アミファンプリジンリン酸塩
製造販売承認申請
CTD　第 2 部

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.1 緒言

2.6.1.1 緒言 5

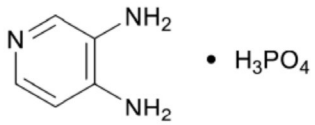
2.6.1.2 申請効能・効果及び用法・用量.....6

2.6.1.3 参考文献 7

図の目次

図 2.6.1.1-1 アミファンプリジンリン酸塩の構造式.....5

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替え等
アミファンプリジンリン酸塩	一般名： アミファンプリジンリン酸塩 化学式： $C_5H_7N_3$・H_3PO_4 構造式： 

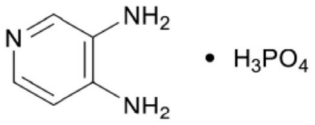
【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
ACh	Acetylcholine	アセチルコリン
Ca^{2+}	Calcium	カルシウム
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
LEMS	Lambert-Eaton myasthenic syndrome	ランバート・イートン筋無力症候群
K^{+}	Potassium	カリウム
SCLC	Small cell lung cancer	小細胞肺がん
VGCC	Voltage-gated calcium channel、 Voltage-dependent calcium channel	電位依存性カルシウムチャネル

2.6.1.1　緒言

申請者は、ランバート・イートン筋無力症候群（LEMS）などの神経筋疾患患者の治療薬として、アミファンプリジンリン酸塩を開発している。アミファンプリジン塩基は、アミファンプリジンリン酸塩錠の活性部分である。アミファンプリジンリン酸塩の構造式を図 2.6.1.1-1 に示す。

図 2.6.1.1-1　　アミファンプリジンリン酸塩の構造式



分子式: $C_5H_{10}N_3O_4P$
分子量: 207.12 g/mol
分子量（遊離塩基）: 109.13 g/mol

LEMS は、神経筋接合部のシナプス前膜に存在する P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）を標的とした免疫グロブリン G（IgG）自己抗体の産生を特徴とする自己免疫反応により発症する [1)]。これらの IgG 自己抗体は、神経内へのカルシウム（Ca^{2+}）の流入を阻害し、コリン作動性神経終末からシナプスへのアセチルコリン（ACh）の放出を障害し、その結果、アセチルコリンを介した神経筋伝達が消失する [2), 3)]。約 50%の患者において、LEMS は小細胞肺がん（SCLC）の腫瘍随伴症状であり、SCLC はこれらの患者に共存しているか、あるいは LEMS の原因となっている可能性がある。SCLC を伴う LEMS 患者も、このがん腫を伴わない患者も、症例の 85%でシナプス前運動神経末端の細胞膜にある VGCC に対して非常に高い特異性を示す病原性抗体を有している [4)]。興味深いことに、LEMS 患者由来の IgG を用いた最近の研究では、IgG がラット及びマウスニューロンの P/Q 型 VGCC に直接作用することが示されており、LEMS IgG が P/Q 型 VGCC に結合する直接的な結果として ACh 放出速度を低下させることで神経筋伝達を障害することが示唆されている [5)]。

LEMS はまれで消耗性の神経筋自己免疫疾患である。LEMS の真の有病率は不明であるが、本疾患は一般人口の約 10 万人に 1 人の割合で発症すると推定されており、米国の LEMS 患者 3500 人未満に相当すると考えられている [6)]。臨床的には、LEMS は近位筋の筋力低下と易疲労性、反射低下又は反射消失、自律神経機能障害（インポテンス、口渇、便秘など）を特徴とする [7), 8)]。その他の症状として、感覚障害、複視、起立性低血圧などが考えられる [8), 9)]。この特徴的な近位筋の筋力低下により、歩行や階段を上るなど、最も基本的な作業が損なわれることがある。神経筋伝達障害の症状は、典型的には 40 歳以降に現れ、50～70 歳に発症のピークがある [8), 9)]。

アミファンプリジンは、LEMS の治療に使用される非特異的電位依存性カリウム（K^+）チャネル遮断薬である。特に、アミファンプリジンによる電位依存性 K^+チャネルの遮断は、

シナプス前膜の脱分極を引き起こし、再分極を減速又は抑制する。脱分極が長引くと、緩徐な VGCC が開口し、それに続いて Ca^{2+}流入が増加する。細胞内 Ca^{2+}濃度が高くなると、ACh を含むシナプス小胞のシナプス間隙への開口放出が増加し、症状が緩和される [10)]。過去 30 年以上にわたり、アミファンプリジンの臨床経験がかなり蓄積されており、LEMS やその他の神経筋疾患患者の治療における有効性と安全性を示す強力な証拠が得られている。

LEMS の治療を適用としたアミファンプリジンリン酸塩の経口投与製剤の新薬承認申請のために、包括的な非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を実施した。アミファンプリジンリン酸塩を用いた *in vitro* での効力を裏付ける試験（ヒト K^+チャネル阻害試験）及び *in vitro* での副次的薬理試験（受容体結合及び酵素阻害試験）を実施している（2.6.2 項）。標準的な安全性薬理評価項目（すなわち、中枢神経系、呼吸系、循環器系）を評価し（2.6.2.4 項）、アミファンプリジンの薬物動態試験も実施している（2.6.4 項）。アミファンプリジンリン酸塩の安全性プロファイルは、慢性経口投与毒性試験（すなわち、ラット 6 ヵ月及びイヌ 9 ヵ月試験）を含むラット及びイヌの反復投与毒性試験で確認されている。標準的な遺伝毒性試験のほか、適切にデザインされたマウス及びラットがん原性試験、生殖発生毒性試験、薬物乱用に関する試験を実施した（2.6.6 項）。

