選択	7
2.4.2.2 非臨床試験計画	8
2.4.3 非臨床試験の総括評価及び結論.....	20
2.4.3.1 薬理試験	20
2.4.3.1.1 効力を裏付ける試験.....	20
2.4.3.1.2 副次的薬理試験.....	21
2.4.3.1.3 安全性薬理試験.....	22
2.4.3.2 薬物動態試験	23
2.4.3.3 毒性試験	25
2.4.3.3.1 単回投与毒性試験.....	25
2.4.3.3.2 反復投与毒性試験.....	26
2.4.3.3.2.1 非 GLP 試験	26
2.4.3.3.2.2 GLP 試験	26
2.4.3.3.3 生殖発生毒性試験.....	28
2.4.3.4 総括及び結論	30
2.4.4 参考文献.....	32
2.4.5 非臨床試験の概括評価の補遺.....	35

表目次

表 2.4.2.1-1 ヒト NPR-A、NPR-B 及び NPR-C とのアミノ酸配列同一性.....	7
表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧	11

図目次

図 2.4.1.2-1 BMN 111 の構造	6
-------------------------------	---

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ACH	achondroplasia	軟骨無形成症
Ach	<i>Fgfr3</i> ^{G380R} achondroplasia mouse model	<i>Fgfr3</i> ^{G380R} 軟骨無形成症マウスモデル
ADA	antidrug antibody	抗薬物抗体
ANP	atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
AUC _{0-t}	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration	0 時間から最終測定時点までの濃度－時間曲線下面積
BBB	blood-brain barrier	血液脳関門
BLQ	below limit of quantitation	定量下限未満
BMC	bone mineral content	骨塩量
BMD	bone mineral density	骨密度
BMN	BioMarin	BioMarin 社
BNP	B-type/brain natriuretic peptide	B 型ナトリウム利尿ペプチド
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシンーリン酸
C _{max}	maximum observed concentration	最高濃度
CNP	C-type natriuretic peptide	C 型ナトリウム利尿ペプチド
CTX-II	C-terminal telopeptide of type II collagen	II 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CV	cardiovascular	心血管系
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases 1 and 2	細胞外シグナル調節キナーゼ 1 及び 2
FBDS	formulated bulk drug substance	製剤化バルク原薬
FGF	fibroblast growth factor	線維芽細胞増殖因子
FGFR	fibroblast growth factor receptor	線維芽細胞増殖因子受容体
G380R	mutation in the <i>FGFR3</i> gene responsible for ACH: c.1138G > A (p.Gly380Arg)	ACH の原因となる <i>FGFR3</i> 遺伝子の変異—c.1138G > A (p.Gly380Arg)
GD	gestation day	妊娠日齢
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human <i>ether-á-go-go</i> -related gene	ヒト <i>ether-á-go-go</i> 関連遺伝子
hr	hour	時間
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IM	intramuscular	筋肉内
IV	intravenous	静脈内
JET	jacketed external telemetry	ジャケット式テレメトリーシステム
LD	lactation day	授乳日齢

略語・略号一覧（続き）

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
MAPK	mitogen activated protein kinase	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
min	minute(s)	分
NA	not applicable	該当なし
NEP	neutral endopeptidase	中性エンドペプチダーゼ
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NPRs	natriuretic peptide receptors	ナトリウム利尿ペプチド受容体
NPR-A	natriuretic peptide receptor type A	ナトリウム利尿ペプチド受容体 A
NPR-B	natriuretic peptide receptor type B	ナトリウム利尿ペプチド受容体 B
NPR-C	natriuretic peptide receptor type C	ナトリウム利尿ペプチド受容体 C
NZW	New Zealand White	—
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PKG	cGMP-dependent tyrosine kinase/protein kinase G	cGMP 依存性チロシンキナーゼ/プロテインキナーゼ G
PKG I	cGMP-dependent tyrosine kinase I	I 型 cGMP 依存性チロシンキナーゼ
PKG II	cGMP-dependent tyrosine kinase II	II 型 cGMP 依存性チロシンキナーゼ
QT	time from the start of the Q-wave to the end of the T-wave.	Q 波の始まりから T 波の終わりまでの時間
RAF-1	fibrosarcoma serine/threonine protein kinase	線維肉腫セリン/スレオニンキナーゼ
SC	subcutaneous	皮下
SD	Sprague Dawley	—
SDS	standard deviation score	標準偏差スコア
SPF	specific pathogen free	—
$t_{1/2}$	elimination phase half-life	半減期
Tab	total anti-BMN 111 antibody	総抗 BMN 111 抗体
TD	thanatophoric dysplasia	タナトフォリック骨異形成症
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum observed concentration	最高濃度到達時間
w/v	weight/volume	重量/容積
WT	wild type	野生型

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 緒言

BMN 111 は、遺伝子組換え C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) アナログで、骨端線閉鎖前の軟骨無形成症 (ACH) 患者の治療を目的としている。

ナトリウム利尿ペプチド (心房性ナトリウム利尿ペプチド [ANP]、B 型ナトリウム利尿ペプチド [BNP] 及び CNP) は、心血管系、骨格系、神経系、生殖系及びそのほかの生体システムを調節する構造的に類似するホルモン/パラクリン因子である。CNP と同様にナトリウム利尿ペプチド受容体 B (NPR-B) に結合する BMN 111 は、細胞内環状グアノシン酸 (cGMP) の産生を誘導する。cGMP のシグナル伝達は、cGMP 依存性チロシニナーゼ (プロテインキナーゼ G [PKG]) によって仲介され、血管緊張 (PKG I) 及び軟骨成長 (PKG II) の調節に関与する。これらの経路を介して、BMN 111 は軟骨細胞の増殖及び分化を促進することによって軟骨内骨成長を促進し ([Bocciardi 2009])、末梢血管抵抗を低下させることによって血圧を低下させる ([Honing 2001]) と予想される。BMN 111 は、CNP と同様の作用機序及び薬理活性を示す。中性エンドペプチダーゼ (NEP) によるタンパク質分解に対して抵抗性を示すため、BMN 111 の異化代謝はナトリウム利尿ペプチド受容体 C (NPR-C) を介したクリアランスに限定され、BMN 111 は、CNP と比較して、循環血液中の半減期が延長され、標的成長板への曝露量を増加させるように設計されている。

BMN 111 の効果は、主に軟骨細胞、末梢血管系、脳、肺及び生殖器官に発現する NPR-B への結合に関連していると考えられる。BMN 111 は 1 日 1 回皮下投与されるため、全身性の作用が期待される。しかし、半減期が短いため (単回投与後のサルでは約 20 分)、一時的にのみ曝露され活性を示すと考えられる。軟骨内骨成長に対する BMN 111 の薬理活性は、成長板閉鎖前の動物でのみ発現する。成熟及び幼若動物間で、NPR-B への結合による活性発現において成長板閉鎖以外の違いは予想されない。

2.4.1.1 適応症

ACH は、成長板における軟骨細胞の増殖及び分化の負の調節因子である線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) 3 遺伝子 (*FGFR3*) の機能獲得型変異に起因する常染色体性顕性遺伝性軟骨異形成症で、最も多くみられる症状は四肢短縮型低身長である。

ACH の最も明らかな臨床的特徴は、長く細い体幹、並びに上肢及び下肢の近位部の短縮のような不均衡な成長を伴う重度の低身長 (平均身長に対して約 -6 標準偏差スコア [SDS]) である ([Vajo 2000]) ([Wright 2012]) ([Merker 2018])。そのほか多くみられる臨床的特徴として、下肢の彎曲、巨頭症、筋緊張低下、顔面中央の発育不全、胸郭狭窄、胸腰椎後彎症及び腰椎過前彎がある。機能制限につながり、日常生活動作に有害な影響を及ぼす四肢短縮型低身長に加えて、ACH における異常な骨の成長は、重篤な病的状態を引き起こす複数の内科的合併症に関与する ([Wright 2012]) ([Ireland 2014])。これらには、特に、大後頭孔での頸髄延髄部の圧迫、水頭症、腰部脊柱管狭窄症、閉塞性睡眠時無呼吸症及び再発性中耳炎などがある。そのほかの骨軟骨異形成症には、*FGFR3* の機能獲得型変異に起因する軟骨低形成症及びタナトフォリック骨

異形成症 (TD) がある。これらの表現型は ACH と類似しているが、これらの重症度は、点突然変異に応じて、軽度 (軟骨低形成不全) から致死性 (TD) まで多様である。

ACH は稀な疾患であり、有病率は全世界で出生者 25,000 人当たり約 1 人である ([Wynn 2007])。新規症例の大半 (80%) は平均的な身長の高親の新生遺伝子突然変異により生じ、最も多くみられる変異は FGFR3 の膜貫通ドメインに存在する G380R 置換 (98%) である ([Gardner1977]) ([Oberklaid 1979]) ([Martínez-Frías 1991]) ([Orioli 1986]) ([Waller 2008]) ([Vajo 2000])。

BMN 111 は、成長板に到達し、FGFR3 の下流シグナル伝達を下方制御し、これにより軟骨細胞の増殖及び分化を促進し、長軸方向の成長を誘導すると考えられる。

2.4.1.2 BMN 111 の原薬及び製剤特性

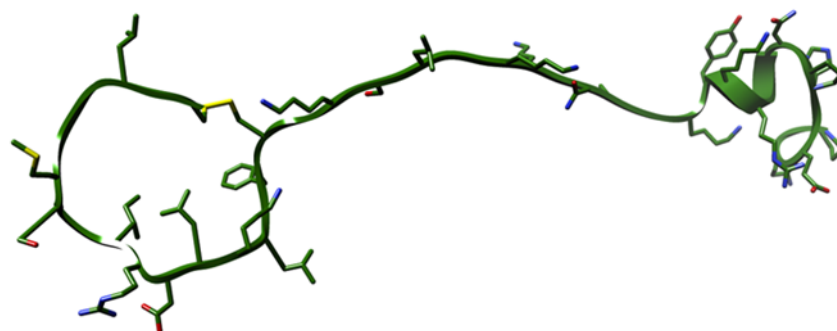
BMN 111 は、天然に存在し組織に発現される CNP (CNP53) の 37 残基のアミノ酸断片の N 末端にアミノ酸 2 残基 (Pro-Gly) を付加して修飾した、39 個のアミノ酸からなるペプチドである。CNP22 及び CNP53 は、1 種類の CNP 前駆体から派生した 2 種類の内在性 CNP である。CNP53 が組織中に認められるのに対し、CNP22 は血漿中に認められる。CNP22 及び CNP53 は NPR-B に結合し、同様の作用機序を発現する。

BMN 111 は大腸菌で遺伝子組換え技術によって生産され、分子量は 4,102 である。BMN 111 のアミノ酸配列を以下に示す。

1 PGQEHPNARK YKGANKKGLS KGCFLKLDLDR IGSM SGLGC 39

BMN 111 の二次構造を図 2.4.1.2-1 に示す。

図 2.4.1.2-1 BMN 111 の構造



BMN 111 の製剤化バルク原薬 (FBDS) の製造は、発酵、BMN 111 の回収、精製及び製剤化の各工程で構成されている。

8 ヶ月齢のラットを用いた試験及び *Fgfr3*^{G380R} ACH マウスモデル (Ach) を用いた試験以外の全ての GLP 非適用の *in vivo* 薬理試験では、0.03 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0)、1% (w/v) ベンジルアルコール及び 10% (w/v) 精製白糖を含むプロトタイプ製剤で BMN 111 を製剤化した。最初の *in vivo* GLP 試験に用いた BMN 111 製剤は、1.5% (w/v) マンニトール、0.727 mg/mL メチ

