

**ボックスゾゴ<sup>®</sup>皮下注用 0.4mg**  
**ボックスゾゴ<sup>®</sup>皮下注用 0.56mg**  
**ボックスゾゴ<sup>®</sup>皮下注用 1.2mg**

## **2.6 非臨床試験の概要文及び概要表**

### **2.6.1 緒言**

**BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社**

## 目次

|               |   |
|---------------|---|
| 2.6.1 緒言..... | 4 |
|---------------|---|

## 表目次

|  |   |
|--|---|
| 表 2.6.1-1 C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 及び命名法..... | 6 |
|--|---|

## 図目次

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 図 2.6.1-1 BMN 111 の構造 ..... | 5 |
|-----------------------------|---|

## 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                |
| ANP    | atrial natriuretic peptide                     | 心房性ナトリウム利尿ペプチド        |
| 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           |
| CNP    | C-type natriuretic peptide                     | C 型ナトリウム利尿ペプチド        |
| 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  |
| FGFR3  | fibroblast growth factor receptor 3            | 線維芽細胞増殖因子受容体 3        |
| MAPK   | mitogen activated protein kinase               | 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ    |
| NP     | natriuretic peptide                            | ナトリウム利尿ペプチド           |
| NPR-B  | natriuretic peptide receptor type B            | ナトリウム利尿ペプチド受容体 B      |
| PKG II | cGMP-dependent tyrosine kinase II              | II 型 cGMP 依存性チロシンキナーゼ |
| RAF-1  | fibrosarcoma serine/threonine protein kinase   | 線維肉腫セリン/スレオニンキナーゼ     |
| SDS    | standard deviation score                       | 標準偏差スコア               |
| TD     | thanatophoric dysplasia                        | タナトフォリック骨異形成症         |

### 2.6.1 緒言

軟骨無形成症 (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 3 遺伝子 (*FGFR3*) の機能獲得型変異に起因する常染色体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 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%) は平均的な身長の両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線維芽細胞増殖因子受容体 3 (*FGFR3*) の膜貫通ドメインに存在する G380R 置換 (98%) である ([Gardner 1977]) ([Oberklaid 1979]) ([Martínez-Frías 1991]) ([Orioli 1986]) ([Waller 2008]) ([Vajo 2000])。

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、胸腰椎後弯症及び腰椎過前弯がある。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 (軟骨低形成症) から致死性 (TD) まで多様である。

*FGFR3* の下流シグナル伝達は、軟骨細胞の増殖及び分化に抑制的に作用する。*FGFR3* の機能獲得型変異が原因で発症する ACH 患者では、この抑制が悪化し、軟骨内骨形成の欠陥がもたらされる。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]) 経路は、軟骨細胞の増殖及び分化に対する *FGFR3* による抑制を仲介する。MAPK (ERK1/2) 経路は、軟骨細胞の増殖及び分化の正の調節因子である C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) によって下方制御される。CNP はナトリウム利尿ペプチド受容体 B

(NPR-B) に結合し、MAPK (ERK1/2) 経路を、RAF-1 の段階で阻害することにより、*FGFR3* の下流シグナル伝達を阻害する。このクロストークは、*FGFR3* に関連した軟骨異形成症のマウスモデルで実証されている ([Yasoda 2004]) ([Yasoda 2009])。*Fgf3* の機能獲得型変異を有するマウスの矮小発育症は、軟骨での CNP の発現又は CNP の持続投与 (注入) によって改善された。

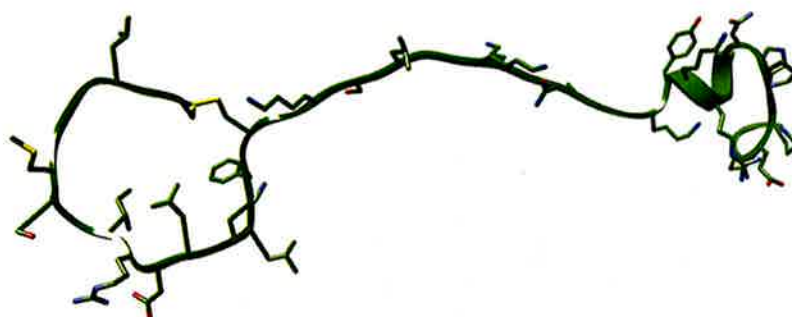
CNP は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 及び B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) を含むナトリウム利尿ペプチド (NP) ファミリーに属している。これらのペプチドは心血管系、骨格系、神経系、生殖系及びその他の生体システムを調節する構造的には類似しているが、異なるパラクリン/オートクリン (CNP) 並びに内分泌ホルモン (ANP 及び BNP) 因子である。ANP (アナリチド及びカルペリチド)、並びに BNP (ネシリチド) の合成アナログは、非代償性心不全及び心血管関連疾患の治療のための有力な治療法として検討されている。

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 CNP アナログである。BMN 111 は大腸菌で産生され、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 KGCFLGLKLDL IGSMISGLGC 39

BMN 111 の二次構造を図 2.6.1-1 に示す。

図 2.6.1-1 BMN 111 の構造



BMN 111 は、1) 受容体結合及び薬理活性に関して CNP の活性を模倣し、2) CNP と比較して半減期を延長するために、中性エンドペプチダーゼ分解に抵抗性を示すようにデザインされている。この半減期の延長は、標的である成長板への BMN 111 の曝露量を増加させると推測される。BMN 111 及び CNP は、構造的類似性に基づき同様の作用機序及び薬理活性を示すことが期待される。BMN 111 は 1 日 1 回皮下投与されるため、内在性 CNP と比較してより全身性の効果が期待される。しかし、半減期が短いため、一時的にのみ曝露され活性を示すと予想される。BMN 111 は、CNP と同様に NPR-B に結合して、細胞内環状グアノシンリン酸 (cGMP) の産生を促進すると考えられる。軟骨細胞では、cGMP のシグナル伝達は、軟骨細胞の増殖及び分化、並びに最終的に軟骨内骨形成を調節する II 型 cGMP 依存性チロシンキナーゼ (PKG II) によって仲介されている。BMN 111 は、この経路を介して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すると考えられる ([Boccardi 2009])。

BMN 111 の一部の非臨床試験は、天然型又は代替配列を使用して実施している。また、非臨床試験報告書では、BMN 111 に対してほかの名称も使用している。表 2.6.1-1 に、使用した用語及びそれぞれのアミノ酸配列を示す。

表 2.6.1-1 C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 及び命名法

| Term                          | Definition   | Sequence   |
|-------------------------------|--|--|
| CNP53                         | Human WT form; protein precursor to CNP22              | LRVDTKSRAAWARLLDEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC |
| CNP22                         | Human WT form; derived post-translationally from CNP53 | GLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC                               |
| CNP37                         | Human recombinant protein harboring CNP22 sequence     | DEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC                |
| CNP38, BMN 111-B2             | Human recombinant protein harboring CNP22 sequence     | GDEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC               |
| BMN 111, BMN 111-B3, ProCNP38 | Human recombinant protein harboring CNP22 sequence     | PGDEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC              |
| BMN 111-C                     | Human recombinant protein harboring CNP22 sequence     | GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC               |
| BMN 111-C2                    | Human recombinant protein harboring CNP22 sequence     | PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGC              |

WT, wild type; CNP, C-type natriuretic peptide.

BMN 111 の非臨床開発プログラムは、小児軟骨無形成症患者集団での BMN 111 の長期皮下投与を支持するように特別にデザインされている。実施した試験には、軟骨細胞及び受容体への親和性及び結合において BMN 111 が CNP と同様の活性を示すことを明らかにした *in vitro* 薬理試験、疾患モデルにおいて骨成長及び低身長表現型に対して改善効果を示すことを明らかにした *in vivo* 試験、中枢神経系、呼吸系及び心血管系の機能に対する BMN 111 の影響を評価した安全性薬理試験、並びに成熟及び幼若／若齢動物を用いた毒性試験などがある。

全ての非臨床試験結果より、骨端線が閉鎖していない患者の ACH の治療を目的として 15 µg/kg/日の BMN 111 を連日反復皮下投与することを強く支持する。

**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**

## **2.6 非臨床試験の概要文及び概要表**

### **2.6.2 薬理試験の概要文**

**BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社**



## 目次

|  |    |
|--|----|
| 2.6.2 薬理試験の概要文.....  | 9  |
| 2.6.2.1 まとめ.....   | 9  |
| 2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....   | 16 |
| 2.6.2.2.1 動物種の選択.....  | 20 |
| 2.6.2.2.2 <i>FGFR3</i> に関連する軟骨異形成症の動物モデル.....  | 21 |
| 2.6.2.2.2.1 軟骨無形成症 (ACH) の <i>Fgfr3</i> <sup>G380R</sup> マウスモデル.....   | 21 |
| 2.6.2.2.2.2 軟骨無形成症の <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスモデル.....                                     | 21 |
| 2.6.2.2.3 <i>In vitro</i> 試験.....  | 23 |
| 2.6.2.2.3.1 カニクイザルの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列とヒトの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C との相同性の比較.....                                | 23 |
| 2.6.2.2.3.2 マウス線維芽細胞株 NIH/3T3 の cGMP 産生に対する BMN 111 の作用.....   | 24 |
| 2.6.2.2.3.3 NPR-A、NPR-B 及び NPR-C に対する BMN 111 の相対的親和性.....   | 24 |
| 2.6.2.2.3.4 ラット、マウス、ウサギ、カニクイザル及びヒトの NPR-B に対する BMN 111 の相対的結合親和性及び cGMP 産生への影響.....                                    | 26 |
| 2.6.2.2.3.5 初代培養ヒト軟骨細胞での BMN 111 の活性 ( <i>in vitro</i> ) .....   | 28 |
| 2.6.2.2.3.6 不死化及び初代培養ヒト正常、軟骨無形成症及びタナトフォリック骨異形成症成長板軟骨細胞での BMN 111 の効力の評価.....   | 30 |
| 2.6.2.2.3.7 BMN 111 による FGF2 誘導性のシグナル伝達の抑制、並びに細胞増殖及び細胞外マトリックスタンパク質産生及び沈着の回復に関する処理頻度の評価.....                            | 32 |
| 2.6.2.2.4 <i>Ex vivo</i> 試験.....   | 34 |
| 2.6.2.2.4.1 胚性 (E16.5) <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス骨外植片の BMN 111 の添加培養による軟骨内骨成長の評価.....      | 34 |
| 2.6.2.2.5 <i>In vivo</i> 試験.....   | 38 |
| 2.6.2.2.5.1 疾患モデル.....   | 39 |
| 2.6.2.2.5.2 正常動物.....  | 51 |
| 2.6.2.3 副次的薬理試験.....   | 66 |
| 2.6.2.3.1 SpectrumScreen®による BMN 111 のオフターゲット活性.....   | 66 |
| 2.6.2.4 安全性薬理試験.....   | 67 |
| 2.6.2.4.1 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する BMN 111 の作用.....  | 67 |
| 2.6.2.4.2 麻酔下の雄性 FVB マウスの BMN 111-B2、BMN 111-C、BMN 111-B3 (BMN 111)、BMN111-C2 及び CNP-A (E/D)の皮下投与による心血管系に対する影響の検討..... | 68 |
| 2.6.2.4.3 ラットの BMN 111 の単回皮下投与による中枢神経系に対する安全性薬理評価.....   | 69 |
| 2.6.2.4.4 雄性ラットの BMN 111 の単回皮下投与によるヘッドアウトプレチスモグラフィを用いた呼吸系に対する安全性薬理評価.....  | 71 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.6.2.4.5 | テレメータを装着したサルの BMN 111-B3 (BMN 111) の皮下投与における漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与の血行動態、毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験 (フェーズ I 及びフェーズ II) ..... | 72 |
| 2.6.2.4.6 | テレメータを装着した覚醒下のカンクイザルの BMN 111 の皮下投与による心血管系に対する予備的安全性薬理評価.....   | 76 |
| 2.6.2.4.7 | テレメータを装着した覚醒下の雄性カンクイザルの BMN 111 の皮下投与による心血管系に対する安全性薬理評価.....  | 77 |
| 2.6.2.5   | 薬力学的薬物相互作用試験.....   | 80 |
| 2.6.2.6   | 考察及び結論 .....  | 80 |

## 表目次

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| 表 2.6.2.1-1    | BMN 111 の薬理試験一覧 .....   | 10 |
| 表 2.6.2.2-1    | ナトリウム利尿ペプチド：構造、組織分布及び生理活性.....  | 17 |
| 表 2.6.2.2-2    | ナトリウム利尿ペプチド受容体：組織分布、相対的リガンド親和性及び機能 .....  | 18 |
| 表 2.6.2.2.1-1  | ヒト NPR-A、NPR-B 及び NPR-C とのアミノ酸配列の同一性.....   | 20 |
| 表 2.6.2.2.2-1  | 表現型特性の動物個体間の変動性 .....   | 22 |
| 表 2.6.2.2.3-1  | EC <sub>50</sub> 評価.....  | 26 |
| 表 2.6.2.2.3-2  | BMN 111 の NPR-B 飽和及び解離活性.....   | 28 |
| 表 2.6.2.2.4-1  | 野生型及び <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの大腿骨の溶媒及び BMN 111 (10 <sup>-6</sup> mol/L) の添加培養 1 日目及び 7 日目の大腿骨長 ..... | 34 |
| 表 2.6.2.2.5-1  | <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの骨成長評価の試験デザイン .....   | 39 |
| 表 2.6.2.2.5-2  | <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の 10 日間投与による最終成長測定及び溶媒に対する増加率.....                                    | 41 |
| 表 2.6.2.2.5-3  | <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の 20 日間投与による全体の発達及び骨の成長評価の試験デザイン.....                               | 44 |
| 表 2.6.2.2.5-4  | 投与群ごとの予定された安楽死までの生存状態.....  | 45 |
| 表 2.6.2.2.5-5  | <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の投与による骨、尾及び頭胴長 (平均値) の野生型マウス及び溶媒投与との比較.....                         | 47 |
| 表 2.6.2.2.5-6  | Ach マウスの BMN 111 の 36 日間皮下投与による骨の成長の試験デザイン.....   | 48 |
| 表 2.6.2.2.5-7  | 最終成長測定及び溶媒を投与した野生型マウスに対する増加率.....   | 50 |
| 表 2.6.2.2.5-8  | 投与量設定試験デザイン (BMN111-09-048 試験、BMN111-09-075 試験及び BMN111-09-074 試験) .....  | 52 |
| 表 2.6.2.2.5-9  | 5 週間連日投与後の最終成長測定及び溶媒を投与した動物に対する増加率 (BMN111-09-048 試験、BMN111-09-075 試験及び BMN111-09-074 試験) .....                                     | 54 |
| 表 2.6.2.2.5-10 | 投与レジメン検討のための試験デザイン (BMN 111-09-074 試験) .....  | 56 |

|   |    |
|---|----|
| 表 2.6.2.2.5-11 種々の投与レジメンの最終成長測定及び溶媒を投与した動物に対する増加率 (BMN111-09-074 試験) .....  | 57 |
| 表 2.6.2.2.5-12 ラットの成長試験デザイン .....   | 60 |
| 表 2.6.2.2.5-13 最終成長測定及び溶媒を投与した動物に対する増加率 .....   | 60 |
| 表 2.6.2.2.5-14 カニクイザルの 6 ヶ月間皮下投与による薬物動態、薬理及び安全性試験予備検討の試験デザイン .....  | 61 |
| 表 2.6.2.3.1-1 有意な反応を示した受容体又はイオンチャネル .....   | 67 |
| 表 2.6.2.4.2-1 心血管系に対する影響に関する投与量設定試験の試験デザイン .....  | 68 |
| 表 2.6.2.4.3-1 ラットの中樞神経系に対する安全性薬理試験の試験デザイン .....   | 70 |
| 表 2.6.2.4.4-1 ラットの呼吸系に対する安全性薬理試験の試験デザイン .....   | 71 |
| 表 2.6.2.4.5-1 テレメータを装着したサル BMN 111 の皮下投与によるおける漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与の血行動態、毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験のフェーズ I の試験デザイン ..... | 73 |
| 表 2.6.2.4.5-2 テレメータを装着したサル BMN 111 の皮下投与による漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与の血行動態、毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験のフェーズ II の試験デザイン .....   | 73 |
| 表 2.6.2.4.6-1 カニクイザルの心血管系に対する予備的安全性薬理試験の試験デザイン .....  | 76 |
| 表 2.6.2.4.7-1 カニクイザルの心血管系に対する安全性薬理試験におけるラテン方格配置のダブルクロスオーバー投与デザイン (フェーズ I) .....   | 77 |
| 表 2.6.2.4.7-2 カニクイザルの反復投与による心血管系に対する安全性薬理試験デザイン (フェーズ II) .....   | 78 |

## 図目次

|   |    |
|---|----|
| 図 2.6.2.2-1 FGFR3 及び CNP の軟骨細胞でのシグナル伝達経路のクロストーク .....   | 19 |
| 図 2.6.2.2.2-1 タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの矮小発育症表現型の進行 .....  | 21 |
| 図 2.6.2.2.2-2 タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの特性 .....   | 22 |
| 図 2.6.2.2.3-1 NIH/3T3 細胞の cGMP 産生 .....   | 24 |
| 図 2.6.2.2.3-2 NPR-B のシグナル伝達 .....   | 25 |
| 図 2.6.2.2.3-3 NPR-A のシグナル伝達 .....   | 25 |
| 図 2.6.2.2.3-4 ウサギ、ラット、マウス又はヒトの NPR-B を発現する HEK293T 細胞の cGMP 産生に対する CNP22 及び BMN 111 の効力 .....                 | 27 |
| 図 2.6.2.2.3-5 ヒト正常関節軟骨細胞の BMN 111 及び CNP22 による cGMP 産生 .....  | 28 |
| 図 2.6.2.2.3-6 <i>FGFR3<sup>wt</sup></i> 及び <i>FGFR3<sup>G380R</sup></i> ヒト関節軟骨細胞での BMN 111 による ERK リン酸化 ..... | 29 |
| 図 2.6.2.2.3-7 <i>FGFR3<sup>G380R</sup></i> 軟骨細胞の BMN 111 による cGMP 産生 .....                                    | 29 |
| 図 2.6.2.2.3-8 初代培養正常成長板軟骨細胞の FGF を介した MAPK リン酸化亢進の BMN 111 による部分的抑制 .....                                     | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 図 2.6.2.2.3-9 初代培養軟骨無形成症 (ACH) 成長板軟骨細胞の FGF を介した MAPK リン酸化亢進の BMN 111 による部分的抑制 .....   | 31 |
| 図 2.6.2.2.3-10 初代培養タナトフォリック骨異形成症 (TD) 成長板軟骨細胞の FGF を介した MAPK リン酸化の亢進の BMN 111 による部分的抑制 .....                                 | 31 |
| 図 2.6.2.2.3-11 ラット軟骨肉腫培養細胞の FBMN 111 及び FGF2 処理による ERK1/2 のリン酸化 .....  | 33 |
| 図 2.6.2.2.3-12 ラット軟骨肉腫細胞の 200 nmol/L の BMN 111 及び FGF2 処理による細胞外マトリックスタンパク質産生及び沈着 .....                                       | 33 |
| 図 2.6.2.2.4-1 野生型及び <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス大腿骨の溶媒及び BMN 111 の 6 日間添加培養による伸長 (平均値) .....       | 35 |
| 図 2.6.2.2.4-2 野生型及び <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの大腿骨の BMN 111 の 6 日間添加培養による大腿骨長の全体的な変化 (平均値) ..... | 35 |
| 図 2.6.2.2.4-3 野生型及び <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの大腿骨の BMN 111 の 6 日間添加培養による絶対伸長 (溶媒に対する平均比率) ..... | 36 |
| 図 2.6.2.2.4-4 遠位大腿骨成長板の BMN 111 (10 <sup>-6</sup> mol/L) の 6 日間添加培養後の組織学的解析 .....  | 37 |
| 図 2.6.2.2.4-5 軟骨細胞の BMN 111 (10 <sup>-6</sup> mol/L) の 6 日間添加培養後の増殖及び分化の評価 .....   | 38 |
| 図 2.6.2.2.5-1 溶媒及び BMN 111 を 10 日間投与した <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス同腹仔の外観 .....                      | 41 |
| 図 2.6.2.2.5-2 <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の 10 日間皮下投与による遠位大腿骨成長板の組織学的評価 .....              | 43 |
| 図 2.6.2.2.5-3 遺伝子型が一致した同腹仔の BMN 111 及び溶媒の 20 日間連日投与による外観の比較 .....  | 46 |
| 図 2.6.2.2.5-4 BMN 111 投与動物の成長板の幅の増加、トリクローム染色切片 (x10) ....  | 55 |
| 図 2.6.2.2.5-5 BMN 111 の連日投与期間の成長速度の増加 (BMN111-09-074 試験) .....   | 58 |
| 図 2.6.2.2.5-6 右後肢長の伸長 (ノギスによる測定) .....   | 63 |
| 図 2.6.2.2.5-7 脛骨の伸長の評価 (デジタル X 線撮影) .....  | 64 |
| 図 2.6.2.2.5-8 左脛骨近位成長板の組織形態計測学的評価 .....  | 65 |
| 図 2.6.2.4.5-1 28 µg/kg の BMN 111 の 7 日間連日皮下投与による雌雄サルの血圧及び心拍数変化 .....   | 75 |
| 図 2.6.2.4.7-1 フェーズ I 動物の平均心拍数及び平均動脈圧 .....   | 79 |

## 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)   |
|--------------------|--|--|
| 2D                 | 2 dimensional  | 2 次元   |
| μCT                | micro computed tomography  | マイクロコンピュータ断層撮影   |
| ACH                | achondroplasia   | 軟骨無形成症   |
| Ach                | <i>Fgfr3</i> <sup>G380R</sup> achondroplasia mouse model                                 | <i>Fgfr3</i> <sup>G380R</sup> 軟骨無形成症マウスモデル               |
| ALP                | alkaline phosphatase   | アルカリホスファターゼ  |
| ANF                | atrial natriuretic factor  | 心房性ナトリウム利尿因子   |
| ANP                | atrial natriuretic peptide   | 心房性ナトリウム利尿ペプチド   |
| AP                 | anterior posterior   | 前後 (方向の)   |
| AUC                | area under the concentration time curve  | 濃度－時間曲線下面積   |
| AUC <sub>0-t</sub> | 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                                |
| BLOQ               | below limit of quantitation  | 定量限界未満   |
| BMD                | bone mineral density   | 骨密度  |
| 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  |
| CHO                | Chinese hamster ovary  | チャイニーズハムスター卵巣  |
| C <sub>max</sub>   | 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   |
| CT                 | computed tomography  | コンピュータ断層撮影 (法)   |
| DMEM               | Dulbecco's modified Eagle medium   | ダルベッコ改変イーグル培地  |
| DXA                | dual energy X ray absorptiometry :   | 二重エネルギー X 線吸収測定法   |
| EC <sub>50</sub>   | half maximal effective concentration   | 50%効果濃度  |
| EDTA               | ethylenediaminetetraacetic acid  | エチレンジアミン四酢酸  |
| ELISA              | enzyme-linked immunosorbent assay  | 酵素結合免疫吸着測定法  |
| ERK                | extracellular signal-regulated kinase  | 細胞外シグナル調節キナーゼ  |
| 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                                     |
| FBS                | fetal bovine serum   | ウシ胎仔血清   |
| Fc                 | fragment crystallizable  | (免疫グロブリン分子の) 結晶化可能フラグメント                                 |
| FDA                | Food and Drug Administration   | 米国食品医薬品局   |
| 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   |
| FGFR2              | fibroblast growth factor receptor 2  | 線維芽細胞増殖因子受容体 2   |
| FGFR3              | fibroblast growth factor receptor 3  | 線維芽細胞増殖因子受容体 3   |
| 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) |

## 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)                |
|------------------|---|-------------------------------|
| GLP              | Good Laboratory Practice  | 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施に関する基準     |
| H&E              | hematoxylin and eosin   | ヘマトキシリン及びエオシン                 |
| HB-PS            | HEPES buffered physiological saline                             | HEPES 緩衝生理食塩水                 |
| HCl              | hydrochloride/hydrochloric acid                                 | 塩酸                            |
| hERG             | human <i>ether-á-go-go</i> related gene                         | ヒト <i>ether-á-go-go</i> 関連遺伝子 |
| HRP              | horseradish peroxidase  | 西洋ワサビペルオキシダーゼ                 |
| IC <sub>50</sub> | half maximal inhibitory concentration                           | 50%阻害濃度                       |
| ID               | identification  | 識別番号                          |
| IgG              | immunoglobulin G  | 免疫グロブリン G                     |
| IgG1             | immunoglobulin G subtype 1                                      | 免疫グロブリン G サブタイプ 1             |
| IHC              | immunohistochemistry  | 免疫組織染色                        |
| IKr              | rapidly activating, delayed rectifier cardiac potassium current | 急速活性化型遅延整流心筋カリウム電流            |
| Kd               | dissociation constant   | 解離定数                          |
| MAPK             | mitogen activated protein kinase                                | 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ            |
| MRI              | magnetic resonance imaging                                      | 磁気共鳴画像 (法)                    |
| MTD              | maximum tolerated dose  | 最大耐量                          |
| NCBI             | National Center for Biotechnology Information                   | 国立バイオテクノロジー情報センター             |
| NEP              | neutral endopeptidase   | 中性エンドペプチダーゼ                   |
| 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              |
| OECD             | Organization for Economic Co-operation and Development          | 経済協力開発機構                      |
| PBS              | phosphate buffered saline                                       | リン酸緩衝生理食塩水                    |
| 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         |
| PND              | post-natal days   | 出生後日数                         |
| QTc              | QT interval corrected for heart rate                            | 心拍数で補正した QT 間隔                |

## 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）          |
|-----------|---|------------------------|
| QTcB      | QT interval corrected for heart rate by the Bazett method | バゼット法により心拍数で補正した QT 間隔 |
| RAF-1     | fibrosarcoma serine/threonine protein kinase              | 線維肉腫セリン／スレオニンキナーゼ      |
| RIPA      | radioimmunoprecipitation assay                            | 放射性免疫沈降アッセイ            |
| SD        | Sprague Dawley  | ラットの系統                 |
| $t_{1/2}$ | elimination phase half-life                               | 半減期                    |
| 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             |
| wt        | wild type   | 野生型                    |

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

BMN 111 は、軟骨無形成症（ACH）の治療を目的とした遺伝子組換え C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）アナログである。BMN 111 及び CNP は、同様の作用機序及び薬理活性を有している。BMN 111 は中性エンドペプチダーゼ（NEP）による分解に抵抗性を示すため、CNP と比較して循環血液中の半減期が延長されており、標的器官である成長板への曝露量が増加すると推定されている。

BMN 111 を特定したスクリーニング試験では、数種類の CNP アナログを *in vitro*、*ex vivo* 及び *in vivo* 試験系で評価した。用いた CNP アナログの名称一覧を[表 2.6.1-1]に示している。

BMN 111 の薬理活性は、9 試験の *in vitro* 試験、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、中枢神経系、呼吸系及び心血管系の機能への影響を含め、CNP と類似していることが示された。

ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系に対する安全性薬理試験、並びにサルを用いた心血管系に対する安全性薬理主試験は、米国食品医薬品局（FDA）GLP 基準 CFR 21 Part 58、厚生労働省 GLP 基準厚生省令第 21 号及び経済協力開発機構（OECD）GLP 基準 ENV/MC/CHEM（98）17 に準拠して実施した。実施した薬効薬理及び安全性薬理試験の一覧を表 2.6.2.1-1 に示す。



表 2.6.2.1-1 BMN 111 の薬理試験一覧

| Type of Study                                  | Test System   | Age at Initiation of Dosing | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses (µg/kg) <sup>a</sup> | GLP Compliance | Study Number    | Summary Location | Location of Study Summary |
|--|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------------|
| <b>Primary Pharmacodynamics</b>                |   |                             |                          |                                      |                            |                |                 |                  |                           |
| Receptor Homology                              | Monkey, cynomolgus; human ( <i>in silico</i> )  | NA                          | NA                       | NA                                   | NA                         | Non-GLP        | [BMN111-11-044] | [2.6.3.2-1]      | 2.6.2.2.3.1               |
| 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]      | 2.6.2.2.3.2               |
| 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]      | 2.6.2.2.3.3               |
| Cross-species receptor potency and affinity    | HEK293T cells transiently expressing NPR-B from rat, mouse, rabbit, and 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]      | 2.6.2.2.3.4               |
|  |   |                             |                          | 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]      | 2.6.2.2.3.5               |

表 2.6.2.1-1 BMN 111 の薬理試験一覧（続き）

| Type of Study  | Test System   | Age at Initiation of Dosing                 | Method of Administration | Duration and Administration Schedule                         | Doses (µg/kg) <sup>a</sup>            | GLP Compliance | Study Number    | Summary Location | Location of Study Summary |
|--|---|---|--------------------------|--|---------------------------------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------------|
| Pharmacological activity in various chondrocytes         | Human chondrocytes, Immortalized [G380R (BL-2.2), G380R (Les-11), Y373C (Mani-1.8), Control (GUI-15), Control (KHAIE-9)], Primary (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]      | 2.6.2.2.3.6               |
|  |   |   |                          | 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 pulsed for 60 min 1-2x daily | 200 nmol/L                            | Non-GLP        | [RS19-001]      | [2.6.3.2-1]      | 2.6.2.2.3.7               |
| Pharmacological activity in TD mice <i>ex vivo</i>       | Embryonic mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> femurs  | Embryonic (E16.5) at collection of explants | <i>Ex vivo</i>           | 6 days   | 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 µmol/L | Non-GLP        | [BMN111-10-002] | [2.6.3.2-1]      | 2.6.2.2.4.1               |

表 2.6.2.1-1 BMN 111 の薬理試験一覧 (続き)

| Type of Study   | Test System   | Age at Initiation of Dosing | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses (µg/kg) <sup>a</sup>       | GLP Compliance | Study Number    | Summary Location | Location of Study Summary |
|---|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------------|
| Pharmacological activity in TD mice                         | Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> | 7 days                      | SC                       | Once daily, 10 days                  | 0 (WT) and 0, 240, 800 (TD)      | Non-GLP        | [BMN111-10-046] | [2.6.3.2-1]      | 2.6.2.2.5.1.1             |
| Pharmacological Activity in TD mice                         | Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> | 7 days                      | SC                       | Once daily, 20 days                  | 0 (WT) and 0, 800 (TD)           | Non-GLP        | [BMN111-11-045] | [2.6.3.2-1]      | 2.6.2.2.5.1.2             |
| Pharmacological activity in Ach mice                        | Mouse, FVB, <i>Fgfr3</i> <sup>ach</sup>                     | 3 weeks                     | SC                       | Once daily, 36 days                  | 0 (WT), and 0, 20, 80, 280 (Ach) | Non-GLP        | [BMN111-11-001] | [2.6.3.2-1]      | 2.6.2.2.5.1.3             |
| 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]      | 2.6.2.2.5.2.1.1           |
| 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]      | 2.6.2.2.5.2.1.1           |

表 2.6.2.1-1 BMN 111 の薬理試験一覧 (続き)

| Type of Study                                  | Test System        | Age at Initiation of Dosing | Method of Administration | Duration and Administration Schedule                                   | Doses (µg/kg) <sup>a</sup> | GLP Compliance | Study Number    | Summary Location | Location of Study Summary |
|--|--------------------|-----------------------------|--------------------------|--|----------------------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------------|
| 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]      | 2.6.2.2.5.2.1.1           |
|  |                    |                             |                          | Once daily for 1 week, then 3x/week for 8 weeks. 1-week recovery       | 80                         |                |                 |                  |                           |
|  |                    |                             |                          | Once daily, on alternating weeks (Week 1, 3, 5, 7, 9). 1-week recovery | 80                         |                |                 |                  |                           |
|  |                    |                             |                          | Once daily for 9 weeks, 1-week recovery                                | 20                         |                |                 |                  |                           |
|  |                    |                             |                          | Once daily for 36 days, terminated on Day 37                           | 20                         |                |                 |                  |                           |
| 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]      | 2.6.2.2.5.2.2             |
| 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]      | 2.6.2.2.5.2.3             |

表 2.6.2.1-1 BMN 111 の薬理試験一覧 (続き)

| Type of Study                     | Test System   | Age at Initiation of Dosing | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses (µg/kg) <sup>a</sup>   | GLP Compliance   | Study Number    | Summary Location           | Location of Study Summary |
|-----------------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--|------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>Secondary Pharmacodynamics</b> |   |                             |                          |                                      |  |                  |                 |                            |                           |
| 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<br>IC <sub>50</sub> : 11.44, 1.144, 0.1144, 0.01144 µmol/L | Non-GLP          | [BMN111-11-026] | [2.6.3.3-1]<br>[2.6.3.3-2] | 2.6.2.3.1                 |
| <b>Safety Pharmacodynamics</b>    |   |                             |                          |                                      |  |                  |                 |                            |                           |
| hERG                              | Human, hERG in stably transfected HEK293 cells                                  | NA                          | <i>In vitro</i>          | Single Dose                          | 60 nmol/L Terfenadine (positive control)<br>0, 50 µg/mL                          | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-023] | [2.6.3.4-1]                | 2.6.2.4.1                 |
| Safety Pharmacology, CV           | Mouse, FVB  | 6 to 7 weeks                | SC                       | Single Dose                          | 0, 80, 280, 800, 8000  | Non-GLP          | [BMN111-09-060] | [2.6.3.4-1]                | 2.6.2.4.2                 |
| Safety Pharmacology, CNS          | Rat, HSD:SD   | 8.6 to 9.7 weeks            | SC                       | Single Dose                          | 0, 30, 100, 300  | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-021] | [2.6.3.4-1]                | 2.6.2.4.3                 |
| Safety Pharmacology, Respiratory  | Rat, HSD:SD   | 11.9 to 12.9 weeks          | SC                       | Single Dose                          | 0, 30, 100, 300  | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-022] | [2.6.3.4-1]                | 2.6.2.4.4                 |

表 2.6.2.1-1 BMN 111 の薬理試験一覧（続き）

| Type of Study           | Test System        | Age at Initiation of Dosing | Method of Administration | Duration and Administration Schedule                          | Doses (µg/kg) <sup>a</sup>   | GLP Compliance   | Study Number    | Summary Location | Location of Study Summary |
|-------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|---|--|------------------|-----------------|------------------|---------------------------|
| Safety Pharmacology, CV | 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]      | 2.6.2.4.5                 |
|                         |                    |                             |                          | Phase II: Once daily, 7 days                                  | Phase II: 0, 28, 70 (conscious)  |                  |                 |                  |                           |
| Safety Pharmacology, CV | Monkey, cynomolgus | 4 to 5 years                | SC                       | Single Dose (baseline)  | 0  | Non-GLP          | [BMN111-11-041] | [2.6.3.4-1]      | 2.6.2.4.6                 |
|                         |                    |                             |                          | Group 1: Day 1, 8, 11, 22, 24, 25                             | 250  |                  |                 |                  |                           |
|                         |                    |                             |                          | Group 2: Day 1, 11, 14, 16, 17                                |  |                  |                 |                  |                           |
| Safety Pharmacology, CV | Monkey, cynomolgus | 3.5 to 6 years              | SC                       | Phase I: Day 1, 4, 8, 11                                      | 0, 10, 50, 200   | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-040] | [2.6.3.4-1]      | 2.6.2.4.7                 |
|                         |                    |                             |                          | Phase II: Once daily, 7 days                                  | 200  |                  |                 |                  |                           |

ACH, achondroplasia; Ach, *Fgfr3*<sup>G380R</sup> achondroplasia mouse model; CNS, central nervous system; CV, cardiovascular; FGF, fibroblast growth factor; FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; GLP, good laboratory practice; Hrs, hours; hERG, human *ether-à-go-go* related gene; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; Min, minute; NA, not applicable; NPR, natriuretic peptide receptor; SC, subcutaneous; SD, Sprague Dawley; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

a) µg/kg, unless otherwise specified.