2009 年、BioMarin Pharmaceutical 社は、EUSA Pharma 社からアミファンプリジンリン酸塩を世界的に開発・商業化するライセンスを取得した。アミファンプリジンリン酸塩の BioMarin Pharmaceutical 社のコード名は BMN125 であった。アミファンプリジンリン酸塩は 2002 年 12 月に欧州医薬品庁で希少疾病用医薬品の指定を受け、その後 2009 年 12 月 23 日に欧州医薬品庁医薬品委員会により LEMS 患者の対症療法薬として Firdapse®の商標名で製造販売承認を受けた。米国では、アミファンプリジンリン酸塩は 2009 年 11 月 19 日に LEMS の治療薬として米国食品医薬品局（FDA）から希少疾病用医薬品の指定を受けた。BioMarin Pharmaceutical 社は 2010 年 12 月 14 日、LEMS の筋力低下症状の治療を目的としたアミファンプリジンリン酸塩の開発について IND106263 を申請し、2013 年 3 月 8 日、この IND の治験依頼者である Catalyst Pharmaceuticals 社（旧 Catalyst Pharmaceutical Partners 社）に移管した。Catalyst Pharmaceuticals 社は 2018 年 11 月に FDA より、成人患者の LEMS を適用として製造販売承認を受けた。また、2020 年 7 月にカナダ保健省より同じ適応症で承認された。申請者は 2021 年 6 月 28 日に国内での開発に関するライセンス契約を Catalyst Pharmaceuticals 社と締結した。

2.6.1.2　申請効能・効果及び用法・用量

【効能・効果】

ランバート・イートン筋無力症候群の筋力低下の改善

【用法・用量】

通常、成人にはアミファンプリジンとして初期用量 1 回 5 mg を 1 日 3 回経口投与する。

患者の状態に応じて、1 回投与量として 5～30 mg の範囲で適宜増減し、1 日 3～5 回経口

投与するが、増量は 3 日以上の間隔をあけて 1 日用量として 5 mg ずつ行うこと。なお、1 日用量は 100 mg を超えないこと。

2.6.1.3 参考文献

1) Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J. Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. J Neurol Sci 1997;147:35-42.【4.3.07】
2) Augustine GJ. Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. J Physiol 1990;431:343-64.【4.3.08】
3) Verschuuren JJ, Wirtz PW, Titulaer MJ, Willems LN, van Gerven J. Available treatment options for the management of Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Expert Opin Pharmacother 2006;7(10):1323-36.【4.3.09】
4) Gilhus NE. Lambert-Eaton myasthenic syndrome; pathogenesis, diagnosis, and therapy. Autoimmune Dis 2011;2011(973808):1-5.【4.3.03】
5) Spillane J, Ermolyuk Y, Cano-Jaimez M, Lang B, Vincent A, Volynski KE, et al. Lambert-Eaton syndrome IgG inhibits transmitter release via P/Q Ca^{2+} channels. Neurology 2015;84(6):575-9.【4.3.04】
6) Sanders DB. Lambert-Eaton myasthenic syndrome: diagnosis and treatment. Ann N Y Acad Sci 2003;998:500-8.【4.3.10】
7) Lambert EH, Eaton LM, Rooke ED. Defect of neuromuscular conduction associated with malignant neoplasms. Am J Physiol 1956;187:612-3.【4.3.11】
8) Wirtz PW, Smallegange TM, Wintzen AR, Verschuuren JJ. Differences in clinical features between the Lambert-Eaton myasthenic syndrome with and without cancer: an analysis of 227 published cases. Clin Neurol Neurosurg 2002;104(4):359-63.【4.3.12】
9) O'Neill JH, Murray NMF, Newsom-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. Brain 1988;111(Pt 3):577-96.【4.3.13】
10) Thomsen RH, Wilson DF. Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at the neuromuscular junction. J Pharmacol Exp Ther 1983;227(1):260-5.【4.3.01】

アミファンプリジンリン酸塩
製造販売承認申請
CTD　第 2 部

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

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....9
2.6.2.3 副次的薬理試験 16
2.6.2.4 安全性薬理試験 28
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用.....34
2.6.2.6 考察及び結論 34
2.6.2.7 図表 36
2.6.2.8 参考文献 37

表の目次

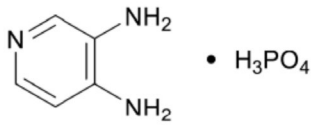
表 2.6.2.2-1 ヒト Kv1.7 電流に対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の阻害作用.....13
表 2.6.2.2-2 ヒト Kv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4 及び Kv1.5 イオンチャネルに対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の阻害作用 ...15
表 2.6.2.3-1 アミファンプリジン及び他のアミノピリジン類によって誘発される律動性収縮 21
表 2.6.2.3-2 種々の動物種の動脈に対するアミファンプリジンの作用.....23
表 2.6.2.4-1 イヌ心血管系安全性薬理試験のデザイン.....30
表 2.6.2.4-2 ラット中枢神経系安全性薬理試験のデザイン.....32
表 2.6.2.4-3 ラット呼吸系安全性薬理試験のデザイン.....33

図の目次

図 2.6.2.2-1 無傷の神経細胞における活動電位及び膜電流に及ぼすアミファンプリジンの影響.....10
図 2.6.2.2-2 シナプス前 APD の延長及び誘発される伝達物質放出に及ぼすアミファンプリジンの影響.....11
図 2.6.2.2-3 シナプトソームにおけるドパミン放出に対するアミファンプリジン及びその他のアミノピリジン系薬剤の作用.....12
図 2.6.2.3-1 自発性及び誘発性ドパミン放出に対する作用.....18
図 2.6.2.3-2 律動性収縮周期長及び持続時間、並びに収縮相の最大張力及び弛緩相の最小張力に対するアミファンプリジンの作用.....22