オニン、0.005% (w/v) ポリソルベート 80、5.25% (w/v) 精製白糖を含む 0.005 mol/L クエン酸緩衝溶液 (pH 5.5) に 2 mg/mL の BMN 111 を含有する注射用滅菌水溶液であった。その後の反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験の非臨床毒性試験は、トレハロース含有製剤が BMN 111 及び凍結乾燥ケーキの安定性の増加をもたらしたため、トレハロース二水和物を精製白糖の代わりに使用した臨床製剤用バルク原薬で実施した ([3.2.P.2 項 Pharmaceutical Development])。

2.4.2 非臨床試験計画概略

2.4.2.1 動物種を選択

各動物種とヒトの CNP 及びナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPRs) とのアミノ酸配列の相同性が高いことに基づき、マウス、ラット及びサルを非臨床試験で使用する動物種として選択し、3 種全てを用いて *in vivo* 試験で薬理活性を評価した。BMN 111 の C 末端側 37 個のアミノ酸配列は、ヒト CNP53 の C 末端側 37 残基のアミノ酸配列と高い類似性 (相同性) を示し、アカゲザル (*Macaca mulatta*) とはアミノ酸 1 残基 (Q37H) のみ、並びにラット及びマウスとはアミノ酸 2 残基 (A26G 及び Q37H) が異なる。カニクイザルの CNP53 のアミノ酸配列は入手できない。NPRs のアミノ酸配列は動物種間で高度に保存されており、ヒトのアミノ酸配列との相同性を表 2.4.2.1-1 に示す。

表 2.4.2.1-1 ヒト NPR-A、NPR-B 及び NPR-C とのアミノ酸配列同一性

Natriuretic Peptide Receptor	Mouse	Rat	Monkey
NPR-A	90%	90%	99%
NPR-B	98%	98%	99%
NPR-C	90%	92%	98%

NPR, natriuretic peptide receptor.

Sequences obtained from the National Center for Biotechnology Information Protein Database

In vitro 結合アッセイにおいて、BMN 111 は、ヒト、並びに非臨床薬理試験及び毒性試験で評価した全ての動物種に効力を示した ([BMN111-18-002 試験])。これら全ての動物種由来の NPR-B に対する BMN 111 (プレートに固相化) の類似した結合親和性が確認された。

安全性薬理試験及び毒性試験では、主要なげっ歯類及び非げっ歯類の動物種としてそれぞれラット及びサルを選択した。サルは、1) 大後頭孔の配置がヒトとサルの間で類似していること、2) サルの後脚はヒトと同様に体重負荷があること、3) サルでは心血管系に対する応答の予測性が高く、イヌでは過度な応答を示すことが知られていること ([Leishman 2011])、並びに 4) BMN 111 製剤には、イヌで反応を引き起こすことが知られ、心血管系試験の結果の解釈に影響を及ぼす可能性があるポリソルベート 80 (0.005%) ([Marks 1971]) ([Masini 1985]) が含まれていることに基づき、安全性薬理評価に最も適切な非げっ歯類の動物種として選択された。サルは、テリパラチド (Forteo®) などの骨同化薬の医薬品開発に広く用いられている。さらに、ラット及びウサギを用いて生殖発生毒性試験を実施した。

幼若ラットを用いた試験は 7 日齢で開始された。ラットの 7 日齢は、全体の発達において 0~4 週齢のヒト乳児に相当する ([Kilborn 2002]) と考えられ、新生児ラットの長骨に一次及び二次

骨化中心が現れる前である。若齢サルを用いた試験では、動物は年長の若齢（2～3歳齢）であった。これらのサルは性的に未成熟であり、思春期前又は思春期周辺の年長の小児と同様に、雄で57ヵ月、雌で63ヵ月の成長板閉鎖の平均年齢に達していない（[Kilborn2002]）。

2.4.2.2 非臨床試験計画

BMN 111の非臨床試験は、予測されるBMN 111の作用機序及び薬理活性、その短い循環血液中の半減期、並びに必要なに応じて、ICH S6(R1)ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」及びICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施について」を考慮してデザインした。

BMN 111の非臨床薬理作用、薬物動態（PK）及び毒性について、11試験の*in vitro*試験、1試験の*ex vivo*試験及び36試験の*in vivo*試験で評価した。BMN 111の臨床開発を裏付けるために全ての非臨床の*in vivo*試験では、臨床投与経路である皮下投与を用い、連日投与のスケジュールを用いた。

BMN 111の薬効薬理を明らかにするために、7試験の*in vitro*薬理試験をBMN 111を用いて実施し、カニクイザルのナトリウム利尿ペプチド受容体A（NPR-A）、NPR-B及びNPR-Cのヒトとの相同性、並びに非臨床試験で使用した全動物種間のNPR-Bの相同性、BMN 111のNPR-Bに対する相対的結合親和性及び効力、ヒトの正常及びACH軟骨細胞のcGMP産生に対するBMN 111の添加培養の効果、正常、ACH及びTD軟骨細胞の分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（細胞外シグナル調節キナーゼ1及び2）（MAPK [ERK1/2]）活性に対するBMN 111の効果、さらに、ラット軟骨肉腫細胞を用いて薬理的有効性の観点から投与方法（継続的な曝露処理対パルス処理）について評価した。

骨成長に対するBMN 111の薬理効果については、FGFR3の関連する軟骨異形成症の軽度（Ach）及び重度（TD）のマウスモデル、並びに正常なマウス、ラット及びサルにおいて確認した。

軟骨細胞の増殖及び分化の促進作用については、TDマウス胚から分離した大腿骨外植片を用いて*ex vivo*モデルでさらに確認した。矮小発育症の表現型が改善されることについては、Achマウスで実施した1試験及びTDマウスモデルで実施した2試験の3試験の*in vivo*試験で確認した。

FGFR3以外のほかのFGFRを介した骨異形成症に対するBMN 111の効果については、*Fgfr2*の種々の活性化遺伝子変異によって受容体を構成的活性化状態にすることが原因で引き起こされるクルーズン症候群マウスモデルにおいて評価した。このモデルでは、出生後の発達中に冠状縫合の早期癒合がもたらされる（[Holmes 2018]）。

種々の皮下投与量及び投与レジメンでのBMN 111の投与において、野生型FVBマウスの3試験を含む、5試験の*in vivo*薬理試験で正常動物における過成長について評価した。8ヵ月齢のラットを用いた1試験では、BMN 111を5週間連日皮下投与し、BMN 111の反復投与による成長能力の低い高齢のげっ歯類の成長の可能性を評価し、若齢カニクイザルを用いた1試験では、BMN 111を6ヵ月間連日皮下投与し、成長期のヒト以外の霊長類の骨成長を評価した。

副次的薬理試験では、NPR-A を含む 165 種類の受容体又はイオンチャネルを用いた細胞システムで構成される *in vitro* 受容体結合アッセイを行い、BMN 111 のオフターゲット作用の可能性を評価した。

BMN 111 の安全性薬理作用については、1 試験の *in vitro* 試験及び 6 試験の *in vivo* 試験で評価した。呼吸系及び中枢神経系機能への影響は、それぞれ GLP に準拠した 2 試験でラットの単回投与により評価した。心血管系に対する安全性評価は、ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子 (hERG) アッセイの 1 試験の *in vitro* 試験及び以下の 4 試験の *in vivo* 試験、1) 麻酔下のマウスの心血管系に対する評価試験、2) テレメータを装着した若齢サル単回投与及び 7 日間連日投与による心拍数、血圧及び心電図の波形変化を評価する漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与毒性試験、3) BMN 111 の投与による心血管系への影響の減衰が認められたテレメータを装着したサルの心血管系に対する安全性薬理予備試験、並びに 4) テレメータを装着したサルのラテン方格配置のダブルクロスオーバー投与デザインで単回投与及び 7 日間の連日反復投与による血行動態変化 (血圧、心拍数及び心電図波形) を確定評価する心血管系に対する安全性薬理試験で評価した。

WT 及び ACH マウス、成熟及び幼若ラット、妊娠ラット及びウサギ、並びに幼若及び性成熟サルに、BMN 111 を皮下投与し PK を評価した。BMN 111 の絶対及び相対的バイオアベイラビリティを求めるために、BMN 111 をラット及びサルに静脈内、皮下投与並びにラットに筋肉内投与しそれらの PK を比較した。

WT マウスに単回及び反復投与した後、軟骨を含む組織のサブセットにおける cGMP 活性を測定し、またサルにおける 6 ヶ月間の薬理試験の一部として成長板の免疫組織化学的染色した 2 つの BMN 111 分布試験を実施した。放射能標識 BMN 111 の生体内分布試験を成熟雄ラットを用いて実施した。BMN 111 を妊娠・授乳期にラット及びウサギに投与し、BMN 111 の乳汁移行を含む胎児及び新生児への分布を検討した。

NEP とのインキュベーションした *in vitro* 試験で、NEP を介したタンパク質分解に対する BMN 111 の耐性が示された。BMN 111 の組織内分布を WT マウスで評価した。軟部組織における RNA レベルによる NPR-B (NPR2) 及び NPR-C (NPR3) 遺伝子の発現を、サル由来の組織、並びに BMN 111 投与マウス (WT 及び ACH) 及びラット (幼若及び成熟) において評価した。

テレメトリーシステムを装着した幼若カニクイザルを用いた非 GLP 漸増用量設定試験及び 7 日間反復投与毒性及び安全性薬理試験、並びに幼若ラットを用いた 21 日間投与パイロット試験を実施し、予備的な毒性評価を行った。ラット及びカニクイザルを用いて、GLP 適合の単回投与毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験を 2 試験実施した。GLP 適合の反復投与毒性及び TK 試験を合計 6 試験実施した。最初に、成熟ラット及び若齢のサルを用いた 28 日間投与毒性及び TK 試験を実施した。また、年齢の進んだ成熟ラットを用いた 26 週間投与毒性試験、及び性成熟したカニクイザルを用いた 44 週間投与毒性試験を実施した。試験開始時に 7 日齢 (乳児期) のラット及び 2~3 歳齢 (若齢又は青年期) のカニクイザルを用いて、26 週間投与毒性及び TK 試験を実施した。これらの反復投与試験では、標準的な毒性学的評価に加えて、骨長測定、X 線検査並びに成長板の組織学的検査及び組織形態計測により骨格の変化を調べた。カニクイザ

ルを用いた試験では、高解像度オシロメトリー（HDO）を用いた血圧測定と共に、ジャケット式テレメトリーシステム（JET）で心拍数及び心電図波形を記録し、心血管系への影響を検討した。

BMN 111 の遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施していないが、文献に基づく総合的なリスク評価を行った。

BMN 111 の生殖発生毒性は、ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C 及び D（胚・胎児発生）をウサギで、ステージ A～F（受胎能、胚・胎児発生、分娩、及び性成熟までの次世代の生後発達）をラットを用いて評価した。