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.

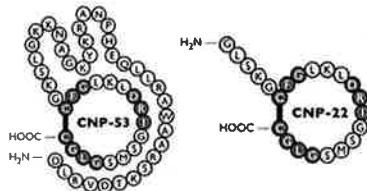
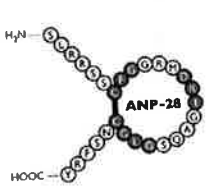
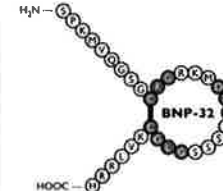
### 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

BMN 111 は、天然に存在し組織に発現されるヒト 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。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 (軟骨細胞、脳、血管内皮及び心臓) に認められるのに対し、CNP22 は血管内皮細胞で産生され分泌されるため血漿中に検出される。CNP22 及び CNP53 は同様の作用機序を有しており、本概要書ではいずれも CNP と称する。BMN 111 の半減期は短い、CNP22 と比較して延長されており、標的器官である成長板への曝露量が増加している ([2.6.4.4]項)。BMN 111 及び CNP は、構造的類似性に基づき同様の作用機序及び薬理活性を示すと考えられる。BMN 111 は皮下投与により 1 日 1 回投与されるため、内在性 CNP と比較してより全身的な効果が期待される。しかし、半減期が短いため、一時的にのみ曝露され薬理活性を示すと考えられる。

CNP、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 及び B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は、ナトリウム利尿ペプチド (NP) ファミリーに属している。これらのペプチドは心血管系、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が、異なるパラクリン/ホルモン因子である。ANP 及び BNP は内分泌ホルモン (エンドクリン) 因子であり、CNP はオートクリン/パラクリン因子として活性を発現する。

ANP、BNP 及び CNP の構造、組織分布及び主な生理活性を表 2.6.2.2-1 に示す。

表 2.6.2.2-1 ナトリウム利尿ペプチド：構造、組織分布及び生理活性

| Feature                           | CNP <sup>a</sup>  | ANP  | BNP  |
|-----------------------------------|---|--|--|
| Structure                         |    |    |   |
| Mode of action                    | Autocrine/paracrine   | Endocrine  | Endocrine  |
| Predominant tissue expression     | CNP53: Chondrocytes, brain, vascular endothelium (predominantly veins), heart<br>CNP22: Plasma (secretion from the endothelial cells)   | Atria, ventricles, kidney  | Atria, ventricles  |
| Predominant physiological effects | <b>Bone</b><br>- Stimulates endochondral bone formation by targeting both chondrocyte and osteoblast proliferation and differentiation<br><b>Vascular</b><br>- Vaso-relaxation by decreasing the peripheral vascular resistance<br><b>Cardiac</b><br>- Inhibits intimal growth mediated by vascular injury<br>- Inhibits pathological cardiac remodeling<br><b>CNS</b><br>Regulation of neuronal development and morphology<br>Regulation of the Hypothalamic Pituitary Adrenal axis<br><b>Reproduction</b><br>Development and physiology of the female reproductive system.<br>Endocrine testicular regulation and penile erection | <b>Renal</b><br>- Increases glomerular filtration rate,<br>- Inhibits sodium re-absorption<br>- Reduces renin and aldosterone secretion<br><b>Vascular</b><br>- Relaxes precontracted aortic rings<br><b>Cardiac</b><br>- Reduces cardiac hypertrophy and fibrosis<br><b>Adipose tissues</b><br>- Increases lipolysis<br><b>Lung</b><br>- Dilatation of pulmonary airways<br><b>CNS</b><br>- Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis | <b>Renal</b><br>- Increases natriuresis and diuresis<br><b>Cardiac</b><br>- Prevents cardiac hypertrophy and fibrosis<br><b>CNS</b><br>Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis |

ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; CNP, C-type natriuretic peptide; CNS, central nervous system.

a) CNP-22 and CNP-53 are the 2 endogenous forms of CNP that are derived from a pro-CNP form.

BMN 111 は、CNP と同様にナトリウム利尿ペプチド受容体 B (NPR-B) 及びナトリウム利尿ペプチド受容体 C (NPR-C) に結合するが、ナトリウム利尿ペプチド受容体 A (NPR-A) には結合しないと予測される。NPR-B 及び NPR-C は、それぞれ、BMN 111 の薬理活性の発現及び BMN 111 のクリアランスの誘導を行うと考えられる。CNP と同様に、BMN 111 により NPR-B が持続的に活性化されると、NPR-B の脱リン酸化が誘導され、その後脱感作が引き起こされることが予想される ([Potter 2009])。ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPRs) の組織分布、CNP、ANP 及び BNP に対する相対的親和性、並びに機能を表 2.6.2.2-2 に示す。1) NPR-C を介したエンドサイトーシス後のリソソームでの分解及び 2) NEP 酵素による酵素的分解の 2 種類の



効率的なクリアランス機構が存在するため、循環血液中の内在性 CNP、ANP 及び BNP の半減期 ( $t_{1/2}$ ) は短い (ANP 及び CNP の  $t_{1/2}$  は約 2 分、並びに BNP の  $t_{1/2}$  は約 20 分)。BNP の  $t_{1/2}$  が ANP 及び CNP より長いのは、ANP 及び CNP と比較して BNP の NPR-C への親和性が弱いことが原因である可能性が高いと考えられる ([Lenz 2011])。

**表 2.6.2.2-2 ナトリウム利尿ペプチド受容体：組織分布、相対的リガンド親和性及び機能**

| Feature                       | NPR-B  | NPR-A   | NPR-C              |
|-------------------------------|--|---|--------------------|
| Predominant tissue expression | Chondrocyte, brain, lung, vascular smooth muscle and reproductive organs (male and female) | Adrenal, brain, vascular smooth muscle, lung, kidney, adipose and heart | Most tissues       |
| Relative affinity             | CNP>ANP>BNP  | ANP>BNP>CNP   | ANP>CNP>BNP        |
| Function                      | Transducer of CNP activities   | Transducer of ANP and BNP activities                                    | Clearance receptor |

ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; CNP, C-type natriuretic peptide; NPR, natriuretic peptide receptor.

CNP 及び NPR-B 発現の正規の時空間解析は実施されていないが、骨格組織及び血管系での CNP 及び NPR-B の発現については、出生前及び出生後の発達の各段階における CNP の薬理活性を評価する細胞アッセイ、*ex vivo* 試験及び *in vivo* 試験で過去 25 年間に確認されている。さらに、循環血液中での CNP の存在が小児及び成人で確認されている ([Hunt 1994]) ([Igaki 1998]) ([Lenz 2011])。成長板閉鎖前の動物でのみ起こる軟骨内成長を除いて、BMN 111 の薬理活性に関して、年齢層間の相違は認められない。

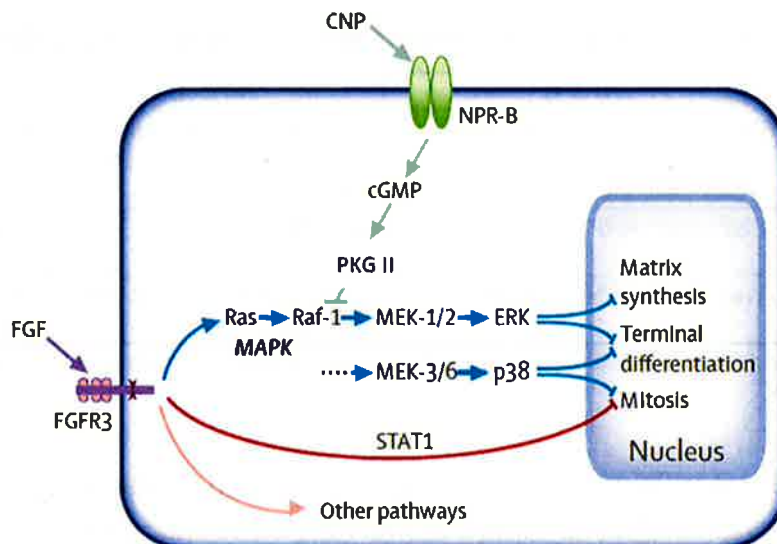
全ての細胞において、ナトリウム利尿ペプチドにより誘導される細胞応答は、主に細胞内環状グアノシンーリン酸 (cGMP) 産生の増加の結果として発現する。cGMP のシグナル伝達は、cGMP 依存性チロシンキナーゼ (プロテインキナーゼ G [PKG]) によって仲介され、血管緊張 (PKG I) 及び軟骨成長 (PKG II) の調節に関与する。

CNP は軟骨細胞の増殖及び分化を促進する、軟骨内骨成長の正の調節因子である。CNP は NPR-B に結合し、軟骨内骨成長の負の調節因子である線維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) の下流シグナル伝達を阻害する。FGFR3 の機能獲得型変異が原因で発症する ACH 患者では、この拮抗作用は悪化し、ACH の特徴であり低身長之最も一般的な形態である軟骨内骨形成の欠陥がもたらされる。CNP は、NPR-B に結合し、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]) 経路を、RAF-1 で阻害することにより、FGFR3 の下流シグナル伝達を阻害する。

FGFR3 及び CNP のシグナル伝達経路間のシグナル伝達クロストーク (図 2.6.2.2-1) については、マウスの ACH モデルにおいて明らかにされた。ACH の原因となる G380R 点変異 (380 番目のグリシンがアルギニンに置換される遺伝子変異) した (*Fgf<sup>G380R</sup>*) マウスの矮小発育症は、軟骨での CNP の過剰発現又は CNP の持続投与によって改善された ([Yasoda 2004]) ([Yasoda 2009])。ヒトでは、染色体転座による CNP の過剰発現が過成長に関連していることが報告されている ([Boccardi 2007])。BMN 111 は、CNP と同様に MAPK (ERK1/2) 経路を下方制御し、

その結果、軟骨内骨形成を促進し、ACH 患者の低身長表現型を改善する可能性があると考えられる。

図 2.6.2.2-1 FGFR3 及び CNP の軟骨細胞でのシグナル伝達経路のクロストーク



ANP, atrial natriuretic peptide; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CNP, C-type natriuretic peptide; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NPR, natriuretic peptide receptor; RAF-1, fibrosarcoma serine/threonine protein kinase. Modified from [Horton 2007].

FGFR3 のシグナル伝達経路が改変されたマウスの表現型特性によって、BMN 111 の過量投与により生じる可能性のある骨格変化についての情報が提供され、*Fgfr3* ノックアウトマウス ([Colvin 1996]) では、FGFR3 のシグナル伝達系の欠損により、軟骨細胞の増殖及び分化の増加に基づき成長板の拡大がもたらされた。この *Fgfr3* ノックアウトマウスでは軟骨細胞が分裂シクラスター形成が認められ、FGFR3 の細胞分裂の調節における役割が裏付けられている。ERK1/2 シグナル伝達が不活性化されたマウス ([Sebastian 2010]) では、骨成長の亢進、縫合閉鎖の遅延、脊柱管の拡大及び二次骨化中心の血管新生の遅延が認められた。

BMN 111 は、CNP と同様に骨芽細胞の形成及び分化を促進することも期待されている

([Bukulmez 2010])。骨で CNP を過剰発現しているマウスは骨形成の増加を示し ([Bocciardi 2007])、FGFR3 の機能獲得型変異を有するマウスは骨形成の減少を示す ([Su 2010]) ことが報告されている。思春期前後の 10 代の軟骨無形成性患者で骨密度 (BMD) の低下の確認が報告されている ([Rao 1999])。

血行動態機能の調節に対する CNP の影響については、*in vitro* 試験で広範囲に検討され、動物モデル及びヒトでの *in vivo* 試験で評価されている。全般的に、CNP の投与により血管平滑筋の弛緩が誘導され、低血圧及び心拍数の代償性増加が誘導される ([Igaki 1998]) ([Seymour 1996])。ANP とは異なり、CNP はナトリウム利尿及び利尿 (尿量) に直接的な影響を及ぼさない ([Clavell 1993])。

結論として、BMN 111 及び CNP は、構造的類似性に基づき同様の作用機序及び薬理活性を示すことが期待される。CNP はオートクリン／パラクリン因子であるが、BMN 111 は全身投与であることから、内分泌因子と同様な活性を現すと考えられる。しかし、BMN 111 は半減期が短い（サルでは約 20 分）、短時間の薬理活性を示すのみと考えられる。これらの薬理活性は、長軸方向の骨成長の促進及び心拍数の代償性増加を伴う一過性の血圧低下などである。

### 2.6.2.2.1 動物種を選択

マウス、ラット及びサルは、CNP 及びナトリウム利尿ペプチド受容体（NPRs）がヒトの CNP 及び NPRs とアミノ酸配列の相同性が高いことに基づき関連種として選択し、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（同一性）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 2.6.2.2.1-1 に示す。

表 2.6.2.2.1-1 ヒト NPR-A、NPR-B 及び NPR-C とのアミノ酸配列の同一性

| 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 National Center for Biotechnology Information Protein Database.

動物種間でアミノ酸配列の相同性が高度に保存されていること、動物種間でシグナル伝達機構が保存されていること、並びにマウス、ラット及びカニクイザルで薬理活性が確認されたことに基づき、これら 3 種類の動物種を用いて BMN 111 の薬理学的評価及び安全性評価を実施した。

安全性薬理試験及び毒性試験では、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。さらに、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。

### 2.6.2.2.2 FGFR3に関連する軟骨異形成症の動物モデル

FGFR3に関連する軟骨異形成症の2種類のマウスモデルを用い、疾患モデルにおける BMN 111 の薬理活性を評価した。両マウスモデルは四肢短縮型矮小発育症を発症するが、点突然変異、導入遺伝子の組織分布及び表現型特性の重症度に関して異なっている。両モデルを用いて、疾患領域（ACH 及び軟骨低形成症）における BMN 111 の適用の妥当性を評価した。

#### 2.6.2.2.2.1 軟骨無形成症（ACH）の *Fgfr3*<sup>G380R</sup> マウスモデル

ACH のマウスモデルである *Fgfr3*<sup>G380R</sup> マウス（FVB 系）モデル（Ach 又は *Fgfr3*<sup>ach</sup>）は、Dr. Ornitz によって開発され（[Naski 1998]）、ヒト ACH 遺伝子変異に対応するヘテロ接合性 *Fgfr3*<sup>G380R</sup> 遺伝子変異を有する。導入遺伝子の発現は、II 型コラーゲンプロモーター及びエンハンサー配列を用いて、軟骨（休止期及び増殖期の軟骨細胞）に標的化されている。

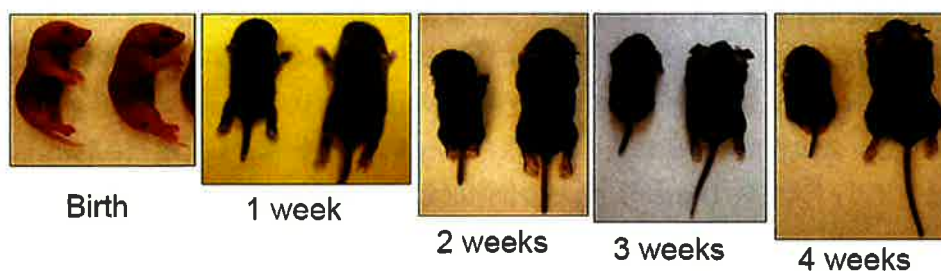
Ach マウスは、四肢骨格及び中軸骨格長の中等度の短縮、ドーム型の頭蓋骨、並びに増殖帯及び肥大帯幅の減少を示すが、それにもかかわらず、全体的に正常な骨構造を示す。Ach マウスは、BioMarin 社の使用経験では全般的に軽度の表現型特性を示した（野生型の同腹子と比較して、体長が約 5～10%短く、四肢長が約 24%短い）。ACH 患者では大後頭孔の狭窄が認められるが、これらのマウスでは大後頭孔面積の増加が認められた（2.6.2.2.5.1.3 項）。

#### 2.6.2.2.2.2 軟骨無形成症の *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症（TD）マウスモデル

*Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> マウスモデルは、Dr. Legeai Mallet によって開発され（[Pannier 2009]）、ヒト Y373C（タナトフォリック骨異形成症 [TD] I 型）アミノ酸変異に対応するヘテロ接合性 Y367C アミノ酸変異を有する。マウスモデルは、CMV-Cre マウス（C57BL/6J）を *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> 遺伝子変異の生殖細胞系列への伝播を示す 129Sv/Pas マウスと交配することによって作製した。*Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> 遺伝子変異は、loxP 組換え部位を隣接する neo カセットと共に、マウス *Fgfr3* 遺伝子のエクソン 9 に導入した。CMV プロモーターにより、*Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> は遍在的に発現される。

出生時、TD マウスは軽度の矮小発育症の表現型特性を示し、マウスの年齢が上がるにつれて表現型はより顕著になり、長骨の短縮（近位肢節短縮型 rhizomelia）、細い体幹、肋骨の短縮及び巨大頭蓋を示すようになる。（図 2.6.2.2.2-1）

図 2.6.2.2.2-1 タナトフォリック骨異形成症（TD）マウスの矮小発育症表現型の進行



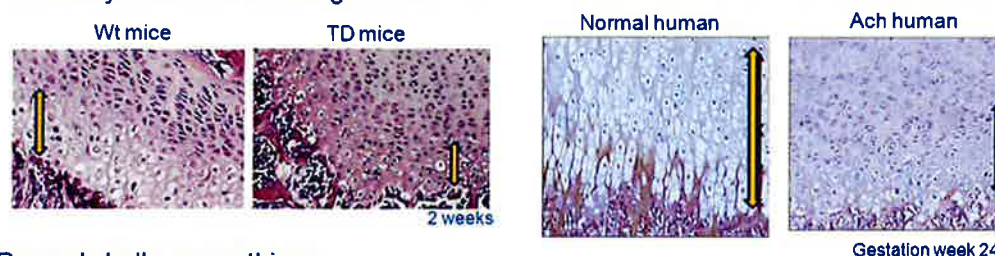
TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

Images provided by Dr. Legeai-Mallet, INSERM, by personal communication. Left mouse: TD mouse; Right mouse: WT mouse.

TD マウスの遠位大腿骨成長板の組織学的解析では、成長板の幅の減少による構造崩壊が認められた。ACH 患者にみられるのと同様に、増殖帯及び肥大帯の幅は短くなり、増殖性軟骨細胞の柱状配列が欠如していた。そのほか、ヒト ACH に関連する組織学的特性に、ドーム型の頭蓋骨、顕著な顎前突、椎間孔狭窄及び脊柱管狭窄がある。TD モデルにおける ACH に関連した特性を図 2.6.2.2.2-2 に示す。全般的に、TD マウスの ACH 特性は、ヒトでみられるものよりも重度である。ACH 患者の平均余命は短縮されないが、TD マウスの生存期間は劇的に短縮される（約 6 週間）。この早期死亡の原因は不明である。

図 2.6.2.2.2-2 タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの特性

Growth plate with shorter proliferative and hypertrophic zones & lack of proliferative chondrocyte columnar arrangement



Domed skull, prognathism



Spinal stenosis



Adapted from [Lorget 2012]; images of mouse and human chondrocyte histology from Dr. Legeai-Mallet, INSERM, by personal communication.

Ach 及び TD マウスの表現型特性の個体間の変動は、野生型マウスの表現型特性の個体間の変動よりも大きかった (表 2.6.2.2.2-1)。

表 2.6.2.2.2-1 表現型特性の動物個体間の変動性

| Test Article     | Naso-anal Length Variability | Tail Length Variability | Body Weight Variability | Skull Variability | Femur Variability | Tibia Variability | LV4-6 Variability |
|------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| WT <sup>a</sup>  | ±1.7%                        | ±1.8%                   | ±3.0%                   | ±2.1%             | ±1.2%             | ±1.3%             | ±3.9%             |
| Ach <sup>b</sup> | ±5.0%                        | ±4.3%                   | ±10.3%                  | ±3.7%             | ±4.2%             | ±4.5%             | ±4.5%             |
| TD <sup>c</sup>  | ±3.2%                        | ±12.0%                  | ±15.4%                  | ±3.5%             | ±2.8%             | ±7.4%             | ±7.2%             |

Ach, *Fgfr3*<sup>G380R</sup> achondroplasia mouse model; LV, lumbar vertebra; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

a) Data obtained from [BMN111-09-075], summarized in memorandum to study report BMN111-09-075.

b) Data obtained from [BMN111-11-001], summarized in memorandum to study report BMN111-09-075.

c) Data obtained from [BMN111-10-046], summarized in memorandum to study report BMN111-09-075.

以上より非臨床薬理試験では、1) 軽度の表現型特性を示す ACH マウスモデル及び 2) 重度の表現型特性を示す TD マウスモデルの 2 種類の *Fgfr3* 遺伝子に関連した軟骨異形成症マウスモデルを使用し、両モデルを用いて、疾患領域（ACH 及び軟骨低形成症）における BMN 111 の薬理活性を評価した。

#### 2.6.2.2.3 *In vitro* 試験

カニクイザルの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列を決定して、ヒト NPRs との配列相同性を評価した。マウス及びラットの NPRs のアミノ酸配列は、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）で公開されている。カニクイザルの NPRs のアミノ酸配列は、新たに cDNA をクローニングして決定した。

BMN 111 の作用機序を明らかにするために、細胞試験を実施した。NP 受容体（NPR-A、NPR-B 及び NPR-C）に対する BMN 111 の結合特異性について、NPRs を過剰発現する HEK293T 細胞を用いて検討した。さらに、BMN 111 の非臨床薬理試験及び毒性試験評価において選択した動物種（マウス、ラット、カニクイザル及びウサギ）由来の NPR-B を発現する HEK293T 細胞を用いて、NPR-B に対する BMN 111 の効力及び結合親和性について、ヒト NPR-B と比較評価した。cGMP 産生に対する BMN 111 の作用について、マウス NIH/3T3 細胞及びヒト初代培養関節軟骨細胞を用いて検討した。線維芽細胞増殖因子（FGF）による MAPK（ERK1/2）リン酸化の亢進に対する BMN 111 の抑制作用について、ACH 及び TD ヒト成長板軟骨細胞を用いて評価した。最後に、ラット軟骨肉腫細胞を用いて、軟骨細胞の増殖及びマトリックスタンパク質産生に対する FGF2 の抑制作用に対する BMN 111 と CNP22 の阻害活性の同等性を評価した。

##### 2.6.2.2.3.1 カニクイザルの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列とヒトの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C との相同性の比較

[BMN111-11-044]試験

カニクイザルの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列を決定し、多重配列アライメントソフトウェア CLUSTAL W2 及び BOXSHADE 3.21 を用いて、ヒトの NPR-A、NPR-B 及び NPR-C のアミノ酸配列と比較した。試験は、BioMarin Pharmaceutical Inc（Novato, CA, USA）で実施し、2009 年 7 月 9 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

カニクイザルの NPR-A 及び NPR-B タンパク質のアミノ酸配列はヒトの NPR-A 及び NPR-B と 99%の相同性を示し、カニクイザルの NPR-C タンパク質のアミノ酸配列はヒトの NPR-C と 98%の相同性を示す。



## 2.6.2.2.3.2 マウス線維芽細胞株 NIH/3T3 の cGMP 産生に対する BMN 111 の作用

[BMN111-10-110]試験

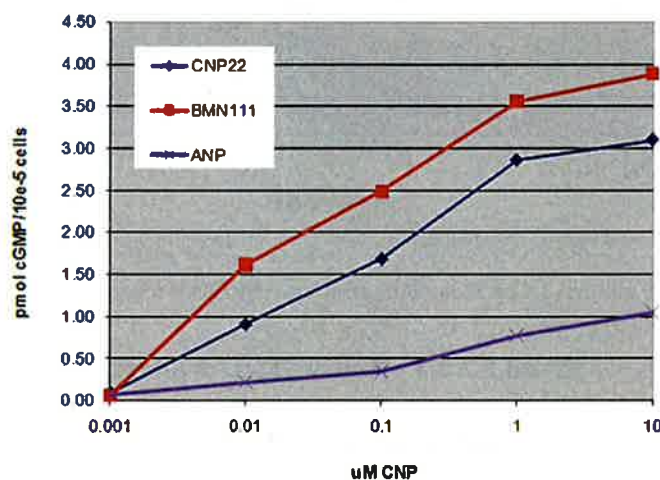
BMN 111 及び CNP22 の cGMP 産生に関する薬理作用について、不死化胚性マウス線維芽細胞株 NIH/3T3 で評価した。試験は、BioMarin Pharmaceutical Inc (Novato, CA, USA) で実施し、2011 年 6 月 29 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

NIH/3T3 細胞は NPR-B を内因的に発現する。CNP22 と同様に、BMN 111 の NPR-B への結合は cGMP 産生を増加させると予測される。cGMP は、細胞プロセスを調節する細胞内セカンドメッセンジャーである。

NIH/3T3 細胞を、種々の濃度の BMN 111 及び CNP22 (0.001~10  $\mu\text{mol/L}$ ) とインキュベートした。CatchPoint cGMP 蛍光アッセイキット (Molecular Devices) を使用して細胞溶解液中の cGMP 産生量を測定した。

BMN 111 及び CNP22 により、同程度の cGMP 増加が認められた。予測どおり ([Koller 1991]) ([Suga 1992])、ANP は NPR-B に対する親和性が低く (CNP の約 100 倍低い)、この細胞株では NPR-A の発現が認められないため、ANP は cGMP 産生の実質的な増加をもたらさなかった。結論として、CNP22 と BMN 111 は同程度の cGMP 産生の増加を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2.3-1 NIH/3T3 細胞の cGMP 産生



n=2/treatment.

## 2.6.2.2.3.3 NPR-A、NPR-B 及び NPR-C に対する BMN 111 の相対的親和性

[BMN111-11-028]試験

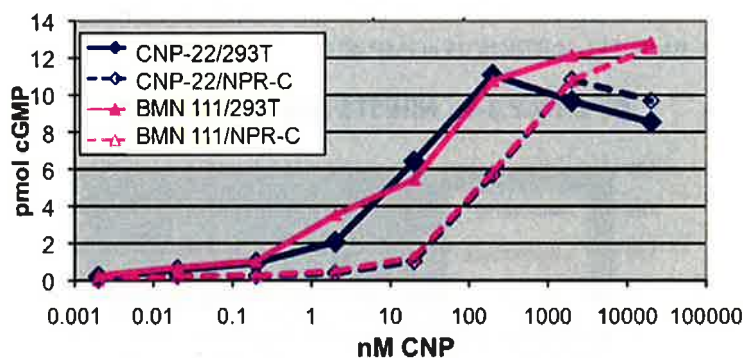
NPR-A、NPR-B 及び NPR-C に対する BMN 111、CNP22 及び ANP の相対的親和性 (50%効果濃度[EC<sub>50</sub>]を測定) を評価するために、シグナル伝達競合アッセイを開発した。試験は BioMarin Pharmaceutical Inc (Novato, CA, USA) で実施し、2011 年 9 月 29 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

NPR-A 又は NPR-B を過剰発現する HEK293T 細胞 (293T) に NPR-C を過剰発現する HEK293 細胞又は HEK293 対照細胞との共培養下で BMN 111、CNP22 又は ANP を添加した。CatchPoint cGMP 蛍光アッセイキット (Molecular Devices) を使用して細胞溶解液中の cGMP 産生量を測定した。

既報文献 ([Koller 1991]) ([Suga 1992]) と一致して、CNP22 は NPR-B 単独 ( $EC_{50}$  は約 10 nmol/L) 及び NPR-C 共培養下 ( $EC_{50}$  は約 50 nmol/L) で NPR-B に対して高い親和性を示し、NPR-A ( $EC_{50}$  は 10  $\mu$ mol/L 超) に対しては低い親和性を示した。

BMN 111 は、NPR-B 及び NPR-C の両方に対して CNP22 と同程度の用量効果及び相対的親和性を示した (図 2.6.2.2.3-2)。CNP22 と同様に、BMN 111 は NPR-A のシグナル伝達に対してアゴニスト活性をほとんど示さなかった ( $EC_{50}$  は 10  $\mu$ mol/L 超) (図 2.6.2.2.3-3)。BMN 111 の  $EC_{50}$  を表 2.6.2.2.3-1 に示す。結論として、BMN 111 は CNP22 と同程度の活性及び特異性を示した。BMN 111 の NPR-B に対する親和性は、NPR-A に対してよりも約 1000~3000 倍高いことが示された。

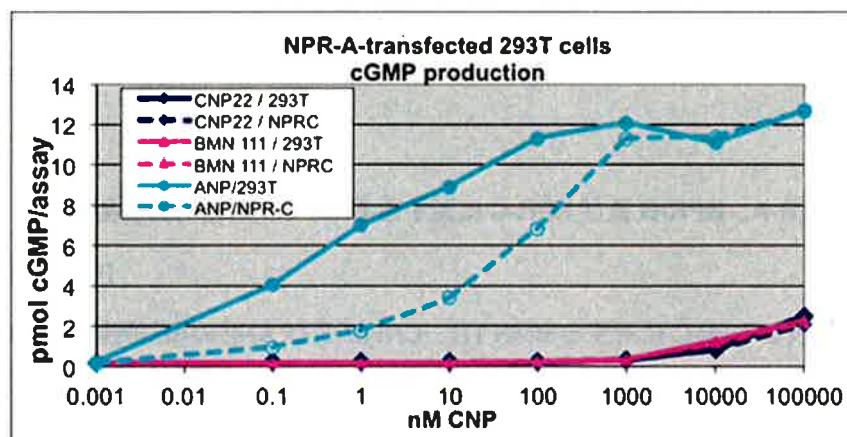
図 2.6.2.2.3-2 NPR-B のシグナル伝達



293T, HEK293T cells; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CNP, C-type natriuretic peptide; NPR, natriuretic peptide receptor.

Ratio of NPR-B cells: NPR-C cells was 1:2 on 12 Jun 2009 assay date (lot SP060909) and 1:1 on 18 Dec 2009 assay date. Different ratios yielded similar results.

図 2.6.2.2.3-3 NPR-A のシグナル伝達



293T, HEK293T cells; ANP, atrial natriuretic peptide; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CNP, C-type natriuretic peptide; NPR, natriuretic peptide receptor.