図 2.6.2.3-3　アミファンプリジン誘発律動性収縮の 10 分後に出現する核周囲空胞 24
図 2.6.2.3-4　ヒト冠動脈に対するアミファンプリジンの作用 25
図 2.6.2.3-5　正常及び肥大心室由来筋細胞の I_{to} に対するアミファンプリジンの作用 27
図 2.6.2.3-6　ラット血圧及び心拍数に対するアミファンプリジンの中枢神経系内投与の作用 28

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替え等
アミファンプリジンリン酸塩	一般名： アミファンプリジンリン酸塩 化学式： $C_5H_7N_3$・H_3PO_4 構造式： 

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
ACh	Acetylcholine	アセチルコリン
APD	Action potential duration	活動電位持続時間
APD_{50} APD_{90}	Action potential duration measured at 50% and 90% of repolarization	50%及び90%再分極時の活動電位持続時間
4-AP	4-Aminopyridine	4-アミノピリジン
APA	Action potential amplitude	活動電位振幅
Ca^{2+}	Calcium	カルシウム
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DAP	Diaminopyridine	ジアミノピリジン
ECG	Electrocardiogram	心電図
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GABA	γ-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLU	Glutamic acid	グルタミン酸
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
hERG	Human ether-á-go-go related gene	ヒト遅延型整流カリウムチャネル遺伝子
5-HT	5-hydroxytryptamine	セロトニン
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
K_{ATP}	ATP-sensitive potassium channel	ATP 感受性カリウムチャネル
I_k	Potassium current	カリウム電流
I_{kr}	Inward rectifying voltage gated potassium channel current	内向き整流性電位依存性カリウムチャネル電流
I_{Na}	Sodium current	ナトリウム電流
K^+	Potassium	カリウム
I_{to}	Transient outward potassium current	一過性外向きカリウム電流
LEMS	Lambert-Eaton myasthenic syndrome	ランバート・イートン筋無力症候群
Na^+	Sodium	ナトリウム
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-メチル-D-アスパラギン酸
PCP	Phencyclidine	フェンシクリジン

略号	省略しない表現	日本語
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QTc	Corrected QT interval	補正 QT 間隔
RMP	Resting membrane potential	静止膜電位
RVL	Rostral ventrolateral medulla	吻側延髄腹外側野
T50% T80%	The time required for the action potential to repolarize 50% and 80% of the way back to resting membrane potential	活動電位が静止膜電位の 50%及び 80%に再分極するまでの時間
TTX	Tetrodotoxin	テトロドトキシン
V_{max}	Maximum rate of rise	最大立ち上がり速度

2.6.2.1 まとめ

非臨床薬理試験では、*in vitro* での効力を裏付ける試験としてヒトカリウム（K^+）チャネル阻害試験 2 試験、*in vitro* での副次的薬理試験として受容体結合及び酵素阻害試験 4 試験、安全性薬理試験として心血管系試験 3 試験、中枢神経系試験 1 試験、呼吸系試験 1 試験において、アミファンプリジンリン酸塩を評価した。残りの薬理学的情報は、アミファンプリジン遊離塩基を評価した関連文献からのデータで裏付けられている。

アミファンプリジンは非特異的な電位依存性の K^+チャネル遮断薬である。神経筋接合部での K^+チャネル阻害は、脱分極が延長し、それに伴ってカルシウム（Ca^{2+}）の流入が増加し、アセチルコリン（ACh）の放出が増加する。アミファンプリジンの平滑筋緊張に対する直接刺激は、アトロピンによって部分的に拮抗されるが [1)]、これはアミファンプリジンの薬理作用（シナプス前 K^+チャネルの遮断による ACh の放出増加）と一致している。

哺乳動物細胞に導入した様々なヒト K^+チャネルを用いた *in vitro* での効力を裏付ける試験では、アミファンプリジンリン酸塩による hKv1.1、hKv1.2、hKv1.3、hKv1.4、hKv1.5 及び hKv1.7 の用量依存的な阻害が示された。ヒト K^+チャネルサブタイプにおけるアミファンプリジンリン酸塩の 50%阻害濃度（IC_{50}）を求めた（試験番号 BMN125-10-111（4.2.1.1.01）及び BMN125-10-112（4.2.1.1.02））。

アミファンプリジンリン酸塩のオフターゲット効果を *in vitro* 受容体結合及び酵素阻害アッセイで評価した（試験番号 BMN125-10-084（4.2.1.2.01）及び BMN125-10-085（4.2.1.2.02））。評価した 29 種類の受容体／チャネル及び 40 種類の酵素パネルに対して、10 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩とインキュベーションしても、有意な反応（50%以上の阻害又は刺激）はみられなかった。これらのパネルスクリーンでは有意な変化はみられなかったが、10 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩とのインキュベーションでは、ATP 感受性 K^+チャネル（K_{ATP}）及びヒト遅延型整流 K^+チャネル遺伝子（hERG）の K^+チャネルでそれぞれ 18%及び 7%の弱い阻害効果がみられた。また、アミファンプリジンリン酸塩の主要代謝物である N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide（3-N-アセチル体）の受容体結合及び酵素阻害プロファイルを評価する試験も実施した（試験番号 100014186（4.2.1.2.03））。その結果、有意な変化はみられなかった。*In vitro* 受容体結合試験では、44 種類の乱用の可能性に関連する受容体、イオンチャネル及び輸送体パネルに対してアミファンプリジンリン酸塩 10 µmol/L 及び 3-N-アセチル体 10 µmol/L のオフターゲット効果の可能性を評価した。その結果、薬理学的に有意な変化はみられなかった（試験番号 100034669（4.2.1.2.04））。

アミファンプリジンリン酸塩の安全性薬理については、心血管系、中枢神経系、呼吸系への影響を評価した。K^+チャネルに対するアミファンプリジンの既知の薬力学的特性を考慮して、2 つの GLP 遵守試験（*in vitro* hERG 試験及び *ex vivo* ウサギプルキンエ線維試験）及びテレメトリー送信器埋め込みイヌにおける心血管系試験（GLP）で心血管系への有害作用の可能性を評価した。