BMN 111 を用いて実施した非臨床試験の一覧を [表 2.4.2.2-1](#) に示す。

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics									
Receptor Homology	Monkey, cynomolgus; human (<i>in silico</i>)	NA	NA	NA	NA	Non-GLP	[BMN111-11-044]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in mouse fibroblasts	Mouse, NIH/3T3 fibroblasts	NA	<i>In vitro</i>	15 min	0.001 to 10 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-10-110]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Receptor affinity	HEK293T cells expressing human NPR-A, -B and -C	NA	<i>In vitro</i>	15 min	0.000001 to 100 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-11-028]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Cross-species receptor potency and affinity	HEK293T cells expressing NPR-B from rat, mouse, rabbit, cynomolgus monkey/human	NA	<i>In vitro</i>	Potency assay, 20 or 44 hrs	1.6 nmol/L to 5 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-18-002]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
				Affinity assay, 15 min	0.1 pmol/L to 2 nmol/L				
Pharmacological activity in human chondrocytes	Human chondrocytes	NA	<i>In vitro</i>	15 min	0.001 to 10 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-11-004]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
Pharmacological activity in various chondrocytes	Human immortalized and primary human chondrocytes (Normal, ACH, TD)	NA	<i>In vitro</i>	Up to 24 hrs	Pilot study: 1 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-10-086]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
				Immortalized cell lines: 48 hrs., Primary cell lines: 5 min	Main study: 10 µmol/L				
Evaluation of dosing frequency on FGF2 induced signaling	Rat chondrosarcoma (RCS) cells	NA	<i>In vitro</i>	72 hrs.; treated continuously or pulse for 60 min 1-2x daily	200 nmol/L	Non-GLP	[RS19-001]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in TD (<i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+}) mouse bones <i>ex vivo</i>	Embryonic mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+} femurs	Embryonic (E16.5) at collection of explants	<i>Ex vivo</i>	6 days	0.0001 to 1 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-10-002]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in TD (<i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+}) mice	Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+}	7 days	SC	Once daily, 10 days	0 (WT), 0 (TD), 240 (TD), 800 (TD)	Non-GLP	[BMN111-10-046]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in TD (<i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+}) mice	Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+}	7 days	SC	Once daily, 20 days	0 (WT), 0 (TD), 800 (TD)	Non-GLP	[BMN111-11-045]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
Pharmacological activity in Ach (<i>Fgfr3^{ach}</i>) mice	Mouse, FVB, <i>Fgfr3^{ach}</i>	3 weeks	SC	Once daily, 36 days	0 (WT), 0 (Ach), 20 (Ach), 80 (Ach), 280 (Ach)	Non-GLP	[BMN111-11-001]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in normal mice	Mouse, FVB	3 weeks	SC	Once daily, 36 days	0, 80, 280	Non-GLP	[BMN111-09-048]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in normal mice, confirmatory study	Mouse, FVB	3 weeks	SC	Once daily, 36 days	0, 80, 280	Non-GLP	[BMN111-09-075]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Dose regimen study in normal mice	Mouse, FVB	3 weeks	SC	Once daily for 9 weeks, 1-week recovery	0	Non-GLP	[BMN111-09-074]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
				Once daily for 1 week, then 3x/week for 8 weeks, 1-week recovery	80				
				Once daily on alternating weeks, 1-week recovery	80				
				Once daily for 9 weeks, 1-week recovery	20				
				Once daily, 36 days	20				

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
Pharmacological activity in normal rats	Rat, HSD:SD	8 months	SC	Once daily, 36 days	0, 80, 240, 800	Non-GLP	[BMN111-11-017]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Pharmacological activity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2 to 4 years	SC	Once daily, 6 months	0, 9, 33	Non-GLP	[BMN111-09-072]	[2.6.3.2-1]	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics									
Secondary pharmacodynamics, receptor binding	Human, rat, mouse, guinea pig, hamster, rabbit cells/organs (source of ligands)	NA	<i>In vitro</i>	NA	Initial: 11.44 µmol/L IC ₅₀ : 0.01144 to 11.44 µmol/L	Non-GLP	[BMN111-11-026]	[2.6.3.3-1] [2.6.3.3-2]	4.2.1.2
Safety Pharmacodynamics									
hERG	Human, hERG in stably transfected HEK293 cells	NA	<i>In vitro</i>	Single dose	60 nmol/L Terfenadine (positive control) 0, 50 µg/mL	GLP ^b	[BMN111-11-023]	[2.6.3.4-1]	4.2.1.3
CNS safety pharmacology in rats	Rat, Hsd:SD	8.6 to 9.7 weeks	SC	Single dose	0, 30, 100, 300	GLP ^b	[BMN111-11-021]	[2.6.3.4-1] [2.6.5.3-3]	4.2.1.3
Respiratory safety pharmacology in rats	Rat, Hsd:SD	11.9 to 12.9 weeks	SC	Single dose	0, 30, 100, 300	GLP ^b	[BMN111-11-022]	[2.6.3.4-1]	4.2.1.3

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
CV safety pharmacology in mice	Mouse, FVB	6 to 7 weeks	SC	Single dose	0, 80, 280, 800, 8000	Non-GLP	[BMN111-09-060]	[2.6.3.4-1]	4.2.1.3
CV safety pharmacology and dose range finding in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2 to 3 years	SC	Phase I: Day 1, 3, 4, 7 (anesthetized). Day 9, 10 (conscious)	Phase I: 0, 1.4, 7, 14, 28, 70 (anesthetized). 0, 28, 49, 70, 140 (conscious)	Non-GLP	[BMN111-09-067]	[2.6.3.4-1] [2.6.7.6-1]	4.2.1.3
				Phase II: Once daily, 7 days	Phase II: 0, 28, 70 (conscious)				
CV safety pharmacology pilot study in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	4 to 5 years	SC	Single Dose (baseline)	0	Non-GLP	[BMN111-11-041]	[2.6.3.4-1]	4.2.1.3
				Group 1: Day 1, 8, 11, 22, 24, 25	250				
				Group 2: Day 1, 11, 14, 16, 17					
CV safety pharmacology in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	3.5 to 6 years	SC	Phase I: Day 1, 4, 8, 11	0, 10, 50, 200	GLP ^b	[BMN111-11-040]	[2.6.3.4-1]	4.2.1.3
				Phase II: Once daily, 7 days	200				
Absorption									
Pharmacokinetics in ACH (<i>Fgfr3^{ach}</i>) and WT mice	Mouse, FGFR3 ^{ACH} FVB Mouse, wild type FVB	24 to 31 postnatal days	SC	Single dose	280, 600	Non-GLP	[BMN111-15-100]	[2.6.5.3-1]	4.2.2.2

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
Pharmacokinetics in rats, comparing age groups	Rat, Hsd:SD	7, 21, 45 days or 13 weeks	SC	Single dose	360	Non-GLP	[BMN111-15-076]	[2.6.5.3-5]	4.2.2.2
Pharmacokinetics by route in rats	Rat, Hsd:SD	8 weeks	SC	Single dose	80, 240, 800	Non-GLP	[BMN111-17-048]	[2.6.5.3-6]	4.2.2.2
			IM	Single dose	240				
Pharmacokinetics in neonatal rats	Rat, Hsd:SD	7 days	SC	Single dose	180, 360	Non-GLP	[BMN111-15-072]	[2.6.5.3-4]	4.2.2.2
Distribution									
Activation of NPR-B in mice after single dose	Mouse, CD-1	8 to 10 weeks	SC	Single dose	0, 800	Non-GLP	[BMN111-11-002]	[2.6.5.5-1]	4.2.2.3
Activation of NPR-B in mice after repeat doses	Mouse, CD-1	8 to 10 weeks	SC	Daily, up to 8 days	0, 800	Non-GLP	[BMN111-11-003]	[2.6.5.5-2]	4.2.2.3
Biodistribution of radio-labeled BMN 111 in rats	Rat, Hsd:SD	7 weeks	IV	Single dose	50	Non-GLP	[BMN111-17-027]	[2.6.5.5-3]	4.2.2.3
			SC	Single dose	90				
Biodistribution of radio-labeled BMN 111 in rats	Rat, Hsd:SD	7 weeks	SC	Single dose	90	Non-GLP	[BMN111-18-004]	[2.6.5.5-4]	4.2.2.3
Metabolism									
NEP clearance	NA	NA	<i>In vitro</i>	0, 20, 40, 80, 160 minutes	100 µmol/L	Non=GLP	[BMN111-10-109]	[2.6.5.10-1]	4.2.2.4

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
NPR-B and NPR-C expression in monkey, mouse, and rat tissues	Tissues from cynomolgus monkey, FGFR3 ^{ACH} FVB Mouse, wild type FVB, SD rat	NA	NA	NA	NA	Non-GLP	[BMN111-16-024]	[2.6.5.10-2]	4.2.2.4
Single Dose Toxicity									
Single dose toxicity in rats	Rat, CrI:CD(SD)	8 to 9 weeks	SC	Single dose, 7 days recovery	0, 80, 240, 800	GLP ^b	[BMN111-11-015]	[2.6.5.3-2] [2.6.7.5-1]	4.2.3.1
			IV		0, 15, 50, 150				
Single dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	2 to 3.5 years	SC	Single dose, 7 days recovery	0, 20, 60, 200	GLP ^b	[BMN111-11-006]	[2.6.5.3-7] [2.6.7.5-1]	4.2.3.1
			IV		0, 2, 6, 20				
Repeat-Dose Toxicity									
28-day repeat-dose toxicity in rats	Rat, CrI:CD(SD)	7 to 8 weeks	SC	Daily, 28 days; 7 days recovery	0, 50, 150 , 500	GLP ^b	[BMN111-11-029]	[2.6.5.4-2] [2.6.7.3-1] [2.6.7.7-1]	4.2.3.2
28-day repeat-dose toxicity in juvenile monkeys	Monkey, cynomolgus	2 to 3 years	SC	Daily, 28 days. 7 days recovery.	0, 20, 90, 300	GLP ^b	[BMN111-11-019]	[2.6.5.4-9] [2.6.7.3-1] [2.6.7.7-4]	4.2.3.2
26-week repeat-dose toxicity in rats	Rat, Hsd:SD	8 months	SC	Daily, 26 weeks. 28-day recovery.	0, 50 , 150, 500	GLP ^b	[BMN111-11-036]	[2.6.5.4-5] [2.6.7.3-1] [2.6.7.7-2]	4.2.3.2

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
44-week repeat-dose toxicity in cynomolgus monkeys	Monkey, cynomolgus	4 to 5 years	SC	Daily, 44 weeks. 13 week recovery.	0, <u>25</u> , 75, 250	GLP ^b	[BMN111-11-043]	[2.6.5.4-11] [2.6.7.3-1] [2.6.7.7-6]	4.2.3.2
21-day pilot feasibility study in juvenile rats	Rat, CrI:CD(SD)	7 days	SC	Daily, 21 days	0, 90	Non-GLP	[BMN111-11-053]	[2.6.7.6-1]	4.2.3.2
26-week repeat-dose toxicity in juvenile rats	Rat, CrI:CD(SD)	7 days	SC	Daily, 26 weeks. 6-week recovery.	0, <u>10</u> , 30, 90	GLP ^b	[BMN111-11-052]	[2.6.5.4-6] [2.6.7.3-1] [2.6.7.7-3]	4.2.3.2
26-week repeat-dose toxicity in monkeys	Monkey, cynomolgus	2 to 3 years	SC	Daily, 26 weeks. 28-day recovery.	0, 20, <u>90</u> , 300	GLP ^b	[BMN111-11-035]	[2.6.5.4-10] [2.6.7.3-1] [2.6.7.7-5]	4.2.3.2
Reproductive and Developmental Toxicity									
Male and female fertility and early embryonic development	Rat, CrI:CD(SD)	9 to 10 weeks	SC	Males: Daily, from 28 days pre-cohabitation to confirmation of mating Females: Daily, 15 days pre-cohabitation to GD 7	0, <u>90</u> ^c , 270, <u>540</u> ^d	GLP ^b	[BMN111-14-060]	[2.6.5.4-3] [2.6.7.12-1]	4.2.3.5.1
Embryo-fetal developmental toxicity in rats	Rat, CrI:CD(SD)	9 to 10 weeks	SC	Daily, GD 6 to 17	0, 90, 270, <u>540</u>	GLP ^b	[BMN111-14-061]	[2.6.5.4-1] [2.6.7.13-1]	4.2.3.5.2