表 2.6.2.2.3-1 EC<sub>50</sub> 評価

| Peptide | EC <sub>50</sub> NPR-B<br>(nmol/L) | EC <sub>50</sub> NPR-A<br>(nmol/L) | EC <sub>50</sub> NPR-C<br>(nmol/L) | EC <sub>50</sub> NPR-C/EC <sub>50</sub> Primary Receptor <sup>a</sup> | n |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|---|
| CNP22   | 13.4 ± 11.2                        | > 10 µmol/L                        | 57.5 ± 35.8                        | 7.2 ± 8.1   | 4 |
| BMN 111 | 3.5 - 10                           | > 10 µmol/L                        | 20.6 - 113.5                       | 5.9 - 11.4  | 2 |
| ANP     | > 10 µmol/L                        | 0.04 - 0.14                        | 5 - 8.7                            | 62.1 - 125  | 2 |

EC<sub>50</sub>, 50% effective concentration; ANP, atrial natriuretic peptide; CNP, C-type natriuretic peptide; NPR, natriuretic peptide receptor.

a) EC<sub>50</sub> NPR-C/EC<sub>50</sub> NPR-B for CNP22 and BMN 111; EC<sub>50</sub> NPR-C/EC<sub>50</sub> NPR-A for ANP

#### 2.6.2.2.3.4 ラット、マウス、ウサギ、カンクイザル及びヒトの NPR-B に対する BMN 111 の相対的結合親和性及び cGMP 産生への影響

[BMN111-18-002]試験

ヒト、並びに BMN 111 の非臨床薬理試験及び毒性試験評価で使用した動物種（ラット、マウス、ウサギ及びカンクイザル）由来の NPR-B に対する BMN 111 の結合親和性及び cGMP 産生の類似性について評価した。試験は BioMarin Pharmaceutical Inc（Novato, CA, USA）で実施し、2018 年 4 月 10 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びカンクイザルの NPR-B の cDNA 及びタンパク質アミノ酸配列を NCBI から入手し、配列のアラインメントを作成した。カンクイザルのリガンド結合ドメイン（23～458 位のアミノ酸）は、187 位のアミノ酸 1 残基のみがヒト及びほかの動物種と異なった（カンクイザルでは Ile、ヒト及びほかの動物種では Val）。NCBI データベースの参照配列の比較ではアミノ酸 1 残基がカンクイザルでは異なっていることが示されているが、BioMarin 社はカンクイザルの NPR-B に対する cDNA 配列を決定し、Sequencher 4.7 ソフトウェアを使用して配列を翻訳した結果、リガンド結合ドメイン内の配列はヒト配列と同一であると判断した。それ以外では 1040 位のアミノ酸残基のみが異なり（カンクイザルでは Gln、ヒトでは Arg）全体のアミノ酸配列の 99%は同一であった（2.6.2.2.3.1 項及び BMN111-11-044 試験）。したがって、この試験ではカンクイザルの NPR-B の cDNA 配列を含むプラスミドを使用し、ヒトとカンクイザル両方の代表とした。

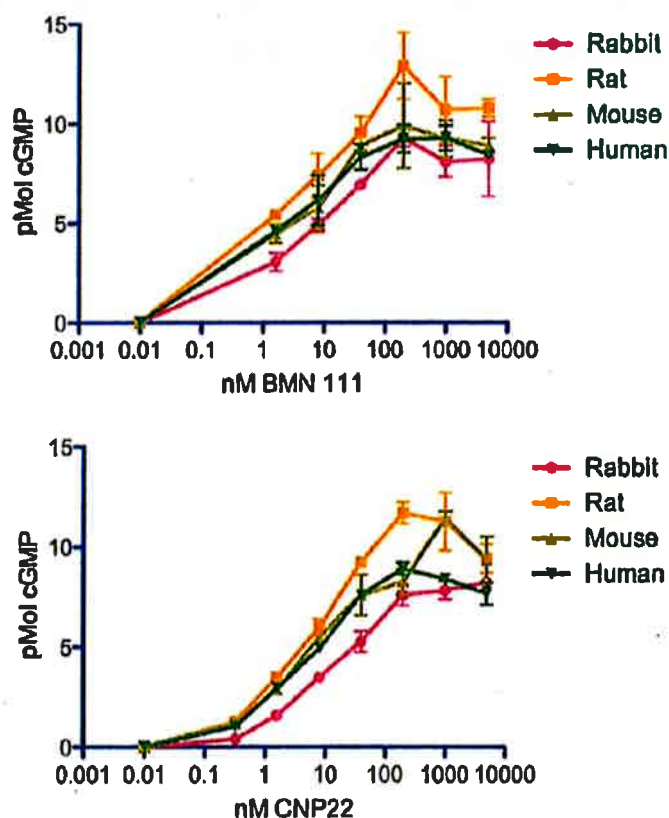
ヒト（及びカンクイザル）、マウス、ラット、並びにウサギの NPR-B をそれぞれ発現する HEK293T 細胞を用いて cGMP 産生への影響を評価した。24 ウェルプレートに 0.3～0.4 x 10<sup>6</sup> 細胞/ウェルの細胞を播種し、最適な細胞密度に到達後、ホスホジエステラーゼ阻害剤の存在下で、細胞を CNP22 及び BMN 111 と 15 分間インキュベートした。反応を停止し、競合 ELISA 法で cGMP 産生量を測定した。

標識リガンド結合アッセイで飽和及び解離試験を実施して、結合親和性を評価した。ヒト免疫グロブリン G サブタイプ 1 (IgG1) Fc タグを各動物種由来の NPR-B の細胞外ドメインの末端に結合した NPR-B-Fc をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で作製した。抗ヒト免疫グロブリン G (IgG) 及び Fc フラグメント特異抗体をコーティングした 96 ウェルプレートに NPR-B-Fc を結合した。N 末端をビオチン化した BMN 111 を種々の濃度（0.1 pmol/L～2 nmol/L）でプレ

ートに添加し結合させた。ストレプトアビジンを結合した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) でプレートに結合した BMN 111 を検出し、化学発光量を測定した。ビオチン化していない BMN 111 を漸増濃度でプレートに添加して、解離曲線を作成した。

各動物種由来の NPR-B の cGMP 産生の増加活性 ( $EC_{50}$ ) は類似しており (図 2.6.2.2.3-4 参照)、ウサギ NPR-B に対する cGMP 産生の増加活性が最も低く最も変動した (CNP22 の  $EC_{50}$  がウサギではそれ以外の動物に比較して 5~15 倍高い)。

図 2.6.2.2.3-4 ウサギ、ラット、マウス又はヒトの NPR-B を発現する HEK293T 細胞の cGMP 産生に対する CNP22 及び BMN 111 の効力



cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CNP, C-type natriuretic peptide; SEM, standard error of the mean. Error bars represent SEM, n=2 wells assayed per concentration.

標識リガンド結合アッセイで固相化された各動物種由来の NPR-B は、ビオチン化した BMN 111 に対して同程度の結合飽和及び解離活性 ( $EC_{50}$ ~ $K_d$ ) を示した (表 2.6.2.2.3-2)。各動物種由来の NPR-B-Fc は、飽和  $EC_{50}$  及び解離 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) による評価において、BMN 111 に対して類似した結合親和性を示した。

表 2.6.2.2.3-2 BMN 111 の NPR-B 飽和及び解離活性

| NPR-B Species           | Saturation EC <sub>50</sub><br>(pmol/L Biotin-BMN 111) | Dissociation IC <sub>50</sub><br>(nmol/L BMN 111) | Signal Intensity at Saturation (RLU) |
|-------------------------|--|---|--------------------------------------|
| Rabbit                  | 20   | 0.894   | 144,852                              |
| Rat                     | 21   | 0.820   | 153,838                              |
| Mouse                   | 12   | 0.702   | 49,077                               |
| Cynomolgus Monkey/Human | 24   | 1.081   | 237,853                              |

EC<sub>50</sub>, half maximal effective concentration; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; NPR, natriuretic peptide receptor; RLU, relative light unit.

結論として、BMN 111 は試験した全ての動物種由来の NPR-B に対して活性を示し、これら全ての動物種由来の NPR-B（プレートに固相化）に対する BMN 111 の類似した結合親和性が確認された。

#### 2.6.2.2.3.5 初代培養ヒト軟骨細胞での BMN 111 の活性 (*in vitro*)

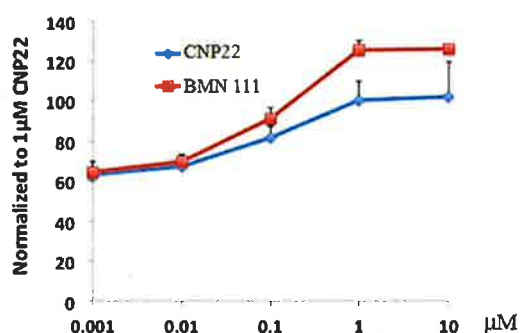
[BMN111-11-004]試験

初代培養ヒト正常及び軟骨無形成関節軟骨細胞のヒト NPR-B の下流メディエーターである cGMP を測定し、BMN 111 及び CNP22 のヒト NPR-B 受容体活性化能を比較した。試験は BioMarin Pharmaceutical Inc (Novato, CA, USA) で実施し、2011 年 5 月 25 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

健康成人ドナーから採取されたヒト正常関節軟骨細胞は、[REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]、USA) から入手した。細胞を BMN 111 及び CNP22 (0.001~10 µmol/L の濃度範囲) とインキュベートした。cGMP ELISA キット (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を使用して、細胞溶解液中の cGMP 量を測定した。

CNP22 及び BMN 111 と反応後、軟骨細胞で cGMP 産生の濃度依存性の増加が認められ、CNP22 と同様に、BMN 111 がヒト関節軟骨細胞の NPR-B を活性化することが確認された (図 2.6.2.2.3-5)。

図 2.6.2.2.3-5 ヒト正常関節軟骨細胞の BMN 111 及び CNP22 による cGMP 産生

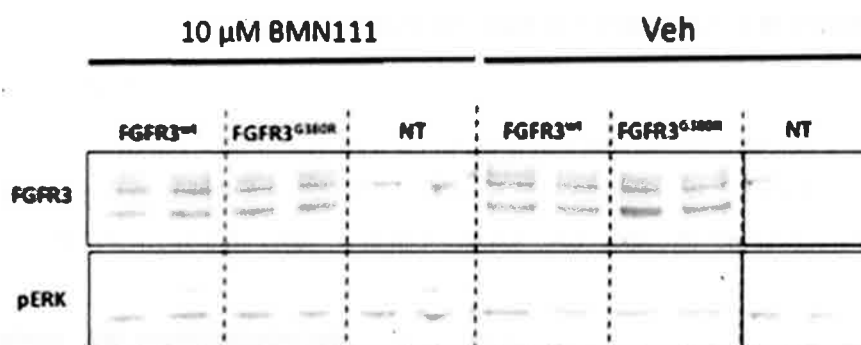


cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CNP, C-type natriuretic peptide; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; SD, standard deviation.

Chondrocytes were grown to ~80% confluency, pretreated with 0.75 mmol/L IBMX for 15 min and treated with increasing concentrations of CNP22 and BMN 111 for 15 min. Cells were lysed for cGMP quantification. Error bars represent SD, n = 2 technical replicates.

ヒト正常関節軟骨細胞に *FGFR3*<sup>G380R</sup> を遺伝子導入して、ヒト ACH の *in vitro* モデルを作成した。本検討は文献 ([Benoist-Lasselín 2007]) で報告されている試験の再現を目的として実施し、この試験と同様に、*FGFR3*<sup>G380R</sup> を遺伝子導入した細胞は FGF による刺激を行わなかったため、ERK リン酸化の亢進は認められなかったと考える。BMN 111 の活性 (ERK リン酸化及び cGMP 産生) は、*FGFR3*<sup>wt</sup> 及び *FGFR3*<sup>G380R</sup> ヒト関節軟骨細胞で同程度であった (図 2.6.2.2.3-6 及び図 2.6.2.2.3-7)。

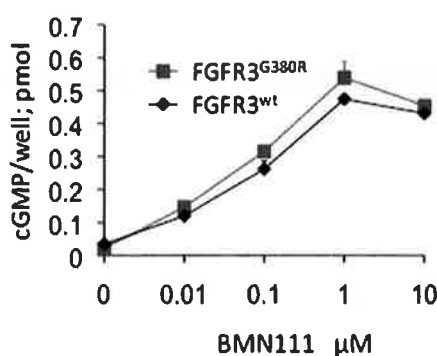
図 2.6.2.2.3-6 *FGFR3*<sup>wt</sup> 及び *FGFR3*<sup>G380R</sup> ヒト関節軟骨細胞での BMN 111 による ERK リン酸化



NT, not transfected; Veh, vehicle.

*G380R* point mutation was introduced in pCMV6 *FGFR3* plasmid. Plasmids containing native (*FGFR3*<sup>wt</sup>) and mutated *FGFR* (*FGFR3*<sup>G380R</sup>) were transfected into normal human chondrocytes. Constitutive activity of *FGFR3*<sup>G380R</sup>, in terms of downstream ERK phosphorylation, was not observed. BMN 111 elicited equivalent responses in cells expressing *FGFR3*<sup>wt</sup> versus those expressing *FGFR3*<sup>G380R</sup> in terms of ERK phosphorylation. pERK, pERK1 and pERK2.

図 2.6.2.2.3-7 *FGFR3*<sup>G380R</sup> 軟骨細胞の BMN 111 による cGMP 産生



cGMP, cyclic guanosine monophosphate; FGFR, fibroblast growth factor receptor; SD, standard deviation.

*G380R* point mutation was introduced in pCMV6-*FGFR3* plasmid. BMN 111 elicited equivalent responses in cells expressing *FGFR3*<sup>wt</sup> versus those expressing *FGFR3*<sup>G380R</sup> in terms of cGMP production. Error bars represent SD, n = 2 technical replicates.

### 2.6.2.2.3.6 不死化及び初代培養ヒト正常、軟骨無形成症及びタナトフォリック骨異形成症成長板軟骨細胞での BMN 111 の効力の評価

[BMN111-10-086]試験

正常、ACH 及び TD ヒト胎児から採取した初代培養及び不死化成長板軟骨細胞の細胞活性に対する BMN 111 の効果について、MAPK 及び ERK1/2 に特化して評価した。試験は、XXXXXXXXXX (XXXXXX) XXXXXX (XXXXXX, France) で実施した。試験は、20XXXX 年 8 月 23 日に開始し、20XXXX 年 10 月 17 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

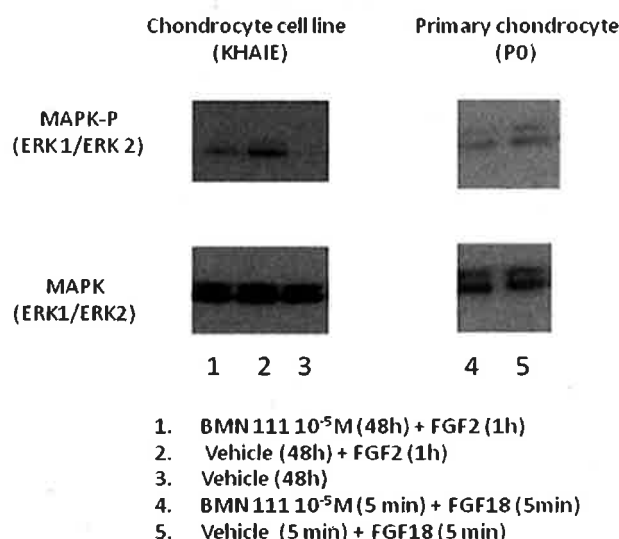
不死化成長板軟骨細胞は、Leggai-Mallet 博士の細胞バンクから入手した ([Benoist-Lasselin 2007])。初代培養成長板軟骨細胞は、在胎期間約 24 週の正常、ACH 及び TD ヒト胎児成長板から分離した。

不死化軟骨細胞用及び初代培養軟骨細胞用にそれぞれ細胞培養プロトコルを開発した。不死化軟骨細胞及び初代培養軟骨細胞は無血清培地でそれぞれ 48 時間及び 24 時間培養後、BMN 111 ( $10^{-5}$  mol/L) とそれぞれ 48 時間及び 5 分間インキュベートし、洗浄し、最後に FGF2 又は FGF18 (100 ng/mL) とそれぞれ 1 時間及び 5 分間インキュベートした。

ウェスタンブロット解析のために細胞溶解液を準備した。リン酸化 ERK1 及び ERK2 は、リン酸化特異的 P42/44 MAPK (ERK1/2) 抗体を用いて検出した。

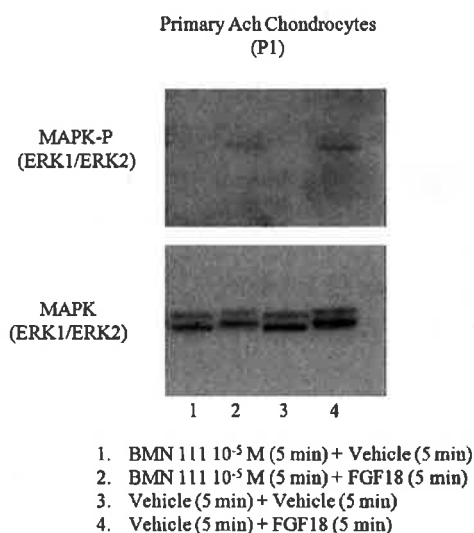
初代培養正常成長板軟骨細胞 (P0 初代培養細胞) 及び不死化正常成長板軟骨細胞 (KHAIE 細胞株) を BMN 111 で前処理すると、FGF を介した MAPK (ERK1/2) リン酸化の亢進が部分的に抑制された (図 2.6.2.2.3-8)。同様に、初代培養 ACH (P1 第一継代細胞) 及び TD (P0) 軟骨細胞を BMN 111 で前処理すると、FGF を介した MAPK (ERK1/2) リン酸化の亢進が部分的に抑制された (図 2.6.2.2.3-9 及び図 2.6.2.2.3-10)。

**図 2.6.2.2.3-8 初代培養正常成長板軟骨細胞の FGF を介した MAPK リン酸化亢進の BMN 111 による部分的抑制**



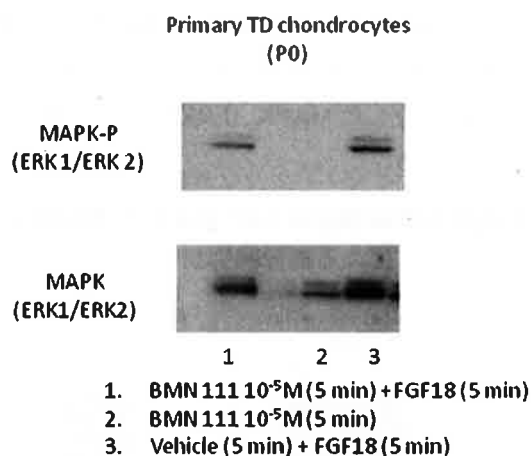
ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; MAPK, mitogen activated protein kinase; MAPK-P, phospho-mitogen-activated protein kinase.

**図 2.6.2.2.3-9 初代培養軟骨無形成症（ACH）成長板軟骨細胞の FGF を介した MAPK リン酸化亢進の BMN 111 による部分的抑制**



ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; MAPK, mitogen activated protein kinase; MAPK-P, phospho-mitogen-activated protein kinase.

**図 2.6.2.2.3-10 初代培養タナトフォリック骨異形成症（TD）成長板軟骨細胞の FGF を介した MAPK リン酸化の亢進の BMN 111 による部分的抑制**



ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGF, fibroblast growth factor; MAPK, mitogen activated protein kinase; MAPK-P, phospho-mitogen-activated protein kinase.

結論として、ヒト成長板から分離した正常、ACH 及び TD 軟骨細胞を BMN 111 で前処理すると、FGF を介した MAPK (ERK1/2) リン酸化の亢進が部分的に抑制された。

以上の *in vitro* 試験をまとめると、BMN 111 の分子レベルでの作用機序 1) BMN 111 は NPR-B 及び NPR-C に結合するが、NPR-A には結合しない、並びに 2) BMN 111 の結合は、細胞内 cGMP の産生及び FGF を介した MAPK (ERK1/2) リン酸化の亢進の抑制をもたらすことが確認され、FGFR3 の機能獲得型変異を有するヒト成長板軟骨細胞での薬理活性が確認された。

### 2.6.2.2.3.7 BMN 111 による FGF2 誘導性のシグナル伝達の抑制、並びに細胞増殖及び細胞外マトリックスタンパク質産生及び沈着の回復に関する処理頻度の評価

[RS19-001]試験

ラット軟骨肉腫細胞を用いて FGF2 誘導性のシグナル伝達並びに FGF2 による細胞増殖及び細胞外マトリックスタンパク質の産生及び沈着抑制作用に対する BMN 111 の影響を検討した。ラット軟骨肉腫細胞は容易に増殖するが、FGF2 の添加により、ACH 軟骨細胞で認められるのと同様に、RAF-MAP キナーゼ経路を介して細胞増殖及び細胞外マトリックスタンパク質産生の両方が抑制される。CNP22 は、継続処理、又は 1 日あたり 1 時間若しくは 2 時間のパルス処理により、FGF2 誘導性のシグナル伝達を抑制し、細胞増殖及びマトリックスタンパク質産生を部分的に回復する ([Krejci 2005])。そこで次に、BMN 111 が同様の効果を有するか評価し、この効果に対する処理頻度の影響について検討した。

試験は BioMarin Pharmaceutical Inc (Novato, CA, USA) で実施し、2019 年 3 月 11 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

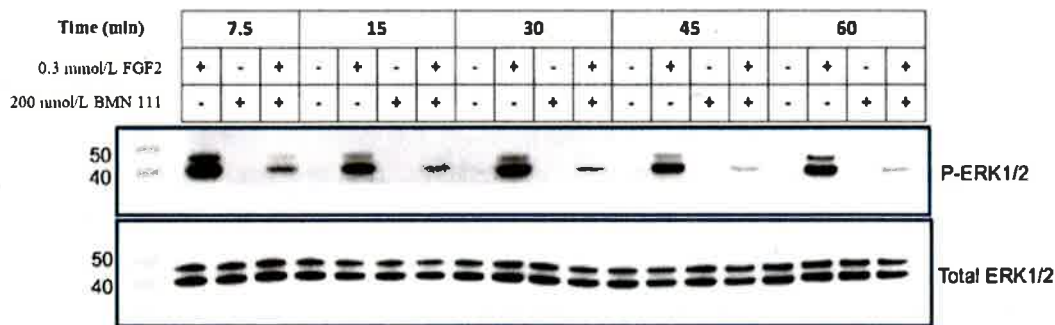
ラット軟骨肉腫細胞は、[REDACTED] ( [REDACTED]、Czech Republic) から入手した。フィブロネクチンを含む  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液で前処理した 96 ウェルプレートを用意し、シグナル伝達アッセイでは  $5 \times 10^4$  細胞/ウェル、増殖アッセイでは  $5 \times 10^3$  細胞/ウェルでラット軟骨肉腫細胞を播種した。細胞は、10%ウシ胎仔血清 (FBS) 並びにペニシリン及びストレプトマイシンを含む完全ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。

MAPK (ERK1/2) 活性を評価するために、細胞を上記培地で 24 時間培養後、8 時間無血清培地で培養した。細胞を BMN 111 で 30 分間前処理後、0.3 nmol/L の FGF2 を添加し、細胞を 37°C で 7.5、15、30、45 及び 60 分間インキュベートした。各インキュベートの終わりに、培地を吸引し、細胞を、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤を含む氷冷した放射性免疫沈降アッセイ (RIPA) 緩衝液に溶解した。ERK1/2 のリン酸化状態を評価するために、細胞溶解液のウェスタンブロット解析を行った。

ラット軟骨肉腫細胞を継続培養して、細胞増殖及び細胞外マトリックスタンパク質産生を評価した。細胞は 200 nmol/L の BMN 111 で毎日継続処理又は 60 分間パルスで 1 日 1 回若しくは 2 回処理した。FGF2 は、BMN 111 の毎日の添加の 30 分後又は各 60 分間パルス処理終了時に添加した。無処理対照 (培地のみ)、BMN 111 処理のみ及び FGF2 処理のみの同時対照細胞も培養し評価した。3 日間処理後、細胞を  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -PBS で洗浄し、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -PBS で希釈した 4%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞増殖を評価するために、細胞をヘキスト染色し、画像化し、核を定量化した。マトリックスタンパク質産生は、細胞をアリシアンブルーで染色し、細胞を画像化し、青色に染色された領域 (細胞外マトリックス) の割合を解析した。

BMN 111 の存在下では、FGF2 による ERK1/2 の活性化は、最大 1 時間まで大幅に減少した (図 2.6.2.2.3-11)。

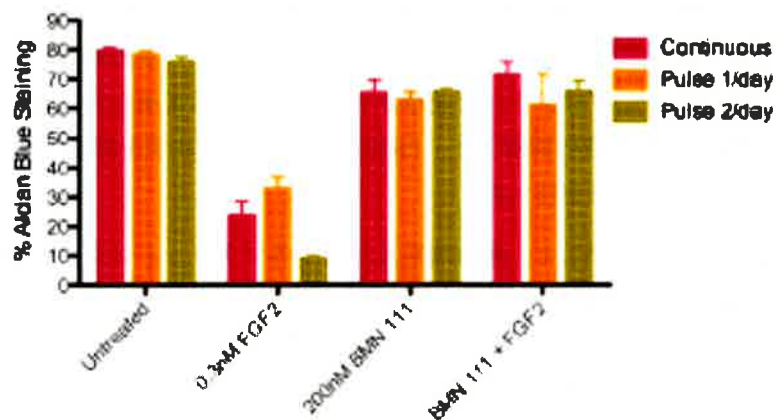
図 2.6.2.2.3-11 ラット軟骨肉腫培養細胞の FBMN 111 及び FGF2 処理による ERK1/2 のリン酸化



FGF, fibroblast growth factor; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; P-ERK1/2, phospho-extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2.

200 nmol/L の BMN 111 処理により、FGF2 処理によるラット軟骨肉腫細胞の増殖の抑制が部分的に回復した ( $P < 0.01$ )。BMN 111 処理レジメンの明らかな影響は認められず、継続、1 日 1 回又は 1 日 2 回処理細胞間で差異は認められなかった ( $P = 0.39$ )。ラット軟骨肉腫細胞の FGF2 による細胞外マトリックスタンパク質産生及び沈着の抑制作用は、200 nmol/L の BMN 111 処理により阻害された (図 2.6.2.2.3-12)。細胞外マトリックスタンパク質産生及び沈着に対しても、BMN 111 処理レジメン間に有意差は認められなかった。

図 2.6.2.2.3-12 ラット軟骨肉腫細胞の 200 nmol/L の BMN 111 及び FGF2 処理による細胞外マトリックスタンパク質産生及び沈着



Nuclei from four fields representing 3 treated wells from 2 independent experiments were counted, averaged and graphed. Error bars represent standard deviation,  $n = 4$ .

結論として、本試験系において CNP22 の効果が再現され、さらに、BMN 111 及び天然の CNP の薬理作用が類似していることが確認された。培養細胞に遍在するプロテアーゼの存在下で BMN 111 の半減期は短いにもかかわらず、200 nmol/L の BMN 111 の継続処理に 1 日 1 回の処理以上の優位性は認められなかった。



## 2.6.2.2.4 Ex vivo 試験

2.6.2.2.4.1 胚性 (E16.5) *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス骨外植片の BMN 111 の添加培養による軟骨内骨成長の評価

[BMN111-10-002]試験

重度の ACH (*Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> TD マウス) の *ex vivo* モデルを用いて BMN 111 の薬理活性を評価した。このマウスモデルについては、2.6.2.2.2 項に記載している。試験は ( 、 France) で実施し、20 年 2 月 17 日に開始し、20 年 10 月 17 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

培養 1 日目に、野生型マウス胚及び TD マウス胚 (胚齢 E16.5) の両方から大腿骨を分離し、その長さを測定した。次に、大腿骨を BMN 111 (左大腿骨、 $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  mol/L) 及び溶媒 (右大腿骨、3.5 mmol/L HCl) と 6 日間培養した。

培養 7 日目に、大腿骨の長さを測定し、組織学的検査のために処理した。切片は、ヘマトキシリン及びエオシン (H&E) (組織学的構造の評価) 染色、並びに KI67 (細胞増殖のマーカー) 及び X 型コラーゲン (軟骨細胞分化のマーカー) の免疫染色を行った。

ベースライン時 (培養 1 日目)、TD マウス的大腿骨長は野生型マウス的大腿骨長よりも有意に短かった。6 日間の培養後、溶媒と培養した TD マウスの骨は、野生型マウスの骨に比べて、有意に短かった。6 日間 BMN 111 を添加し培養した場合には、この差が部分的に縮まった。溶媒及び BMN 111 ( $10^{-6}$  mol/L) の添加培養による培養 1 日目及び 7 日目の野生型及び TD マウス的大腿骨の絶対長を表 2.6.2.2.4-1 に示す。TD マウス及び野生型マウス的大腿骨の両方で、 $10^{-9}$ ~ $10^{-6}$  mol/L の BMN 111 の濃度範囲で骨長の有意な伸長が認められた (図 2.6.2.2.4-1)。

**表 2.6.2.2.4-1 野生型及び *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス的大腿骨の溶媒及び BMN 111 ( $10^{-6}$  mol/L) の添加培養 1 日目及び 7 日目の大腿骨長**

| Sample                                | Day 1                        | Day 7<br>Vehicle              | Day 7<br>BMN 111 $10^{-6}$ mol/L |
|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| TD femurs ( $\mu\text{m}$ , $\pm$ SD) | 2743 $\pm$ 141 *<br>(n = 25) | 3178 $\pm$ 172 **<br>(n = 11) | 3399 $\pm$ 160 **, #<br>(n = 13) |
| WT femurs ( $\mu\text{m}$ , $\pm$ SD) | 2914 $\pm$ 285<br>(n = 33)   | 3826 $\pm$ 376<br>(n = 16)    | 4330 $\pm$ 418<br>(n = 15)       |

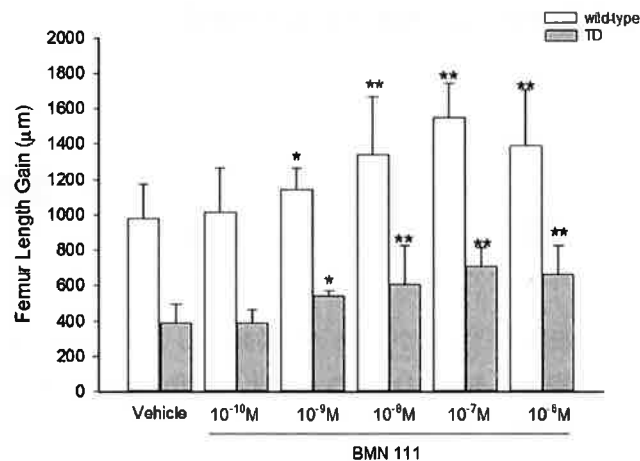
TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type; SD, standard deviation.

\*  $p < 0.05$  using 2-tailed unpaired Student's T-Test comparing initial TD femur lengths to WT femur lengths; specific to experiments conducted for BMN 111 at  $10^{-6}$  mol/L.

\*\*  $p < 0.001$  using 2-tailed unpaired Student's T-Test comparing (TD femurs + vehicle) vs (WT femurs + vehicle) or (TD femurs + BMN 111) vs (WT femurs + BMN 111).

#  $p < 0.001$  using 2-tailed unpaired Student's T-Test comparing Day 7 (TD femurs + BMN 111) vs (WT femurs + vehicle).

図 2.6.2.2.4-1 野生型及び *Fgfr3*<sup>Y387C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス大腿骨の溶媒及び BMN 111 の 6 日間添加培養による伸長 (平均値)



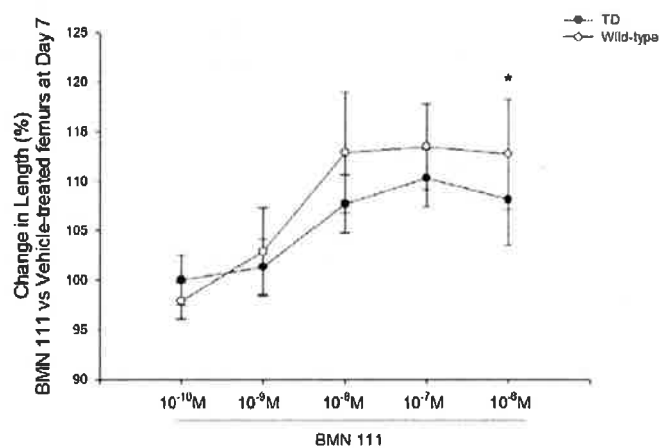
TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

Absolute gain in femur length after 6 days of culture. For vehicle, n = 47 or 42 for WT and TD, respectively; for BMN 111 treatment, n = 7 to 15 for WT and n = 5 to 13 for TD.

\* p < 0.05 and \*\*p < 0.001 using 2-tailed unpaired Student's T-Test comparing BMN 111 treatment to overall gain in length for vehicle.

大腿骨の 6 日間添加培養では、10<sup>-7</sup> 及び 10<sup>-6</sup> mol/L の両方で BMN 111 の最大効果が認められた。最大伸長は 10<sup>-7</sup> mol/L で認められた。BMN 111 の効果を総合すると、骨伸長は、TD 及び野生型マウス的大腿骨でそれぞれ 10<sup>-7</sup> mol/L で約 10 及び 14%、10<sup>-6</sup> mol/L で 8 及び 13%であった (図 2.6.2.2.4-2 及び図 2.6.2.2.4-3)。

図 2.6.2.2.4-2 野生型及び *Fgfr3*<sup>Y387C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス的大腿骨の BMN 111 の 6 日間添加培養による大腿骨長の全体的な変化 (平均値)



\* p < 0.05 for Wild-type vs. TD

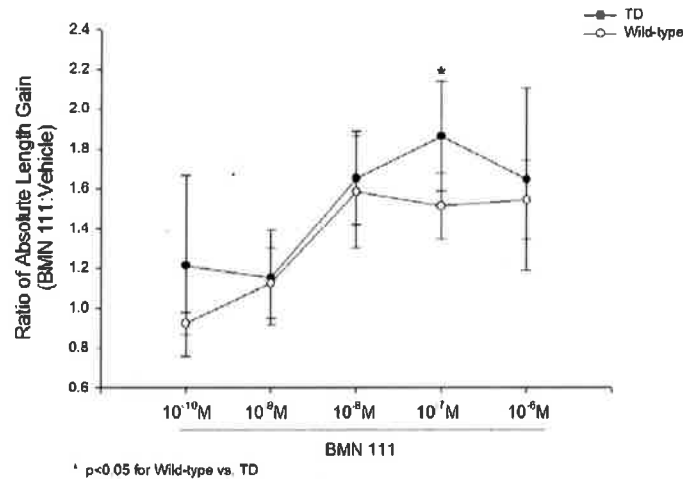
TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

Percentage change in femur length after 6 days of culture. 100% corresponds to no change.

n = 7 to 15 for WT and n = 6 to 11 for TD.

\* P < 0.05 using 2-tailed unpaired Student's T-test comparing BMN 111 treatment (WT) to corresponding BMN 111 treatment (TD).

図 2.6.2.2.4-3 野生型及び *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの大腿骨の BMN 111 の 6 日間添加培養による絶対伸長 (溶媒に対する平均比率)



TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

Change in femur length ratio gain after 6 days of culture.