ウサギのプルキンエ線維において、アミファンプリジンリン酸塩は 30 及び 100 µmol/L の濃度で、クラス III の抗不整脈作用がみられたが（試験番号 1710/AGE/03（4.2.1.3.02））、こ

の濃度はヒトに 20 mg を単回投与したときの平均最高血漿中濃度（C_{max}）の 50 倍以上であった。アミファンプリジンリン酸塩は 30 及び 100 µmol/L で有意に 50%（APD_{50}）及び 90%（APD_{90}）再分極時の活動電位持続時間（APD）を延長し、徐脈（0.2 Hz 刺激）時に APD_{90} をそれぞれ 18%及び 40%延長した。このような結果にもかかわらず、アミファンプリジンリン酸塩 30 µmol/L までの濃度（20 mg 投与後のヒトにおけるアミファンプリジン平均 C_{max} 値の約 50 倍）では、hERG 系において内向き整流性電位依存性 K^+チャネル電流（I_{Kr}）に対する影響はみられなかった（試験番号 1711/AGE/03（4.2.1.3.01））。

0.5 mg/kg までのアミファンプリジンリン酸塩を単回経口投与したところ、テレメトリー送信器埋め込みイヌを用いた心血管系試験（GLP）において、PR 間隔の短縮及び動脈圧の上昇が記録された（試験番号 BMN125-10-059（4.2.1.3.03））。イヌを用いた反復投与毒性試験（GLP）において、血圧及び心電図（ECG）に変化はみられなかった（試験番号 [redacted] 266/014（4.2.3.2.08）、[redacted] AA40847（4.2.3.2.09）及び S12032（4.2.3.2.10））。

Irwin 変法を用いた中枢神経系に対する安全性薬理試験（GLP）の結果、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 40 mg/kg まで経口投与しても、検討したいずれのパラメータにおいても、投与に関連した中枢神経系に対する作用はみられなかった（試験番号 20070139PGR（4.2.1.3.04））。

ラットにアミファンプリジンリン酸塩を 10 mg/kg まで単回経口投与したとき、呼吸機能（一回換気量、呼吸数及び分時換気量）に投与に関連した影響はみられなかった（試験番号 BMN125-10-058（4.2.1.3.05））。

要約すると、アミファンプリジンリン酸塩の薬理作用は、その作用機序（電位依存性 K^+チャネルの遮断）によって規定される。一連の受容体、チャネル、酵素に対するオフターゲット効果を評価した結果から、本薬に関連した特異的活性や結合の変化は認められなかった。同様に、アミファンプリジンリン酸塩の代謝物である 3-N-アセチル体についても、オフターゲット効果は認められなかった。

アミファンプリジンの作用機序から過剰な薬理作用の発現が予想されたので、*ex vivo* 心血管系を用いて評価した結果、ヒトと比較して比較的高い曝露濃度で変化がみられた。ラットの Irwin 機能観察試験（GLP）では中枢神経系パラメータに有意な変化はみられず、ラットの呼吸系試験（GLP）では呼吸機能に投与に関連した影響はみられなかった。アミファンプリジンリン酸塩の作用機序からは予想できないことであるが、プルキンエ線維において K^+流出に対する潜在的クラス III の抗不整脈作用が確認された。しかし、APD の延長は、高濃度（30 µmol/L）でみられ、これはヒトでの臨床投与後にみられた濃度（20 mg 単回経口投与後の平均 C_{max} 値は 0.6 µmol/L、DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））よりもはるかに高かった。重要なのは、アミファンプリジンリン酸塩の臨床での補正 QT 間隔（QTc）試験の結果、心血管系のリスクを示す証拠は示されなかったことである（試験番号 QTC-002（5.3.4.1.01）、2.7.2.4.2 項に要約）。テレメトリー送信器埋め込みイヌを用いた心血管系試験（GLP）では、PR 間隔の短縮及び動脈圧の上昇が投与に関連した心血管系への影響として認められた。しかし、心血管リスクの証拠は他の試験系には当てはまらず、30 µmol/L までの濃度による

hERG 試験では影響はみられず、イヌ反復投与毒性試験（GLP）では心伝導の異常はみられなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　作用機序

アミファンプリジンリン酸塩の推定される作用機序は、電位依存性 K^+チャネル遮断である。電位依存性 K^+チャネルの遮断は、シナプス前膜の脱分極を引き起こし、再分極を遅延又は抑制する。長期間の脱分極により、遅い電位依存性 Ca^{2+}チャネル（VGCC）が開口し、それに伴って Ca^{2+}が流入する。細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇すると生化学的機構が活性化され、最終的には ACh 含有シナプス小胞がシナプス間隙に開口放出される [2)]。

ランバート・イートン筋無力症候群（LEMS）患者へアミファンプリジンを投与すると、ACh 放出が増加し、神経筋接合部機能が改善することで筋力の改善という症状緩和が得られる。興味深いことに、LEMS 患者由来の免疫グロブリン G（IgG）を用いた最近の研究では、IgG がラット及びマウス神経細胞の P/Q 型 VGCC に直接作用することが示されており、LEMS 患者由来の IgG が P/Q 型 VGCC に結合することで ACh 放出速度を低下させ、神経筋伝達を障害することが示唆されている [3)]。