表 2.4.2.2-1 BMN 111 の非臨床試験一覧 (続き)

Type of Study	Test System	Age at Initiation of Dosing	Method of Administration	Duration and Administration Schedule	Doses ^a	GLP Compliance	Study/Report Number	Summary Location	Location in CTD
Embryo-fetal developmental toxicity dose-range finding in rabbits	Rabbit, Hra:(NZW) SPF	6 months	SC	Daily, GD 7 to 19	0, 45, 135, 240	Non-GLP	[BMN111-14-055]	[2.6.5.4-7] [2.6.7.11-1]	4.2.3.5.2
Embryo-fetal developmental toxicity in rabbits	Rabbit, Hra:(NZW) SPF	5-6 months	SC	Daily, GD 7 to 19	0, 45, 135, <u>240</u>	GLP ^b	[BMN111-14-081]	[2.6.5.4-8] [2.6.7.13-2]	4.2.3.5.2
Pre- and post-natal developmental toxicity study in rats	Rat, CrI:CD(SD)	11-13 weeks	SC	Daily, GD 6 to LD 20	0, 90, 270, <u>540</u>	GLP ^b	[BMN111-18-103]	[2.6.5.4-4] [2.6.7.14-1]	4.2.3.5.3

ACH, achondroplasia; Ach, *Fgfr3*^{G380R} achondroplasia mouse model; CNS, central nervous system; CV, cardiovascular; FGF, fibroblast growth factor; FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; GD, gestation day; GLP, Good Laboratory Practice; hERG, human *ether-à-go-go* related gene; hr, hour; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; IV, intravenous; IM, intramuscular; LD, lactation day; min, minute; NA, not applicable; NPR, natriuretic peptide receptor; NOAEL, no observed adverse effect level; NZW, New Zealand White; SC, subcutaneous; SD, Sprague Dawley; SPF, specific pathogen free; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

a) µg/kg unless otherwise stated. NOAELs are bolded and underlined.

b) This study was compliant with United States Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations, Title 21 of the United States Code of Federal Regulations Part 58; Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare Good Laboratory Practice Standards Ordinance No. 21; Organisation for Economic Co-operation and Development Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM(98)17, as applicable.

c) Paternal/maternal

d) Fertility and embryonic development

2.4.3 非臨床試験の総括評価及び結論

BMN 111 の非臨床試験では、臨床投与経路である皮下投与及び連日投与レジメンを用いて、薬理作用、PK 及び毒性について評価した。これにより、ACH 小児患者への BMN 111 の 1 日 1 回皮下投与が裏付けられた。

2.4.3.1 薬理試験

2.4.3.1.1 効力を裏付ける試験

BMN 111 の薬理活性は、9 試験の *in vitro* 試験の、1 試験の *ex vivo* 試験及び 14 試験の *in vivo* 試験で評価した。これらの試験結果に基づき、BMN 111 の薬理活性は CNP と同様であると判断された。成長板において、BMN 111 は NPR-B に結合して細胞内シグナル伝達カスケードを開始し（細胞内 cGMP 産生の増加と、それに続く線維芽細胞増殖因子（FGF）を介した MAPK [ERK1/2] リン酸化の亢進の抑制）、その結果、軟骨細胞の増殖及び分化を促進し、成長板の拡大及びそれに続く長軸方向の骨形成を促進した。

BMN 111 は NPR-B 及び NPR-C に結合するが NPR-A には結合しないことが、これらの受容体を過剰発現する HEK293T (293T) 細胞で示された。BMN 111 の添加培養により cGMP 産生が増加することが、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) 及びヒト初代培養関節軟骨細胞で確認された。また、BMN 111 が FGF を介した MAPK (ERK1/2) リン酸化の亢進を抑制することが、*FGFR3* の機能獲得型変異を有するヒト初代培養及び不死化成長板軟骨細胞で示された。最後に、1 日 1 回の BMN 111 のパルス添加により FGF2 によって引き起こされる軟骨細胞増殖及びマトリックスタンパク質産生の抑制が低減され、これは、継続的な曝露による効果と同程度であった。

BMN 111 の骨成長に対する薬理活性は、*FGFR3* に関連した軟骨異形成症の軽度 (Ach モデル) 及び重度 (TD モデル) のマウスモデル、並びに正常なマウス、ラット及びサルで確認された。これらの動物種由来の NPR-B に対する BMN 111 の効力及び結合親和性は、ヒト NPR-B と類似しており、これらの結果に基づき BMN 111 のヒトでの安全性及び有効性の両方を予測することが可能であることが示唆された。

TD マウスモデルでは、大腿骨外植片において、成長板のサイズ及び構造的欠如の部分的な正常化が *ex vivo* 試験で認められた。*In vivo* 試験では、閉鎖前又は不完全に融合した成長板を有する全ての動物モデルにおいて、BMN 111 の投与は、軟骨細胞の増殖及び分化の促進をもたらした。成長板の拡大及びそれに続く骨成長をもたらした。*FGFR3* に関連した軟骨異形成症のマウスモデルでは、矮小発育症の表現型の部分的又は完全な正常化が認められた。さらに、TD マウスへの BMN 111 の投与は、中軸骨格の成長よりも四肢骨格の成長を促進し、したがって、四肢骨格の成長障害が顕著な ACH 患者の四肢短縮を改善する可能性が認められた。7 日齢で投与を開始した TD マウスでも大後頭孔及び環椎の矢状径及び横径のわずかな改善が認められ、ACH 患者への BMN 111 の投与が脊髄圧迫のリスクを潜在的に減衰する可能性があることが示された。

BMN 111 は、RAF-1 を阻害することにより 4 種類の FGFR (FGFR1-4) 全てのシグナル伝達に影響を及ぼすと期待される。クルーズン症候群マウスモデル (*Fgfr2c*^{C342Y/+}) では、広範な冠状縫合癒合が通常 2 週齢までに生じ 4 週齢までに完了するため、BMN 111 の効果を評価するために、*Fgfr2c*^{C342Y/+}マウスに 800 µg/kg の BMN 111 を生後 3 日から 30 日まで皮下投与した

([Holmes 2018])。この投与量では、モデルに頭蓋骨の表現型の改善は認められなかったが、野生型対照群を含む全ての投与動物の脛骨において軟骨内骨成長が認められた。

正常動物では、BMN 111 の投与後、わずかな成長作用から重度な過度の薬理作用まで、薬理活性に幅が認められた。重度な過度の薬理作用としては、曲尾及び後肢の可動性の低下の一般状態の変化、又は成長板の構造崩壊及び血管新生の減少が認められた。これらの変化は、*Fgfr3* ノックアウトマウス ([Colvin 1996]) 及び ERK1/2 シグナル伝達が不活性化されたマウス ([Sebastian 2010]) の表現型と一致していた。サルでは骨形成の異常は認められなかったが、おそらくこれはこの動物がげっ歯類と比較して、寿命が長いこと、それに伴い成長期間 (げっ歯類で数週間～数ヵ月間であるのに対し、サルで 4～6 年間) が長いこと、さらに試験した投与量が低投与量であったことが原因と考えられた。さらにラットでは、小児患者集団に相当する幼若 (1～3 週齢) の時期全体を通して NPR-C の発現量は変化しないため、幼若ラットでは安定した血漿曝露量が認められた。同様に、NPR-B の発現量も小児患者集団に相当する年齢層では変化していない ([BMN111-16-024 試験])。以上をまとめると、NPR-B 及び NPR-C の発現量が変化しないで安定している場合、幼若 ACH 動物及び正常動物において非臨床試験で認められたのと同様の成長速度及び組織的な骨形成がもたらされる可能性が示唆される。高齢の正常動物で認められた過度の薬理作用の発現には、NPR-C の発現量の低下とそれに伴う BMN 111 の血漿曝露量の上昇も伴っている。したがって、NPR-C 及び NPR-B の発現量が安定している治療集団での BMN 111 の投与は、過度の薬理作用をもたらす可能性は低いと判断される。この推測は、現在実施中の小児患者を対象とした臨床試験の所見によって裏付けられている。

全般的に、3 週齢から活発な成長期間の終わりまで BMN 111 を連日皮下投与した正常マウスでは、成長速度の増加、並びに中軸骨格及び四肢骨格の最終サイズの増大が認められ、BMN 111 による治療は ACH 患者の成長速度を増加させ、最終的に成人の最終身長に改善につながる可能性があることを示唆した。6 ヶ月間の BMN 111 の投与を受けた若齢サルでは、試験した全ての投与量で骨成長が認められ、骨成長に対する BMN 111 の無影響量は 9 µg/kg 未満と判断された。

2.4.3.1.2 副次的薬理試験

副次的薬理作用の可能性を評価する受容体結合アッセイでは、NPR-A を含む 165 の受容体又はイオンチャネルに基づいた細胞システムを 11.44 µmol/L の BMN 111 とインキュベートした。NPR-A を含む 8 種類の受容体又はイオンチャネルが確定阻害 (50%以上の活性化又は阻害) を示し、2.1 µmol/L～11.4 µmol/L (8～46 µg/mL) の 50%阻害濃度 (IC₅₀) 値が算出された。5 µg/kg の BMN 111 を皮下投与したサルの 400 pg/mL の最高濃度 (C_{max}) の推定値に基づいて 115,000 倍超の安全係数が算出され、臨床で予測される曝露量ではこれらの受容体又はイオンチャネルに

オフターゲット作用はないと考えられた。試験結果からは、BMN 111 が NPR-A に対して結合親和性がないことも確認された。

2.4.3.1.3 安全性薬理試験

ラットに 30、100 及び 300 µg/kg の BMN 111 を単回皮下投与した後、BMN 111 の投与に関連した呼吸系及び中枢神経系パラメータの変化は認められなかった。これらの試験において BMN 111 の無影響量は 300 µg/kg と判断された。

予測されていたように、血管系における CNP の作用機序に基づいて、BMN 111 の投与は血管平滑筋の弛緩を誘導し、それに続く血圧の低下及び心拍数の代償性増加を誘導した。全般的に、10 µg/kg 以下の BMN 111 を投与した覚醒下のサルでは、血圧及び心拍数の変化はほとんど又はまったく認められなかった（漸増法による投与量設定試験及び 7 日間の反復投与試験、並びに心血管系に対する安全性薬理主試験）。28 µg/kg の BMN 111 を投与した覚醒下のサルでは、心拍数の約 25% の増加が認められた（漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与試験）。50 µg/kg の BMN 111 を投与した覚醒下のサルでは、心血管系に関連した明らかな一般状態の変化は認められなかったが、血圧の 10% 未満の低下及び心拍数の約 37% の増加が認められた。