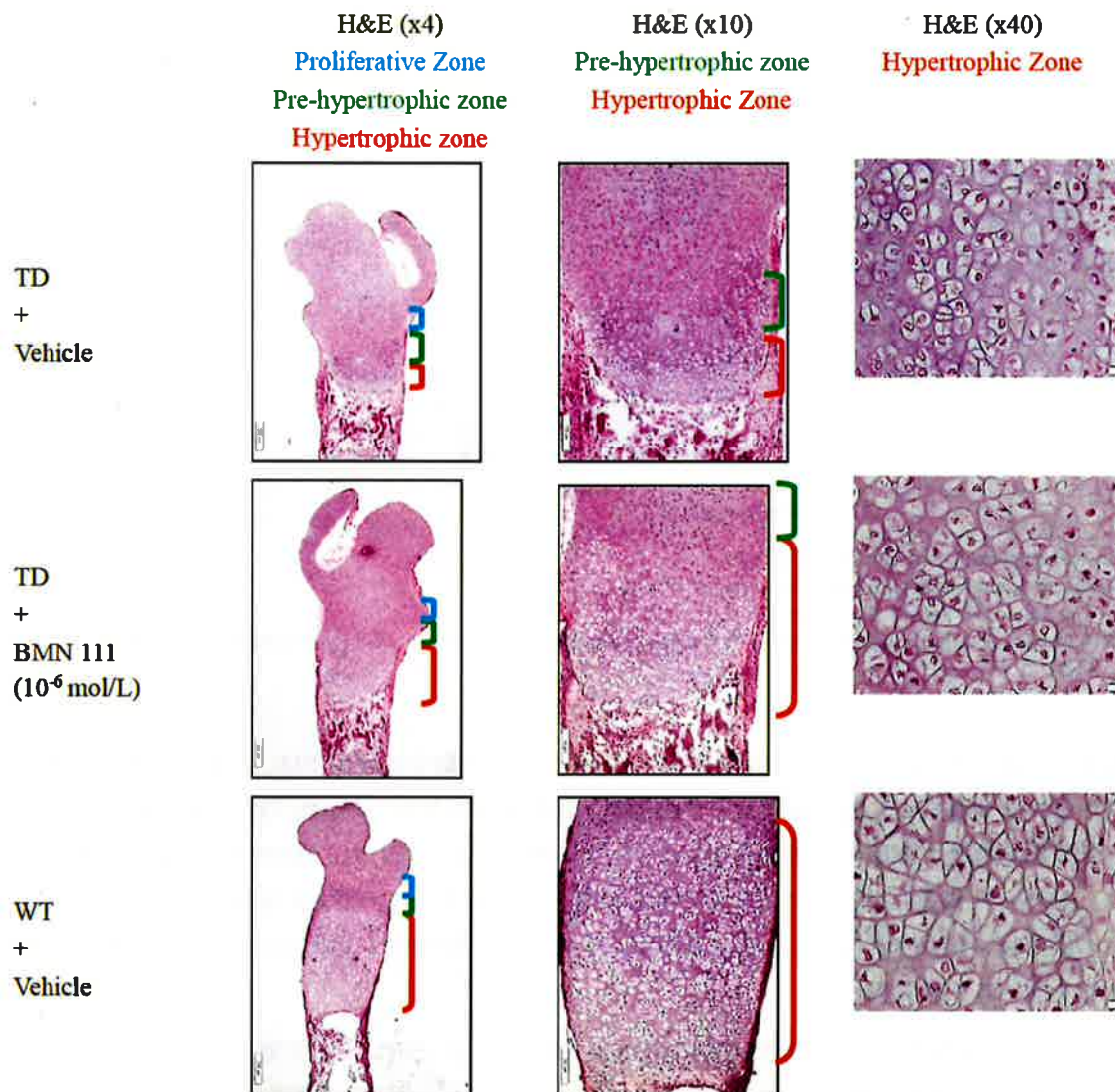
n = 7 to 15 for WT and n = 6 to 11 for TD.

\* P<0.05 using 2-tailed unpaired Student's T-Test comparing BMN 111 treatment (WT) to corresponding BMN 111 treatment (TD).

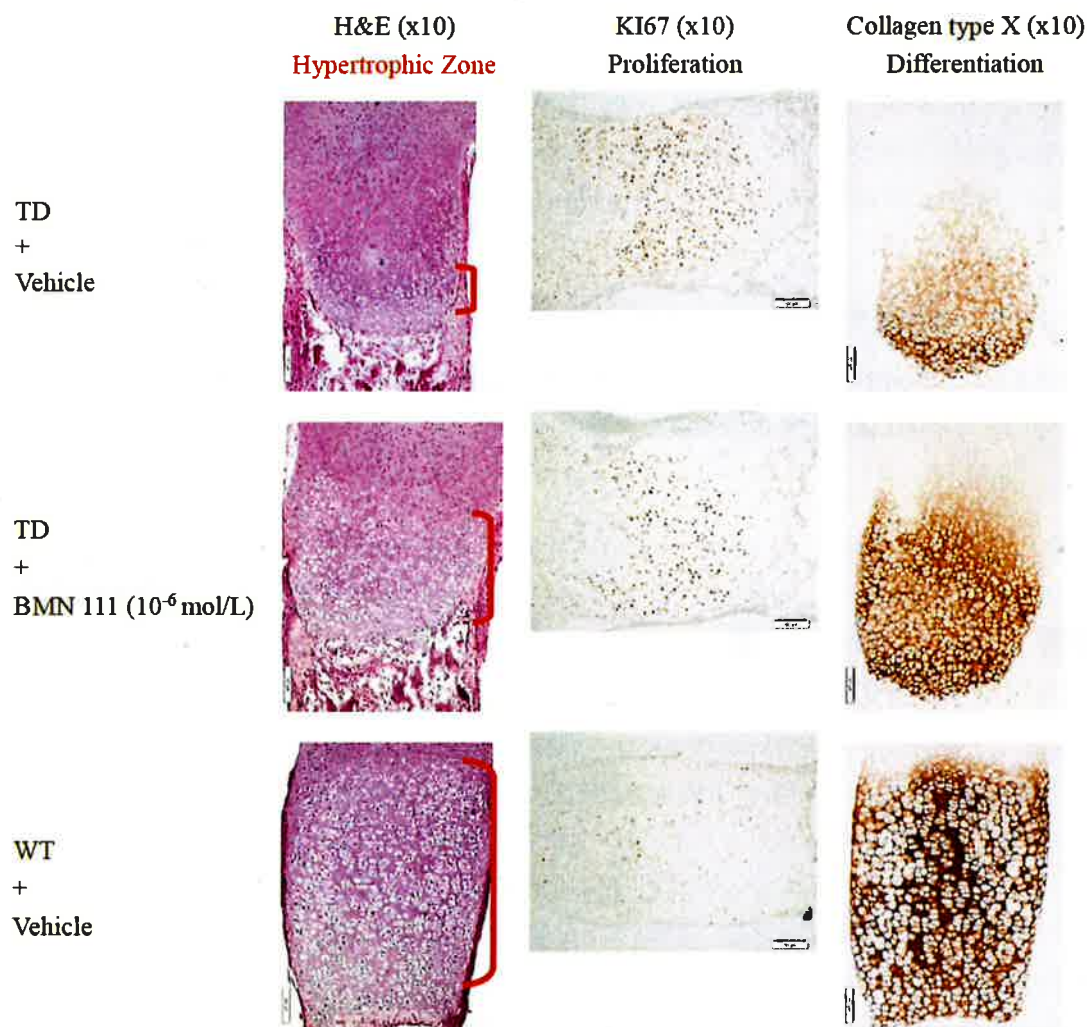
溶媒と培養した TD マウスの遠位大腿骨の H&E 染色の組織学的解析では、溶媒と培養した野生型マウスと比較して、成長板のサイズの縮小、前肥大帯の欠如、柱状配列の欠如、並びに前肥大軟骨細胞様肥大細胞の異常な形状及びサイズの縮小が認められた。BMN 111 の添加培養により、BMN 111 濃度に依存した肥大帯の幅の増加がもたらされた。肥大軟骨細胞は、野生型マウスの成長板で観察されるのと同様に球形で大型化した。BMN 111 (10<sup>-6</sup> mol/L) による組織学的変化を図 2.6.2.2.4-4 に示す。

TD マウスの大腿骨成長板の細胞分裂の亢進が KI67 の免疫染色によって認められた。ヒト ACH 及び TD 患者で細胞周期の破壊が報告されており、これは予想された結果であった ([Schibler 2009])。FGF による活性化は、細胞周期停止及びそれに続く時期尚早で不完全な軟骨細胞分化を仲介することが示されている。KI67 の染色は、BMN 111 を添加培養した大腿骨で減少し、細胞周期の欠陥の部分的な回復が示唆された。溶媒と培養した TD マウスの大腿骨での X 型コラーゲン発現の減少は、不完全な軟骨細胞分化を裏付けた。X 型コラーゲンの免疫染色の顕著な増加が BMN 111 を添加培養した大腿骨で認められ、軟骨細胞分化の回復が示唆された。TD マウスの大腿骨に BMN 111 を添加培養すると、KI67 の染色の減少及び X 型コラーゲンの染色の増加によって示されるように、軟骨細胞周期が部分的に回復し、軟骨細胞前駆細胞の肥大軟骨細胞への分化が促進された (図 2.6.2.2.4-5)。

図 2.6.2.2.4-4 遠位大腿骨成長板の BMN 111 ( $10^{-6}$  mol/L) の 6 日間添加培養後の組織学的解析



H&E, hematoxylin and eosin; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

図 2.6.2.2.4-5 軟骨細胞の BMN 111 ( $10^{-6}$  mol/L) の 6 日間添加培養後の増殖及び分化の評価

H&E, hematoxylin and eosin; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

結論として、BMN 111 の添加培養は、細胞周期、細胞増殖及び分化を部分的に正常化することにより、重度の ACH 表現型特性を有する近位骨の軟骨内骨形成過程を部分的に回復し、成長板のサイズ及び構造を改善した。

#### 2.6.2.2.5 *In vivo* 試験

BMN 111 の *in vivo* 薬理活性は、疾患 (TD 及び ACH) の 2 種類のマウスモデル、並びに正常マウス、ラット及びサルで評価した。8 ヶ月齢で、少なくとも一部の成長板は閉鎖前であるが全般的にはほとんど成長していないラットを用いた 1 試験、並びにそれ以外の全ての試験は、成長期の動物 (TD マウスでは 7 日齢、正常マウスでは 3 週齢及びサルでは 2~4 歳) を用いて実施した。

詳細については記載しないが、ほかの FGFR を介した骨異形成症に対する BMN 111 の効果につ

いても、線維芽細胞増殖因子受容体 2 (FGFR2) を構成的活性化状態にする種々の活性化遺伝子変異によって引き起こされるクルーゾン症候群マウスモデルで評価した。*Fgfr2c*<sup>C342Y/+</sup>マウスモデルは、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、動物は出生後日数 (PND) 3 から PND30 まで 800 µg/kg/日の BMN 111 を皮下投与した。この投与量では、モデルに頭蓋骨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 ([Holmes 2018])。

### 2.6.2.2.5.1 疾患モデル

#### 2.6.2.2.5.1.1 *Fgfr3*<sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の反復皮下投与による軟骨内骨成長の評価

[BMN111-10-046]試験

7 日齢の TD マウスを用いて、BMN 111 の 1 日 1 回 10 日間皮下投与の骨成長を含む全体の発達に対する影響を検討した。モデルについては 2.6.2.2.2 項に記載した。試験は、XXXXXXXXXX (France) で実施し、20XXXX 年 6 月 8 日に開始し、20XXXX 年 10 月 17 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

7 日齢の TD (*Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> 変異) マウス及びその野生型同腹仔に、溶媒、並びに BMN 111 (240 及び 800 µg/kg) を、1 日 1 回 10 日間皮下投与した。野生型動物は、正常な成長の比較対照として使用するため、溶媒のみを投与した。TD マウスの寿命が短いこと及び 17 日齢超で必要な歯のトリミング処理をなくすため、試験期間は 10 日間にした。投与は背中に行い、投与部位 (4 箇所) は投与ごとに順番に変えた。BMN 111 を最終投与した 1 日後の投与 11 日目にマウス (17 日齢) を安楽死させた。試験では短い投与期間中の成長を最大化するために、高投与量が選択された。試験デザインを表 2.6.2.2.5-1 に示す。

**表 2.6.2.2.5-1 *Fgfr3*<sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの骨成長評価の試験デザイン**

| Groups | Genotype | Compound             | Dose (µg/kg) <sup>b</sup> | Dosing Frequency    | Animal No. per Group (Genders combined) |
|--------|----------|----------------------|---------------------------|---------------------|---|
| 1      | WT       | vehicle <sup>a</sup> | 0                         | Once daily, 10 days | 9                                       |
| 2      | TD       | vehicle <sup>a</sup> | 0                         | Once daily, 10 days | 9                                       |
| 3      | TD       | BMN 111              | 240                       | Once daily, 10 days | 10                                      |
| 4      | TD       | BMN 111              | 800                       | Once daily, 10 days | 9                                       |

No., number; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

a) Animals in groups 1 and 2 received vehicle only (0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% [w/v] benzyl alcohol and 10% [w/v] sucrose).

b) Animals were dosed at a volume of 10 mL/kg.

動物の瀕死状態及び死亡率を 1 日 1 回評価した。一般状態の変化を毎日評価し、可動性及び姿勢に関連する一般状態の変化について、投与 1 及び 11 日目に重症度をスコア化した。体重は、投与 1 日目の投与前に測定し、その後週 2 回及び投与 11 日目 (剖検日) に測定した。頭胴長は

投与 1 日目及び投与 11 日目、尾長は、投与 1 日目、その後週 2 回及び投与 11 日目に測定した。測定にはルーラーを使用した。投与 11 日目の剖検時の頭胴長はノギスを用いて測定した。

全ての動物は試験終了時に安楽死させ、全身のマイクロ X 線透視画像を撮影し、保存した。全ての動物から脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、精巣及び腸を採取し、器官重量を測定した。骨（大腿骨、脛骨、上腕骨、尺骨及び第 4～6 腰椎）を採取し、ノギスを用いて長さを測定した。頭蓋骨の前後（AP）径をノギスで測定した。全大後頭孔（C0）及び環椎（C1）を含む頭蓋骨を投与群ごとに採取し、コンピュータ断層撮影（CT）スキャンを使用して解析した。2 次元（2D）スキャン解析後に C0 及び C1 の矢状径及び横径を測定し、3D 解析後に C0 の面積を測定した。大腿骨のサブセットは、組織学的検査用の処理を行った。ほかの組織は保管した。

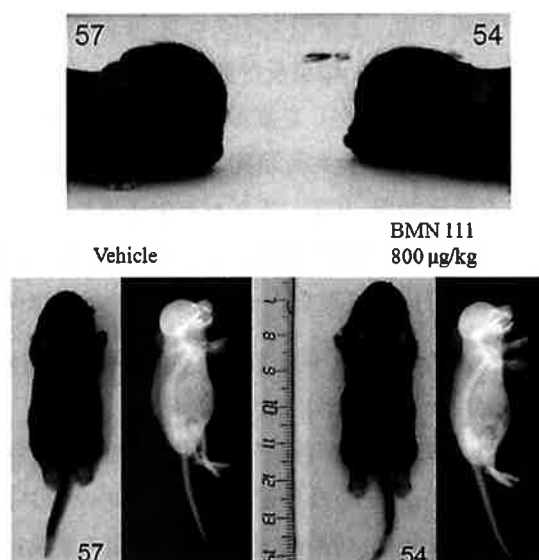
800 µg/kg の BMN 111 を投与した雌マウス 1 例を除いて、試験動物全体に、後肢の動き、姿勢、尾、足蹠及び関節の腫脹（腫大）の異常は認められなかった。投与 11 日目に、この雌マウスは、足蹠の腫脹及び軽度の湾曲（運動性及び収縮は正常）に加えて、後肢の運動性及び収縮の軽度の低下を示した。一般に、800 µg/kg の投与量でほとんどのマウスは、おそらく BMN 111 の投与に関連した血行動態の変化のために、投与の最初の 5 日間の薬物投与後に一過性の自発運動の低下を示したが、薬物投与後約 2 時間で正常な自発運動を回復した。BMN 111 の投与に関連したほかの一般状態の変化は認められなかった。

TD マウスの体重は、7 日齢及び 17 日齢でそれぞれ野生型同腹仔よりも約 40%及び約 60%低下したが、溶媒を投与した TD マウスと比較して、BMN 111 を投与した TD マウスでは明らかな体重の変化は認められなかった。

BMN 111 の投与に関連した頭胴長及び尾長の伸長、並びに頭蓋骨の外観の変化は、800 µg/kg の BMN 111 を 10 日間投与した TD マウスで顕著であった（図 2.6.2.2.5-1）。図に示した 2 例のマウスは同腹仔であり、溶媒（左側のマウス、ID 57）及び 800 µg/kg/日の BMN 111（右側のマウス、ID 54）を 10 日間連日皮下投与した。



図 2.6.2.2.5-1 溶媒及び BMN 111 を 10 日間投与した *Fgfr3*<sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウス同腹仔の外観



剖検では、投与量に依存した四肢骨格及び中軸骨格の成長が認められた。この成長は、尺骨以外の長骨（大腿骨、脛骨及び上腕骨）で有意であった。第4～6腰椎（L4～L6）ではわずかな成長しか認められず、BMN 111 の10日間連日皮下投与が椎骨よりも長骨の成長を優先的に促進し、四肢骨格の成長障害が顕著である ACH 患者の四肢短縮を改善する可能性があることを示唆している。第4～6腰椎（L4～L6）と比較して頭胴長の比較的大きな伸長は、溶媒を投与した TD マウスと比較して、800 µg/kg の BMN 111 を投与した TD マウスで有意に大きかった個々の椎骨の伸長及び頭蓋骨の前後（AP）径の伸長の累積効果による可能性が最も高い。試験結果を表 2.6.2.2.5-2 に示す。

表 2.6.2.2.5-2 *Fgfr3*<sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の10日間投与による最終成長測定及び溶媒に対する増加率

| Treatment Group                | Femur   | Tibia    | Lumbar Vertebra<br>L4-L6 | AP Skull | Naso-Anal |
|--------------------------------|---------|----------|--------------------------|----------|-----------|
| WT+ vehicle (mm) <sup>a</sup>  | 9.84 mm | 12.99 mm | 5.83 mm                  | 20.25 mm | 69.08 mm  |
| TD + vehicle (mm) <sup>a</sup> | 5.31 mm | 5.41 mm  | 4.16 mm                  | 14.18 mm | 45.14 mm  |
| 240 µg/kg (%) <sup>b</sup>     | 5.49 mm | 5.61 mm  | 4.28 mm                  | 14.59 mm | 47.17 mm  |
|                                | 3.41% * | 3.69%    | 2.84%                    | 2.88%    | 4.51% *   |
| 800 µg/kg (%) <sup>b</sup>     | 5.58 mm | 5.77 mm  | 4.29 mm                  | 14.86 mm | 47.52 mm  |
|                                | 5.23% * | 6.64% *  | 3.26%                    | 4.77% *  | 5.29% *   |

ANOVA, analysis of variance; AP, anterior-posterior; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

\*  $p < 0.05$  using a one-way ANOVA (post hoc Tukey's) when compared to vehicle-treated TD mice.

a) Data presented are absolute measures and are expressed in mm.

b) Data presented are absolute measures in mm and the percentage of increase in comparison to vehicle-treated TD mice.

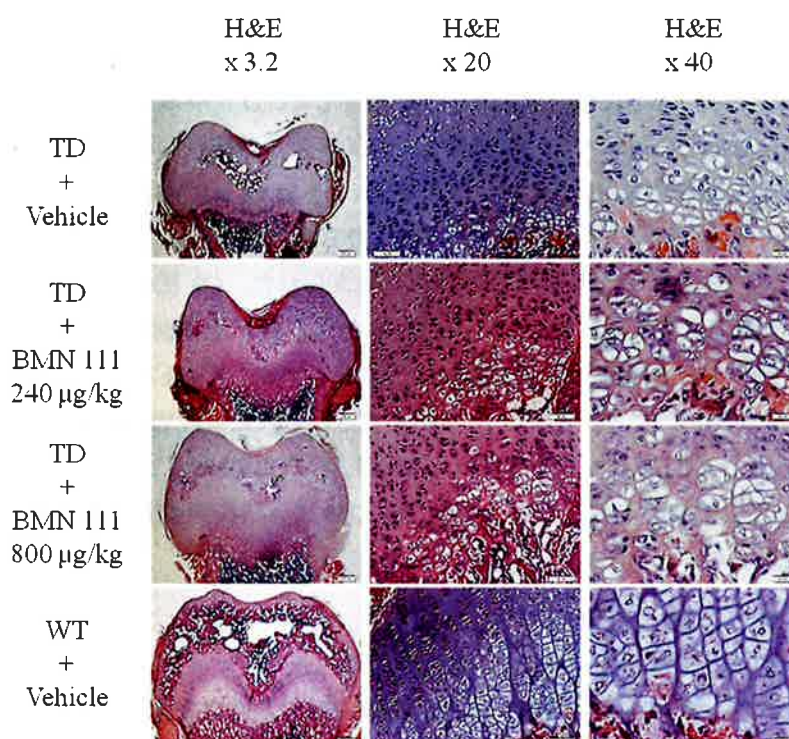


溶媒を投与した野生型マウスと比較して、溶媒を投与した TD マウスでは、C0 及び C1 の矢状径及び横径の減少、並びに大後頭孔の面積の減少が測定された。TD マウスでは、直径は約 20～35% 短く（C1 の矢状径はわずかに約 8.5% 短かった）、面積は約 40% 小さかった。これらの結果は、ヒトでの病理所見と一致している。溶媒を投与した TD マウスと比較して、BMN 111 を投与した TD マウスでは、800 µg/kg の BMN 111 を投与した TD マウスで著しく増加した C1 の横径（+9.14%、[ $p = 0.06$ ]）を除いて、C0 及び C1 の矢状径及び横径のわずかな増加しか認められなかった。これらの試験結果は、TD マウスで BMN 111 の 10 日間の連日投与が脊柱管狭窄を悪化させなかったことを示唆し、むしろ、ACH 患者で BMN 111 の投与が脊髄圧迫のリスクを潜在的に減少させる可能性があることを示していると考えられた。C0 及び C1 の直径のわずかな増加が C0 の面積の増加に反映されなかったのは、おそらく短い治療期間及び形状変化のために、これらの面積が測定可能な変化にならなかったと考えられる。C0 及び C1 の直径の増加は、ERK1 及び ERK2 を遺伝的に不活性化したマウスで認められた脊柱管の拡大と一致している ([Sebastian 2010])。FGF によって誘導される ERK1 及び ERK2 のリン酸化の部分的な阻害については、BMN 111 を添加培養した正常、ACH 及び TD ヒト成長板軟骨細胞において示されている (2.6.2.2.3.6 項)。

脳以外の全ての器官重量は、溶媒を投与した野生型マウスと比較して、溶媒を投与した TD マウスで減少した（約 50～70% の重量減少）。溶媒を投与した TD マウスと比較して、BMN 111 を投与した TD マウスで、脳、心臓、腎臓、肺及び精巣の器官重量に変化は認められなかった。溶媒を投与した TD マウスと比較して、800 µg/kg の BMN 111 を投与した TD マウスで、肝臓（+22.30%）及び腸（+17.59%）の重量の有意な増加が認められた。これらの増加は、BMN 111 を投与した Ach マウス ([BMN111-11-001]試験；2.6.2.2.5.1.3 項) で認められた器官サイズの正常化作用と関連性がある可能性がある。

溶媒を投与した野生型マウスと比較して、TD マウスの遠位大腿骨の組織学的解析では、骨端頭のサイズの著しい減少、二次骨化の遅延、成長板の小型化、肥大帯の欠如、柱状配列の欠如、並びに肥大細胞の異常な形状及び小型化が認められた。BMN 111 の 10 日間連日皮下投与により上記欠陥が部分的に回復し、BMN 111 の連日皮下投与が、ACH の重度のモデルにおいて軟骨内骨形成を促進することが確かめられた。

図 2.6.2.2.5-2 *Fgfr3*<sup>Y367C</sup> タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の 10 日間皮下投与による遠位大腿骨成長板の組織学的評価



H&E, hematoxylin and eosin; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

結論として、BMN 111 の 10 日間連日皮下投与は、重度の ACH のマウスモデルにおいて中軸骨格及び四肢骨格の成長を促進した。脊柱管狭窄の悪化は認められず、中軸骨格よりも四肢骨格が優先的に成長することにより、四肢短縮の改善が認められた。

### 2.6.2.2.5.1.2 *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup>タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の 20 日間連日皮下投与による全体の発達及び軟骨内骨成長評価の予備検討

[BMN111-11-045]試験

幼若 TD マウスを用いて、全体の発達及び骨成長に及ぼす BMN 111 の 1 日 1 回 20 日間皮下投与の影響を評価した。モデルについては 2.6.2.2.2 項に記載した。試験は、XXXXXXXXXX (XXXXXXXXXX、France) で実施し、20XXXX 年 6 月 17 日に開始し、20XXXX 年 7 月 13 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

7 日齢の TD マウスに、溶媒及び 800 µg/kg の BMN 111 を 1 日 1 回 20 日間皮下投与した。野生型 (*Fgfr3*<sup>+/+</sup>) 動物は、正常な成長の比較対照として使用するため溶媒のみを投与した。TD マウスを用いた前項の試験期間が 10 日間のみであったため (2.6.2.2.5.1.1 項を参照)、20 日間の BMN 111 の投与期間を検討する探索的予備試験を実施した。試験デザインを表 2.6.2.2.5-3 に示す。

**表 2.6.2.2.5-3 *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup>タナトフォリック骨異形成症 (TD) マウスの BMN 111 の 20 日間投与による全体の発達及び骨の成長評価の試験デザイン**

| Group | Genotype | Compound             | Dose (µg/kg) <sup>b</sup> | Dosing Frequency    | Animal No. and Sex per Group (Total) |
|-------|----------|----------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| 1     | WT       | vehicle <sup>a</sup> | 0                         | Once daily, 20 days | 4M/3F (7)                            |
| 2     | TD       | vehicle <sup>a</sup> | 0                         | Once daily, 20 days | 3 ND/2M/4F <sup>d</sup> (9)          |
| 3     | TD       | BMN 111 <sup>c</sup> | 800                       | Once daily, 20 days | 5 ND/5M/2F (12)                      |

F, female; No., number; ND, sex was not able to be determined; M, male; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

a) Animals in Groups 1 and 2 received control vehicle (0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% [w/v] benzyl alcohol and 10% [w/v] sucrose).

b) Animals were dosed at a volume of 10 mL/kg.

c) BMN 111 lot CM092309.

d) Although genotyping confirmed the presence of the *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> mutation, one female was noted as having a mild TD phenotype.

動物は、死亡率並びに有害な作用及び苦痛の明らかな徴候について、少なくとも 1 日 1 回評価した。詳細な一般状態の変化について、投与初日 (投与 1 日目、PND7)、11 日目 (PND17) 及び 21 日目の試験終了前 (PND27) に評価した。動物はまた、同じ評価間隔で、後肢の動き、姿勢、尾の外観、足蹠の形の崩れ及び腫脹、並びに関節の腫脹について、それぞれ 0~4 点の 5 段階の重症度スコアで評価した。

投与 1、5、8、11、15、18 及び 21 日目に動物の体重を測定した。体重が 20%以上減少した動物は直ちに安楽死させた。

尾長及び頭胴長は、投与 1、8、15 及び 21 日目に測定した。

投与 21 日目 (PND27) に、BMN 111 を 20 日間連日投与した動物を安楽死させた。表現型特性を明らかにするために、各動物の写真撮影を行い、全身マイクロコンピュータ断層撮影 (µCT)

を実施した。頭蓋骨の前後（AP）径を測定した。ほとんどの動物は、 $\mu$ CT 機器を使用してスキャンするまで、屠体全体を 4%パラホルムアルデヒド、70%エタノール又は 10%中性緩衝ホルマリン液のいずれかで保存した。溶媒を投与した TD マウス 1 例及び BMN 111 を投与した TD マウス 2 例は、左右の大腿骨、脛骨、上腕骨、尺骨、橈骨及び第 4～6 腰椎（L4～L6）を切除し、長さを測定し、パラホルムアルデヒドで保存した。頭蓋骨も 70%エタノールで保存した。

保存した屠体全体に対して  $\mu$ CT スキャンを実施し、頭蓋形状を比較した。2 次元（2D）解析結果は本試験の目的には必要でないと考えられたが、全てのスキャン結果を資料として保管した。

大腿骨サブセットを 0.5 mol/L EDTA で約 3～4 週間脱灰した後、パラフィン包埋した。大腿骨の遠位端及び近位端の連続した 5  $\mu$ m 切片を、組織学的検査（H&E 染色）、KI67 の染色による免疫組織染色（IHC）、並びに X 型コラーゲン及び II 型コラーゲン特異的なリボプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション用に処理した。全てのほかの保存骨及び屠体は保管した。

BMN 111 の投与に関連した死亡は認められなかったが、数例は予定された安楽死の時点まで生存しなかった。歯のトリミング後 4 例のマウスが死亡した。このモデル動物で通常観察される顕著な顎前突のため、歯のトリミングは一般的に必要とされる。さらに、1 例のマウスが死亡した状態で発見され、6 例のマウスが体重減少のために予定より早く安楽死された。これらの予定外の死亡は、重度の TD 表現型特性による成長障害が原因と考えられた。表 2.6.2.2.5-4 に、試験早期死亡例及び予定された安楽死まで生存した動物数を要約した。試験を遂行できなかった動物はいなかった。

表 2.6.2.2.5-4 投与群ごとの予定された安楽死までの生存状態

| Group, Genotype, Treatment      | Number of Early Deaths and Type  | Number surviving to scheduled necropsy |
|---------------------------------|--|--|
| 1, WT, Vehicle                  | None (0)   | 7                                      |
| 2, TD, Vehicle                  | Total of 4<br>2 – Found dead (Day 15) due to teeth trimming<br>1 – Euthanized for body weight loss (Day 14)<br>1 – Euthanized for body weight loss (Day 16)  | 5                                      |
| 3, TD, BMN 111 (800 $\mu$ g/kg) | Total of 7<br>2 – Found dead (Day 15) due to teeth trimming<br>1 – Euthanized for body weight loss (Day 12)<br>2 – Euthanized for body weight loss (Day 14)<br>1 – Euthanized for body weight loss (Day 16)<br>1 – Found dead, partially cannibalized (Day 17) | 5                                      |

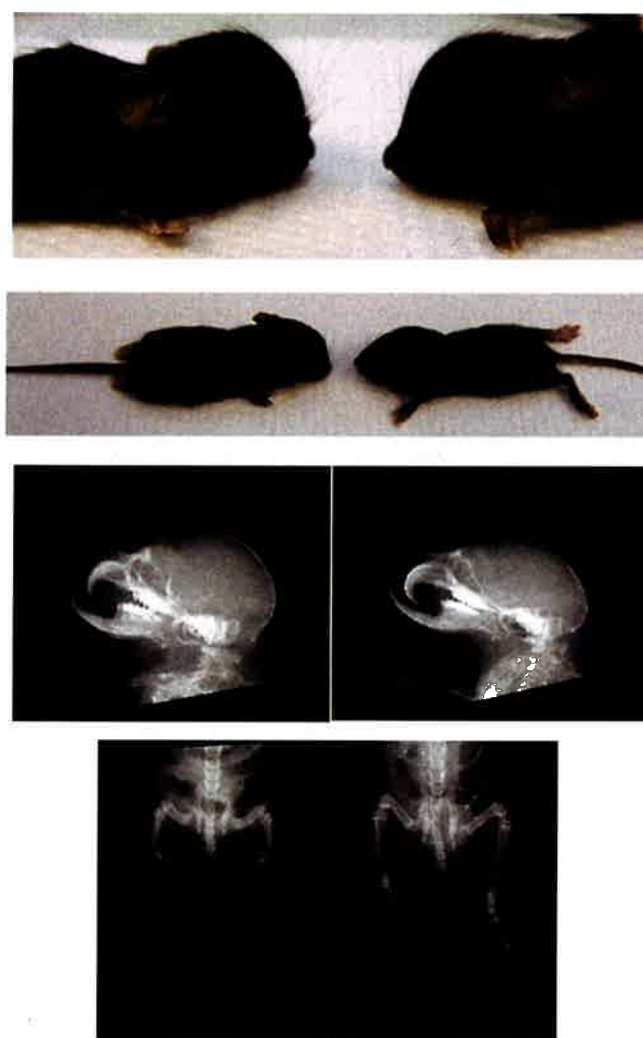
TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

800  $\mu$ g/kg/日の BMN 111 を投与後生存した TD マウス 5 例（雄 3 例及び雌 2 例）のうち、雄 1 例（動物 A1）のみが試験期間中 BMN 111 の投与に関連した一般状態の変化が認められなかった。雄 2 例は投与 21 日目に後肢の運動性及び収縮の一過性の軽度の減少を示し、1 例は中等度の曲尾も示した。雌 2 例は、投与 21 日目に軽度の曲尾及び足蹠の軽度の腫脹・湾曲を示した。

BMN 111 を投与した TD マウスのほとんどは、投与開始後 4～5 日間は、投与後約 5～10 分間、BMN 111 の投与に関連した血行動態の変化に起因する自発運動の一過性の低下を示した。

投与 20 日後、溶媒を投与した TD マウスと比較して、BMN 111 を投与した TD マウスの外観に顕著な変化が認められた。扁平化した頭蓋に対し明らかな鼻の突出を示す外観、顎前突の減少、足蹠及び指の大型化、並びに脛骨及び大腿骨の伸長及び直線化など顕著な表現型の変化が認められた（図 2.6.2.2.5-3）。BMN 111 の投与はまた、頭蓋骨の頭頂部にある大泉門の閉鎖を修復する可能性が認められた。これらの所見については、試験終了時に  $\mu$ CT 評価によってさらに確認した。

図 2.6.2.2.5-3 遺伝子型が一致した同腹仔の BMN 111 及び溶媒の 20 日間連日投与による外観の比較



**Left:** TD Mouse D4 Group 2 Vehicle (0 µg/kg) **Right:** TD Mouse D1 Group 3 BMN 111 (800 µg/kg)

TD, thanatophoric dysplasia.

溶媒を投与した TD マウスと比較して、BMN 111 を投与した TD マウスでは、体重増加に対する明らかな影響は認められなかった。

尾長及び頭胴長、並びに頭蓋骨の前後（AP）径の平均値は、溶媒を投与した TD マウスと比較して、BMN 111 を投与したマウスで投与 20 日後に伸長する傾向が認められたが、測定技術のばらつき及びサンプル数が少ないため、統計学的有意性が低下した。

TD マウスの溶媒投与群の比較的軽症例との比較においても、ほとんどの骨長の *ex vivo* 測定で、BMN 111 を投与した TD マウスでは伸長が認められた。

**表 2.6.2.2.5-5 *Fgfr3*<sup>Y367C/+</sup> タナトフォリック骨異形成症（TD）マウスの BMN 111 の投与による骨、尾及び頭胴長（平均値）の野生型マウス及び溶媒投与との比較**

| Phenotype and Treatment            | Tail     | Femur   | Tibia    | L4-L6   | AP skull | Naso-anal |
|------------------------------------|----------|---------|----------|---------|----------|-----------|
| WT, vehicle                        | 56 mm    | NA      | NA       | NA      | 22.23 mm | 73.79 mm  |
| TD, vehicle                        | 33 mm    | 7.23 mm | 9.35 mm  | 4.58 mm | 16.68 mm | 51.55 mm  |
| TD, 800 µg/kg BMN 111 <sup>a</sup> | 37 mm    | 8.50 mm | 10.79 mm | 5.04 mm | 18.84 mm | 55.62 mm  |
|                                    | 12.12% * | 17.57%  | 15.40%   | 10.04%  | 13.00%   | 7.89% **  |

AP, anterior-posterior; NA, not applicable; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild type.