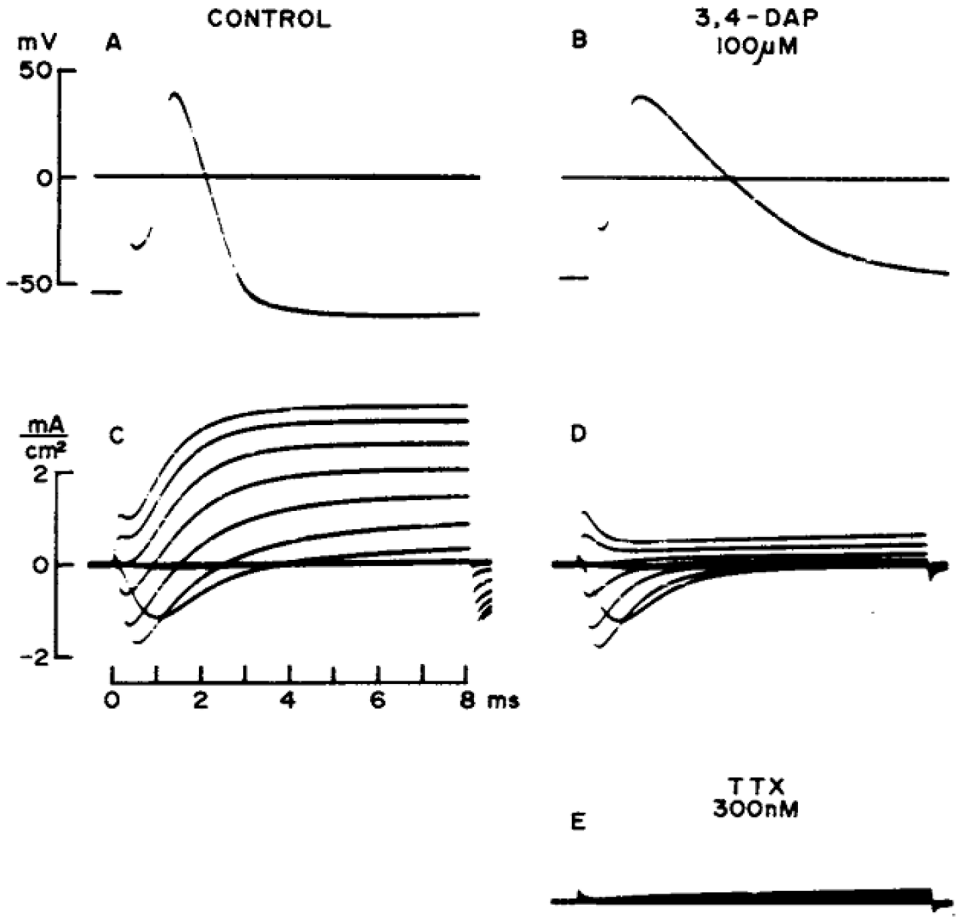
アミファンプリジンの活動電位に及ぼす影響

アミファンプリジンの作用機序は、*in vitro* の手法を用いて明らかにされた。複数の研究者が神経毒に侵された運動神経の内向き及び外向きイオン電流を記録することにより、運動神経終末に対するアミファンプリジンの作用を研究し、アミファンプリジンは神経終末の K^+外向き電流が失われた結果、Ca^{2+}流入を増加させることを示した [4), 5), 6), 7), 8)]。アミファンプリジンにより K^+電流が完全に遮断されると、神経終末の脱分極が延長し、VGCC が正常よりも長時間開口状態を維持した。

運動神経の単離標本と電位固定法を用いた種々の他の試験で、イオン流動、イオンチャネル活性及び結果として生じる運動神経の活動電位が測定された。これらの試験により、アミファンプリジンの K^+チャネルに対する特異性が確認された。特に、イカ（*Loligo pealei*）由来の内部灌流した無傷の巨大軸索を用いて、ダブル軸ワイヤ電極法で、アミファンプリジンが K^+チャネルに特異的に作用することが示された [9)]。アミファンプリジンは、無傷の軸索に適用した場合、活動電位の下降相を延長した（図 2.6.2.2-1A 及び B）。これは、K^+電流（I_k）が著しく減少し、ナトリウム（Na^+）電流（I_{Na}）がほとんど変化しなかったことを示唆している。

最も重要な結果を図 2.6.2.2-1 の C、D、E に示す。ここでは、Na^+チャネル遮断薬であるテトロドトキシン（TTX）とアミファンプリジンを併用適用することで、I_k が完全に消失することが示されている。また、アミファンプリジンは、別の K^+チャネル拮抗薬である 4-アミノピリジン（4-AP）よりも解離定数が高い。これはより強固かつ特異的な結合を示唆していた。

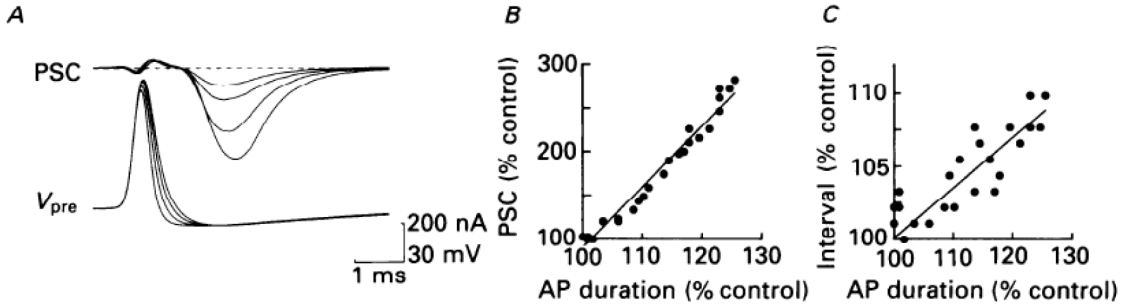
図 2.6.2.2-1　　無傷の神経細胞における活動電位及び膜電流に及ぼすアミファンプリジンの影響



Effects of amifampridine on action potentials (panel A and B) and membrane currents associated with step depolarizations (panel C-E) recorded from an intact axon. Panel A and C are control records before addition of amifampridine. Panels B and D were recorded from the same axon after the addition of 100 µmol/L amifampridine to the external bathing solution. Panel E shows membrane currents after external application of both amifampridine and TTX (300 nmol/L). Holding potential -70 mV. Temperature, 8ºC.[9)]
3,4-DAP: amifampridine
出典：Kirsh GE and Narahashi T (1978)[9)], Figure 1