200 µg/kg 以上の BMN 111 を投与した覚醒下のサルの一部に、心血管系に関連した明らかな一般状態の変化が認められた。この一般状態の変化は、心血管系に対する予備試験の投与 1 日目の投与後 40～60 分に 8 匹中 5 例のサルで認められた活動性の低下、並びに心血管系に対する安全性薬理主試験のフェーズ II で投与後 1 時間の間に 8 匹中 3 例に認められた sternal recumbency（胸を地面につけて腹ばいになる姿勢）又は側臥位の特異な短い反復発作であった。28 日間の反復投与毒性試験（[2.6.6.3.6]項）では、最大 300 µg/kg の BMN 111 を投与したサルに心血管系に関連した明らかな一般状態の変化は認められなかった。心血管系に関連した明らかな一般状態の変化に関する試験間の不一致は、投与方法（遠隔又は手動）及び投与群当たりの動物数に基づき技術スタッフが室内にいた時間の合計に関連している可能性が高いと考えられた。

BMN 111 を連日反復投与後、血圧の低下の減衰が認められたが、心拍数の増加には減衰は認められず、高投与量の反復投与による血管系の NPR-B の脱感作が原因である可能性が示唆された。少なくとも 2 日間のウォッシュアウト期間の後では、心血管系に対してナイーブ動物に類似した応答が認められた。血管系における NPR-B の分布は大部分が末梢血管系に限定されているため、測定可能で評価可能な血行動態の変化の程度は全般的に限定された可能性がある。心拍数及び血圧に変化が認められず、心血管系に関連した一般状態の変化が認められないことに基づいて、覚醒下のサルに対する BMN 111 の皮下投与の無影響量は 10 µg/kg と判断された。50 µg/kg 以下の BMN 111 を皮下投与した覚醒下のサルでは、心血管系に関連した明らかな一般状態の変化は認められなかった。全試験を通じて、QT 間隔の延長は認められなかった。

サルでは、心血管系に関連する明らかな影響を誘発する投与量よりも低い投与量で成長に関連する効果が認められた。33 µg/kg の BMN 111 を 6 ヶ月間連日投与した若齢サルでは、有意な成長が測定されたが、50 µg/kg 超の BMN 111 の投与量では、心血管系に関連する明らかな一般状態の変化が認められた。

2.4.3.2 薬物動態試験

マウス、ラット、サル及びウサギに BMN 111 を皮下投与し非臨床 PK を検討した。これらの試験を、単回投与 7 試験及び反復投与 11 試験を含む毒性試験と併せて実施した。

さらに、BMN 111 の分布を検討するために、げっ歯類を用いた 4 試験（マウス及びラットで各 2 試験）を実施した。BMN 111 の代謝安定性を明らかにするため、2 試験を実施した。ラット、ウサギ、サル及びヒトにおける曝露量並びに投与量に基づく安全性係数を[表 2.6.4.9-1]に示す。

幼若（24～31 日齢）雌雄 WT 及び ACH マウスに BMN 111 の 280 及び 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回皮下投与し、BMN 111 の PK に及ぼす病態の影響を評価した（[BMN111-15-100]）。両方の遺伝子型で最高濃度到達時間（ T_{max} ）は 5 又は 15 分、 $t_{1/2}$ は 14.8～17.4 分であった。BMN 111 の曝露量は両遺伝子型で同様であり、投与量と共に増加した。概して、ACH フェノタイプは BMN 111 を皮下投与したとき WT と同様の曝露量と PK を示した。

ラット単回投与毒性及び TK 試験（[BMN111-11-015]）では、BMN 111 皮下投与量 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で 0 時間から最終測定時点までの濃度－時間曲線下面積（ AUC_{0-t} ）及び C_{max} に性差は認められなかった。240 及び 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき、雄の AUC_{0-t} は雌の 2 倍以上であったが、 C_{max} は雌雄で類似していた。皮下投与後 15 分以内で C_{max} に達した。80～800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき平均 C_{max} 及び AUC_{0-t} はほぼ投与量に比例して増加した。 $t_{1/2}$ の平均値は、皮下投与では 19～23 分、静脈内投与では 8～19 分であった。皮下投与後の BMN 111 のバイオアベイラビリティは約 5～7%であった。ラット単回投与中枢神経に対する安全性薬理評価試験及び TK 試験

（[BMN111-11-021]）において、BMN 111 の 30 及び 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき AUC_{0-t} 及び C_{max} に性差は認められなかった。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき雄の AUC_{0-t} 及び C_{max} は、雌の 2 倍以上であった。皮下投与後 15 分以内に C_{max} に達した。平均 $t_{1/2}$ は 11～15 分であった。30～300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき C_{max} 及び AUC_{0-t} の平均値は、ほぼ投与量に比例して増加した。

様々な週齢のラットに単回投与した PK 試験（[BMN111-15-076]）では、BMN 111 の同じ投与量に対する血漿曝露量は、7 日齢から 13 週齢のラットまで、概して年齢と共に増加した。13 週齢ラットにおける全血漿曝露量（ AUC_{0-t} ）は、7 日齢の動物と比較して約 13 倍高く、21 日齢の動物と比較して 3～4 倍高く、45 日齢の動物と比較して 2～3 倍高かった。 C_{max} は、12～13 週齢の動物では 7 日齢の動物と比較して約 4 倍高く、21 日齢及び 45 日齢の動物と比較して約 2 倍高かった。高齢の動物で曝露が高いのは、体重に基づいての投与量設定をしているが、総クリアランスは年齢及び動物の体重によって顕著に変動しないためであると考えられる。

サル単回投与毒性試験及び TK 試験（[BMN111-11-006]）では、BMN 111 の 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき、 AUC_{0-t} 及び C_{max} に性差は認められなかった。20 及び 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与した群では、雌の平均 AUC_{0-t} は雄の 2 倍以上であった。皮下投与後 5 分で C_{max} に達した。平均 C_{max} は、雌の C_{max} が雄の 2 倍以上であった 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の皮下投与を除いて、皮下投与、静脈内投与共に雌雄で類似していた。平均 $t_{1/2}$ は、皮下投与では 12～19 分、静脈内投与では 9～22 分であった。皮下投与後の BMN 111 のバイオアベイラビリティは約 1～11%であり、一般に投与量の増

加に伴い上昇した。平均 C_{max} 及び AUC_{0-t} は、2~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静脈内投与したときほぼ投与量比例性を示し、20~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を皮下投与したとき投与量比を上回る増加を示した。

ラットの反復投与毒性及び TK 試験 ([BMN111-11-029]、[BMN111-11-036]) では、一般に雄の BMN 111 の曝露量は雌と比較して高かった。皮下投与したとき BMN 111 は迅速に吸収され、 T_{max} は 5~30 分であり、 $t_{1/2}$ は、全ての投与量と投与日ではほぼ 15~60 分であった。血漿中曝露量、特に AUC_{0-t} は投与量比を上回って増加した。さらに、同じ投与量では、反復投与時の血漿中曝露量が高かった (3~10 倍)。反復投与時の曝露量の増加は、投与間隔と比較して $t_{1/2}$ が比較的短いこと及びいずれの投与日においても投与前値が定量下限未満 (BLQ) であったことから、蓄積性による可能性は低いと考える。

サルの反復投与毒性及び TK 試験 ([BMN111-11-019]、[BMN111-11-035]及び[BMN111-11-043]) では、性差は認められなかった。皮下投与では、BMN 111 は迅速に吸収され、 T_{max} の中央値は 5~45 分であり、その後急速に消失し平均 $t_{1/2}$ はほぼ 1 時間未満であった。これに対応する血漿中 C_{max} 及び AUC_{0-t} は、雌雄ともおおむね投与量比を上回る増加を示した。サルにおける C_{max} 及び AUC_{0-t} は投与初日と比較して反復投与後におおむね高く、蓄積率は 1.2~4 でありラットよりも低かった。BMN 111 の $t_{1/2}$ が比較的短く、反復投与の投与前における多数の濃度値が BLQ (250 pg/mL) であったことを考慮すると、反復投与後の曝露量の増加は蓄積による可能性は低いと考えられる。反復投与後のサルの曝露量の中等度の増加は、ラットの試験 ([BMN111-15-076]) で示されているように、サルの体重が増加し BMN 111 の総投与量が増加した結果である可能性が高いと考えられる。

生殖発生毒性試験を、ラット ([BMN111-14-060]、[BMN111-14-061]及び[BMN111-18-103]) 及びウサギ ([BMN111-14-055]及び[BMN111-14-081]) を用いて実施し、母動物及び胎児における TK 解析で以下の結果が得られた。(a) 妊娠による BMN 111 の PK の変化が認められた。クリアランスは妊娠前から妊娠期間中にかけて減少した。分布容積とクリアランスは共に GD 6 から GD 17 にかけて減少した。(b) 測定可能なレベルであったが、同時間の母体試料より数百倍低い BMN 111 がいくつかのプール胎児試料で測定された。(c) BMN 111 濃度は乳汁中において投与量依存的に観察されたが、母体血漿中濃度の 5%未満であった。(d) BMN 111 は、妊娠期間中に BMN 111 を投与された母親から生まれた仔から出産後 1 日目と 14 日目に採取された試料で BLQ であった。全体として、BMN 111 の胎児及び新生児への曝露はごくわずかであった。

野生型マウスを用いて実施された 2 つの生体内分布試験 ([BMN111-11-002]、[BMN111-11-003]) では、おそらく BMN 111 が血液脳関門 (BBB) を通過しないために cGMP 産生が測定されなかった脳を除き、BMN 111 の皮下投与により、NPR-B 発現組織における NPR-B 下流シグナル伝達 (cGMP) が一過性に活性化されることが示された。

ラットに放射能標識した BMN 111 を投与した 2 試験 ([BMN111-17-027]、[BMN111-18-004]) で、BMN 111 の分布は主に末梢であり、ほとんどの放射能が注射部位、血漿循環、及び多く曝露した臓器に残留していたことが示された。標的組織への適切な分布が観察された。脳への分布は採取した組織の中で最も少なく、BBB を通過する BMN 111 が限られていることを示唆している。これらの所見は、中枢神経系に対する安全性薬理試験において薬理活性が認められな

ったことと一致している。8日間の反復投与後、成長板における NPR-B 脱感作のエビデンスはなかった。

単回及び反復投与試験を通じて BMN 111 の曝露量の増加は概して、投与量の増加を上回る増加を示した。高用量では、投与部位におけるクリアランスの飽和がバイオアベイラビリティの上昇につながり、その結果曝露量が投与量比を上回って増加する可能性がある。BMN 111 の皮下投与部位の組織は、脂肪細胞で構成されている。BMN 111 と同様に内在性 CNP の既知のクリアランス受容体である NPR-C の発現を、マウス、ラット及びサルのような組織を用いた試験 ([BMN111-16-024]) で検討した。本試験で、脂肪組織が最も豊富な NPR-C 発現組織の 1 つであることが確認された。本試験でも、サルの複数の組織における NPR-C 発現に性差がないことが報告されており、このことからサルの曝露量に性差がないことが裏付けられた。

ラット及びサルを用いた 1 日 1 回の反復投与試験において、反復投与による BMN 111 曝露量の増加は、ラットの試験 ([BMN111-15-076]) で述べたように、動物の体重が増加したために BMN 111 の総投与量が増加した結果である可能性が高いと考える。加えて、遺伝子解析発現の試験 ([BMN111-16-024]) で示されているように、より老齢の動物における NPR-C の発現の変化など、さらなる機序が関与している可能性がある。この試験では、NPR-C の mRNA 発現低下が老齢ラットで観察された。In vitro 代謝試験で BMN 111 が NEP を介したタンパク質分解に対して抵抗性を示すことが示されたため ([BMN111-10-109])、NEP の発現変化は検討しなかった。