<sup>a</sup> Absolute measurement in mm and percentage increased relative to vehicle treated TD mice.

\*  $p = 0.039$  using a Student's T-Test when compared to vehicle-treated TD mice.

\*\* Approaching significance ( $p = 0.056$ ) using a Student's T-Test when compared to vehicle-treated TD mice. On Study Day 15, the naso-anal segment was significantly longer (+11.36%,  $p = 0.048$ ) using a ruler for measurement.

近位及び遠位大腿骨の顕微鏡検査において、このモデルで特徴的に認められ、試験で溶媒を投与した TD マウスで認められたものと比較して、800 µg/kg の BMN 111 を連日投与した TD マウスでは、成長板の種々の場所で幅及び構造が回復されることが示され、増殖帯において、複製軟骨細胞の柱状配列の回復が認められた。肥大帯では、分化した軟骨細胞が柱状配列を回復した。増殖帯及び肥大帯の形状及びサイズの回復が認められた。原発性海綿骨欠損は、軟骨下骨梁の増加により部分的に回復される可能性が示唆された。

結論として、TD マウスに 800 µg/kg の BMN 111 を 10 日間追加投与し、合計 20 日間連日投与すると、重度の ACH のマウスモデルで BMN 111 が中軸骨格及び四肢骨格の成長を促進することがさらに裏付けられた。投与期間を延長すると、さらなる成長及び疾患の表現型の顕著な改善がもたらされた。後肢の運動性の変化、曲尾及び足蹠の歪曲などの過度の薬理作用も認められたが、おおむね軽度であった。

#### 2.6.2.2.5.1.3 *Fgfr3*<sup>ach</sup> (Ach) マウスの BMN 111 の 36 日間皮下投与による骨の成長

[BMN111-11-001]試験

ACH のマウスモデルである *Fgfr3*<sup>ach</sup> (Ach) マウスに対する BMN 111 の効果を検討した。モデルについては 2.6.2.2.2.1 項に記載した。試験は、[REDACTED] ( [REDACTED]、 [REDACTED]、USA) で実施し、20 [REDACTED] 年 1 月 11 日に開始し、20 [REDACTED] 年 10 月 18 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

3 週齢の雄性 Ach マウス及びその野生型 (FVB 系) 同腹仔 (n = 8~10/群) に、20、80 及び 280 µg/kg の BMN 111 及び溶媒を 36 日間連日皮下投与した。試験デザインを表 2.6.2.2.5-6 に示す。

**表 2.6.2.2.5-6 Ach マウスの BMN 111 の 36 日間皮下投与による骨の成長の試験デザイン**

| Genotype | Treatment            | Dose Level <sup>b</sup> | Frequency      |
|----------|----------------------|-------------------------|----------------|
| WT       | vehicle <sup>a</sup> | 0                       | Daily, 36 days |
| Ach      | vehicle <sup>a</sup> | 0                       | Daily, 36 days |
| Ach      | BMN 111              | 20 µg/kg                | Daily, 36 days |
| Ach      | BMN 111              | 80 µg/kg                | Daily, 36 days |
| Ach      | BMN 111              | 280 µg/kg               | Daily, 36 days |

Ach, *Fgfr3*<sup>G380R</sup> achondroplasia mouse model; WT, wild type.

a) 0.005 mol/L citric acid buffer solution, pH 5.5, containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) Polysorbate 80.

b) Animals were dosed at a volume of 3.33 mL/kg.

動物は、姿勢、後肢の動き、尾、足趾、関節の腫脹及び全身の健康状態を毎週検査した。体重、頭胴長及び尾長を、試験開始時に測定した。成長については、週に 1 回の尾長の測定及び週に 2 回の体重の測定によって、生存投与期間中評価した。剖検では、X 線画像並びに頭胴長、尾長及び頭蓋骨の長さを評価した。長骨（大腿骨、脛骨、上腕骨、尺骨及び第 4~6 腰椎）を採取し、ノギスで長さを測定した。大腿骨及び脛骨を組織学的検査用に固定し、組織学的及び組織形態計測学的解析を大腿骨に対して実施した。精巣、腎臓、肝臓、心臓、肺及び脳の重量を測定し、組織学的検査用に固定した。肺の組織学的及び組織病理学的解析は、溶媒及び BMN 111 を投与した動物から選択した試料で実施した。ほかの全ての組織は固定して保管した。試験終了時に血清を採取し、保管した。

BMN 111 の投与に関連した一般状態の変化の観察において軽度の曲尾が認められたが、それ以外の投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。足根関節の肥大はいずれの動物にも認められなかった。

Ach マウスの体重は、試験開始時、野生型同腹仔よりも有意に低かった。溶媒を投与した Ach マウスと比較して、BMN 111 を投与した Ach マウスで体重の増加が認められた。18 日間の投与後、280 µg/kg の BMN 111 を投与した Ach マウスの体重は、溶媒を投与した野生型マウスと統計学的に有意差がなかった。

溶媒を投与した Ach マウスと比較して、BMN 111 を投与した Ach マウスでは、四肢骨格及び中軸骨格の有意な成長の亢進が認められ、この亢進は、おおむね投与量に依存していた。

Ach マウスの頭胴長及び尾長は、試験開始時、野生型マウスより統計学的に有意に短かった。280 µg/kg の投与量で BMN 111 を連日皮下投与すると、29 日後に尾長の伸長が認められた。BMN 111 を 36 日間連日皮下投与後の頭胴長は、80 µg/kg で伸長し、280 µg/kg で過度に伸長した。尾長の過度の伸長は、過度の薬理作用に起因し、FGFR3 ノックアウトマウス ([Colvin 1996]) 及び BMN 111 を投与した野生型マウス (2.6.2.2.5.2.1.1 項) で認められたのと同様の曲尾を引き起こした。

溶媒を投与した野生型マウスと比較して、溶媒を投与した Ach マウスでは、尾長が短かったが、脊椎第 4～6 腰椎 (L4～L6) の長さは同程度であった。尾長と第 4～6 腰椎 (L4～L6) の長さの評価が異なったのは、個々の椎骨のごくわずかな短縮が尾では累積的に影響した可能性がある (FVB マウスの L4～L6 間は 2 椎骨、尾は約 24 椎骨)。BMN 111 を 80 及び 280 µg/kg の投与量で 36 日間連日皮下投与後、尾長は正常化した。第 4～6 腰椎 (L4～L6) は過成長した。

ヒト ACH と一致して、溶媒を投与した野生型マウスと比較して、溶媒を投与した Ach マウスでは、長骨及び頭蓋骨の前後 (AP) 径の長さの短縮が測定された。280 µg/kg の BMN 111 を 36 日間連日皮下投与後、長骨 (脛骨) 長の正常化が認められたが、280 µg/kg の BMN 111 では、頭蓋骨の前後 (AP) 径の短縮は改善傾向がみられたのみであった。

Ach マウスは、ヒトの ACH の病理所見と一致しないいくつかの特徴を示す。ACH 患者では、大後頭孔の狭窄が観察されるが、Ach マウスでは、大後頭孔の矢状径及び横径の伸長が認められた。280 µg/kg の投与量で BMN 111 を 36 日間連日皮下投与後、大腿骨及び脛骨の過成長と共に大後頭孔の直径の正常化が認められた。

成長の測定値を以下の表 (表 2.6.2.2.5-7) に示す。



表 2.6.2.2.5-7 最終成長測定及び溶媒を投与した野生型マウスに対する増加率

| Group | Genotype | Test Article | Dose level (µg/kg) | Day 36 Final Growth Measurement (Group 1) or Difference in Mean from Group 1 (Absolute and Percent) <sup>a</sup> |             |             |                                      |                                  |                                  |                             |
|-------|----------|--------------|--------------------|--|-------------|-------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|       |          |              |                    | Naso-anal Length   | Tail Length | Body Weight | Skull (Anterior to Posterior) Length | Right and Left Mean Femur Length | Right and Left Mean Tibia Length | Lumbar Vertebrae 4-6 Length |
| 1     | WT       | vehicle      | 0                  | 9.40 cm  | 8.43 cm     | 26.93 g     | 24.17 mm                             | 14.91 mm                         | 18.24 mm                         | 9.74 mm                     |
| 2     | Ach      | vehicle      | 0                  | -0.58 cm   | -           | -3.14 g     | -2.87 mm                             | -0.55 mm                         | -                                | -                           |
|       |          |              |                    | -6.2%  | -           | -11.7%      | -11.9%                               | -3.7%                            | -                                | -                           |
| 3     | Ach      | BMN 111      | 20                 | -0.40 cm   | 0.38 cm     | -2.29 g     | -2.27 mm                             | -                                | -                                | -                           |
|       |          |              |                    | -4.3%  | -4.5%       | -8.5%       | -9.4%                                | -                                | -                                | -                           |
| 4     | Ach      | BMN 111      | 80                 | -  | -           | -2.17 g     | -2.75 mm                             | -                                | -                                | -                           |
|       |          |              |                    | -  | -           | -8.1%       | -11.4%                               | -                                | -                                | -                           |
| 5     | Ach      | BMN 111      | 280                | +0.36 cm   | -           | -           | -1.98 mm                             | +0.52 mm                         | +0.86 mm                         | +0.66 mm                    |
|       |          |              |                    | +3.8%  | -           | -           | -8.2%                                | +3.5%                            | +4.7%                            | +6.8%                       |

Ach, *Fgfr3<sup>G380R</sup>* achondroplasia mouse model; ANOVA, analysis of variance; G1, group 1; WT, wild type; -, no significant difference ( $p > 0.05$ , ANOVA with Dunnett's test compared to vehicle group).

a) Increase in growth relative to Group 1 (WT, vehicle), shown in absolute difference from control (mean for treatment group – mean for Group 1) and percent difference ([absolute difference in growth/mean growth for Group 1] x 100). Values are only presented that were significantly different from Group 1.

剖検において、精巣、腎臓、肝臓、心臓、肺及び脳の肉眼的検査に異常は認められなかった。溶媒を投与した野生型マウスと比較して、溶媒を投与した Ach マウスでは、肝臓、肺及び心臓の重量が有意に低かった。BMN 111 の投与は肝臓重量を改善した。280 µg/kg の BMN 111 を連日投与した Ach マウスの肝臓重量は、野生型マウスと有意差がなかった。肺には BMN 111 の投与に関連した組織学的変化は認められず、全ての肺切片は、コッサ染色による石灰化評価は陰性であった。

軟骨補充帯、増殖帯及び肥大帯の面積及び幅の増加などの遠位大腿骨の成長板構造の正常化が、280 µg/kg の BMN 111 を投与した Ach マウスで認められた。

結論として、20、80 及び 280 µg/kg の投与量での BMN 111 の 36 日間連日皮下投与は、心血管系への影響に起因する明らかな一般状態の変化を伴わずに、Ach マウスの中軸骨格及び四肢骨格の投与量に依存した成長をもたらした。矮小発育症の表現型の正常化又は過度の伸長が、280 µg/kg の BMN 111 で認められた。過度の薬理作用に関連する一般状態の変化は、280 µg/kg の投与量でのみ認められ、軽度の曲尾であった。

#### 2.6.2.2.5.2 正常動物

##### 2.6.2.2.5.2.1 正常マウスの成長過程に対する BMN 111 の薬理活性

3 週齢の正常 FVB マウスで *in vivo* 試験 3 試験を実施し、骨成長及び全体の発達に対する BMN 111 の薬理活性を評価した。正常マウスの成長期間は、出生～約 13 週齢までである ([Zoetis 2003])。2 試験は投与量設定試験で、1 試験で、種々の投与レジメンを評価した。

##### 2.6.2.2.5.2.1.1 正常マウスの投与量設定試験

[BMN111-09-048]試験、[BMN111-09-075]試験、[BMN111-09-074]試験

BMN 111 の連日皮下投与が、正常マウスの骨成長及び全体の発達に及ぼす影響を 3 試験で検討した。BMN111-09-048 試験及び BMN111-09-074 試験は、[REDACTED] ([REDACTED]、[REDACTED]、USA)、並びに BMN111-09-075 試験は [REDACTED] ([REDACTED]、[REDACTED]、USA) で実施し、BMN111-09-048 試験は、20[REDACTED] 年 5 月 28 日に開始し 20[REDACTED] 年 3 月 19 日に終了し、BMN111-09-075 試験は、20[REDACTED] 年 7 月 20 日に開始し 20[REDACTED] 年 3 月 23 日に終了し、BMN111-09-074 試験は、20[REDACTED] 年 12 月 9 日に開始し 20[REDACTED] 年 1 月 5 日に終了した。BMN111-09-075 試験では、尿試料の保管場所に関して 20[REDACTED] 年 3 月 1 日に報告書を修正した。種々の CNP 類縁物質を評価したが、本項には BMN 111 (試験報告書では BMN-111-B3) に関連する試験結果のみを記載した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

3 週齢の雄性正常 FVB マウス (n=3~10 群) に、20、80 及び 280 µg/kg の BMN 111、並びに溶媒を 36 日間連日皮下投与した。動物は、姿勢、後肢の動き、尾、足蹠、関節の腫脹及び全身の健康状態を、毎日又は週に 2 回評価した。試験開始時に、体重測定、ベースラインの X 線解析、頭胴長及び尾長測定を行った。成長については、週に 1 回の尾長の測定及び週に 2 回の体

重の測定によって、生存投与期間中評価した。投与 35 日目に全身の二重エネルギー X 線吸収測定法 (DXA) によるスキャンを実施し、全身骨塩量、総骨面積及び全身 BMD を測定した。BMN111-09-075 試験では、骨の蛍光色素標識のために、溶媒及び 280 µg/kg の BMN 111 の投与動物 (n = 5/群) に投与 30 日目及び 35 日目にカルセインを投与した。剖検では、最終 X 線解析及び頭胴長測定を行った。長骨を採取し、長さをノギスで測定し、組織学的検査のために固定した。次に、カルセイン標識大腿骨について、静的及び動的パラメータの組織形態計測学的解析を実施した。精巣、腎臓、肝臓、心臓、肺及び脳重量を測定し、組織学的検査のために固定した。肺の組織学的解析は、選択した試料でのみ実施した。ほかの全ての固定臓器は保管した。投与前 (投与-1 日目 [サテライト群])、投与後 15 分 (投与 1 日目 [サテライト群]) 及び投与 36 日目)、並びに試験終了時に血液を採取し、曝露量、cGMP、II 型コラーゲン分解産物 (CartiLaps® ELISA [CTX-II] キット)、総アルカリホスファターゼ (ALP) 値及び総抗 BMN 111 IgG 抗体量を評価した。試験デザインを表 2.6.2.2.5-8 に示す。

**表 2.6.2.2.5-8 投与量設定試験デザイン (BMN111-09-048 試験、BMN111-09-075 試験及び BMN111-09-074 試験)**

| Test System:         | 3-week-old FVB WT mice    |              |                |
|----------------------|---------------------------|--------------|----------------|
| Treatment            | Dose Level <sup>a,b</sup> | Route        | Frequency      |
| Vehicle <sup>c</sup> | 0 µg/kg                   | subcutaneous | Daily, 5 weeks |
| BMN 111 <sup>d</sup> | 20 µg/kg                  | subcutaneous | Daily, 5 weeks |
| BMN 111              | 80 µg/kg                  | subcutaneous | Daily, 5 weeks |
| BMN 111              | 280 µg/kg                 | subcutaneous | Daily, 5 weeks |
| BMN 111 <sup>e</sup> | 280 µg/kg                 | subcutaneous | Once, Day 1    |

WT, wild type.

a) Animals were dosed at a volume of 3.33 mL/kg.

b) Equivalent to 0, 5, 20, 70 and 70 nmol/kg, respectively.

c) 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% (w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

d) Data obtained from BMN111-09-074.

e) Satellite toxicokinetic group (Study BMN111-09-048 only).

BMN 111 の連日皮下投与では投与量に依存した中軸骨格及び四肢骨格の成長が認められたが、心血管系への影響に起因する明らかな一般状態の変化は認められなかった。

過度の薬理作用 (過量投与) に関連する一般状態の変化は、BMN 111 の投与群全例で認められ、足趾の歪曲、曲尾及び円背位などであった。これらの所見の重症度は、おおむね投与量に依存した。これら認められた所見は、*Fgfr3* ノックアウトマウスの表現型と一致していたため、過度の薬理作用に起因すると考えられた ([Colvin 1996])。80 及び 280 µg/kg の投与量で BMN 111 を投与した動物では、足根関節の肥大が 1~複数個の関節で認められた。所見の認められた投与群の足関節の X 線解析では、以下に説明する BMD の減少に関連している可能性がある骨折線からカルス様形成に至る範囲の骨構造の異常が認められた。

280 µg/kg の BMN 111 を投与した動物は、投与量に依存した BMD の減少を示し、骨面積 (領域) の増加が測定され、成長の促進による骨石灰化の遅延が示唆された。この骨石灰化の遅延により、上記の異常な骨構造が生じる原因となる可能性のある、荷重骨 (足関節) の骨脆弱性が引き起こされた可能性がある。

四肢骨格及び中軸骨格の成長は、おおむね、投与量に依存した。尾長の有意な伸長が、投与 8 日目に早期検出された。大腿骨及び脛骨の伸長は 20 µg/kg の投与量で認められたが、中軸骨格の変化は検出されなかった。成長に関する測定値の増加を、以下の表に示す (表 2.6.2.2.5-9)。

表 2.6.2.2.5-9 5週間連日投与後の最終成長測定及び溶媒を投与した動物に対する増加率 (BMN111-09-048 試験、BMN111-09-075 試験及び BMN111-09-074 試験)

| Test Article         | Dose level<br>(µg/kg) | Final Growth Measurement (Vehicle) or Difference in Mean from Same-Study Vehicle Treated Animals<br>(Absolute and Percent) <sup>a</sup> |             |             |                               |                |                |                      |
|----------------------|-----------------------|---|-------------|-------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------------|
|                      |                       | Naso-anal Length  | Tail Length | Body Weight | Skull (Anterior to Posterior) | Combined Femur | Combined Tibia | Lumbar Vertebrae 4-6 |
| Vehicle <sup>b</sup> | 0                     | 94.26 mm  | 8.30 cm     | 26.99 g     | 21.78 mm                      | 14.92 mm       | 17.86 mm       | 9.56 mm              |
| Vehicle <sup>c</sup> | 0                     | 94.62 mm  | 8.25 cm     | 27.01 g     | 21.82 mm                      | 15.01 mm       | 17.83 mm       | 10.03 mm             |
| BMN 111 <sup>d</sup> | 20                    | +2.45 mm  | +0.65 cm    | -           | +1.21 mm                      | +0.46 mm       | +0.32 mm       | +0.28 mm             |
|                      |                       | +2.6%   | +7.9%       | -           | +5.5%                         | +3.1%          | +1.8%          | +2.8%                |
| BMN 111 <sup>b</sup> | 80                    | +7.85 mm  | +0.59 cm    | -           | -                             | +1.01 mm       | +0.45 mm       | +1.26 mm             |
|                      |                       | +8.3%   | +7.1%       | -           | -                             | +6.8%          | +2.5%          | +13.2%               |
| BMN 111 <sup>c</sup> | 80                    | +6.69 mm  | +0.68 cm    | -           | -                             | +1.11 mm       | +0.74 mm       | +1.04 mm             |
|                      |                       | +7.1%   | +8.2%       | -           | -                             | +7.4%          | +4.2%          | +10.4%               |
| BMN 111 <sup>b</sup> | 280                   | +11.58 mm   | +0.94 cm    | -           | -                             | +1.3 mm        | +0.81 mm       | +1.24 mm             |
|                      |                       | +12.3%  | +11.3%      | -           | -                             | +8.7%          | +4.5%          | +13.0%               |
| BMN 111 <sup>c</sup> | 280                   | +12.04 mm   | +1.28 cm    | +2.54 g     | +0.42 mm                      | +1.47 mm       | +1.23 mm       | +1.29 mm             |
|                      |                       | +12.7%  | +15.5%      | +9.4%       | +1.9%                         | +9.8%          | +6.9%          | +12.9%               |

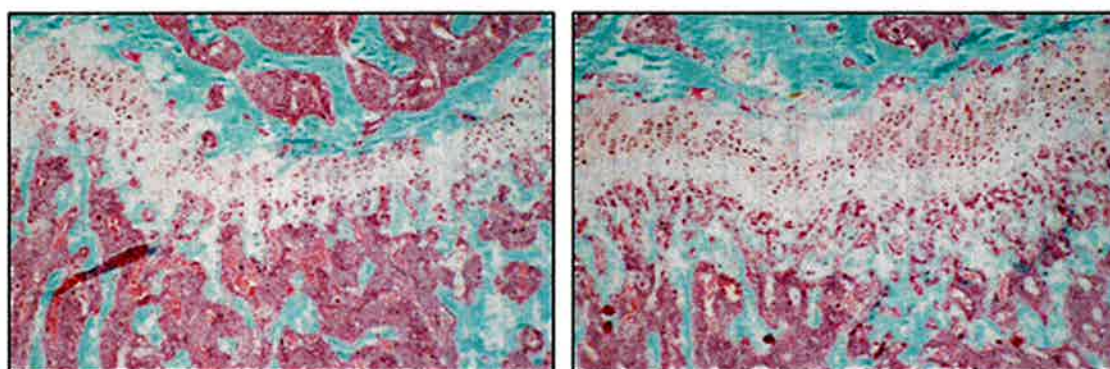
ANOVA, analysis of variance; - no significant difference ( $p > 0.05$ , ANOVA with Dunnett's test compared to vehicle group).

- a) Increase in growth relative to vehicle-treated animals in study, shown in absolute difference from control (mean for treatment group – mean for vehicle) and percent difference ([absolute difference in growth/mean growth for vehicle] x 100). Values are only presented that were significantly different from vehicle control.
- b) Data obtained from BMN111-09-048, Groups 1 (vehicle), C1 (80 µg/kg/day), and C2 (280 µg/kg/day).
- c) Data obtained from BMN111-09-075, Groups 1 (vehicle), 2 (80 µg/kg/day) and 3 (280 µg/kg/day).
- d) Data obtained from BMN111-09-074, Group 5, compared to Group 1 (vehicle) from BMN111-09-075.

剖検において、精巣、腎臓、肝臓、心臓、肺及び脳の肉眼的検査は正常であった。これらの試験では、器官重量に有意な変化は認められなかった。選択した肺試料の組織学的解析では、溶媒対照群の動物を含む検査した全群に血管周囲の炎症の発生が認められた。無機質の沈着は、80 及び 280  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した動物の 60%の肺の間質腔において、コッサ染色により検出された（2〜3 細胞幅で 10x 視野当たり 1〜2 箇所発生）。これらの無機質の沈着は、80  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した動物 1 例を除いて、H&E 染色では検出されなかった。この無機質の沈着はごくわずかであり、臨床的に重要ではないと考えられた。

280  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した動物では、遠位大腿骨の骨構造及び成長動態に関して軟骨細胞の増殖による成長板の幅の顕著な増加（約 25%）が認められたが、それ以外の投与に関連した変化は認められなかった（図 2.6.2.2.5-4）。静的及び動的組織形態計測学的解析により、溶媒及び 280  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した動物の間で長軸方向の成長速度に有意差は認められなかった。成長板の拡大により、BMN 111 の軟骨細胞における作用機序（軟骨細胞の増殖及び分化の促進）が確認された。

図 2.6.2.2.5-4 BMN 111 投与動物の成長板の幅の増加、トリクローム染色切片（x10）



Vehicle <sup>a</sup>

BMN 111 (280  $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>b</sup>

- a) Growth plate (x10) of left distal femur of animal #903, treated for five weeks with control article by daily subcutaneous injection on study BMN111-09-075.  
b) Growth plate (x10) of left distal femur of animal # 908, treated for five weeks with 280  $\mu\text{g/kg/day}$  BMN 111 by daily subcutaneous injection on study BMN111-09-075.

投与 36 日目の BMN 111 の最終投与後 15 分に cGMP 濃度の増加が認められ、36 日間の連日投与後の BMN 111 の活性が確認された。同様に、最終投与後の試験終了時の投与 37 日目に II 型コラーゲン分解産物及び ALP 値の増加が認められた。これは、BMN 111 の作用機序から予測される軟骨及び骨形成の亢進に関連している可能性が最も高い。総抗 BMN 111 IgG 抗体は検出されなかった。

結論として、BMN 111 の 5 週間の連日皮下投与は、投与量に依存した中軸骨格及び四肢骨格の成長をもたらした。過度の薬理作用による一般状態の変化は、薬理学的投与量を超えたことにより認められた可能性が高く、正常動物で予測されるものである。280  $\mu\text{g/kg}$  の投与量での BMN 111 の投与では、正常な新規の骨形成が認められた。

正常マウスの骨成長及び全体の発達に対する BMN 111 の種々の投与レジメンの効果を評価するために、3 週齢の雄性正常 FVB マウスに、表 2.6.2.2.5-10 に記載したスケジュール及び投与量に従って BMN 111 を背部に皮下投与した。動物は、姿勢、後肢の動き、尾、足蹠、関節の腫脹及び全身の健康状態を毎週評価した。試験開始時に体重、並びにベースラインの頭胴長及び尾長を測定した。成長については、週に 1 回の尾長の測定及び週に 2 回の体重の測定によって、生存投与期間中評価した。剖検では、最終 X 線解析及び頭胴長測定を行った。精巣、腎臓、肝臓、心臓、肺及び脳重量を測定し、組織学的検査用に固定した。長骨を採取して長さを測定し、大腿骨及び脛骨を組織学的検査用に固定して保管した。肺の組織学的解析は、全投与群の動物から採取した試料のサブセットで実施した。試験終了時に血液を採取し、II 型コラーゲン分解産物、ALP 値及び総抗 BMN 111 IgG 抗体量を評価した。

**表 2.6.2.2.5-10 投与レジメン検討のための試験デザイン (BMN 111-09-074 試験)**

| Group <sup>a</sup> | Treatment            | Dose Level <sup>b</sup> | Equivalent Total Dose over 10 Weeks | Dose Regimen  |
|--------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------------|---|
| Group 1            | Vehicle <sup>c</sup> | 0                       | 0                                   | Daily, 9 weeks.<br>1 week recovery.                                   |
| Group 2            | BMN 111              | 80 µg/kg                | 2480 µg/kg                          | Daily for 1 week, then 3x/week for 8 weeks.<br>1 week recovery.       |
| Group 3            | BMN 111              | 80 µg/kg                | 2800 µg/kg                          | Daily, on alternating weeks (Week 1, 3, 5, 7, 9).<br>1 week recovery. |
| Group 4            | BMN 111              | 20 µg/kg                | 1260 µg/kg                          | Daily, 9 weeks.<br>1 week recovery.                                   |

a) 10 animals per group.

b) Animals were dosed at a volume of 3.33 mL/kg.

c) 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% (w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

四肢骨格及び中軸骨格の成長は、全ての投与レジメンで認められた。正常動物で予測される過度の薬理作用に関連する一般状態の変化が認められた。BMN 111 を投与した全ての動物が、足蹠の歪曲、曲尾又は円背位を示した。しかし、これらの一般状態の変化の発現は、以前の試験 (BMN111-09-048 試験及び BMN111-09-075 試験) と比較して相対的な重症度が低下して遅延して発生した。本試験では、足根関節の肥大は認められなかった。

溶媒を投与した動物と比較して、BMN 111 の全ての投与量及び投与レジメンで有意な成長の亢進が認められた。成長測定値の要約を以下の表に示す (表 2.6.2.2.5-11)。

表 2.6.2.2.5-11 種々の投与レジメンの最終成長測定及び溶媒を投与した動物に対する増加率 (BMN111-09-074 試験)

| Group | Dose     | Regimen                                    | Final Growth Measurement (Vehicle) or Difference in Mean from Vehicle Treated Animals (Absolute and Percent) <sup>a</sup> |             |             |                               |                |                |                      |
|-------|----------|--|---|-------------|-------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------------|
|       |          |  | Naso-anal Length  | Tail Length | Body Weight | Skull (Anterior to Posterior) | Combines Femur | Combined Tibia | Lumbar Vertebrae 4-6 |
| 1     | Vehicle  | Daily 9 weeks                              | 97.81 mm  | 9.36 cm     | 30.72 g     | 21.91 mm                      | 15.13 mm       | 18.04 mm       | 10.18 mm             |
| 2     | 80 µg/kg | Daily for 1 week, then 3x/week for 8 weeks | +5.89 mm  | +0.45 cm    | +2.27 g     | -                             | +0.8 mm        | -              | -                    |
|       |          |  | +6.0%   | +4.8%       | +7.4%       | -                             | +5.3%          | -              | -                    |
| 3     | 80 µg/kg | Daily, on alternating weeks for 9 weeks    | +6.35 mm  | +0.59 cm    | +2.06 g     | -                             | +0.61 mm       | +0.44 mm       | -                    |
|       |          |  | +6.5%   | +6.3%       | +6.7%       | -                             | +4.0%          | +2.4%          | -                    |
| 4     | 20 µg/kg | Daily, 9 weeks                             | +5.0 mm   | +0.46 cm    | +2.41 g     | -                             | +1.1 mm        | +0.49 mm       | -                    |
|       |          |  | +5.1%   | +4.9%       | +7.8%       | -                             | +7.3%          | +2.7%          | -                    |

ANOVA, analysis of variance; -, no significant difference ( $p > 0.05$ , ANOVA with Dunnett's test compared to vehicle group).

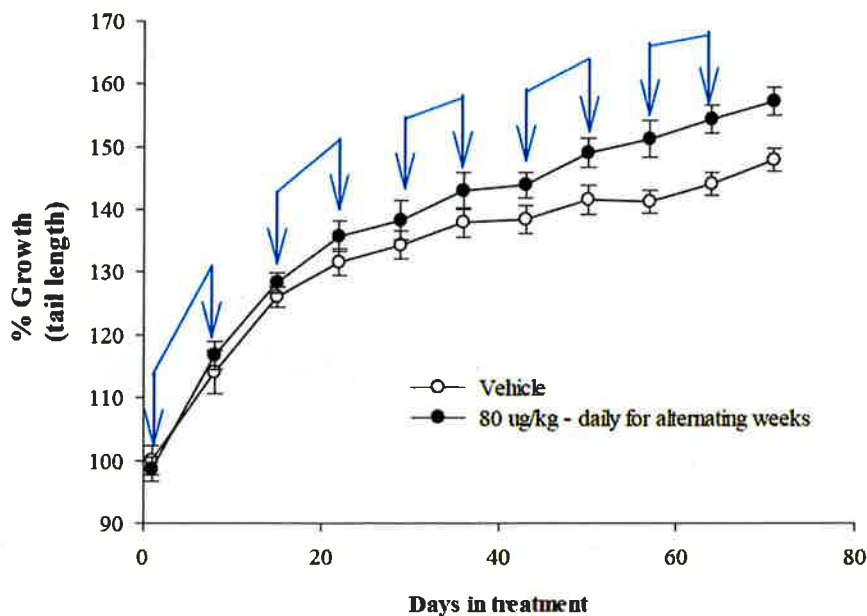
a) Increase in growth relative to Group 1 (vehicle), shown in absolute difference from control (mean for treatment group – mean for Group 1) and percent difference ([absolute difference in growth/mean growth for Group 1] x 100). Values are only presented that were significantly different from Group 1.



中軸方向の成長の指標として頭胴長を測定すると、投与レジメン間で統計学的な有意差は認められなかった。しかし、四肢骨格の成長のマーカーとして大腿骨長を測定すると、投与第4群（20 µg/kg、連日）は、断続的な投与レジメンと比較して BMN 111 の総投与量は少ないが、中軸方向の成長に対する四肢骨格の成長の比率を大幅に増加させた。

投与第3群では、1週間の休薬が成長に及ぼす影響を検討した。成長が活発な時期（3～10週齢、投与1～50日目に相当）のマウスに 80 µg/kg の BMN 111 を投与すると、溶媒を投与した動物と比較して成長速度が増加した。この投与群において投与間に1週間投与を休薬すると、成長は通常の数値に戻った。投与50日以降、成長速度は、おおむね、溶媒を投与した動物と BMN 111 を投与した動物の間で類似した（図 2.6.2.2.5-5）。

図 2.6.2.2.5-5 BMN 111 の連日投与期間の成長速度の増加（BMN111-09-074 試験）



WT, wild type; SD, standard deviation.

Treatment was administered during the periods delineated by the blue arrows. Each growth rate of tail length was calculated as the ratio of the measured values of Day 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64 and 71 to the measured values of Day 1, averaging 10 WT mice. Error bar shows SD.