この結果は Augustine[10)]によって確認された。また、Augustine の研究では、アミファンプリジンリン酸塩はシナプス前スパイクと同様に終板電位の持続時間を延長することも示された（図 2.6.2.2-2）。

図 2.6.2.2-2　　シナプス前 APD の延長及び誘発される伝達物質放出に及ぼすアミファンプリジンの影響



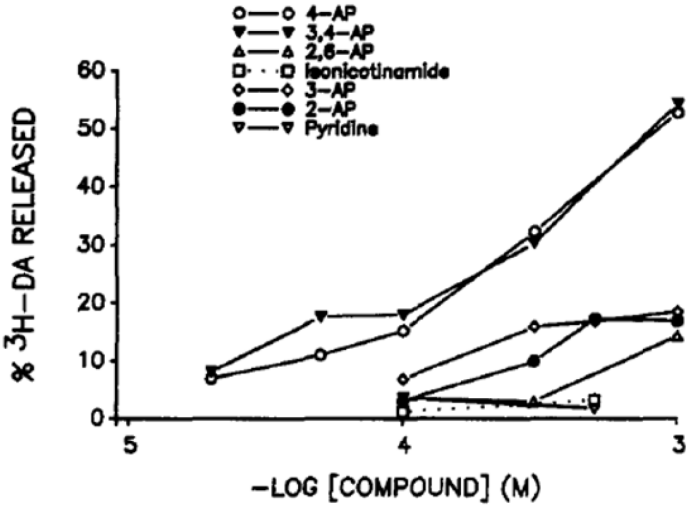
Amifampridine broadens presynaptic action potentials and enhances evoked transmitter release. Panel A, local application of 25 µmol/L amifampridine from an extracellular pipette produced a gradual broadening of the presynaptic action potential (Vpre) and caused an enhancement and increase in the time-to-peak of resultant postsynaptic responses (PSC). Panel B, amifampridine-induced changes in the peak amplitude of PSCs could be described by a linear function with a slope of 6% to 92% change in PSC amplitude per 1% change in action potential (AP) duration [correlation coefficient (r) = 0.99]. Panel C, changes in the time interval between the peaks of the presynaptic action potential and the PSC could be described by a linear function with a slope of 0% to 34% change in interval per 1% change in action potential duration (r = 0.89). All parameters were normalized by dividing by their mean value measured before amifampridine treatment.[10)]
出典：Augustine GJ (1990)[10)], Fig. 6

要約すると、アミファンプリジン及び一般的なアミノピリジン系薬物は、K^+チャネルを遮断することで神経膜の脱分極時間を長くし、VGCC の開口時間を長くすることで細胞内への Ca^{2+}の流入を増強する。アミファンプリジンは閉じた K^+チャネルに結合し、その後、脱分極によってチャネルが開いている間に除去され、再分極によりチャネルが閉じた後、ゆっくりとチャネルに再結合する可能性が高い[10)]。

神経終末での神経伝達物質放出に対するアミファンプリジンの作用

アミノピリジンの作用機序と神経伝達物質放出における活性を明らかにするために、単離した神経終末（シナプトソーム）における ^{3}H-ドパミン放出と $^{45}Ca^{2+}$含量を測定する試験を行った[11)]。アミノピリジンは、ラットのシナプトソーム標本から ^{3}H-ドパミンの放出を誘発し、その作用は 4-AP と同等であり、用量依存的であった（図 2.6.2.2-3）。

図 2.6.2.2-3　　シナプトソームにおけるドパミン放出に対するアミファンプリジン及びその他のアミノピリジン系薬剤の作用



Dose-response curves for various aminopyridines in stimulating ^{3}H-dopamine release from synaptosomes. Values shown are the mean of 3 to 9 experiments; standard deviations are omitted for reasons of clarity.[11)]
4-AP: 4-aminopyridine, 3,4-AP: 3,4-diaminopyridine, 2,6-AP: 2,6-diaminopyridine, 3-AP: 3-diaminopyridine, 2-AP: 2-aminopyridine, ^{3}H-DA: ^{3}H-dopamine
出典：Scheer HW and Lavoie PA (1991)[11)], Fig. 1

アミファンプリジンの筋肉に及ぼす影響

研究者らは、若齢及び老齢の雄 Fischer ラットの横隔膜における静止膜電位、活動電位の高さ、オーバーシュート及び脱分極速度を測定することにより、アミファンプリジンの横隔膜の筋力及び疲労に及ぼす影響を検討した[12)]。

静止膜電位、活動電位の高さ、オーバーシュート、面積、立ち上がり速度は若齢筋と老齢筋で差がなく、アミファンプリジンの影響を受けなかった。逆に、アミファンプリジンは、若齢筋と老齢筋の両方の筋で活動電位の再分極時間を延長させた。若齢筋では、活動電位が静止膜電位の 50%に再分極するまでの時間（T50%）は 181%（$p < 0.05$）、80%に再分極するまでの時間（T80%）は 471%（$p < 0.05$）増加し、老齢筋では T50%は 95%（$p < 0.05$）、T80%は 190%（$p < 0.05$）増加した。

活動電位再分極の遅延の結果、アミファンプリジンは若齢筋の活動電位の面積を 245%（$p < 0.05$）、老齢筋のそれを 86%（$p < 0.05$）増加させた。この違いの機能的な影響を理解するために、短時間（20 Hz）テタニーと単収縮中の筋力をアミファンプリジンの存在下及び非存在下で測定した。アミファンプリジン非存在下では、筋力は若齢筋と老齢筋で同様であったが、アミファンプリジン存在下では、単収縮中の筋力は老齢筋よりも若齢筋で 15%大きかった（$p < 0.05$）。