BMN 111 の $t_{1/2}$ が比較的短く、反復投与の投与前における多数の濃度値が BLQ であったことを考慮すると、反復投与後の曝露量の増加は蓄積による可能性は低いと考えられる。また、抗薬物抗体 (ADA) 産生による可能性も低いと考えられる。サルを用いた 28 日間反復投与 TK 試験ではほぼ全ての抗体反応が陰性であったが、サルを用いたより長期間 (26 週間及び 44 週間) の試験では、通常 12 週目までに ADA の存在が確認された。ADA 生成率は試験期間と共に上昇した (28 日後 0% から 12~24 週後約 50%、44 週後約 100%)。同様に、ラットでは、発現率は投与 182 日目で約 60% であった。高い発現率にもかかわらず、発現率/力価と BMN 111 の血漿での曝露量との間に直接的な相関はみられなかった。また、サル 28 日間反復投与 TK 試験において、ADA 非存在下で曝露量が増加したことは、BMN 111 の PK に年齢依存性変化を含むほかの機序が存在していることを示唆している。

2.4.3.3 毒性試験

BMN 111 の安全性評価として、Sprague Dawley (SD) 系ラット及びカニクイザルの幼若及び成熟動物を用いて、単回投与毒性試験、並びにそれぞれ最長 26 及び 44 週間までの反復投与毒性試験を実施した。BMN 111 の生殖発生毒性についても、ICH R5(S3)ガイドラインのステージ A~F を SD 系ラットで、ステージ C 及び D を New Zealand White ウサギを用いて評価した。

2.4.3.3.1 単回投与毒性試験

ラットの単回投与毒性及び TK 試験では、BMN 111 を 0、80、240 及び 800 µg/kg の用量で単回皮下投与、又は 0、15、50 及び 150 µg/kg の用量で単回静脈内ボラス投与した。BMN 111 を

投与したときの忍容性は良好であり、毒性標的器官は認められなかった。BMN 111 をラットに単回皮下投与した場合の無毒性量は 800 µg/kg、単回静脈内投与した場合の無毒性量は 150 µg/kg であった。

サル単回投与毒性及び TK 試験では、BMN 111 を 0、20、60 及び 200 µg/kg の用量で単回皮下投与、又は 0、2、6 及び 20 µg/kg の用量で単回静脈内投与した。BMN 111 を投与したときの忍容性は良好であり、毒性標的器官は明らかではなかった。BMN 111 をサルに皮下投与した場合の無毒性量は 200 µg/kg、静脈内投与した場合の無毒性量は 20 µg/kg であった。

2.4.3.3.2 反復投与毒性試験

2.4.3.3.2.1 非 GLP 試験

BMN 111 の投与が心血管機能に及ぼす影響を検討し、予備的な毒性評価を行うため、テレメータを装着したサルを用いて、漸増用量設定試験及び 7 日間反復投与と血行動態、毒性・TK 試験を実施した。BMN 111 を 70 µg/kg の用量で 7 日間連日投与した結果、予想された成長板の肥大帯の拡大以外には、一般状態、摂餌量、体重、臨床病理学的検査、剖検及び病理組織学的検査で、BMN 111 に関連した変化は認められなかった。血行動態に及ぼす影響については 2.4.3.1.3 項に記載した。

幼若ラットを用いた長期反復投与（26 週間）毒性試験を開始する前に、生後 7 日齢のラットに BMN 111 を 90 µg/kg/日の用量で連日皮下投与して、忍容性及び試験の実行可能性を予備的に評価した。7 日齢の幼若ラットに、BMN 111 を 90 µg/kg/日の用量で 3 週間連日皮下投与した場合、忍容性が良好であった。動物の尾長に若干の差が認められ、本用量で薬理作用が発現する可能性が示された。その結果、幼若ラットを用いた GLP 適合の 26 週間反復投与毒性試験の高用量として本用量（90 µg/kg/日）を設定した。

2.4.3.3.2.2 GLP 試験

ラットの 28 日間反復投与毒性及び TK 試験では、7~8 週齢の動物に BMN 111 を 0、50、150 又は 500 µg/kg/日の用量で 28 日間連日皮下投与した後、7 日間の回復期間を設けた。BMN 111 に関連する所見として、1) 過度の薬理作用を反映した骨格関連の変化につながる軟骨内骨化の促進、及び 2) 毒性学的意義はないと考えられる BMN 111 結合抗体（ADA 又は Tab）の産生が認められた。一部の病理組織学的変化は、雌よりも雄の方が重度であると考えられた。これは、雌と比較して雄でおおむね曝露量が高値であったことに起因すると考えられた。BMN 111 を 500 µg/kg/日投与した動物で認められた、後肢の可動性の低下、足根関節の腫脹、及びそれに関連した肉眼的及び病理組織学的変化を除いて、各所見はおおむね可逆的であった。500 µg/kg/日の用量で足根関節に後肢の可動性が低下する肉眼的及び病理組織学的変化が持続的に認められたことから、本試験における BMN 111 の無毒性量は 150 µg/kg/日と判断された。

サルを用いた 28 日間反復投与毒性及び TK 試験では、2~3 歳齢のカニクイザルに BMN 111 を 0、20、90 又は 300 µg/kg/日の用量で 28 日間連日皮下投与した後、7 日間の回復期間を設けた。カニクイザルに BMN 111 を 20、90 及び 300 µg/kg/日の用量で 28 日間連日皮下投与した場合、忍容性が良好であった。予想された BMN 111 関連の影響として、1) 300 µg/kg 群にのみ一過

性の心拍数増加、2) 全ての BMN 111 投与群で軟骨内骨化の促進、及び 3) 曝露量が減少した雌 1 例で ADA の産生が認められたのみであった。雄は大腿骨に雌と比べてより顕著な組織学的変化が認められ、これは雄で観察された高い曝露量と一致していた。胸骨及び大腿骨で観察された成長板の所見は BMN 111 の作用機序と一致しており、回復期間終了時までには部分的な回復がみられたことから、これらの変化は有害所見とは判断しなかった。これらの組織学的変化は、高用量の BMN 111 を投与した正常動物における、BMN 111 の過剰な薬理作用に起因すると考えられた。予想されたとおり、cGMP 及び II 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (CTX-II) 濃度が BMN 111 投与に反応して増加した。ANP 濃度に変化はなかった。本試験で毒性標的器官は特定されず、BMN 111 を 28 日間連日皮下投与した場合の無毒性量は 300 µg/kg/日であった。

BMN 111 を長期間投与したときの影響を評価するため、ラットに BMN 111 を 0、50、150 又は 500 µg/kg/日の用量で 26 週間連日皮下投与した後、28 日間の回復期間を設けた。本試験は、試験の開始前又は初期に成長板の閉鎖が予想される年齢の高い（生後 8~9 ヶ月齢）ラットを使用して実施した。この月齢のラットを使用することにより、BMN 111 の薬理作用の重篤度を最小限に抑えることが期待され、長期投与による器官系に対する毒性作用の評価が可能である。ラットに BMN 111 を 50、150 又は 500 µg/kg/日の用量で連日皮下投与したとき忍容性が認められ、BMN 111 の薬理作用である軟骨内骨化の促進に関連した毒性所見が観察された。雌と比べて雄で重度の影響がみられたが、原因として雄の曝露量が高いことが考えられる。骨構造に対する持続的変化、*in vivo* で観察された一般状態への影響、及び 150 µg/kg 以上を投与した動物で認められた精子数への影響に基づき、BMN 111 を 26 週間連日投与した成熟ラットにおける無毒性量は 50 µg/kg/日と判断された。

成熟ラットを用いた 26 週間投与毒性試験と同様に、4~5 歳齢のカニクイザルを用いた 44 週間投与毒性・TK 試験を実施した。本試験では、骨成長に対する BMN 111 の薬理作用を軽減し、より多くの動物が投与期間中生存して、長期投与による毒性作用を評価できるよう試みた。また、年齢の進んだ動物を使用することにより、性成熟した霊長類における BMN 111 の長期投与の影響を評価することが可能となった。動物に BMN 111 を 0、25、75 又は 250 µg/kg/日の用量で連日皮下投与した。44 週間の投与期間終了後、一部の動物を 13 週間の回復性試験に供した。カニクイザルに BMN 111 を 25、75 又は 250 µg/kg/日の用量で 44 週間連日皮下投与したとき、忍容性が認められた。BMN 111 に関連する影響は、薬理作用に起因する骨格の成長及び成長板閉鎖に対する予想された影響、並びに投与直後に心拍数の増加が認められたのみであった。股関節の可動域の減少及び骨の変形を引き起こす持続的な骨及び関節の所見に基づき、カニクイザルに BMN 111 を 44 週間連日投与したときの無毒性量は 25 µg/kg/日と判断された。

ラットに BMN 111 を 0、10、30 又は 90 µg/kg/日の用量で、乳児期から成熟期まで 26 週間連日投与し、その後 6 週間の回復期間を設けて影響を評価した。本試験は、全般的な発達状態が 0~4 週齢のヒト乳児に相当し ([Kilborn 2002])、長骨に一次・二次化骨中心が出現する前の生後 7 日齢の新生児ラットを使用して実施した。本試験では、おそらく長骨の成長板の融合は完了していないが、小児期、青年期及び成熟期まで動物を評価したと考えられる。幼若ラットに、BMN 111 を 10、30 及び 90 µg/kg/日の用量で、生後 7~188 日まで連日皮下投与した結果、用量

依存的な骨病変の増加、骨塩量 (BMC) 及び骨密度 (BMD) の低下、並びに骨の生体力学的指標の低下が認められた。生体力学的変化は、*in vivo* 観察で認められた四肢及び関節機能の低下、並びに関節の腫脹及び表面の変位による外形異常と相応した。これらの変化は、成長 (頭殿長及び尾長) の促進及び BMC・BMD の低下はあるものの、幼若期には *in vivo* で観察されず、ラットが青年期から成熟期 (約 8~15 週齢) に達するまで、骨の過成長に関連する臨床症状はほとんど現れなかった。体重の重い動物で曝露量が高いこと、及び大腿骨などの残り少ない骨端線が閉鎖していない骨に対する影響が相まって、過剰な薬理作用をもたらした可能性が考えられる。本試験では、骨格に対する影響の発現頻度及び重症度に性差が認められたが、これは雄で BMN 111 の曝露量が高いためと考えられた。BMN 111 の投与に関連した幼若ラットの行動及び性成熟への明らかな影響は認められなかった。BMN 111 を 26 週間投与した幼若ラットの無毒性量は、この用量の所見の発現頻度及び重症度が低かったことから、10 µg/kg/日と判断された。

最後に、若齢/青年期のカンクイザルに BMN 111 を 26 週間連日投与した後、28 日間の回復期間を設けて毒性及び TK を評価した。本試験は、成長板閉鎖の平均月齢 (雄: 57 ヶ月齢、雌: 63 ヶ月齢[Kilborn 2002]) に達していない、性的に未成熟な 2~3 歳齢のサルを用いて実施した。動物に BMN 111 を 0、20、90 又は 300 µg/kg/日の用量で連日皮下投与した。カンクイザルに BMN 111 を 20、90 又は 300 µg/kg/日の用量で 26 週間連日皮下投与したときの忍容性は良好であった。BMN 111 に関連する影響は、骨格の過成長とそれに伴う、特に大腿骨の頭頸部及び股関節の機能に関連した変化に限られていた。雄では歩行困難及び姿勢の変化などの重要な臨床症状がみられ、85 日目における各動物の曝露量 (C_{max}) の違いが反映されると考えられた。この曝露量との関連は、臨床症状に影響がみられた雌 1 例では明らかではなかった。注射部位における軽度の刺激性増加は、BMN 111 の連日投与に起因し、被験物質に対する免疫反応に関連する、あるいは、それによって増強された可能性が考えられた。300 µg/kg を投与した動物で持続的な骨及び関節の臨床症状が認められたことから、若齢のカンクイザルに BMN 111 を連日長期反復投与したときの無毒性量は 90 µg/kg/日と判断された。