Source: This figure was generated from the data of Table 33 in BMN111-09-074

剖検において、精巣、腎臓、肝臓、心臓、肺及び脳の肉眼的検査は正常であった。投与第2群及び投与第4群で肝臓及び心臓の重量のわずかな増加が認められた。投与第4群の腎臓でも重量の増加が認められた。関連する肉眼的変化は認められなかった。この器官重量の増加は、(体重によって決定される) 体のサイズの全体的な増加と関連している可能性がある。肺試料の組織学的解析により、溶媒対照群の動物を含む測定した全試料に血管周囲の炎症の発生が再び認められた。BMN 111 を投与した群の試料の20～40%に、コッサ染色により間質腔にごくわずかの石灰化（2～3細胞幅でx10視野当たり1～2箇所の発生）が認められた。これらの小さな病巣はH&E染色では検出されず、臨床的に重要ではないと判断された。

ALP 値は、投与 5 週目の最終投与後 1 日の採血において増加した。投与 10 週目の最終投与後 1 週間では、溶媒を投与した動物と比較して、ALP 値及び II 型コラーゲン分解産物の増加は検出されなかった。これは、投与 9 週目及び 10 週目の間の休薬のため、若しくは動物がもはや活発に成長しなくなったため（13 週齢）、又はその両方により、溶媒を投与した動物と BMN 111 を投与した動物で成長速度が類似したことを示唆する。投与第 2 群の動物 1 例を除いて抗 CNP 抗体は検出されなかった。この抗 CNP 抗体が検出された動物の成長は投与第 2 群のほかの動物と同程度で、一般状態の変化は認められなかった。

結論として、BMN 111 の連日投与は、ACH 患者で認められるのと類似した四肢短縮を改善するために有利な四肢の伸長の促進を伴う中軸骨格及び四肢骨格の成長をもたらした。成長が活発な時期に休薬すると、成長は通常速度に戻った。全般的に、3 週齢から成長が活発な時期の終わりまで 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拡大が認められ、BMN 111 の投与を受けた ACH 患者で最終身長伸長の達成される可能性があることを示唆した。

#### 2.6.2.2.5.2.2 Sprague Dawley (SD) ラットの BMN 111 の 36 日間皮下投与による骨の成長に関する効果

[BMN111-11-017]試験

8 カ月齢の雄性 Sprague Dawley (SD) ラットの中軸骨格及び四肢骨格の成長における骨の成長に関連した BMN 111 の効果を評価した。試験は、[REDACTED] ( [REDACTED]、[REDACTED]、USA) で実施し、20[REDACTED] 年 3 月 8 日に開始し、20[REDACTED] 年 10 月 18 日に終了した。20[REDACTED] 年 5 月 24 日に、報告書の軽微な修正を行った。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

8 カ月齢ラットでは、一次骨化中心の融合は完了していないが、長軸方向の成長はもはや発生していない ([Zoeti 2003])。

8 カ月齢の雄性 SD ラット (Hsd: SD; Harlan Laboratories) (n = 10/群、4 群) に、BMN 111 (80、240 及び 800 µg/kg) 及び溶媒を 36 日間連日皮下投与した。試験開始時に、体重測定、DXA による骨成分の測定、並びに頭胴長及び尾長の測定を行った。成長については、週 1 回の尾長の測定及び週 2 回の体重測定によって、生存投与期間中評価した。動物は、姿勢、後肢の動き、尾、足蹠、関節の腫脹及び全身の健康状態を毎週評価した。剖検では、最終 X 線解析、DXA による測定及び頭胴長測定を行った。大腿骨長をノギスで測定し、組織学的検査用に固定又は、瞬間凍結した。次に、800 µg/kg の BMN 111 及び溶媒を投与した動物の大腿骨のサブセット (n = 5/群) の組織学的検査を実施した。最終投与の 15 分後に血漿を採取し、曝露量を確認した。血清は試験終了時に採取し、保管した。試験デザインを表 2.6.2.2.5-12 に示す。

表 2.6.2.2.5-12 ラットの成長試験デザイン

| Group | Treatment            | Dose Level <sup>a</sup> | Route        | Frequency      | Number of Animals |
|-------|----------------------|-------------------------|--------------|----------------|-------------------|
| 1     | Vehicle <sup>b</sup> | 0                       | subcutaneous | Daily, 36 days | 10 males          |
| 2     | BMN 111              | 80 µg/kg                | subcutaneous | Daily, 36 days | 10 males          |
| 3     | BMN 111              | 240 µg/kg               | subcutaneous | Daily, 36 days | 10 males          |
| 4     | BMN 111              | 800 µg/kg               | subcutaneous | Daily, 36 days | 10 males          |

a) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg.

b) 0.005 mol/L citric acid buffer solution, pH 5.5, containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) Polysorbate 80.

BMN 111 の投与に関連した体重の変化は認められなかった。一般状態の変化に関しては、BMN 111 を投与した全ての群で軽度の曲尾が認められ、240 µg/kg の BMN 111 を投与した雄 2 例及び 800 µg/kg の BMN 111 を投与した雄 1 例で後肢の運動性の低下が認められた。これらの一般状態の変化の重症度は軽度であり、BMN 111 の投与 3 週目の初めに現れた。これらの変化は、正常動物での BMN 111 の投与による過成長（以下の段落を参照）に関連していると考えられ、BMN 111 を反復皮下投与した正常マウスにおいて前項 2.6.2.2.5.2.1 で認められた変化と一致している。足根関節の肥大はいずれの動物においても認められなかった。試験終了時に DXA で測定した骨面積、骨塩含有量及び BMD に有意差は認められなかった。

試験終了時に、尾長の伸長が BMN 111 を投与した全ての群で認められ、これは 80 及び 240 µg/kg の BMN 111 を投与した動物で有意であった。頭胴長は、240 及び 800 µg/kg の BMN 111 の投与量で伸長した。大腿骨長の統計学的に有意な伸長も、BMN 111 を投与した全ての群で認められた。8 ヶ月齢の動物では想定されていなかったが、げっ歯類の成長板の融合が不完全なため、この過成長が生じた可能性が最も高い。成長に関する試験結果を表 2.6.2.2.5-13 に示す。

表 2.6.2.2.5-13 最終成長測定及び溶媒を投与した動物に対する増加率

| Treatment | Naso-Anal length | Tail Length | Femur Length <sup>a</sup> |
|-----------|------------------|-------------|---------------------------|
| Vehicle   | 24.56 cm         | 20.63 cm    | 41.75 cm                  |
| 80 µg/kg  | 24.89 cm         | 20.83 cm    | 43.16 cm                  |
|           | -                | 1.0%        | 3.4%                      |
| 240 µg/kg | 25.31 cm         | 21.42 cm    | 44.59 cm                  |
|           | 3.1%             | 3.8%        | 6.8%                      |
| 800 µg/kg | 25.38 cm         | 20.97 cm    | 44.15 cm                  |
|           | 3.3%             | -           | 5.7%                      |

No significant difference.

a) Average of left and right.

組織学的変化は、長軸方向の成長に関与する領域（成長帯 [成長板]、骨梁 [一次海綿骨] 及び大腿骨の骨幹端）に限定され、増殖帯、並びに肥大及び石灰化帯の厚さが増加した。これらの変化は、軟骨細胞における BMN 111 の作用機序（軟骨細胞の増殖及び分化の促進）と一致している。骨幹端の直径は、骨芽細胞における BMN 111 の作用機序（骨芽細胞増殖の促進）に関連している可能性が高い骨膜及び一次海綿骨の骨梁の厚さに対応して増加した。

800 µg/kg を投与した動物では、分裂している軟骨細胞のクラスターの形成及び一次海綿骨の骨梁の血管新生の減少に関連するいくつかの組織学的変化が認められ、過度の薬理作用に起因すると考えられた。これらの変化は、長軸方向の成長を導く細胞及び分子応答の微調整変化と考えられ、正常動物での FGFR3 シグナル伝達の過度の下方制御又は本試験で用いられた投与量が高投与量であること、又はその両方に関連している可能性が高い。FGFR3 は細胞周期の重要な調節因子の一つであり、そのシグナル伝達の過度の制御は、細胞周期、細胞外マトリックスタンパク質の産生及び沈着及び血管浸潤を変化させることが知られている ([Schibler 2009]) ([Horton 2007])。

試験では、BMN 111 の血漿中濃度を測定し、曝露量を確認した。

以上をまとめると、8 ヶ月齢のラットに BMN 111 を 36 日間連日投与すると、中軸骨格と四肢骨格の成長が認められ、過成長に関連する一般状態の変化はごくわずかに認められた。組織学的変化は、成長板の融合が不完全な 8 ヶ月齢の正常ラットにおける、過度な薬理作用が原因と考えられた。

#### 2.6.2.2.5.2.3 カニクイザルの 6 ヶ月間皮下投与による薬物動態、薬理及び安全性試験予備検討

[BMN111-09-072]試験

カニクイザルの 181 日間連日皮下投与による BMN 111 の薬力学及び薬物動態 (PK) プロファイルを評価し、安全性について予備検討した。

試験は、[REDACTED] ([REDACTED]、[REDACTED]、Canada) で実施し、20[REDACTED] 年 11 月 13 日に開始し、20[REDACTED] 年 11 月 3 日に終了した。[表 2.6.3.2-1]に要約を示す。

雄性若齢ナイーブカニクイザル ([REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]、USA) (2~4 歳、2.2~2.9 kg) 12 匹を使用し、3 投与群に割り当てた。試験デザインを表 2.6.2.2.5-14 に示す。

**表 2.6.2.2.5-14 カニクイザルの 6 ヶ月間皮下投与による薬物動態、薬理及び安全性試験予備検討の試験デザイン**

| Treatment Group | Compound <sup>a</sup> | Dose Level <sup>b</sup> (µg/kg) | Dosing Frequency and Duration        | Animals Number and Gender |
|-----------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 1               | vehicle               | 0                               | Once daily for 6 months <sup>c</sup> | 4M                        |
| 2               | BMN 111               | 9                               | Once daily for 6 months <sup>c</sup> | 4M                        |
| 3               | BMN 111               | 33                              | Once daily for 6 months <sup>c</sup> | 4M                        |

a) BMN 111 lot CM092309; Vehicle lots 092209 and 022310; 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% (w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

b) Volume administered was 0.5 mL/kg.

c) The exact duration was 181 days.

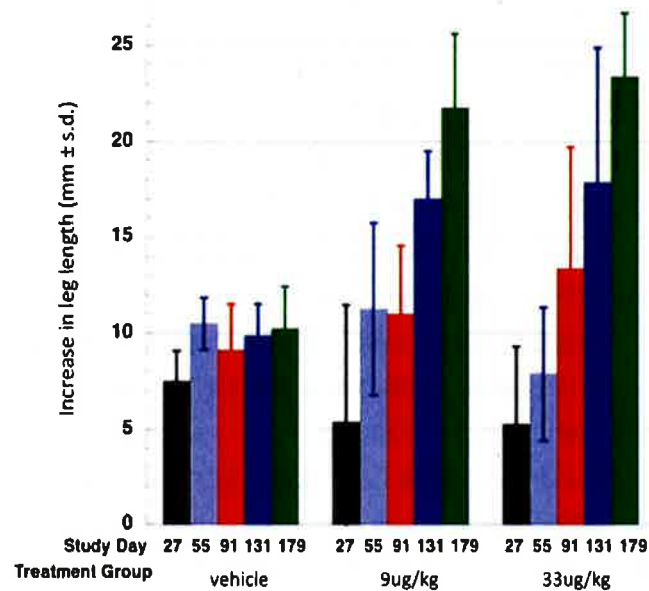
動物に、注射針付き注射器を使用して、溶媒及びBMN 111を1日1回、181日間背部に連日皮下投与した。投与部位は毎日順番に変えた（合計8投与部位）。

動物の一般状態の観察は、試験前少なくとも1週間及び投与期間中に、1日2回実施した。詳細な一般徴候所見については、少なくとも、試験前の週に1回、並びに投与期間中は毎週及び剖検の日に観察した。体重は少なくとも毎週及び剖検の日に測定した。各動物のおおよその体高（横臥）、前肢及び全肢長、並びに尾長を、麻酔下の動物について、試験前に1回、並びに投与期間の投与27、55、91、131及び179日目に測定した。成長板のサイズ及び脛骨長を評価するために、各動物の両脚のデジタルX線撮影を、試験前に1回、並びに投与4、8、13及び23週目に1回行った。さらに、磁気共鳴画像法（MRI）を用いて両脚を画像化し、右脛骨近位成長板の幅及び体積を測定した。投与23週目に胸部のX線撮影を行い、肺のカルシウム沈着を評価した。骨の成長速度の評価及び骨の組織学的形態計測パラメータの測定のために、動物の骨をカルセイン及びオキシテトラサイクリンで標識した。動物には、剖検の90日前及び14日前にカルセインを静脈内投与し、剖検の6日前にオキシテトラサイクリンを静脈内投与した。臨床病理学的検査試料は、試験前（投与-7日目及び-1日目）、投与7、21、35、49、63、77、91、105、133、及び161日目の投与前、並びに182日目の剖検前に絶食動物で採取した。絶食動物の尿を、試験前、並びに投与5、33、61、89、117、145及び173日目に1回採取した。トキシコキネティクス（TK）解析用の血漿試料を投与1日目及び181日目の投与前並びに投与後5、15、30、60、90及び150分に採取した。抗BMN 111抗体評価のための血清試料は、試験前、並びに投与35、77、133及び182日目に採取した。さらに、バイオマーカー分析のための血清及び血漿試料は、試験前（投与-7日目及び-1日目）、投与7、21、35、49、63、77、91、105、133及び161日目の投与前、並びに投与182日目の剖検前に採取した。予定された安楽死実施時に完全剖検を行い、組織を採取した。胸骨から骨髓塗抹標本を作製した。成長板を含む左大腿骨、肺、心臓、腎臓及び肝臓を病理組織学的に解析した。近位成長板を含む左脛骨を組織形態計測学的に解析した。第2～4腰椎（L2～L4）は、椎孔領域のCT解析のために採取した。ほかの組織は保管した。

全ての動物は、予定された安楽死実施時まで生存した。BMN 111の投与に関連した一般状態及び体重の変化は認められなかった。BMN 111及び溶媒を皮下投与した動物に、投与部位の暗赤色化及び皮下組織の肥厚化が認められた。これらは、実験手技（皮下投与）に続発する二次的变化と考えられた。しかし、これらの部位は顕微鏡的に評価されていないため、変化の性質及び重症度は判定されていない。

全ての動物は、若齢サルで予測されるとおりに、試験実施期間中に成長した。身長、上腕骨長、前肢全長、大腿骨長、後肢長（図 2.6.2.2.5-6）及び尾長の測定時点間の伸長の増大が、溶媒を投与した動物と比較して、BMN 111を投与した動物において高頻度で認められた。

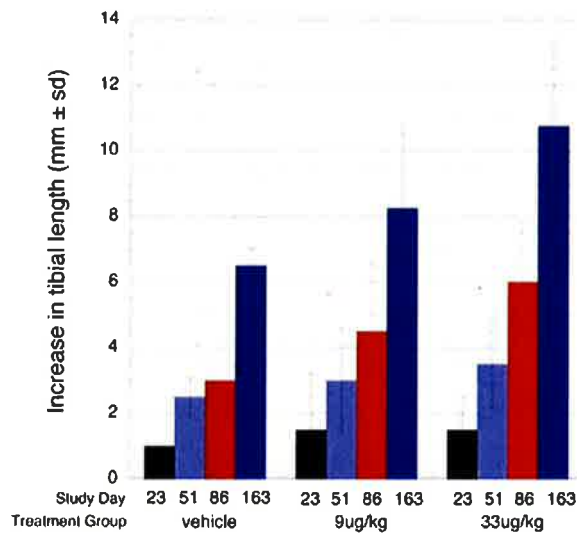
図 2.6.2.2.5-6 右後肢長の伸長（ノギスによる測定）



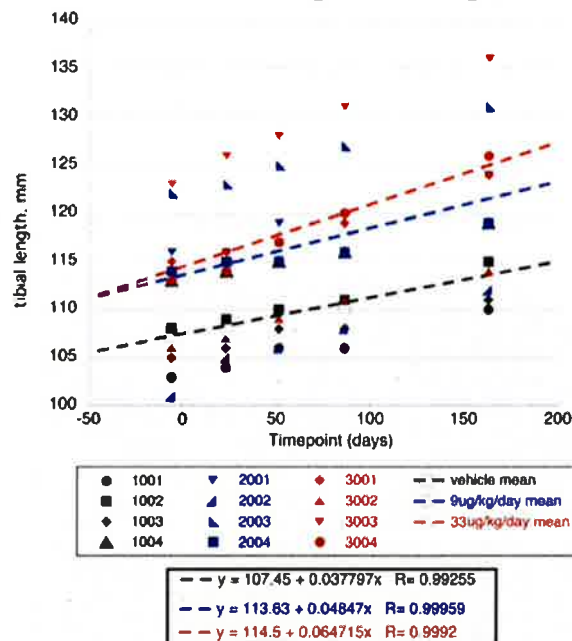
デジタル X 線撮影の評価において、溶媒を投与した動物と比較して、9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p = 0.068$ ) 及び 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p = 0.032$ ) の BMN 111 を投与した動物では、投与 163 日目に脛骨長の投与量に依存した進行性の伸長が認められた。BMN 111 を投与した動物では、脛骨長のデータを経時的にプロットし外挿した直線の傾きが増加したことから明らかなように、脛骨の成長速度は直線的に増加した（図 2.6.2.2.5-7）。投与 6 カ月後、脛骨長の伸長は、33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の BMN 111 を投与した動物では約 14 mm で、同じ期間溶媒を投与した動物では約 8 mm であった。

図 2.6.2.2.5-7 脛骨の伸長の評価 (デジタル X 線撮影)

## Increase in right tibia length from pre-study length



## Increase in rate of growth of right tibia



デジタル X 線撮影では、脛骨成長板の幅は、投与 4 週目 ( $p < 0.05$ ) 及び 8 週目 ( $p < 0.01$ ) に溶媒を投与した動物と比較して、33  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した動物で有意に増加した。脛骨成長板の幅の同様の増加は、MRI 解析でも認められた。さらに、MRI では、投与 4 週目に 33  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した動物で右脛骨成長板の体積の有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。X 線及び MRI 解析では、投与 4 週間及び 8 週間後に成長板の幅及び体積の増加が認められたが、投与 23 週間後にはベースラインに戻った。しかし、組織学的評価では、成長



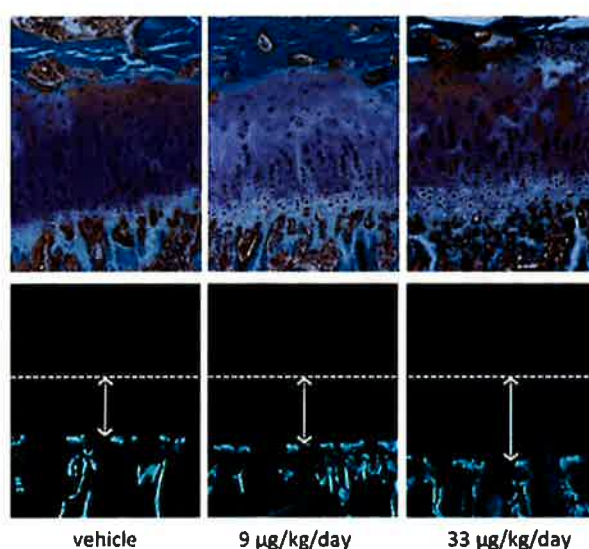
板、増殖帯及び肥大帯の総厚が試験終了時まで維持されたことが示された。成長速度の増加（脛骨長で評価）も、試験終了時まで持続した。

投与 23 週目の肺のカルシウム沈着の X 線評価において、BMN 111 の投与に関連した変化は認められなかった。

溶媒を投与した動物と比較して、BMN 111 を投与した両群に ALP 値の上昇が認められたが、BMN 111 の投与に関連したそれ以外の臨床病理学的検査パラメータの変化は認められなかった。ALP 値の上昇は投与 21 日目に始まり、残りの試験期間中持続した。ALP 値は、骨芽細胞及び軟骨細胞の活性の増加（すなわち、新たな骨の形成）と共に上昇することが知られている。

組織学的検査では、左大腿骨の遠位成長板のごくわずかに軽度の拡大が、9 µg/kg の BMN 111 を投与した動物 2 例及び 33 µg/kg の BMN 111 を投与した動物全てに認められた。これは、肥大帯の軟骨細胞の数及びサイズの増加によるものであり、BMN 111 の作用機序から予測されるものである。成長板の形態変化は、左脛骨近位成長板の組織形態計測学的評価によって確認されたが、左脛骨では骨代謝回転パラメータの変化は認められなかった。成長板の厚さ及び長軸方向の成長速度は、対照として溶媒を投与した動物と比較して、33 µg/kg の BMN 111 を投与した動物 ( $p < 0.05$ ) で増加した (図 2.6.2.2.5-8)。増殖帯の厚さの増加を伴う、BMN 111 の投与量に依存した肥大帯の厚さ及び肥大細胞の体積の増加傾向が認められた。骨量及び骨梁構造パラメータの差は明らかではなかった。骨形成の速度も変化は認められなかった。骨芽細胞及び破骨細胞数に影響が認められなかったことと共に、この結果は、BMN 111 の投与が正常動物の骨形成又は吸収に影響を与えなかったことを示している。H&E 及びコッサ染色により、肺にカルシウム沈着は認められなかった。

図 2.6.2.2.5-8 左脛骨近位成長板の組織形態計測学的評価



Upper panel: Goldner trichrome stain (cartilage, purple; mineralized bone, green; osteoid [unmineralized matrix], orange/red).

Lower panel: Calcein labeling of mineralizing surfaces (green). Dashed line delineates distal edge of growth plate. Arrows represent new bone growth 14 days prior to termination.



溶媒対照と比較して、33 µg/kg の BMN 111 を投与した動物では、L2 椎孔大後頭孔の平均面積が有意に大きく ( $p=0.03$ )、L3 及び L4 椎孔の平均面積は大きい傾向を示した。

TK 試料の長期保存条件が不完全であったため、投与 1 日目の曝露量は定量限界未満 (BLOQ) であった。曝露は投与 181 日目に確認された。試験中に総抗 BMN 111 抗体は検出されなかった。溶媒を投与したサルと比較して、33 µg/kg の BMN 111 を投与したサルにおいて、II 型コラーゲン分解産物がわずかに増加した。骨型 ALP 値は、9 及び 33 µg/kg の BMN 111 を投与したサルで増加した。cGMP は、BMN 111 の投与 1 日目の投与後 60 分に最大濃度 800 pmol/mL 超、BMN 111 の投与 181 日目の投与後 15 分に最大濃度 400 pmol/mL を示した。

結論として、若齢雄性カニクイザルにおいて、9 及び 33 µg/kg の投与量にて BMN 111 を 181 日間連続皮下投与した場合の忍容性は良好であった。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。BMN 111 の投与に関連した影響として、投与量に依存した骨の成長及び骨の成長の速度のわずかな増加、並びに成長板のサイズ（幅と体積）及び活性の増加（肥大帯の軟骨細胞の数及びサイズの増加）が認められた。また、第 2～4 腰椎（L2～L4）孔の面積、並びに血清総 ALP 値及び骨型 ALP 値の増加傾向が認められた。全ての影響は予測されたもので、BMN 111 の作用機序に起因していた。骨量や骨組成への影響は認められなかった。総抗 BMN 111 抗体は検出されなかった。

### 2.6.2.3 副次的薬理試験

#### 2.6.2.3.1 SpectrumScreen®による BMN 111 のオフターゲット活性

[BMN111-11-026]試験

*In vitro* 受容体結合アッセイパネルを用いて BMN 111 のオフターゲット作用を評価した。試験は、XXXXXXXXXX、XXXX（XXXX、台湾）で実施し、20XXXX年 6 月 29 日に開始し、20XXXX年 9 月 22 日に終了した。[表 2.6.3.3-1]及び[表 2.6.3.3-2]に要約を示す。

BMN 111 (11.44 µmol/L、5 mmol/L クエン酸緩衝液、pH 5.5) を、NPR-A（カタログ番号 211000、心房性ナトリウム利尿因子 [ANF] アッセイ）を含む 165 種類の受容体又はイオンチャネルシステムを用いた細胞ベースアッセイを行った。有意な確定阻害（50%以上と定義）を示した受容体又はイオンチャネルについて、次に、0.01144、0.1144、1.144 及び 11.44 µmol/L の BMN 111 とインキュベートして IC<sub>50</sub> 値を算出した。8 種類の受容体又はイオンチャネル（NPR-A を含む）は、2.1～11.4 µmol/L（8～46 µg/mL）の IC<sub>50</sub> 値で BMN 111 をリガンドとすることが確認された（表 2.6.2.3.1-1）。が、特定された各受容体の IC<sub>50</sub> は、第 III 相臨床試験（[111-301]試験）で測定された BMN 111 の第 52 週の最高濃度（C<sub>max</sub>）平均値の 0.0014 µmol/L（5.8 ng/mL）に対して 1500 倍以上の差があるため、臨床推奨用量投与時にはこれらの受容体又はイオンチャネルに対してオフターゲットの薬理活性はないと考えられた。この試験結果は、また、2.6.2.2.3.3 項（BMN111-11-028 試験）で示された BMN 111 の NPR-A に対する結合親和性が低いことを支持している。

表 2.6.2.3.1-1 有意な反応を示した受容体又はイオンチャネル

| Receptor/Channel                      | Species    | Inhibition (%) <sup>a</sup> | IC <sub>50</sub> (μmol/L) |
|---------------------------------------|------------|-----------------------------|---------------------------|
| APJ (apelin receptor)                 | Human      | 78                          | 3.15                      |
| Potassium Channel (SK <sub>CA</sub> ) | Rat        | 85                          | 2.1                       |
| Somatostatin sst3                     | Human      | 53                          | 10.2                      |
| NPR-A <sup>b</sup>                    | Guinea Pig | 70                          | 4.39                      |
| Neuromedin U NMU <sub>2</sub>         | Human      | 60                          | 6.56                      |
| Progesterone PR-B                     | Human      | 50                          | 11.4                      |
| NPBW2/GPR8                            | Human      | 54                          | 9.84                      |
| Calcium Channel N-Type                | Rat        | 60                          | 7.53                      |

IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; NPR, natriuretic peptide receptor.

a) Values for 11.44 μmol/L BMN 111 reported from IC<sub>50</sub> experiment.

b) NPR-A is the receptor for the Atrial Natriuretic Factor (old nomenclature, also known as ANP). Inhibition in this assay format means downstream inhibition of aldosterone production by guinea pig adrenal gland glomerulosa cells due to interaction of BMN 111 with NPR-A for which BMN 111 has poor affinity compared to ANP.

#### 2.6.2.4 安全性薬理試験

ラットを用いた GLP に準拠した 2 試験で、BMN 111 の単回皮下投与による中枢神経系及び呼吸系機能に対する影響について評価した。2.6.2.2 項に記載したように、CNP は血管系及び平滑筋に影響を及ぼす。したがって、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すると予想された。したがって、BMN 111 の心血管系機能に対する影響については、4 試験の *in vivo* 試験で広範に評価した。測定パラメータは、覚醒下及び麻酔下の動物を用いて、心拍数、血圧、心電図波形及び一般状態の変化などを検討した。

##### 2.6.2.4.1 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する BMN 111 の作用

[BMN111-11-023]試験

GLP 試験で、ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子 (hERG) チャネル電流 (IKr [急速活性化型遅延整流心筋カリウム電流] の代用) に対する BMN 111 の *in vitro* 作用を生理的温度付近で検討した。試験は、[REDACTED] ([REDACTED]、[REDACTED]、USA) で、米国の GLP 規制に準拠して実施し、20[REDACTED] 年 8 月 8 日に開始し、20[REDACTED] 年 10 月 12 日に終了した。[表 2.6.3.4-1]に要約を示す。

hERG チャネルを発現する HEK293 細胞を、溶媒対照 (HEPES 緩衝生理食塩水 [HB-PS])、並びに 50、300、2500 及び 5000 μg/mL の BMN 111 と、33~35°C でインキュベートした (n=3)。テルフェナジンを陽性対照として使用した。hERG チャネルの阻害は、自動パッチクランプアッセイシステムを使用して測定した。300、2500 及び 5000 μg/mL の濃度でギガオームシールの反復破壊が認められ、hERG 電流の正確な測定が妨げられた。これらの濃度では、この技術的な問題のために使用可能な試験結果は得られなかった。

BMN 111 は、50 μg/mL で hERG 電流を 1.8±1.2% (平均±標準誤差) 抑制したが、溶媒対照は

1.4±0.7%抑制した。50 µg/mLでのhERG抑制は、溶媒対照値と比較して、統計学的に有意 ( $P < 0.05$ ) ではなかった。hERG カリウム電流に対する BMN 111 の抑制作用の  $IC_{50}$  は計算できなかったが、50 µg/mL 超と推定された。

5 µg/kg の BMN 111 を皮下投与したサル の  $C_{max}$  の推定値に基づき 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影響はないと考えられた。

#### 2.6.2.4.2 麻酔下の雄性 FVB マウスの BMN 111-B2、BMN 111-C、BMN 111-B3

##### (BMN 111)、BMN111-C2 及び CNP-A (E/D)の皮下投与による心血管系に対する影響の検討

[BMN111-09-060]試験

非 GLP 試験で、麻酔下のマウスに種々の CNP アナログ (BMN 111-B2、BMN 111-C、BMN 111-B3 [BMN 111]、BMN111-C2 及び CNP-A [E/D]) の皮下投与を行い、心血管系に影響を及ぼす投与量を決定し、毒性について予備検討した。本項では、BMN 111 (BMN111-09-060 試験報告書では BMN 111-B3 と記載されている) に関する試験結果のみを示している。試験は、XXXXXXXXXX ( XXXXXX、XXXXXX、Canada) で実施し、20XXXX 年 5 月 15 日に開始し、20XXXX 年 10 月 27 日に終了した。[表 2.6.3.4-1]に要約を示す。

雄性 FVB マウス ( XXXXXX、XXXXXX、XXXXXX、Canada) (約 6~7 週齢、21~29 g) を 5 群に割り当てた。試験デザインを表 2.6.2.4.2-1 に示す。

表 2.6.2.4.2-1 心血管系に対する影響に関する投与量設定試験の試験デザイン

| Group                    | Compound             | Dose <sup>a</sup><br>(µg/kg) | Dosing<br>Frequency | Animal No. and Gender per<br>Group |
|--------------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 1 (Control) <sup>b</sup> | vehicle <sup>c</sup> | 0 <sup>e</sup>               | Once                | 3M                                 |
| 2 (Low)                  | BMN 111 <sup>d</sup> | 80 <sup>e</sup>              | Once                | 3M                                 |
| 3 (Mid)                  |                      | 280 <sup>e</sup>             | Once                | 3M                                 |
| 4 (High)                 |                      | 800 <sup>e</sup>             | Once                | 3M                                 |
| 5 (Very high)            |                      | 8000 <sup>f</sup>            | Once                | 3M                                 |

M, male; No., number.

a) Equivalent to 0, 20, 70, 200, and 2000 nmol/kg, respectively.

b) Group 1 animals received the control/vehicle article alone.

c) Vehicle lot 050509V; 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1%(w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

d) BMN 111-B3 lot B3090616.

e) Volume administered was 3.33 mL/kg.

f) Volume administered was 6.1 mL/kg.

投与前に、マウスをイソフルランで麻酔し、圧力変換器付カテーテルを大動脈に外科的に移植して、血圧及び心拍数に対する BMN 111 の影響を評価した。カテーテルは遠隔測定送信機に接続した。BMN 111 及び溶媒をマウスの腰部に皮下投与した。麻酔下のマウスを水循環加熱パッドに置いた。心血管系評価は、ベースライン値を確立するために投与の少なくとも 15 分前に麻

酔下の動物で開始し、投与後約 90 分間継続した。呼吸数及び体温は、麻酔下で約 5 分ごとに測定した。

最終データ収集後、全ての生存動物を安楽死させた。外観の肉眼的検査、詳細な内部検査、最終採血、大腿骨、膝関節軟骨を含む脛骨、尾及び耳介の収集に限定した剖検を実施した。血漿及び組織は保管した。

動物の一部は、麻酔が原因である可能性が最も高いが、試験実施中に死亡し、補充した。

BMN 111 の投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。BMN 111 の皮下投与は、投与量に依存した平均動脈圧の低下をもたらし、最下点におけるベースライン値からの変化は、80、280、800 及び 8000 µg/kg の投与量でそれぞれ-11%、-13%、-16%及び-29%であった。

平均動脈圧の低下は、投与直後に認められ、約 30 分間続いた。心拍数の代償性変化の程度は、おおむね麻酔の存在により制限され、心拍数が 15%増加した 800 µg/kg の投与量を除いて、80 µg/kg の+3%から 8000 µg/kg の+10%の範囲であった。

BMN 111 の投与に関連した呼吸数及び体温の変化は認められなかった。剖検では、BMN 111 の投与に関連した肉眼的変化は認められなかった。

結論として、麻酔下のマウスに 80 µg/kg の投与量（マウス薬効薬理試験 [2.6.2.2.5.2 項] で検討した投与量）で BMN 111 を投与すると、動脈圧が約 10%低下し、心拍数が 10%未満増加した。この試験結果は、血圧低下に基づき血行動態に関して許容できる投与量であれば、BMN 111 投与によりマウスが成長可能であることを示唆している。

#### 2.6.2.4.3 ラットの BMN 111 の単回皮下投与による中枢神経系に対する安全性薬理評価

[BMN111-11-021]試験

GLP 試験で、雌雄ラットに BMN 111 の単回皮下投与を行い、神経学的影響を検討し、TK を測定した。神経学的影響は、Irwin 変法で評価した。

試験は、米国、日本及び OECD の GLP 規制に準拠して、[REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]、USA) で実施し、20[REDACTED] 年 4 月 11 日に開始し、20[REDACTED] 年 10 月 7 日に終了した。[表 2.6.3.4-1] に要約を示す。試験デザインを表 2.6.2.4.3-1 に示す。

表 2.6.2.4.3-1 ラットの中樞神経系に対する安全性薬理試験の試験デザイン

|                    | Group       | Compound <sup>a,b</sup> | Dose (µg/kg) <sup>c,d</sup> | Dosing Frequency | Animal No. and Gender per Group |
|--------------------|-------------|-------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------------|
| Main study animals | 1 (Control) | vehicle                 | 0                           | Once             | 6M + 6F                         |
|                    | 2 (Low)     | BMN 111                 | 30                          | Once             | 6M + 6F                         |
|                    | 3 (Mid)     | BMN 111                 | 100                         | Once             | 6M + 6F                         |
|                    | 4 (High)    | BMN 111                 | 300                         | Once             | 6M + 6F                         |
| TK animals         | 5 (Control) | vehicle                 | 0                           | Once             | 3M + 3F                         |
|                    | 6 (Low)     | BMN 111                 | 30                          | Once             | 6M + 6F                         |
|                    | 7 (Mid)     | BMN 111                 | 100                         | Once             | 6M + 6F                         |
|                    | 8 (High)    | BMN 111                 | 300                         | Once             | 6M + 6F                         |

F, female; M, male; No., number; TK, toxicokinetic.

a) BMN 111 from Lot No. Tox 2 (CM112410) was used in this study.

b) Animals in Groups 1 and 5 received vehicle control article only (0.005 mol/L citrate buffer [pH 5.5] solution containing 5.25% [w/v] sucrose, 1.5% [w/v] mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% [w/v] polysorbate 80 in Sterile Water for Injection, USP).

c) Animals were dosed at a volume of 1.0 mL/kg.

d) The dose levels (µg/kg) and dose concentrations (0, 30, 100, and 300 µg/mL for Groups 1 through 4 and Groups 5 through 8, respectively) were expressed as the peptide concentration. Dose concentrations were prepared based on the lot specific peptide content of the BMN 111 stock formulation (1.86 mg/mL).