以上のことから、アミファンプリジンは、ラットの老齢筋よりも若齢筋において活動電位の再分極を遅延させるため、若齢ラットの筋力に対してより強く作用したと考えられる。機能的には、アミファンプリジンによる収縮力の変化は、老齢筋（144%増加）よりも若齢筋（181%増加）で大きかった。しかし、差はわずかであり、老齢筋では変力作用が弱いにも

かかわらず、アミファンプリジンは若齢筋と老齢筋ともにラットの筋収縮性を改善した。このように、アミファンプリジンの薬力学的特性は、高齢患者の LEMS の治療に適していると考えられる。

他の研究者らは、腹腔内投与されたアミファンプリジンは A 型ボツリヌストキシンを投与されたマウスの生存期間を延長することを示した[4]。興味深いことに、これらの著者らは遊離塩基を購入したが、使用前にリン酸塩に変換した。本試験は、リン酸塩を用いて実施された唯一の薬力学試験である。また、アミファンプリジンは麻酔下ネコにおいて抗クラーレ活性を有することが示され、ピペクロニウム及びベクロニウムの作用に拮抗した[13]。

2.6.2.2.2 アミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の溶解度評価並びに哺乳類細胞に発現させたhKv1.7電流に及ぼす影響（試験番号BMN125-10-111（4.2.1.1.01））

本試験の目的は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に一過性に導入したヒト Kv1.7 におけるアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の *in vitro* での作用及び濃度反応関係を検討し、IC_{50} 値を求めることであった。電気生理学的研究に先立ち、調製液中のアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の溶解度を評価した。

アミファンプリジンリン酸塩については 7 濃度（1、10、30、100、300、1000 及び 3000 µmol/L）で、3-N-アセチル体については 3 濃度（100、1000 及び 3000 µmol/L）で濃度反応関係を評価した。3-N-アセチル体については、10000 µmol/L（n=2）での試験も実施したが、この調製液では目にみえる沈殿が観察されたため、これらのデータは適切でないと考えられた。濃度反応データを表 2.6.2.2-1 示す。

陽性対照である 4-AP は 1 mmol/L で hKv1.7 電流を 79.3%（平均、n=2）阻害した。この結果は過去のデータと一致したため、測定系の性能が確認された。

表 2.6.2.2-1　　ヒト Kv1.7 電流に対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の阻害作用

Test Article	Concentration (µmol/L)	Percent Inhibition			IC50 (µmol/L)
		Mean	SD	N	
Amifampridine Phosphate	1	0.5%	0.2%	2	338.4
	10	3.7%	1.1%	2	
	30	10.6%	1.3%	2	
	100	23.9%	0.6%	2	
	300	50.2%	4.2%	2	
	1000	74.2%	0.1%	2	
	3000	81.0%	0.1%	2	
3-N-acetyl Metabolite	100	1.0%	0.1%	2	> 3000
	1000	2.8%	0.8%	2	
	3000	8.4%	1.8%	2	

IC_{50} = median inhibitory concentration; N = number of cells; SD = standard deviation.
試験番号 BMN125-10-111（4.2.1.1.01）の要約中の表を改変

2.6.2.2.3 哺乳類細胞に発現させた hKv1.1、hKv1.2、hKv1.3、hKv1.4 及び hKv1.5 イオンチャネルに対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の影響（試験番号 BMN125-10-112（4.2.1.1.02））

本試験の目的は、以下のイオンチャネルに対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の *in vitro* での作用を検討し、IC_{50} 値を求めることであった。イオンチャネルは、クローン化ヒト Kv1.1 K^+チャネル［ヒト *KCNA1* 遺伝子によりコードされ、ヒト胎児腎臓（HEK）293 細胞に発現］、クローン化ヒト Kv1.2 K^+チャネル（ヒト *KCNA2* 遺伝子によりコードされ、HEK293 細胞に発現）、クローン化ヒト Kv1.3 K^+チャネル（ヒト *KCNA3* 遺伝子によりコードされ、CHO 細胞に発現）、クローン化ヒト Kv1.4 K^+チャネル（ヒト *KCNA4* 遺伝子によりコードされ、HEK293 細胞に発現）及びクローン化ヒト Kv1.5 K^+チャネル（ヒト *KCNA5* 遺伝子によりコードされ、CHO 細胞に発現）であり、超急速活性化遅延整流性 K^+電流に関与している。

アミファンプリジンリン酸塩については、7 濃度（1、10、30、100、300、1000 及び 3000 µmol/L）で、3-N-アセチル体については、3 濃度（100、1000 及び 3000 µmol/L）で濃度反応関係を評価した。アミファンプリジンリン酸塩により hKv1.1、hKv1.2、hKv1.3、hKv1.4 及び hKv1.5 の用量依存的な阻害が示され、その IC_{50} 値を表 2.6.2.2-2 に示す。3-N-アセチル体では IC_{50} 値を求めることができず、3000 µmol/L 超と推定された。

陽性対照である 4-AP は 1 mmol/L で、hKv1.1、hKv1.2、hKv1.3 及び hKv1.4 に対して、その電流をそれぞれ 73.8%、67.0%、76.8%及び 61.0%抑制した（平均、n=2）。hKv1.5 の陽性対照である 4-AP は 2 mmol/L でその電流を 90.2%（平均、n=2）抑制した。これらの結果は過去のデータと一致したため、測定系の性能が確認された。

表 2.6.2.2-2　　ヒト Kv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4 及び Kv1.5 イオンチャネルに対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体の阻害作用