2.4.3.3.3 生殖発生毒性試験

BMN 111 の生殖発生毒性は、ICH S5(R3)ガイドラインの生殖発生ステージ C 及び D (胚・胎児発生) をウサギで、ステージ A~F (受胎能、胚・胎児発生、分娩及び性成熟までの次世代の生後発達) をラットを用いて評価した。

雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、雌雄ラットに BMN 111 を 0、90、270 又は 540 µg/kg/日の用量で、交配前に雄は 28 日間、雌は 15 日間連日投与した。22 日間の交配期間を通じて雄は交配期間終了時まで、雌は妊娠 7 日の剖検時まで投与を継続した。雄ラットに交配前から交配期間を通じて合計 50~52 回、雌ラットに交配前 2 週間及び妊娠初期まで、BMN 111 を 90、270 又は 540 µg/kg/日の用量で連日皮下投与したとき、忍容性が認められた。BMN 111 の骨成長に対する薬理作用と関連した影響が全用量の雌雄で観察され、270 µg/kg/日以上用量では有害所見と考えられた。その結果、雌雄ラットに対する無毒性量は共に 90 µg/kg/日であった。540 µg/kg/日で、交配までの日数のわずかな増加、精子数の減少

及び精嚢重量の減少が観察されたが、受胎率への影響がないことから有害所見とは判断しなかった。ラットの生殖毒性に関する無毒性量は 540 µg/kg/日であった。

妊娠ラットに BMN 111 を 0、90、270 又は 540 µg/kg/日の用量で、胚の着床（妊娠 6 日）から器官形成期を通して硬口蓋閉鎖（妊娠 17 日）まで投与し、胚・胎児の発生に及ぼす影響を評価した。妊娠雌ラットに BMN 111 を妊娠 6～17 日まで連日皮下投与した結果、母動物毒性及び発生毒性は認められなかった。ラットにおける BMN 111 の母動物及び胚・胎児発生に関する無毒性量は 540 µg/kg/日と判断された。

ウサギの胚・胎児発生に関する用量設定試験において、妊娠ウサギに BMN 111 を 240 µg/kg/日の用量で投与したときの忍容性は良好であった。用量設定試験の結果に基づき、妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、BMN 111 を 0、45、135 又は 240 µg/kg/日の用量で、着床（妊娠 7 日）から硬口蓋閉鎖（妊娠 19 日）まで投与した。妊娠ウサギに BMN 111 を妊娠 7～19 日まで連日皮下投与したとき、忍容性が良好であった。母動物の妊娠及び胚・胎児発生に及ぼす影響は認められなかった。その結果、ウサギにおける母動物毒性及び胚・胎児発生に関する無毒性量は 240 µg/kg/日と判断された。

雌ラットに BMN 111 を 0、90、270 又は 540 µg/kg/日の用量で、胚の着床から F₁ 世代の離乳（妊娠 6 日～授乳 20 日）まで毎日投与し、出生児の胚・胎児発生から性成熟に至るまでの発達に及ぼす影響を評価した。F₁ 世代の評価として、出生児の成長、生後発達、神経行動学的発達、性的発達及び生殖能力の検査を実施した。妊娠及び授乳中の雌ラットに BMN 111 を妊娠 6 日～授乳 20 日まで連日皮下投与した場合、忍容性が良好であった。BMN 111 を投与した雌の出生児では、出生前及び出生後の生存性、発達及び哺育に影響は認められなかった。BMN 111 を投与した雌の乳汁中で低濃度の BMN 111 が検出され、出生児から薬物が検出されたのは血漿採取前に授乳していない 1 例のみであったが、特に高用量群で出生後に F₁ 世代が BMN 111 に曝露される可能性が示された。ラットにおける母動物毒性、並びに出生前及び出生後の発生に関する無毒性量は 540 µg/kg/日と判断された。

2.4.3.4 総括及び結論

BMN 111 の薬理活性を評価し、CNP と同様であることが明らかにされた。一般的に、BMN 111 の薬理作用及び安全性プロファイルは、成長板及び血管系での NPR-B のシグナル伝達における BMN 111 の活性に関連していた。CNP と同様に、BMN 111 は軟骨内骨形成を促進し、血管緊張を変化させた。

BMN 111 で実施された一連の *in vitro* 試験において、NPR-B 及び NPR-C への結合特異性及び親和性、並びにヒト軟骨細胞での細胞内 cGMP 産生及び FGF を介した MAPK リン酸化の増加に対する NPR-B への結合による下流シグナル伝達への効果が確認された。FGFR3 に関連した軟骨異形成に対する BMN 111 の改善効果については、マウス疾患モデルで示された。骨成長に対する効果は、試験に用いた投与期間を通して成長板が閉鎖前の全ての動物種で認められたが、動物が老化し、その動物種で予想される正常な成長期間の終わりに達すると、薬理作用は過度な作用となり、機能的影響が深刻になった。BMN 111 の成熟ラットへの投与において中枢神経系及び呼吸系の機能に対する影響は 300 µg/kg の無影響量まで認められなかった。サルにおける心血管系への影響は、血管平滑筋の弛緩に対して予想された影響に限定され、10 µg/kg 超の投与量で血圧が低下し心拍数が代償的に増加した。これらの変化は自然治癒性で、50 µg/kg 以下の BMN 111 を皮下投与した覚醒下のサルでは心血管系に関連した一般状態の明らかな変化は認められなかった。

ラット及びサルにおける単回及び反復投与の TK 試験結果、皮下投与後の BMN 111 の吸収は速やかであった。皮下投与したときの絶対的バイオアベイラビリティは低かったが、十分な全身曝露量及び標的への組織内分布が得られた。t_{1/2} は一般に 30 分 (9~126 分) 未満であった。全体に性差は認められなかった。毎日の反復投与では、血漿中曝露量の増加が認められた。このことは、反復投与試験の過程で動物の体重増加に伴って総 BMN 111 投与量が増加したこと起因している可能性が高いと考えられる。BMN 111 の生体内分布は主として末梢であり、投与部位、血漿循環、及び多く曝露された臓器に BMN 111 が残存していた。活性 BMN 111 の標的組織への生体内分布が観察された。脳への生体内分布は採取した組織の中で最も少なく、BBB を通過する BMN 111 が限られていることを示唆している。

ラット及びサルでは軟骨内骨化の促進により、特に体重を支える関節の変性及び機能不全、並びに骨塩量及び骨密度の低下が認められた。関節の変化は、試験及び動物の年齢にかかわらず、特に BMN 111 を長期投与した動物で観察された。これらの影響はラットの特に雄で顕著であり、BMN 111 の曝露量 (C_{max} 及び AUC) が高かったことに起因するものと考えられる。成熟動物では体重に性差があり、そのため体重の重い雄で BMN 111 の総投与量が多かったことによるものと考えられる。非臨床毒性試験は正常動物を用いて実施したことから、投与期間、試験開始時の動物の年齢、動物種及びその遺伝的背景を考慮して、骨所見の重篤性を解釈する必要があると考える。BMN 111 は、妊娠又は授乳中に BMN 111 を投与した母動物の生殖機能や、出生児の発達に影響を及ぼさないと考えられた。BMN 111 を投与した幼若動物又は BMN 111 を投与した母動物の出生児には、神経学的発達への影響は認められなかった。ラットの長期投与毒性試験で精子数及び濃度の低下が認められたが、雌雄ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に

関する試験では、精子数の低下に伴う受胎率の低下は認められなかった。性成熟に達したサルに最長 44 週間投与しても、精子への影響は認められなかった。

BMN 111 の遺伝毒性試験は実施していない。BMN 111 は全て天然アミノ酸で構成されるペプチドであり、合成リンカーを含まないため、DNA と直接反応することは予想されない。

BMN 111 のがん原性試験は実施していない。文献に基づくリスク評価を実施した結果、げっ歯類を用いた標準的ながん原性試験を実施することにより、BMN 111 のがん原性リスクを予測する臨床的意味のある安全性情報が得られる可能性は低く、BMN 111 の作用機序からがん原性のリスクは低いと結論付けた ([4.2.3.4.3]項)。

解剖学的構造、成長板の生理学的特徴及び個体発生の類似性から、若齢／青年期のサルがヒトと最も関連の深い動物種であり年齢と考えられる。高用量で認められた骨格に対する有害作用に基づき、BMN 111 を最長 26 週間投与した若齢のサルの無毒性量は 90 µg/kg であった。これは、BMN111-301 試験で BMN 111 を 15 µg/kg 投与した小児 ACH 患者の曝露量 (AUC_{0-t}) と比較して、3.6 倍の安全係数を表している ([表 2.6.4.9-1])。いずれの毒性試験でも、ほかの器官系／軟部組織には BMN 111 に関連した影響は認められなかった。

要約すると、ACH の最も多くみられる臨床的特徴は、長く細い体幹、並びに上肢及び下肢の近位部の短縮のような不均衡な成長を伴う低身長である ([Vajo 2000]、[Wright 2012]、[Merker 2018])。そのほかに多くみられる特徴的な症状として、下肢の彎曲、巨頭症、筋緊張低下、顔面中央の発育不全、胸郭狭窄、胸腰椎後彎症及び腰椎過前彎がある。四肢短縮型低身長は、日常生活動作に影響を及ぼす機能制限につながり、異常な骨の成長は、特に、大後頭孔での頸髄延髄圧迫、水頭症、腰部脊柱管狭窄症、閉塞性睡眠時無呼吸症及び再発性中耳炎などの重篤な病的状態を引き起こす複数の内科的合併症と関連している ([Wright 2012]、[Ireland 2014])。非臨床試験では、ACH のマウスモデルにおいて、BMN 111 は前肢及び後肢の近位部を投与量依存的に伸長し、マウスの表現型のほかの要素を改善することが示された。さらに、正常なマウス、ラット及びサルにおいて、BMN 111 は、近位部の骨及び尾長を用量依存的に伸長させることが示された。BMN 111 の投与の中断により、骨成長に対する効果の停止が認められた。サルにおいて成長に対するこれらの効力は、短期間の症候性心血管系作用を誘発する投与量よりはるかに低い投与量で認められた。非臨床試験における PK では、皮下投与した BMN 111 は速やかに吸収及び排泄されることが示され、ラット及びサルにおける初回投与後の見かけの t_{1/2} は 20 分未満で、反復投与後に増加した。投与量から求めた安全係数 (正常動物) は、長期反復投与試験 (26 週間以上) の 0.1 倍から短期反復投与試験 (28 日間) の 8.8 倍の範囲であった。これらの安全係数は、主に骨の形態と発達の様々な側面に影響を及ぼす、正常動物を用いた毒性試験における過度の薬理作用の発現に依存し、非臨床試験では、オフターゲット作用は認められていない。ACH 患者の重症度及びアンメット・メディカル・ニーズを考慮すると、非臨床モデルで示された広範囲に及ぶ薬理作用、蓄積性のない短期間の曝露及び十分に特徴付けられた薬理作用に関連した毒性所見を前提に、BMN 111 の非臨床試験は、BMN 111 の臨床開発を裏付ける情報を提供し、骨端線が閉鎖していない患者の ACH の治療のための BMN 111 の承認申請を支持する。