雌雄 SD ラット (■■■■■、■■■■■、■■■■■、■■■■■、USA) (約 8~10 週齢、267~304 g [雄] 及び 177~216 g [雌]) を 8 群に割り当て、溶媒、並びに 30、100 及び 300 µg/kg の BMN 111 を背部に単回皮下投与した。

投与前、並びに投与 1 日目の投与後約 5 及び 20 分、並びに 1、2 及び 6 時間に、主試験群 (第 1~4 群) の各動物の Irwin 変法による神経学的評価を実施した。呼吸数及び活動性のホームケージ評価、皮膚色、皮膚の血流、体調、被毛状態、立毛、過剰流涙、過剰流涎、ハンドリングに対する反応性及び啼鳴のハンドリング観察、糞便量、尿量、自発運動、姿勢、歩行異常、そのほかの異常な行動、糞便の状態及び挙尾のオープンフィールド観察、並びにアプローチ検査、触診、聴覚性驚愕反応、視覚感覚、耳介応答、角膜応答、瞳孔の状態、瞳孔応答、カタレプシー、正向反射、瀕死状態及び死亡などの機能検査を評価した。握力、侵害受容性及び体温も評価した。

血液は、溶媒を対照として投与した動物 (第 5 群) 及び BMN 111 を投与した動物 (第 6~8 群) に対して投与前、並びに投与後約 1、5、15、30、60 及び 120 分に TK 用動物から、採取した。

全投与群で最終採取後、動物はそれ以上の検査なしに安楽死させた。

全ての動物は、予定された安楽死まで生存し、BMN 111 の投与に関連する一般状態の変化は認められなかった。300 µg/kg の BMN 111 を投与した雌性ラットで体温の低下が認められた。この変化は、BMN 111 の投与に関連している可能性があるが、中枢神経系の評価において 300 µg/kg の BMN 111 を投与した雄、並びに単回投与毒性試験及び TK 試験において 800 µg/kg の BMN 111 を投与した雌雄ラット ([BMN111-11-015]試験) では認められなかったため、この変化は偶発的なものである可能性が高いと考えられた。原因にかかわらず、この所見は生理学的懸

念とは考えられなかった。そのほかの異常な変化は認められなかった。また、BMN 111 を投与したラットの Irwin 変法によるいずれの評価においても、投与群間及び雌雄間で統計学的に有意な変化は認められなかった。

TK パラメータは、30、100 及び 300 µg/kg の投与量で BMN 111 を単回皮下投与したラットで測定され、[2.6.4.3.1.3]項に記載した。

溶媒を投与した動物と比較して、最大 300 µg/kg の BMN 111 を単回皮下投与した雌雄ラットの中樞神経系機能に変化は認められなかった。300 µg/kg の投与において、雌雄の 0 時間から最終測定時点までの濃度－時間曲線下面積 (AUC<sub>0-t</sub>) は 1,471,240 min pg/mL、C<sub>max</sub> は 49,742 pg/mL 及び見かけの t<sub>1/2</sub> は 14.76 min を示し、BMN 111 の無影響量は 300 µg/kg と判断された。

#### 2.6.2.4.4 雄性ラットの BMN 111 の単回皮下投与によるヘッドアウトプレチスモグラフィーを用いた呼吸系に対する安全性薬理評価

[BMN111-11-022]試験

GLP 試験で、雄性ラットに BMN 111 の単回皮下投与を行い、1 回換気量、呼吸数及び分時換気量を測定して呼吸機能に対する影響を評価した。呼吸系への影響は、ヘッドアウトプレチスモグラフィーを用いて検討した。

試験は、米国、日本及び OECD の GLP 規制に準拠して、[REDACTED] ( [REDACTED]、 [REDACTED]、USA) で実施し、20 [REDACTED] 年 4 月 11 日に開始し、20 [REDACTED] 年 10 月 7 日に終了した。[表 2.6.3.4-1] に要約を示す。試験デザインを表 2.6.2.4.4-1 に示す。

表 2.6.2.4.4-1 ラットの呼吸系に対する安全性薬理試験の試験デザイン

| Group       | Compound <sup>a,b</sup> | Dose (µg/kg) <sup>c,d</sup> | Dosing Frequency | Animal No. and Gender per Group |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------------------|
| 1 (Control) | vehicle                 | 0                           | Once             | 8M                              |
| 2 (Low)     | BMN 111                 | 30                          | Once             | 8M                              |
| 3 (Mid)     |                         | 100                         | Once             | 8M                              |
| 4 (High)    |                         | 300                         | Once             | 8M                              |

M, male; No., number.

a) BMN 111 from Lot No. Tox 2 (CM112410) was used in this study.

b) Animals in Group 1 received vehicle control article only [0.005 mol/L citrate buffer (pH 5.5) solution containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 in Sterile Water for Injection, USP].

c) Animals were dosed at a volume of 1.0 mL/kg.

d) The dose levels (µg/kg) and dose concentrations (0, 30, 100, and 300 µg/mL for Groups 1 through 4, respectively) were expressed as the peptide concentration. Dose concentrations were prepared based on the lot specific peptide content of the BMN 111 stock formulation (1.86 mg/mL).

雄性 SD ラット ( [REDACTED]、 [REDACTED]、 [REDACTED]、USA) (約 12～13 週齢で、322～349 g) を 4 群に割り当て、溶媒、並びに 30、100 及び 300 µg/kg の BMN 111 を背側胸部に単回皮下投与した。

動物は、死亡、異常、並びに疼痛及び苦痛の徴候について 1 日 2 回評価した。動物は、試験前

及び投与日の投与前に1回、体重を測定した。

試験では、投与2日前にヘッドアウトプレチスモグラフィーを用いてベースライン値を約2.5時間連続計測した。投与日に、ラットは、溶媒、並びに30、100及び300 µg/kgのBMN 111を皮下投与後プレチスモグラフィーチャンバーに入れた。投与後15分から6時間以上まで、一回換気量、呼吸数（呼吸/分）及び分時換気量を測定し解析した。

最終測定データ採取後、動物をチャンバーから取り出し、それ以上の検査なしに安楽死させた。

BMN 111の曝露量は、同一の投与経路及び投与量でBMN 111を使用したラット単回投与中枢神経系及びTK試験（[BMN111-11-021]試験、2.6.2.4.3項参照）で確認した。

0、30、100及び300 µg/kgのBMN 111を投与した雄性ラットでは、死亡率、一般状態の変化及び呼吸パラメータ測定値にBMN 111の投与に関連した変化は認められなかった。

溶媒を投与した動物と比較して、30、100及び300 µg/kgのBMN 111の単回皮下投与では、呼吸機能に変化は認められなかった。この試験のBMN 111の無影響量は300 µg/kgと判断された。

#### 2.6.2.4.5 テレメータを装着したサルのBMN 111-B3 (BMN 111) の皮下投与における漸増法による投与量設定試験及び7日間反復投与の血行動態、毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験 (フェーズI及びフェーズII)

[BMN111-09-067]試験

非GLP試験で、心血管系機能に関してサルのBMN 111 (BMN111-09-067試験報告書ではBMN 111-B3と記載されている)の単回皮下投与最大耐量 (MTD) を決定し (フェーズI)、サルにMTD及びMTDの2.5倍の投与量のBMN 111の7日間連日投与を行い、心血管系機能に関する影響を評価した (フェーズII)。本項では、心血管系評価に関連する試験結果を要約した。MTDは試験実施前に、平均動脈圧を最大10%低下させる、又は、心拍数を最大25%増加させる投与量と定義した。心血管系への影響 (血圧及び心拍数) は、カニクイザルの大動脈に外科的に圧力変換器付カテーテルを留置して評価した。

試験は、[REDACTED] ([REDACTED]、[REDACTED]、Canada) で実施し、20[REDACTED]年10月9日に開始し、20[REDACTED]年11月4日に終了した。[表2.6.3.4-1]に要約を示す。本試験の心血管系評価には、予備的な7日間の毒性試験が含まれており、この毒性評価の要約は[2.6.6.6.3.5]項に記載した。

雌雄ナイーブカニクイザル ([REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]、USA) (2~3歳、2.2~2.7 kg) (雌雄各n=4) を使用した。

試験のフェーズIでは、投与1、3、4及び7日目の投与前に麻酔した動物に、0 (溶媒)、並びに1.4、7、14、28及び70 µg/kgの投与量でBMN 111を皮下投与し、投与9日目の覚醒下の動物に0 (溶媒) を皮下投与、並びに投与10日目の覚醒下の動物に、28、49、70及び140 µg/kgの投与

量で BMN 111 を皮下投与した。全般的に、BMN 111 の投与間に 3 日間のウォッシュアウト期間を設けた。フェーズ I の試験デザインを表 2.6.2.4.5-1 に示す。

**表 2.6.2.4.5-1 テレメータを装着したサルの BMN 111 の皮下投与によるおける漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与の血行動態、毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験のフェーズ I の試験デザイン**

| Animal ID         | Dose level (µg/kg) <sup>a,b</sup> |       |                 |                 |       |       |                 |       |                |                  |
|-------------------|-----------------------------------|-------|-----------------|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|----------------|------------------|
|                   | Day 1                             | Day 2 | Day 3           | Day 4           | Day 5 | Day 6 | Day 7           | Day 8 | Day 9          | Day 10           |
| 1001              | 0 <sup>c</sup>                    | ND    | ND              | 70 <sup>c</sup> | ND    | ND    | 7 <sup>c</sup>  | ND    | 0 <sup>d</sup> | 70 <sup>d</sup>  |
| 1002              | 1.4 <sup>c</sup>                  | ND    | ND              | 28 <sup>c</sup> | ND    | ND    | 14 <sup>c</sup> | ND    | 0 <sup>d</sup> | 140 <sup>d</sup> |
| 1501              | 0 <sup>c</sup>                    | ND    | ND              | 7 <sup>c</sup>  | ND    | ND    | 70 <sup>c</sup> | ND    | 0 <sup>d</sup> | 70 <sup>d</sup>  |
| 1502              | 1.4 <sup>c</sup>                  | ND    | ND              | 28 <sup>c</sup> | ND    | ND    | ND              | ND    | ND             | ND               |
| 1003              | ND                                | ND    | 14 <sup>c</sup> | 28 <sup>c</sup> | ND    | ND    | ND              | ND    | ND             | 49 <sup>d</sup>  |
| 1503              | ND                                | ND    | ND              | ND              | ND    | ND    | 14 <sup>c</sup> | ND    | ND             | ND               |
| 1503 <sup>e</sup> | ND                                | ND    | ND              | ND              | ND    | ND    | ND              | ND    | 0 <sup>d</sup> | 28 <sup>d</sup>  |

ID, identification; ND, not dosed.

a) Based on analysis of the BMN 111 lot used in this study, actual dose concentrations and dose levels were approximately 35% of the nominal values. Concentrations reported in this table are actual concentrations.

b) BMN 111 lot CM092309, Vehicle lot 092209; 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% (w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

c) Animal was anesthetized.

d) Animal was conscious.

e) Animal 1503 replaced Animal 1502 on Day 7.

フェーズ I 試験の完了後 7 日間の休薬期間を設け、フェーズ I から無作為に選択した 4 匹のサル（雄 2 匹及び雌 2 匹）及びナイーブサル 2 匹（雄 1 匹及び雌 1 匹）をフェーズ II 試験に登録した（表 2.6.2.4.5-2）。フェーズ I で使用したサルは BMN 111 を投与する群（28 及び 70 µg/kg）に割り当て、ナイーブサルは溶媒を投与する群に割り当てた。全ての動物に、0（溶媒）、並びに 28 及び 70 µg/kg の BMN 111 を 1 日 1 回 7 日間連日遠隔皮下投与し、その後 2 日間の休薬期間を設けた。BMN 111 の投与量は、MTD（28 µg/kg）及び MTD の 2.5 倍量を設定した。フェーズ II 試験実施中、動物は覚醒下であった。

**表 2.6.2.4.5-2 テレメータを装着したサルの BMN 111 の皮下投与による漸増法による投与量設定試験及び 7 日間反復投与の血行動態、毒性及びトキシコキネティクス (TK) 試験のフェーズ II の試験デザイン**

| Group | Treatment | Dose <sup>a,b</sup><br>(µg/kg) | Dosing Frequency and<br>Treatment Duration | Recovery<br>Period<br>Duration | Animal No.<br>and Gender<br>per Group <sup>c</sup> |
|-------|-----------|--------------------------------|--|--------------------------------|--|
| 1     | vehicle   | 0                              | Once daily for 7 days                      | 2 days                         | 1M + 1F  |
| 2     | BMN 111   | 28                             | Once daily for 7 days                      | 2 days                         | 1M + 1F  |
| 3     | BMN 111   | 70                             | Once daily for 7 days                      | 2 days                         | 1M + 1F  |

F, female; M, male; No., number.

a) BMN 111 lot CM092309, Vehicle lot 092209; 0.03 mol/L acetic acid buffer solution, pH 4.0, containing 1% (w/v) benzyl alcohol and 10% (w/v) sucrose.

b) Based on analysis of the BMN 111 lot used in this study, actual dose concentrations and dose levels were approximately 35% of the nominal values. Concentrations reported in this table are actual concentrations.

c) Animals were conscious.



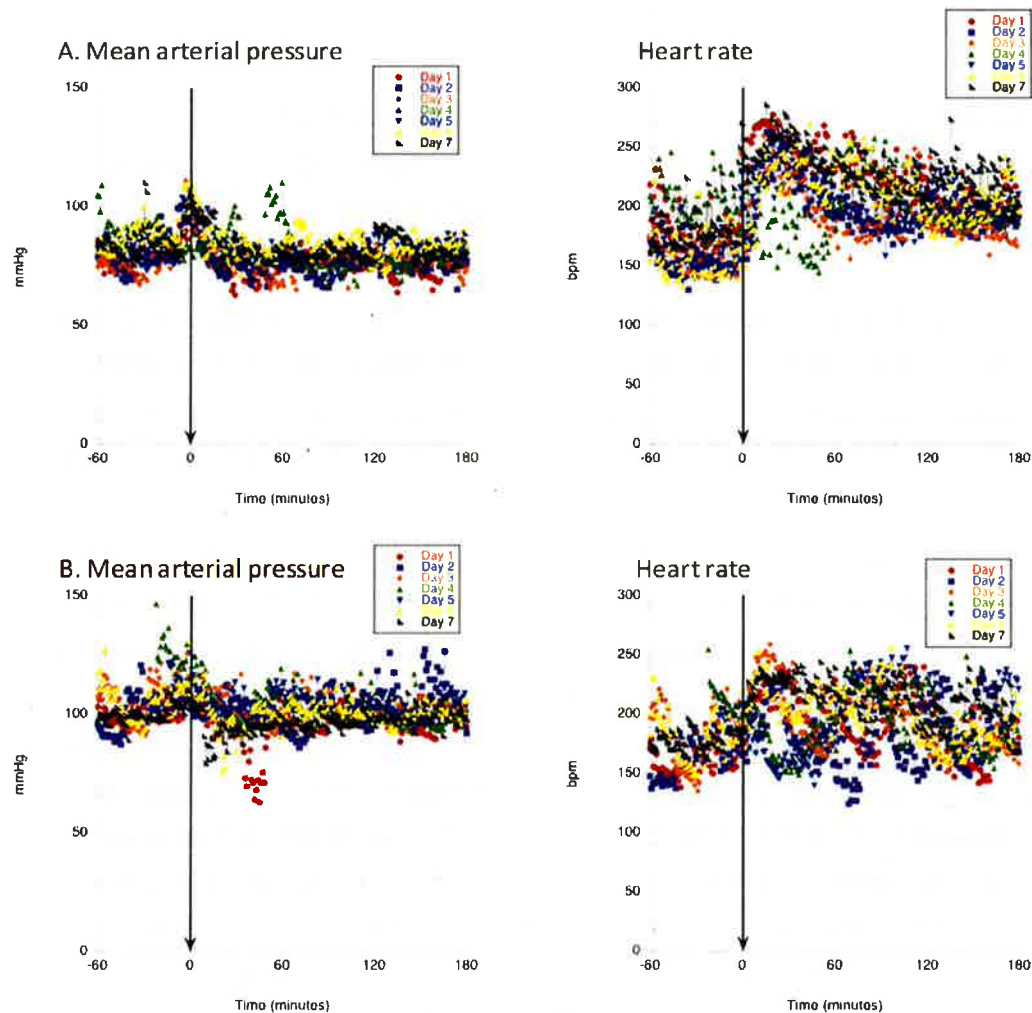
両フェーズでは動物はテレメータを装着し、大腿動脈に留置カテーテル及び血管内（大静脈）リードを取り外せないように埋め込んだ。チューブは腰背部に巡回させ、上頸で外部に表出させた。動物に、取り外せないように外科的に皮下に埋め込んだカテーテルを使用して遠隔投与した。

一般状態の観察は1日2回行った。フェーズIでは、動物は、投与後少なくとも30分間、その後2時間は少なくとも1時間ごとに、有害な作用について継続的に観察した。摂餌量は毎日測定した。体重は、試験前に少なくとも1回及びフェーズIでは各投与の前日、並びにフェーズIIでは投与1、7、9日目及び剖検の前に測定した。

フェーズIでは、動脈血圧（収縮期、拡張期及び平均血圧）、並びに心拍数は、各投与の少なくとも15分前から測定を開始し、投与後少なくとも30分間継続して測定した。心電図は、各投与の15分前から投与後ベースラインに戻るまで最大180分まで評価した。フェーズIIでは、血圧（収縮期、拡張期及び平均血圧）、心拍数、並びに心電図を、投与の24時間前から試験終了まで継続して測定した。

フェーズIでは、麻酔下のサル及び覚醒下のサルの両方で、投与量に依存した平均動脈圧の低下が認められた。覚醒下の動物では、心拍数が同時に増加した。この反応は、麻酔下の動物では鈍化した。麻酔下の動物では、1.4 µg/kgの投与量で平均動脈圧及び心拍数にBMN 111の投与に関連した変化は認められなかった。麻酔下の動物では、28 µg/kgのBMN 111の皮下投与により、血圧はほとんど変化が認められなかったが、心拍数は約25%増加した。心拍数の増加は一過性であり、投与後10～20分で最大になった。投与量制限決定因子として心拍数が用いられ、MTDは28 µg/kgと決定された。同様に、フェーズIIでは、28 (MTD) 及び70 µg/kg (2.5x MTD)の投与量でBMN 111をサルに7日間連日皮下投与により、投与量に依存した血圧の低下及び心拍数の増加が測定された。血圧に対するBMN 111のこれらの作用は心拍数とは異なり、急速で、一過性で、その後の投与ではあまり顕著でなく、ある程度の脱感作が示唆された（図2.6.2.4.5-1）。心電図は、両投与量で2日目にRR間隔の短縮を示した。RR間隔は定義上心拍数と逆相関するため、これは心拍数の増加が原因であると考えられた。BMN 111の投与に関連した心電図パラメータの変化は認められなかった。

図 2.6.2.4.5-1 28  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 の 7 日間連日皮下投与による雌雄サルの血圧及び心拍数変化



Panels A and B are daily blood pressure and heart rate outputs for one male (A) and one female (B) given 28  $\mu\text{g/kg}$  BMN 111, subcutaneous daily. Red data indicates data for Day 1 of dosing.

結論として、1.4  $\mu\text{g/kg}$  の BMN 111 を投与した麻酔下の動物では血圧への影響は認められなかった（フェーズ I）。MTD は、覚醒下の動物の血圧を最大 10%低下させ、心拍数を最大 25%増加させる投与量に基づいて 28  $\mu\text{g/kg}$  と決定された。フェーズ II での心血管系機能の評価では、BMN 111 を投与した全群に、投与量に依存した一過性で急速な血圧の低下及びこれに伴う心拍数の増加が認められた。連日の反復投与により血圧低下の減衰が認められ、血管組織の BMN 111 の受容体（NPR-B）のある程度の脱感作が示唆された。BMN 111 の投与に関連した心電図パラメータの変化は認められなかった。

#### 2.6.2.4.6 テレメータを装着した覚醒下のカニクイザルの BMN 111 の皮下投与による心血管系に対する予備的安全性薬理評価

[BMN111-11-041]試験

非 GLP 試験で、被験物質である BMN 111 を用いて、この後の 2.6.2.4.7 項の心血管系に対する安全性薬理試験で使用可能なラテン方格配置による投与スケジュールを検討した。カニクイザルに 250 µg/kg の BMN 111 の単回皮下投与を行い、1～7 日間の種々のウォッシュアウト期間を設け、心血管系パラメータを評価し、心血管系に対してナイーブ動物に類似した応答を回復させるために、連続した 2 回の BMN 111 の投与間に必要なウォッシュアウト期間を決定した。

試験は、[REDACTED] 社の標準操作手順書及び一般に認められている医薬品探索研究実施基準に準拠して、[REDACTED] ( [REDACTED]、 [REDACTED]、USA ) で実施し、20[REDACTED] 年 6 月 2 日に開始し、20[REDACTED] 年 10 月 12 日に終了した。[表 2.6.3.4-1]に要約を示す。試験デザインを表 2.6.2.4.6-1 に示す。

**表 2.6.2.4.6-1 カニクイザルの心血管系に対する予備的安全性薬理試験の試験デザイン**

| Group <sup>a,b</sup> | No. of Animals (Males) | Dose Level (µg/kg)   | Dose Concentration (µg/mL) <sup>c,d</sup> |
|----------------------|------------------------|----------------------|---|
| 1                    | 4                      | 0 <sup>e</sup> , 250 | 250                                       |
| 2                    | 4                      | 0 <sup>e</sup> , 250 | 250                                       |

No., number.

a) All animals received vehicle on Day 1 for baseline cardiovascular measurements.

b) Animals received subcutaneous doses on the following Study Days: All animals on Days 1 and 11, Group 1 animals on Days 8, 22, 24, and 25, and Group 2 animals on Days 14, 16, and 17.

c) Dose concentrations were based on the test article as supplied. A correction factor was not used.

d) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg.

e) Vehicle; 0.005 mol/L citric acid buffer solution, pH 5.5 ± 0.2, containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) Polysorbate 80.

雄性カニクイザル ( [REDACTED]、 [REDACTED]、USA ) (4～5 歳、4.0～5.7 kg)

(n = 8) に外科的処置によりテレメータを装着し、2 群に割り当てた。全ての動物に溶媒 (0 µg/kg) を皮下投与して、心血管系に対するベースライン測定値を確定し、その後、投与 1 日目及び 11 日目に 250 µg/kg の BMN 111 を皮下投与した。第 1 群の動物には投与 8、22、24 及び 25 日目にも皮下投与し、第 2 群の動物には、14、16 及び 17 日目にも皮下投与した。

動物は生存中、一般状態の変化、体重、摂餌量及び尿量を評価した。各投与後に血圧 (収縮期、拡張期及び平均動脈圧)、並びに心拍数の心血管系パラメータを評価した。

全ての動物は試験期間中生存した。投与 1 日目に活動性の低下が、最初の BMN 111 の投与後 40～60 分に、8 匹中 5 例のサルで認められた。これは、BMN 111 の投与に関連した血圧の低下が原因である可能性がある。試験期間中、一般状態にほかの変化は認められなかった。BMN 111 の投与に関連した摂餌量及び体重変化は認められなかった。薬物を投与しなかった投与 7 日目と比較して、投与 8 日目の投与後に尿量の増加 (+25～75 mL) が認められた。最大 300 µg/kg の投与量の BMN 111 を連日皮下投与したサルの 28 日間反復投与毒性試験でこの所見が認められなかったため、この尿量の増加が ANP の活性によるものかどうかは明らかではない。

おおむね、平均動脈圧の低下は、投与後 30 分から始まり投与後 120 分まで持続し、30～60 分に最下点が認められた。BMN 111 を 2 日間連日投与すると、血圧低下の減衰が認められた。

BMN 111 を 2 日間以上のウォッシュアウト期間を設けて投与すると、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。心拍数の代償性増加は、投与後 90 分まで認められ、適応応答は認められなかった。血圧のベースライン値への回復期間である投与後約 100 分及び 200 分に、血圧のわずか（約 5 mmHg）で一過性（30 分未満）のさらなる低下が認められた。おおむね全ての血行動態の変化は、BMN 111 の投与後 360 分までにベースラインに戻った。

#### 2.6.2.4.7 テレメータを装着した覚醒下の雄性カニクイザルの BMN 111 の皮下投与による心血管系に対する安全性薬理評価

[BMN111-11-040]試験

GLP 試験で、BMN 111 の心血管系への影響の可能性について、テレメータを装着した雄性カニクイザルを用いて評価した。BMN 111 は、ラテン方格配置のダブルクロスオーバー投与デザイン（フェーズ I）及び 7 日間の反復投与試験デザイン（フェーズ II）で動物に皮下注入により遠隔投与した。

試験は、米国、日本及び OECD の GLP 規制に準拠して、[REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]、USA) で実施し、20[REDACTED] 年 6 月 21 日に開始し、20[REDACTED] 年 11 月 17 日に終了した。[表 2.6.3.4-1] に要約を示す。フェーズ I 試験デザインを表 2.6.2.4.7-1 に示す。

表 2.6.2.4.7-1 カニクイザルの心血管系に対する安全性薬理試験におけるラテン方格配置のダブルクロスオーバー投与デザイン（フェーズ I）

| Animal ID<br>(Male) | Dose Level Designation on Specified Days<br>(µg/kg) <sup>a,b,c</sup> |       |       |        |
|---------------------|--|-------|-------|--------|
|                     | Day 1  | Day 4 | Day 8 | Day 11 |
| I09049              | 10   | 0     | 200   | 50     |
| I09050              | 50   | 200   | 0     | 10     |
| I09051              | 200  | 10    | 50    | 0      |
| I09052              | 0  | 50    | 10    | 200    |
| I09053              | 0  | 200   | 50    | 10     |
| I09054              | 200  | 10    | 0     | 50     |
| I09055              | 50   | 0     | 10    | 200    |
| I09056              | 10   | 50    | 200   | 0      |

ID, identification.

a) BMN 111 vehicle (0 µg/kg) = 0.005 mol/L citrate buffer (pH 5.5) containing 5.25% (w/v) sucrose, 1.5% (w/v) mannitol, 0.727 mg/mL methionine, and 0.005% (w/v) polysorbate 80 in sterile water for injection, USP.

b) The dose level (µg/kg) was expressed as the peptide concentration. Concentrations were corrected using the actual peptide concentration.

c) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg.

雄性カニクイザル ([REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]、USA) (3.6～6 歳、4.0～5.8 kg) (n = 8) にテレメータを装着し、腹部大動脈に留置カテーテルを取り外せないように埋め込ん

だ。投与前に、腰部の皮下組織にカテーテルを埋め込み、所定の位置で縫合した。外部ポンプを使用して、BMN 111 を投与した。

フェーズ I では、動物をラテン方格配置のダブルクロスオーバー投与デザインに割り当てた。各動物には、投与 1、4、8 及び 11 日目に 4 投与量の中の 1 投与量を（所定の順序で）投与した。各投与間の 3 日間のウォッシュアウト期間は、心血管系に対する予備試験結果（2.6.2.4.6 項）に基づき決定された。投与製剤は、2 分間の皮下注入により遠隔投与した。各投与日に、動物に溶媒、並びに 10、50 及び 200 µg/kg の BMN 111 を投与した。

フェーズ II では、フェーズ I で使用した全ての動物に、200 µg/kg の BMN 111 を 1 mL/kg の投与液量で 7 日間連日投与した。

フェーズ II 試験デザインを以下の表 2.6.2.4.7-2 に示す。

**表 2.6.2.4.7-2 カニクイザルの反復投与による心血管系に対する安全性薬理試験デザイン（フェーズ II）**

| Group | Number of Animals <sup>a</sup> | Dose Concentration (µg/kg) <sup>b,c</sup> |
|-------|--------------------------------|---|
| 1     | 8                              | 200                                       |

a) Animals transferred from Phase 1; animals were dosed on Days 1 through 7 of Phase 2. A CV baseline was assessed 2 days prior to Day 1.

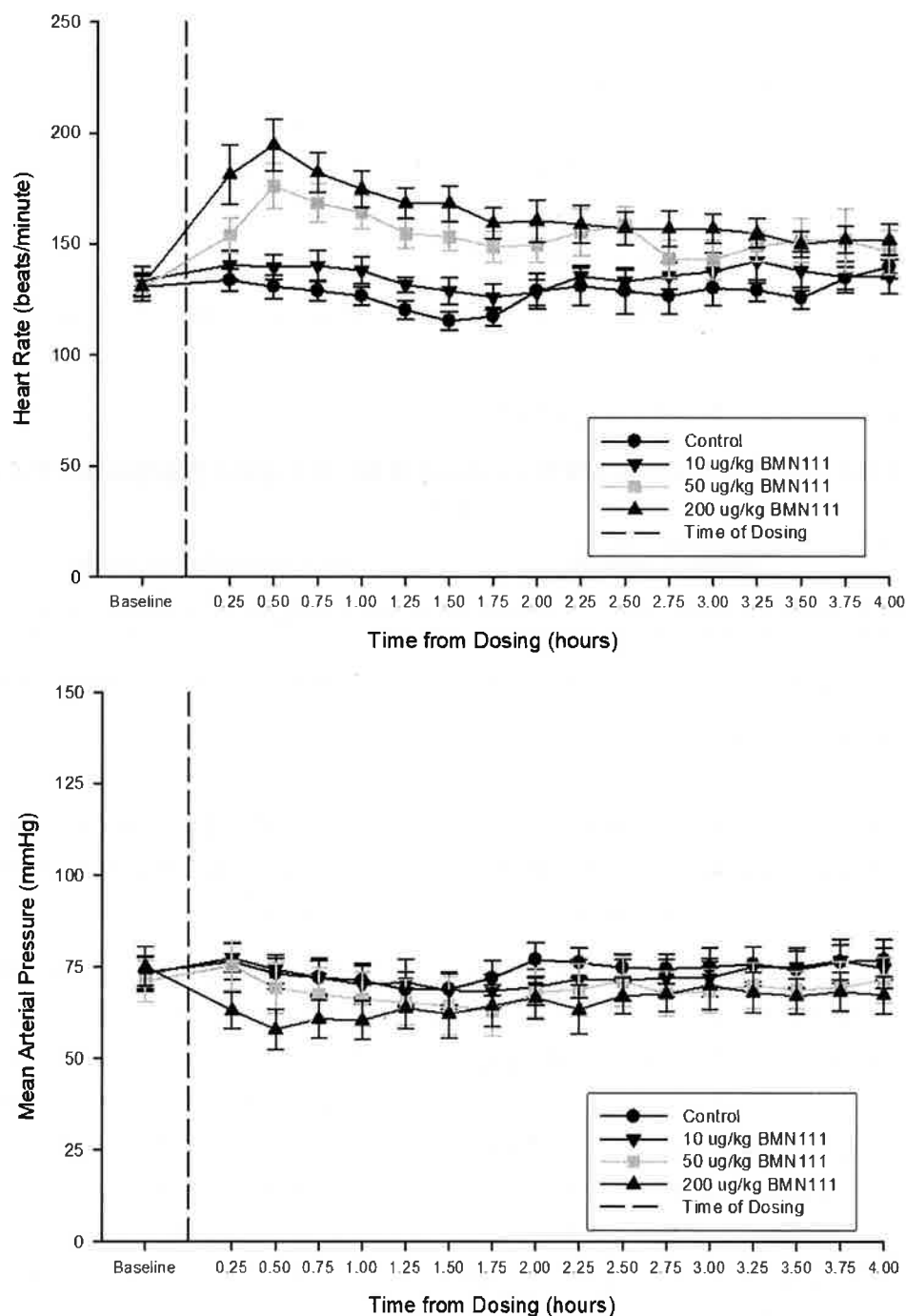
b) The dose level (µg/kg) was expressed as the peptide concentration. Concentrations were corrected using the actual peptide concentration.

c) Animals were dosed at a volume of 1 mL/kg.