2.4.4 参考文献

- Benoist-Lasselín, C, Gibbs, L, Heuertz, S, Odent, T et al. Human immortalized chondrocytes carrying heterozygous FGFR3 mutations: an in vitro model to study chondrodysplasias. *FEBS Lett* 581[14], 2593-2598. 2007.
- Bocciardi, R, Giorda, R, Buttgerit, J, Gimelli, S et al. Overexpression of the C-type natriuretic peptide (CNP) is associated with overgrowth and bone anomalies in an individual with balanced t(2;7) translocation. *Hum Mutat* 28[7], 724-731. 2007.
- Bocciardi, R, Ravazzolo, R. C-type natriuretic peptide and overgrowth. *Endocr Dev* 14, 61-66. 2009.
- Bukulmez, H, Haqqi, T, Khan, F, Welter, JF et al. Role of C-type natriuretic peptide (CNP) in osteogenesis and treatment of osteoporosis. *Osteoarthritis and Cartilage Supplement 2*, s89. 2010.
- Clavell, AL, Stingo, AJ, Wei, CM, Heublein, DM et al. C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide. *Am J Physiol* 264[2 Pt 2], R290-R295. 1993.
- Colvin, JS, Bohne, BA, Harding, GW, McEwen, DG et al. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12[4], 390-397. 1996.
- Gardner, RJ. A new estimate of the achondroplasia mutation rate. *Clin Genet* 11[1], 31-38. 1977.
- Holmes, G, Zhang, L, Rivera, J, Murphy, R et al. C-type natriuretic peptide analog treatment of craniosynostosis in a Crouzon syndrome mouse model. *PLoS ONE* 13[7], 2018.
- Honing, ML, Smits, P, Morrison, PJ, Burnett, JC et al. C-type natriuretic peptide-induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels. *Hypertension* 37[4], 1179-1183. 2001.
- Horton, WA, Hall, JG, Hecht, JT. Achondroplasia. *Lancet* 370[9582], 162-172. 2007.
- Hunt, PJ, Richards, AM, Espiner, EA, Nicholls, MG et al. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 78[6], 1428-1435. 1994.
- Igaki, T, Itoh, H, Suga, S, Hama, N et al. Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide. *Hypertens Res* 21[1], 7-13. 1998.
- International Conference on Harmonisation. 2009. ICH M3(R2) guideline on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals, Step 5.
- International Conference on Harmonisation. 2020. ICH S5(R3) guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals
- International Conference on Harmonisation. 2011. ICH S6(R1) guideline – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, Step 5.
- Ireland, PJ, Pacey, V, Zankl, A, Edwards, P et al. Optimal management of complications associated with achondroplasia. *Appl Clin Genet* 7, 117-125. 2014.
- Kilborn, SH, Trudel, G, Uthoff, H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci* 41[5], 21-26. 2002.
- Koller, KJ, Lowe, DG, Bennett, GL, Minamino, N et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252[5002], 120-123. 1991.

- Krejci, P, Masri, B, Fontaine, V, Mekikian, PB et al. Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis. *J Cell Sci* 118[Pt 21], 5089-5100. 2005.
- Leishman, DJ, Beck, TW, Dybdal, N, Gallacher, DJ et al. Best practice in the conduct of key nonclinical cardiovascular assessments in drug development: current recommendations from the Safety Pharmacology Society. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65[3], 93-101. 2011.
- Lenz, AM. Natriuretic peptides in children: physiology and clinical utility. *Curr Opin Pediatr* 23[4], 452-459. 2011.
- Lorget, F, Kaci, N, Peng, J, Benoist-Lasselin, C et al. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a *Fgfr3* mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet* 91[6], 1108-1114. 2012.
- Marks, LS, Kolmen, SN. Tween 20 shock in dogs and related fibrinogen changes. *Am J Physiol* 220[1], 218-221. 1971.
- Martínez-Frías, ML, Bermejo, E, Cereijo, A, Sánchez, M et al. Epidemiological aspects of Mendelian syndromes in a Spanish population sample: II. Autosomal recessive malformation syndromes. *Am J Med Genet* 38[4], 626-629. 1991.
- Masini, E, Planchenault, J, Pezziardi, F, Gautier, P et al. Histamine-releasing properties of Polysorbate 80 *in vitro* and *in vivo*: correlation with its hypotensive action in the dog. *Agents Actions* 16[6], 470-477. 1985.
- Merker, A, Neumeyer, L, Hertel, NT, Grigelioniene, G et al. Growth in achondroplasia: development of height, weight, head circumference, and body mass index in a European cohort. *Am J Med Genet A* 176[8], 1723-1734. 2018.
- Naski, MC, Colvin, JS, Coffin, JD, Ornitz, DM. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125[24], 4977-4988. 1998.
- Niu, H, Klem, T, Yang, J, Qiu, Y et al. A biotin-drug extraction and acid dissociation (BEAD) procedure to eliminate matrix and drug interference in a protein complex anti-drug antibody (ADA) isotype specific assay. *J Immunol Methods* 446, 30-36. 2017.
- Oberklaid, F, Danks, DM, Jensen, F, Stace, L et al. Achondroplasia and hypochondroplasia. Comments on frequency, mutation rate, and radiological features in skull and spine. *J Med Genet* 16[2], 140-146. 1979.
- Orioli, IM, Castilla, EE, Barbosa-Neto, JG. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet* 23[4], 328-332. 1986.
- Pannier, S, Couloigner, V, Messaddeq, N, Elmaleh-Bergés, M et al. Activating *Fgfr3* Y367C mutation causes hearing loss and inner ear defect in a mouse model of chondrodysplasia. *Biochim Biophys Acta* 1792[2], 140-147. 2009.
- Potter, LR, Yoder, AR, Flora, DR, Antos, LK et al. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol* [191], 341-366. 2009.
- Rao, GN, Greger, NG, Nelson, DA. Whole body bone mass and body composition in a girl with achondroplasia, at ages 9 through 12. *J Clin Densitom* 2[2], 185-190. 1999.
- Sawant, SG, Fielden, MR, Black, KA. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. *Regul Toxicol Pharmacol* 70[1], 87-97. 2014.

- Schibler, L, Gibbs, L, Benoist-Lassel, C, Decraene, C et al. New Insights on FGFR3-related chondrodysplasias molecular physiopathology revealed by human chondrocyte gene expression profiling. *PLoS One* 4[10], e7633, 2009.
- Sebastian, A, Matsushita, T, Kawanami, A, Mackem, S et al. Genetic inactivation of ERK1 and ERK2 in chondrocytes promotes bone growth and enlarges the spinal canal. *J Orthop Res* 29[3], 375-379. 2010.
- Seymour, AA, Mathers, PD, Abboa-Offei, BE, Asaad, MM et al. Renal and depressor activity of C-natriuretic peptide in conscious monkeys: effects of enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 28[3], 397-401. 1996.
- Su, N, Sun, Q, Li, C, Lu, X et al. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Hum Mol Genet* 19[7], 1199-1210. 2010.
- Suga, S, Nakao, K, Hosoda, K, Mukoyama, M et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130[1], 229-239. 1992.
- Thybaud, V, Kasper, P, Sobol, Z, Elhajouji A et al. Genotoxicity assessment of peptide/protein-related biotherapeutics: points to consider before testing. *Mutagenesis* 31[4], 375-384. 2016.
- Vajo, Z, Francomano, CA, Wilkin, DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 21[1], 23-39. 2000.
- Vesely, DL. Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure, and cancer? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33[3], 169-176. 2006.
- Vesely, DL. Heart peptide hormones: adjunct and primary treatments of cancer. *Anticancer Res* 36[11], 5693-5700. 2016.
- Waller, DK, Correa, A, Vo, TM, Wang, Y et al. The population-based prevalence of achondroplasia and thanatophoric dysplasia in selected regions of the US. *Am J Med Genet A* 146A[18], 2385-2389. 2008.
- Wright, MJ, Irving, MD. Clinical management of achondroplasia. *Arch Dis Child* 97[2], 129-134. 2012.
- Wynn, J, King, TM, Gambello, MJ, Waller, DK et al. Mortality in achondroplasia study: a 42-year follow-up. *Am J Med Genet A* 143A[21], 2502-2511. 2007.
- Yasoda, A, Komatsu, Y, Chusho, H, Miyazawa, T et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 10[1], 80-86. 2004.
- Yasoda, A, Kitamura, H, Fujii, T, Kondo, E et al. Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology* 150[7], 3138-3144. 2009.
- Zenitani, M, Nojiri, T, Uehara, S, Miura, K et al. C-type natriuretic peptide in combination with sildenafil attenuates proliferation of rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Med* 5[5], 795-805. 2016.
- Zoetis, T, Tassinari, MS, Bagi, C, Walthall, K et al. Species comparison of postnatal bone growth and development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68[2], 86-110. 2003.

2.4.5 非臨床試験の概括評価の補遺

Listing of Studies Not Presented in Module 4	
CTD Section	Justification
4.2 Nonclinical Study Reports	
4.2.1 Pharmacology	
4.2.1.4 Pharmacodynamic Drug Interactions	Since BMN 111 is a peptide comprised entirely of natural amino acids and does not contain an unnatural linker, it is not expected to elicit any drug interactions.
4.2.2 Pharmacokinetics	
4.2.2.5 Excretion	BMN 111, a peptide, is expected to be catabolized by proteases and degraded into small peptide fragments and amino acids. Hence conventional studies to characterize excretion were not conducted.
4.2.2.6 Pharmacokinetic Drug Interactions	In vitro drug-drug interaction (DDI) studies using human biomaterials were conducted to assess DDI potential of BMN 111. Detailed results are provided in CTD Section 5.3.2.2.
4.2.3 Toxicology	
4.2.3.3 Genotoxicity	Since BMN 111 is a peptide comprised entirely of natural amino acids and does not contain an unnatural linker, it is not expected to react directly with DNA.
4.2.3.4 Carcinogenicity 4.2.3.4.1 Long-term studies 4.2.3.4.2 Short- or medium-term studies	A literature-based risk assessment was performed for BMN 111 that concluded standard carcinogenicity studies in rodents were unlikely to provide additional clinically meaningful safety data to predict the potential carcinogenic risk of BMN 111. Due to the mechanism of action of BMN 111, the risk for carcinogenicity is considered low.
4.2.3.5 Reproductive and Development Toxicity 4.2.3.5.4 Studies in which the offspring (juvenile animals) are dosed and/or further evaluated	In reproductive and developmental toxicity studies there were no effects on reproduction or offspring from mothers treated with BMN 111 (Studies BMN 111-14-060, BMN 111-14-061, BMN 111-14-081, BMN 111-18-103). Studies in which juvenile animals are directly administered test article are included in the repeat-dose toxicity section, 4.2.3.2. (Studies BMN 111-11-019, BMN 111-11-053, BMN 111-11-052, BMN111-11-035).
4.2.3.6 Local Tolerance	Specific local tolerance studies were not conducted with BMN 111, however injection sites were evaluated in the GLP toxicology studies including clinical observations and histopathology. In these studies, BMN 111-treated animals exhibited slightly higher incidence and severity of subcutaneous injection site perivascular infiltrates compared to the vehicle control, suggesting that BMN 111 was slightly more irritating or immunogenic than vehicle alone (Studies BMN 111-11-035, BMN 111-11-036, BMN 111-11-043, BMN 111-11-052). This finding was reversible and not considered an adverse event in these studies.