フェーズ I 及びフェーズ II では、動物は生存中、死亡率、一般状態の変化、摂餌量及び体重変化を評価した。心血管系機能に対する評価は、フェーズ I では血行動態、体温及び心電図パラメータ、並びにフェーズ II では血行動態及び体温パラメータに基づいて行った。

フェーズ I では、BMN 111 の投与に関連した死亡、瀕死状態、一般状態の変化、並びに摂餌量及び体重に対する変化は認められなかった。投与量に依存した心拍数の増加及び血圧の低下が認められ、投与後 19 時間で回復した。10 µg/kg の BMN 111 を投与したサルでは、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。50 µg/kg の BMN 111 を投与した動物と比較して、200 µg/kg の BMN 111 を投与した動物は血行動態の変化の発現が早く、持続時間も長かった。50 及び 10 µg/kg の BMN 111 を投与した動物ではそれぞれ投与後 1.75 及び 2 時間以内に、200 µg/kg の BMN 111 を投与した動物では投与後 15～30 分以内に、最大の変化が認められた。50 及び 200 µg/kg の BMN 111 を投与した動物の血圧低下は、最下点でそれぞれ 6.8%及び 12.2%であった。50 及び 200 µg/kg の BMN 111 を投与した動物の心拍数の最大の増加は、それぞれ約 37%及び約 49%であった。心拍数及び平均動脈圧変化を図 2.6.2.4.7-1 に示す。全ての心電図パラメータ測定結果は定性的に正常であると考えられた。一部の心電図間隔（PR、QT、QTcB など）に短縮が認められたが、QRS 時間に影響は認められなかった。これら認められた変化は、心拍数の増加に続発する変化と判断され、生理学的懸念はないと考えられた。

図 2.6.2.4.7-1 フェーズ I 動物の平均心拍数及び平均動脈圧



フェーズ II では、BMN 111 の投与に関連した一般状態の変化は、反復投与の投与後 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のみであった。これは、BMN 111 の血行動態への影響に関連している可能性があるが、横臥の一般状態の変化がフェーズ II のみで認められた理由は明らかではない。BMN 111 は投与後、フェーズ I と同様の時期に同様の大きさで動脈圧を急速に低下させ、

心拍数を増加させた。翌日以降の血圧変化は全般的に小さく、遅延傾向を示し、これは、フェーズ I の低投与量の変化とパターンが類似した。血圧は初回投与後それほど影響を受けなかったが、連日投与による適応応答はごくわずかであった。心拍数に対して明らかな適応応答は認められなかった。

全般的に、テレメータを装着したサルへの BMN 111 の皮下投与は、投与量に依存した血圧の低下及び心拍数の増加をもたらした。心血管系への影響に対する BMN 111 の無影響量は、心拍数及び血圧、並びに一般状態の変化が認められなかったことに基づいて 10 µg/kg と判断された。50 µg/kg の BMN 111 を投与したサルでは、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。200 µg/kg 以上の BMN 111 を投与したサルの一部では、心血管系に関連した一般状態の明らかな変化が認められた。7 日間の反復投与では、全般的に、投与を重ねるにつれ、血圧変化の減少が認められ、BMN 111 の連日投与による血管系の NPR-B の脱感作が関連している可能性が考えられた。心拍数に関しては、経時的適応応答はわずか又はまったく認められなかった。血管系での NPR-B の分布は主に末梢血管系に限定されているため、測定可能な血行動態の変化の程度が限定された可能性がある。

#### 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

#### 2.6.2.6 考察及び結論

全般的に、BMN 111 の薬力学的プロファイルは、成長板及び血管系での NPR-B シグナル伝達に対する 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。

実施した *in vitro* 試験において、BMN 111 は、1) NPR-B 及び NPR-C との結合が確認されたが、NPR-A との結合は確認されなかった、2) *FGFR3* の機能獲得型変異を有するヒト成長板軟骨細胞において、細胞内 cGMP 産生を増加し、3) FGF を介した MAPK リン酸化 (ERK1/2) の亢進を阻害することが確認された、さらに、4) BMN 111 の 1 日 1 回の (パルス) 処理により、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産生の抑制を低減し、これは、継続的な曝露処理による効果と同程度であることが確認された。

骨成長に対する BMN 111 の薬理活性は、*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) の両マウスモデル、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 と同程度であり、これら動物での効果に基づき BMN 111 のヒトでの安全性及び有効性を予測することが可能であることが示唆された。

閉鎖前又は融合が不完全な状態の成長板を有する動物モデル全てにおいて、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、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である ACH 患者の四肢短縮を改善する可能性が示された。TD マウスでは大後頭孔及び環椎の矢状径及び横径のわずかな改善も認められ、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少させる可能性があることが示された。この軟骨内骨成長に対する作用は、クルーゾン症候群マウスモデル (*Fgfr2c*<sup>C342Y/+</sup>) でも実証されているが ([Holmes 2018])、頭蓋骨の表現型を改善するのに十分な膜内骨成長は、この試験の投与量では認められなかった。正常動物における薬理活性は、わずかな成長作用から重度な過度の薬理作用まで幅が認められた。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、さらに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る。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。全般的に、3週齢から成長が活発な時期の終わりまで BMN 111 の連日皮下投与を受けた正常マウスでは、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加が認められ、BMN 111 の治療を受ける ACH 患者で最終身長が伸長が達成される可能性があることを示唆した。6ヵ月間の 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。

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。これらの試験では、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。

覚醒下のサルでは、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ヵ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。

**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**

## **2.6 非臨床試験の概要文及び概要表**

### **2.6.3 薬理試験概要表**

**BioMarin Pharmaceutical Japan 株式会社**

## 目次

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 2.6.3 薬理試験概要表.....        | 3  |
| 2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....     | 3  |
| 2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....    | 6  |
| 2.6.3.3 副次的薬理試験 .....     | 12 |
| 2.6.3.4 安全性薬理試験 .....     | 16 |
| 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験..... | 21 |

## 2.6.3 藥理試驗概要表

## 2.6.3.1 藥理試驗：一覽表

Test Article: BMN 111

表 2.6.3.1-1 藥理試驗一覽表

| Type of Study  | Test System   | Method of Administration | Testing Facility               | Study/Report Number | Location in CTD |
|--|---|--------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------|
| <b>Primary Pharmacodynamics</b>                          |   |                          |                                |                     |                 |
| Receptor homology  | Monkey, cynomolgus; human ( <i>in silico</i> )  | NA                       | BioMarin Pharmaceutical Inc.   | [BMN111-11-044]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in mouse fibroblasts            | Mouse, NIH/3T3 fibroblasts  | <i>In vitro</i>          | BioMarin Pharmaceutical Inc.   | [BMN111-10-110]     | 4.2.1.1         |
| Receptor affinity  | HEK293T expressing human NPR-A, -B and -C   | <i>In vitro</i>          | BioMarin Pharmaceutical Inc.   | [BMN111-11-028]     | 4.2.1.1         |
| Cross-species receptor potency and affinity              | HEK293T cells transiently expressing NPR-B from rat, mouse, rabbit, and cynomolgus monkey/human   | <i>In vitro</i>          | BioMarin Pharmaceutical Inc.   | [BMN111-18-002]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in human chondrocytes           | Human chondrocytes  | <i>In vitro</i>          | BioMarin Pharmaceutical Inc.   | [BMN111-11-004]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in various chondrocytes         | Human chondrocytes, Immortalized (G380R [BL-2.2], G380R [Les-11], Y373C [Mani-1.8], Control [GUI-15], Control [KHAIE-9]), Primary (Normal, ACH, TD) | <i>In vitro</i>          | ██████████, ██████████, France | [BMN111-10-086]     | 4.2.1.1         |
| Evaluation of dosing frequency on FGF2 induced signaling | Rat chondrosarcoma (RCS) cells  | <i>In vitro</i>          | BioMarin Pharmaceutical Inc.   | [RS19-001]          | 4.2.1.1         |

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表 (続き)

| Type of Study   | Test System   | Method of Administration | Testing Facility               | Study/Report Number | Location in CTD |
|---|---|--------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------|
| Pharmacological activity in TD mouse <i>ex vivo</i>         | Embryonic mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> femurs    | <i>Ex vivo</i>           | ██████████, ██████████, France | [BMN111-10-002]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in TD mice                         | Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup>                     | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, France | [BMN111-10-046]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in TD mice                         | Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup>                     | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, France | [BMN111-11-045]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in Ach mice                        | Mouse, FVB, <i>Fgfr3</i> <sup>ach</sup>   | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, USA    | [BMN111-11-001]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in normal mice                     | Mouse, FVB  | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, USA    | [BMN111-09-048]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in normal mice, confirmatory study | Mouse, FVB  | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, USA    | [BMN111-09-075]     | 4.2.1.1         |
| Dose regimen study in normal mice                           | Mouse, FVB  | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, USA    | [BMN111-09-074]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in normal rats                     | Rat, HSD:SD   | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, USA    | [BMN111-11-017]     | 4.2.1.1         |
| Pharmacological activity in cynomolgus monkeys              | Monkey, cynomolgus  | Subcutaneous             | ██████████, ██████████, Canada | [BMN111-09-072]     | 4.2.1.1         |
| <b>Secondary Pharmacodynamics</b>                           |   |                          |                                |                     |                 |
| Receptor Binding  | Human, rat, mouse, guinea pig, hamster, rabbit cells/organs (source of ligands) | <i>In vitro</i>          | ██████████, ██████████, Taiwan | [BMN111-11-026]     | 4.2.1.2         |

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表（続き）

| Type of Study   | Test System                                   | Method of Administration | Testing Facility   | Study/Report Number          | Location in CTD |
|---|---|--------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|
| <b>Safety Pharmacodynamics</b>                                      |   |                          |                    |                              |                 |
| hERG  | Human hERG in Stably Transfected HEK293 Cells | <i>In vitro</i>          | [REDACTED], USA    | [BMN111-11-023] <sup>a</sup> | 4.2.1.3         |
| CV safety pharmacology in anesthetized mice                         | Mouse, FVB                                    | Subcutaneous             | [REDACTED], Canada | [BMN111-09-060]              | 4.2.1.3         |
| CNS safety pharmacology in rats                                     | Rat, HSD:SD                                   | Subcutaneous             | [REDACTED], USA    | [BMN111-11-021] <sup>a</sup> | 4.2.1.3         |
| Respiratory safety pharmacology in rats                             | Rat, HSD:SD                                   | Subcutaneous             | [REDACTED], USA    | [BMN111-11-022] <sup>a</sup> | 4.2.1.3         |
| CV safety pharmacology and dose range finding in cynomolgus monkeys | Monkey, cynomolgus                            | Subcutaneous             | [REDACTED], Canada | [BMN111-09-067]              | 4.2.1.3         |
| CV safety pharmacology pilot study in cynomolgus monkeys            | Monkey, cynomolgus                            | Subcutaneous             | [REDACTED], USA    | [BMN111-11-041]              | 4.2.1.3         |
| CV safety pharmacology in cynomolgus monkeys                        | Monkey, cynomolgus                            | Subcutaneous             | [REDACTED], USA    | [BMN111-11-040] <sup>a</sup> | 4.2.1.3         |

ACH, achondroplasia; CNS, central nervous system; CTD, Common Technical Document; CV, cardiovascular; FGF, fibroblast growth factor; hERG, human *ether-à-go-go*-related gene; NPR, natriuretic peptide receptor; SD, Sprague Dawley; TD, thanatophoric dysplasia.

a) 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.

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: BMN 111

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験

| Type of Study                                 | Test System   | Route of Administration | Duration, Dosing Schedule, and Doses  | Noteworthy Findings   | GLP Compliance | Study/Report Number |
|---|---|-------------------------|---|---|----------------|---------------------|
| Receptor homology                             | Monkey, cynomolgus, human ( <i>in silico</i> )  | NA                      | NA  | Monkey protein sequence of NPR-A and -B are 99% homologous to human NPR-A and NPR-B. Monkey protein sequence of NPR-C is 98% homologous to human NPR-C.   | Non-GLP        | [BMN111-11-044]     |
| Pharmacological activity in mouse fibroblasts | Mouse, NIH-3T3 fibroblasts  | <i>In vitro</i>         | 15 min;<br>0.001 to 10 µmol/L   | CNP22 and BMN 111 had comparable potencies.   | Non-GLP        | [BMN111-10-110]     |
| Receptor affinity                             | HEK293T cells expressing human NPR-A, -B and -C   | <i>In vitro</i>         | 15 min;<br>0.000001 to 100 µmol/L   | In presence of NPR-C, both BMN 111 and CNP22 had 5 to 10-fold reduction in signaling. In contrast, ANP signaling through NPR-A is reduced nearly 100-fold. The results indicated that signaling characteristics of BMN 111 and CNP22 were indistinguishable with regards to activating NPR-B and in NPR-C signal competition. | Non-GLP        | [BMN111-11-028]     |
| Cross-species receptor potency and affinity   | HEK293T cells transiently expressing NPR-B from rat, mouse, rabbit, and cynomolgus monkey/human | <i>In vitro</i>         | Potency assay<br>20 or 44 hrs;<br>1.6 nmol/L to 5 µmol/L<br>Affinity assay<br>15 min;<br>0.1 pmol/L to 2 nmol/L | BMN 111 demonstrated potency across human and pharmacology and toxicology nonclinical animal species. Similar affinity for immobilized NPR-B from all species for BMN 111 was confirmed.  | Non-GLP        | [BMN111-18-002]     |

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study  | Test System   | Route of Administration | Duration, Dosing Schedule, and Doses   | Noteworthy Findings  | GLP Compliance | Study/Report Number |
|--|---|-------------------------|--|--|----------------|---------------------|
| Pharmacological activity in human chondrocytes           | Human chondrocytes  | <i>In vitro</i>         | 15 min;<br>0.001 to 10 µmol/L  | BMN 111 activated human NPR-B receptors in primary human chondrocytes.   | Non-GLP        | [BMN111-11-004]     |
| Pharmacological activity in various chondrocytes         | Human chondrocytes, Immortalized (G380R [BL-2.2], G380R [Les-11], Y373C [Mani-1.8], Control [GUI-15], Control [KHAIE-9]), Primary (Normal, ACH, TD) | <i>In vitro</i>         | Pilot Study:<br>Up to 24 hours;<br>1 µmol/L<br><br>Main Study:<br>Immortalized cell lines: 48 hr., Primary cell lines: 5 min;<br>10 µmol/L | BMN 111 pretreatment of normal, ACH, and TD chondrocytes from the human growth plate partially prevented FGF-mediated increases in MAPK phosphorylation (ERK1/2).  | Non-GLP        | [BMN111-10-086]     |
| Evaluation of dosing frequency on FGF2 induced signaling | Rat chondrosarcoma (RCS) cells  | <i>In vitro</i>         | 72 hrs., treated continuously or pulsed for 60 min 1 to 2x daily;<br>200 nmol/L  | Results replicated the effects of CNP22 in the system, confirming similar pharmacologic effects of BMN 111 and native CNP.<br>Despite the short half-life of BMN 111 in presence of proteases, no apparent advantages to continuous delivery of 200 nmol/L BMN 111 over a single daily treatment was noted.              | Non-GLP        | [RS19-001]          |
| Pharmacological activity in TD mice <i>ex vivo</i>       | Embryonic mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> femurs  | <i>Ex vivo</i>          | 6 days;<br>0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 µmol/L   | Gains in femur length were observed for BMN 111 when co-incubated with femurs.<br>BMN 111 co-incubation partially rescued the endochondral bone formation process of proximal bones with a severe achondroplastic phenotype by partially normalizing cell cycle and improving size and architecture of the growth plate. | Non-GLP        | [BMN111-10-002]     |



表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study                       | Test System   | Route of Administration | Duration, Dosing Schedule, and Doses                          | Noteworthy Findings  | GLP Compliance | Study/Report Number |
|-------------------------------------|---|-------------------------|---|--|----------------|---------------------|
| Pharmacological activity in TD mice | Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> | Subcutaneous            | Once daily, 10 days; 0 (WT), 0 (TD), 240 (TD), 800 (TD) µg/kg | Daily administration for 10 days promoted growth of the axial and appendicular skeletons in a mouse model of severe achondroplasia. A partial restoration of the growth plate defect was observed. No exaggeration of the spinal stenosis was noted, and improvement in body disproportion was observed due to preferential growth of the appendicular skeleton over the axial skeleton.   | Non-GLP        | [BMN111-10-046]     |
| Pharmacological Activity in TD mice | Mouse, C57BL/6J-129 Sv/PAS, <i>Fgfr3</i> <sup>Y367C/+</sup> | Subcutaneous            | Once daily, 20 days; 0 (WT), 0 (TD), 800 (TD) µg/kg           | Once-daily administration of BMN 1111 for 20 days promoted growth of axial and appendicular skeletons in a mouse model of severe ACH. Notable improvement in phenotypic appearance was observed that included pronounced flattening of the skull with visible snout, reduced prognathism, larger paws and digits, and longer and straightened tibias and femurs, along with a restoration of the growth plate defect. Exaggerated pharmacology effects, such as changes in hindlimb motility, tail kinking, and curled paws, were also observed. | Non-GLP        | [BMN111-11-045]     |

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study   | Test System                            | Route of Administration | Duration, Dosing Schedule, and Doses                                      | Noteworthy Findings   | GLP Compliance | Study/Report Number |
|---|--|-------------------------|---|---|----------------|---------------------|
| Pharmacological activity in Ach mice                        | Mouse, FVB, <i>Fgfr3<sup>ach</sup></i> | Subcutaneous            | Once daily, 36 days; 0 (WT), 0 (Ach), 20 (Ach), 80 (Ach), 280 (Ach) µg/kg | Daily BMN 111 subcutaneous administrations over 36 days resulted in a dose related growth of the axial and appendicular skeletons in Ach mice with no overt clinical signs attributable to cardiovascular effects. Normalization or over-correction of the dwarfism phenotype was observed at 280 µg/kg. Clinical signs related to exaggerated pharmacology were only observed at 280 µg/kg and consisted of mild tail kinks.         | Non-GLP        | [BMN111-11-001]     |
| Pharmacological activity in normal mice                     | Mouse, FVB                             | Subcutaneous            | Once daily, 36 days; 0, 80, 280 µg/kg                                     | Treatment with BMN 111 resulted in increased animal body, tail, and bone lengths when compared to vehicle-treated animals. All treatment groups, including the vehicle control, had evidence of mild pulmonary inflammation most commonly associated with blood vessels. Minimal mineralization was found in the majority of samples in all treatment groups. Signs of exaggerated pharmacology were observed for all treated groups. | Non-GLP        | [BMN111-09-048]     |
| Pharmacological activity in normal mice, confirmatory study | Mouse, FVB                             | Subcutaneous            | Once daily, 36 days; 0, 80, 280 µg/kg                                     | There were no statistical significances regarding histomorphometric calculations between the vehicle and treated groups. Treatment with BMN 111 resulted in increased animal body, tail, and bone lengths when compared to vehicle-treated animals. Signs of exaggerated pharmacology were observed for all treated groups.   | Non-GLP        | [BMN111-09-075]     |

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study                     | Test System | Route of Administration | Duration, Dosing Schedule, and Doses   | Noteworthy Findings  | GLP Compliance | Study/Report Number |
|-----------------------------------|-------------|-------------------------|--|--|----------------|---------------------|
| Dose regimen study in normal mice | Mouse, FVB  | Subcutaneous            | Once daily for 9 weeks, 1-week recovery; 0 µg/kg                                 | <p>Significant increased growth compared to vehicle-treated animals was observed at all dose levels.</p> <p>Increased growth in tail length, body length, and bone lengths was evident in all treatment groups at the end of the study.</p> <p>The daily dosing regimen resulted in equivalent increases in axial growth and significantly greater increases in appendicular growth than either intermittent dosing regimen.</p> <p>Histological analysis of the selected lung samples revealed incidence of perivascular inflammation in all samples examined, including vehicle control group animals.</p> <p>When assessed by von Kossa staining, minimal mineralization was observed in 20-40% of the samples from treated groups.</p> | Non-GLP        | [BMN111-09-074]     |
|                                   |             |                         | Once daily for 1 week, then 3x/week for 8 weeks. 1-week recovery; 80 µg/kg       |  |                |                     |
|                                   |             |                         | Once daily, on alternating weeks (Week 1, 3, 5, 7, 9). 1-week recovery; 80 µg/kg |  |                |                     |
|                                   |             |                         | Once daily for 9 weeks, 1-week recovery; 20 µg/kg                                |  |                |                     |
|                                   |             |                         | Once daily for 36 days, terminated on Day 37; 20 µg/kg                           |  |                |                     |
|                                   |             |                         |  |  |                |                     |

表 2.6.3.2 1 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study                                  | Test System        | Route of Administration | Duration, Dosing Schedule, and Doses       | Noteworthy Findings   | GLP Compliance | Study/Report Number |
|--|--------------------|-------------------------|--|---|----------------|---------------------|
| Pharmacological activity in normal rats        | Rat, HSD:SD        | Subcutaneous            | Once daily, 36 days; 0, 80, 240, 800 µg/kg | Daily administration for 5 weeks resulted in dose-dependent BMN 111-induced growth and minimal clinical signs associated with overgrowth.<br>Treatment resulted in increased terminal naso-anal length measurements at 240 and 800 µg/kg, increased tail length at Weeks 4, 5, and 6 at 240 µg/kg, and increased right and left femoral length and combined left and right femoral length at 80, 240 or 800 µg/kg. These observations were correlated with histological changes in the regions associated with growth in bone length. | Non-GLP        | [BMN111-11-017]     |
| Pharmacological activity in cynomolgus monkeys | Monkey, cynomolgus | Subcutaneous            | Once daily, 6 months; 0, 9, 33 µg/kg       | BMN 111-related effects included a modest increase in bone growth, rate of bone growth, and promotion of growth plate size/activity. The average area of the foramen of vertebrae L2, 3, and 4 trended higher at the high dose versus controls, which was accompanied by a trend to increased total and bone-specific serum alkaline phosphatase. No anti-BMN 111 antibodies were detected. No effects on bone volume or turnover noted. No evidence of calcium deposition in lungs.  | Non-GLP        | [BMN111-09-072]     |

ACH, achondroplasia; Ach, *Fgfr3<sup>G380R</sup>* achondroplasia mouse model; CNP, C-type natriuretic peptide; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; FGF, fibroblast growth factor; GLP, Good Laboratory Practice; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NA, not applicable; NPR, natriuretic peptide receptor; SD, Sprague Dawley; TD, thanatophoric dysplasia; WT, wild-type.

## 2.6.3.3 副次的藥理試驗

Test Article: BMN 111

表 2.6.3.3-1 副次的藥理試驗

| Type of Study  | Test System   | Route of Administration | Doses ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>a</sup>                           | Number of Replicates/Dose | Noteworthy Findings   | GLP Compliance | Study/Report Number |
|--|---|-------------------------|--|---------------------------|---|----------------|---------------------|
| Off-target binding of BMN 111 to 165 different cell receptors/channels | Human, rat, mouse, guinea pig, hamster, rabbit cells/organs (source of ligands) | <i>In vitro</i>         | Initial: 11.44<br>IC <sub>50</sub> : 11.44, 1.144, 0.1144, 0.01144 | 2                         | Notable inhibition for 9 receptors/channels: APJ, Potassium Channel [SK <sub>CA</sub> ], Potassium Channel [K <sub>A</sub> ], Somatostatin sst3, Atrial Natriuretic Factor (ANF) <sup>b</sup> , Neuromedin U NMU <sub>2</sub> , Progesterone PR-B, NPBW2/GPR8, and Calcium Channel N-Type. IC <sub>50</sub> was determined for 8 of the receptors/channels. Potassium Channel [K <sub>A</sub> ] had < 50% inhibition at 11.44 $\mu\text{mol/L}$ , thus, IC <sub>50</sub> could not be determined. | Non-GLP        | [BMN111-11-026]     |

GLP, Good Laboratory Practice; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration.

- a) The off-target binding of BMN 111 to 165 receptors was initially evaluated at 11.44  $\mu\text{mol/L}$  using radioligand binding assays. Based on the findings from the initial screen, a second experiment was conducted using log dilutions to determine the IC<sub>50</sub> values for receptors, which showed significant positive inhibition ( $\geq 50\%$ ).
- b) Natriuretic Peptide Receptor A (NPR-A) is the receptor for the Atrial Natriuretic Factor (old nomenclature).

表 2.6.3.3-2 SpectrumScreen®による BMN 111 のオフターゲット活性 (BMN111-11-026 試験)

| <b>Species/Strain</b>                        |            | Human, rat, mouse, guinea pig, hamster, rabbit cell receptors/channels (source of ligands)   |              |  |                                      |                |
|--|------------|--|--------------|--|--------------------------------------|----------------|
| <b>Number of Replicates per Dose</b>         |            | 2  |              |  |                                      |                |
| <b>Vehicle/Formulation</b>                   |            | Aqueous 5 mmol/L citrate buffer (pH 5.5)   |              |  |                                      |                |
| <b>Method of Administration</b>              |            | <i>In vitro</i>  |              |  |                                      |                |
| <b>Dose</b>                                  |            | Initial screen (165 receptors): 11.44 $\mu\text{mol/L}$<br>IC <sub>50</sub> experiment (9 receptors): 11.44, 1.144, 0.1144 and 0.01144 $\mu\text{mol/L}$ |              |  |                                      |                |
| <b>Sample <sup>a</sup></b>                   |            | Various cell receptors and channels  |              |  |                                      |                |
| <b>Analyte</b>                               |            | Appropriate radiolabeled ligand (specific to each assay)   |              |  |                                      |                |
| <b>Assay</b>                                 |            | Radioligand binding  |              |  |                                      |                |
| Receptor/Channel                             | Species    | Dose ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>a</sup>  | % Inhibition | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ ) | K <sub>I</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ ) | n <sub>H</sub> |
| APJ (apelin receptor)                        | Human      | 11.44  | 90           | 3.15                                   | 1.52                                 | 0.967          |
|  |            | 11.44  | 78           |  |                                      |                |
|  |            | 1.144  | 27           |  |                                      |                |
|  |            | 0.1144   | 4            |  |                                      |                |
|  |            | 0.01144  | 7            |  |                                      |                |
| Atrial Natriuretic Factor (ANF) <sup>b</sup> | Guinea Pig | 11.44  | 97           | 4.39                                   | 3.94                                 | 0.773          |
|  |            | 11.44  | 70           |  |                                      |                |
|  |            | 1.144  | 22           |  |                                      |                |
|  |            | 0.1144   | 12           |  |                                      |                |
|  |            | 0.01144  | 5            |  |                                      |                |
| Calcium Channel N-Type                       | Rat        | 11.44  | 90           | 7.53                                   | 6.29                                 | 0.971          |
|  |            | 11.44  | 60           |  |                                      |                |
|  |            | 1.144  | 13           |  |                                      |                |
|  |            | 0.1144   | 4            |  |                                      |                |
|  |            | 0.01144  | -1           |  |                                      |                |

表 2.6.3.3-2 SpectrumScreen®による BMN 111 のオフターゲット活性 (BMN111-11-026 試験) (続き)

| Receptor/Channel                      | Species | Dose (μmol/L) <sup>a</sup> | % Inhibition | IC <sub>50</sub> (μmol/L) | K <sub>I</sub> (μmol/L) | n <sub>H</sub> |
|---------------------------------------|---------|----------------------------|--------------|---------------------------|-------------------------|----------------|
| Neuromedin U NMU2                     | Human   | 11.44                      | 83           | 6.56                      | 4.33                    | 0.819          |
|                                       |         | 11.44                      | 60           |                           |                         |                |
|                                       |         | 1.144                      | 21           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.1144                     | -1           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.01144                    | -2           |                           |                         |                |
| NPBW2/GPR8                            | Human   | 11.44                      | 59           | 9.84                      | 4.47                    | 0.623          |
|                                       |         | 11.44                      | 54           |                           |                         |                |
|                                       |         | 1.144                      | 16           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.1144                     | 13           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.01144                    | 0            |                           |                         |                |
| Potassium Channel [K <sub>A</sub> ]   | Rat     | 11.44                      | 60           | >11.44                    | NC                      | NC             |
|                                       |         | 11.44                      | 39           |                           |                         |                |
|                                       |         | 1.144                      | 1            |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.1144                     | -1           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.01144                    | 5            |                           |                         |                |
| Potassium Channel [SK <sub>CA</sub> ] | Rat     | 11.44                      | 98           | 2.1                       | 2.03                    | 1.06           |
|                                       |         | 11.44                      | 85           |                           |                         |                |
|                                       |         | 1.144                      | 36           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.1144                     | 1            |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.01144                    | 0            |                           |                         |                |
| Progesterone PR-B                     | Human   | 11.44                      | 70           | 11.4                      | 4.41                    | 6.78           |
|                                       |         | 11.44                      | 50           |                           |                         |                |
|                                       |         | 1.144                      | -2           |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.1144                     | -10          |                           |                         |                |
|                                       |         | 0.01144                    | -8           |                           |                         |                |

表 2.6.3.3-2 SpectrumScreen®による BMN 111 のオフターゲット活性 (BMN111-11-026 試験) (続き)

| Receptor/Channel  | Species | Dose ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>a</sup> | % Inhibition | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ ) | K <sub>i</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ ) | n <sub>H</sub> |
|-------------------|---------|---|--------------|--|--------------------------------------|----------------|
| Somatostatin sst3 | Human   | 11.44                                   | 66           | 10.2                                   | 3.48                                 | 1.15           |
|                   |         | 11.44                                   | 53           |  |                                      |                |
|                   |         | 1.144                                   | 8            |  |                                      |                |
|                   |         | 0.1144                                  | -1           |  |                                      |                |
|                   |         | 0.01144                                 | -11          |  |                                      |                |

K<sub>i</sub>, inhibition constant; NC, not calculated; n<sub>H</sub>, Hill coefficient; IC<sub>50</sub>, calculated BMN 111 concentration that will cause 50% inhibition of cell receptor/channel.

Note: Only receptors/channels with significant inhibition ( $\geq 50\%$ ) are presented; none of the other receptors/channels investigated in this study had significant findings.

a) For each receptor/channel, the initial screening result for BMN 111 at 11.44  $\mu\text{mol/L}$  is presented first followed by the IC<sub>50</sub> experimental findings.

b) Natriuretic Peptide Receptor A (NPR-A) is the receptor for the Atrial Natriuretic Factor (old nomenclature).



## 2.6.3.4 安全性藥理試驗

Test Article: BMN 111

表 2.6.3.4-1 安全性藥理試驗

| Organ Systems Evaluated | Test System                                    | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>a</sup>                                | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings  | GLP Compliance   | Study/Report Number |
|-------------------------|--|--------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------|--|------------------|---------------------|
| hERG Channel            | Human, hERG in Stably Transfected HEK293 Cells | <i>In vitro</i>          | Single Dose                          | 0, 50 $\mu\text{g/mL}$<br><br>60 nmol/L Terfenadine (positive control) | 3 cells                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>BMN 111 inhibited hERG current by (Mean <math>\pm</math> SEM) <math>1.8 \pm 1.2\%</math> at 50 <math>\mu\text{g/mL}</math>, versus <math>1.4 \pm 0.7\%</math> in control.</li> <li>hERG inhibition at 50 <math>\mu\text{g/mL}</math> was not statistically significant (<math>p &lt; 0.05</math>) versus control.</li> <li>IC<sub>50</sub> for the inhibitory effect of BMN 111 on hERG potassium current estimated to be greater than 50 <math>\mu\text{g/mL}</math>.</li> </ul> | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-023]     |
| Cardiovascular          | Mouse, FVB                                     | Subcutaneous             | Single Dose                          | 0, 80, 280, 800, 8000  | 3M                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>A BMN 111-associated, mild decrease in arterial BP, accompanied by increase in HR, was noted at low- and mid-doses, with a more pronounced effect at the higher doses.</li> <li>No treatment-related macroscopic findings were observed.</li> </ul>   | Non-GLP          | [BMN111-09-060]     |

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験（続き）

| Organ Systems Evaluated | Test System | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses (µg/kg) <sup>a</sup> | Gender and No. Per Group                                  | Noteworthy Findings  | GLP Compliance   | Study/Report Number |
|-------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---|--|------------------|---------------------|
| Central Nervous System  | Rat, HSD:SD | Subcutaneous             | Single Dose                          | 0, 30, 100, 300            | Main Study: 6M/6F<br>TK: 3M/3F (vehicle), 6M/6F (BMN 111) | <ul style="list-style-type: none"> <li>No BMN 111-related effects on mortality or clinical signs.</li> <li>No BMN 111-related effects of physiological concern on modified Irwin battery (central and peripheral nervous system tests).</li> </ul> | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-021]     |
| Respiratory             | Rat, HSD:SD | Subcutaneous             | Single Dose                          | 0, 30, 100, 300            | 8M  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Administration of BMN 111 had no effect on mortality, clinical signs, or respiratory function assessed by measurement of tidal volume, respiration rate, and minute volume.</li> </ul>                      | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-022]     |

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験 (続き)

| Organ Systems Evaluated | Test System        | Method of Administration | Duration and Administration Schedule                          | Doses (µg/kg) <sup>a</sup>  | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings   | GLP Compliance | Study/Report Number |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|---|---|--------------------------|---|----------------|---------------------|
| Cardiovascular          | Monkey, cynomolgus | Subcutaneous             | 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) | 2-3M/2F per dose         | <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ A BMN 111-associated mild-to-moderate decrease in arterial BP, with an increase in HR, was noted in anesthetized and conscious monkeys.</li> <li>♦ CV effects were transient, maximal at ~ 30 min post-dose, and reversible.</li> <li>♦ Attenuation of BP drop was observed following repeat daily dosing.</li> <li>♦ No effects on clinical chemistry parameters.</li> <li>♦ No gross abnormalities or organ weight change.</li> <li>♦ Minimal-to-mild widening of epiphyseal growth plates.</li> <li>♦ Inflammation and some hemorrhage of subcutis at injection sites.</li> </ul> | Non-GLP        | [BMN111-09-067]     |
|                         |                    |                          | Phase II: Once daily, 7 days                                  | Phase II: 0, 28, 70 (conscious)   | 1M/1F                    |   |                |                     |

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験（続き）

| Organ Systems Evaluated | Test System        | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses (µg/kg) <sup>a</sup> | Gender and No. Per Group | Noteworthy Findings  | GLP Compliance | Study/Report Number |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------|--|----------------|---------------------|
| Cardiovascular          | Monkey, cynomolgus | Subcutaneous             | Single Dose (baseline)               | 0                          | 4M                       | <ul style="list-style-type: none"><li>♦ The hemodynamic response to BMN 111 treatment was not statistically significantly different compared with naïve animals with washout intervals of 1, 2, 3, and 7 days.</li><li>♦ A trend toward a slight attenuation of hemodynamic effects occurred with only a 1-day washout period.</li></ul> | Non-GLP        | [BMN111-11-041]     |
|                         |                    |                          | Group 1: Day 1, 8, 11, 22, 24, 25    | 250                        |                          |  |                |                     |
|                         |                    |                          | Group 2: Day 1, 11, 14, 16, 17       |                            |                          |  |                |                     |

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験 (続き)

| Organ Systems Evaluated | Test System        | Method of Administration | Duration and Administration Schedule | Doses (µg/kg) <sup>a</sup> | Gender and No. Per Group               | Noteworthy Findings  | GLP Compliance   | Study/Report Number |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--|--|------------------|---------------------|
| Cardiovascular          | Monkey, cynomolgus | Subcutaneous             | Phase I: Day 1, 4, 8, 11             | 0, 10, 50, 200             | Phase I: 8M Double Latin square X-over | <ul style="list-style-type: none"> <li>A single dose of BMN 111 caused rapid time- and dose-dependent decreases in systolic (-16%), diastolic (-9%), mean arterial (-12%), and arterial pulse (-34%) pressures, with complete recovery to control levels within 19 hours of dosing.</li> <li>A compensatory increase in HR (+49%) was accompanied by expected shortening of PR (-15%), QT (-23%), and QTcB (-8%) intervals.</li> <li>The magnitude of BP effects, but not HR, appeared blunted upon second dosing, with no improvement upon subsequent daily doses.</li> </ul> | GLP <sup>b</sup> | [BMN111-11-040]     |
|                         |                    |                          | Phase II: Once daily, 7 days         | 200                        | Phase II: 8M Parallel Dosing           |  |                  |                     |

BP, blood pressure; CV, cardiovascular; F, female; GLP, Good Laboratory Practice; hERG, human *ether-à-go-go*-related gene; HR, heart rate; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; M, male; No, number; SEM, standard error of the mean; TK, toxicokinetic.

a) In µg/kg, unless otherwise specified; single dose unless otherwise specified.

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.

**2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験**

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。