Channel	Test Article	Concentration (μmol/L)	% Inhibition			IC_{50} (μmol/L)
			Mean	SD	N	
hKv1.1	Amifampridine Phosphate	1	1.4%	5.0%	2	767.5
		10	4.6%	1.6%	2	
		30	8.9%	4.9%	2	
		100	22.1%	3.2%	2	
		300	37.6%	1.4%	2	
		1000	53.6%	1.8%	2	
		3000	69.6%	5.4%	2	
	3-N-acetyl Metabolite	100	1.6%	0.8%	2	> 3000
		1000	0.5%	2.0%	2	
		3000	4.0%	3.6%	2	
hKv1.2	Amifampridine Phosphate	1	0.8%	1.1%	2	1278.8
		10	-0.1%	1.5%	2	
		30	-3.4%	5.1%	2	
		100	6.4%	7.4%	2	
		300	24.3%	1.8%	2	
		1000	43.3%	0.7%	2	
		3000	68.6%	4.8%	2	
	3-N-acetyl Metabolite	100	-2.2%	2.7%	2	> 3000
		1000	5.0%	5.7%	2	
		3000	2.2%	0.2%	2	
hKv1.3	Amifampridine Phosphate	1	0.1%	1.6%	2	524.8
		10	7.4%	3.2%	2	
		30	3.8%	1.7%	2	
		100	19.0%	0.5%	2	
		300	43.2%	6.9%	2	
		1000	61.2%	10.0%	2	
		3000	79.7%	1.5%	2	
	3-N-acetyl Metabolite	100	-2.0%	1.8%	2	> 3000
		1000	-0.1%	3.2%	2	
		3000	19.5%	3.9%	2	
hKv1.4	Amifampridine Phosphate	1	-1.8%	2.0%	2	1860.3
		10	3.8%	0.6%	2	
		30	-0.5%	4.6%	2	
		100	0.0%	1.8%	2	
		300	12.1%	2.6%	2	
		1000	24.4%	4.7%	2	
		3000	69.2%	1.4%	2	
	3-N-acetyl Metabolite	100	7.1%	4.8%	2	> 3000
		1000	13.6%	0.3%	2	
		3000	21.5%	3.6%	2	
hKv1.5	Amifampridine Phosphate	1	0.8%	2.7%	2	490.8
		10	6.2%	2.0%	2	
		30	8.7%	5.2%	2	
		100	30.4%	3.5%	2	
		300	39.3%	2.7%	2	
		1000	59.8%	8.6%	2	
		3000	77.8%	2.2%	2	
	3-N-acetyl Metabolite	100	-0.3%	0.2%	2	> 3000
		1000	4.5%	4.3%	2	
		3000	2.7%	4.7%	2	

IC_{50} = median inhibitory concentration; N = number of cells; SD = standard deviation.
試験番号 BMN125-10-112（4.2.1.1.02）の要約中の表を改変

2.6.2.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験として、アミファンプリジンリン酸塩の受容体結合又は酵素阻害プロファイルを検討した複数の *in vitro* 試験を実施した。また、アミファンプリジンリン酸塩の主要代謝物である 3-N-アセチル体についても同様の *in vitro* 試験を実施し、受容体結合及び酵素阻害プロファイルを評価した。その他、文献の研究を追加して示した。

2.6.2.3.1　Hit Profiling Screen：アミファンプリジンリン酸塩のオフターゲット効果（試験番号 BMN125-10-084（4.2.1.2.01））

本試験の目的は、アミファンプリジンのオフターゲット効果を、一連の *in vitro* 受容体結合試験で評価することであった。

アミファンプリジンリン酸塩を 29 種類の異なる受容体又はチャネルベースの細胞系とインキュベートした。各々の *in vitro* スクリーニングアッセイは、アミファンプリジンリン酸塩を 10 µmol/L の公称濃度で標的受容体又はチャネルベースの細胞系とインキュベートし、これを 2 回繰り返した。測定結果は、特異的結合又は活性の阻害率又は刺激率として示した。有意な反応は 50%以上の阻害又は刺激と定義した。

評価した 29 種類の受容体／チャネルにおいて、アミファンプリジンリン酸塩の 10 µmol/L では、有意な阻害又は刺激のいずれの反応もみられなかった。今回のパネルスクリーンでは有意な変化はみられなかったが、10 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩は、K_{ATP} 及び hERG の K^+チャネルをそれぞれ 18%及び 7%阻害した。アミファンプリジンリン酸塩は α_{1A} アドレナリン受容体（21%）及び Na^+チャネル・サイト 2（24%）に対して弱い刺激作用を示した。

2.6.2.3.2　Delta Adverse-Enzyme Profiling Screen：デルタ有害酵素プロファイルスクリーニング（試験番号 BMN125-10-085（4.2.1.2.02））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩の各種酵素活性に及ぼす影響を、一連の *in vitro* 酵素阻害試験で検討することであった。

アミファンプリジンリン酸塩を 40 種類の異なる酵素ベースの細胞系とインキュベートした。各々の *in vitro* スクリーニングアッセイは、アミファンプリジンリン酸塩を 10 µmol/L の公称濃度で標的酵素とインキュベートし、これを 2 回繰り返した。測定結果は、活性の阻害率又は刺激率として示した。有意な反応は 50%以上の阻害又は刺激と定義した。

評価した 40 種類の酵素において、アミファンプリジンリン酸塩の 10 µmol/L では、有意な阻害又は刺激のいずれの反応もみられなかった。アミファンプリジンリン酸塩は、プロテインセリン／スレオニンホスファターゼ PPP3CA（47%）及びプロテインセリン／アルギニンリッチキナーゼ SRPK1 活性（29%）に対して弱い刺激作用を示した。

2.6.2.3.3　Hit Profiling Screen：アミファンプリジンリン酸塩の代謝物である 3-N-アセチル体のオフターゲット効果（試験番号 100014186（4.2.1.2.03））

本試験の目的は、3-N-アセチル体の *in vitro* 受容体結合アッセイパネル、並びに阻害及び取り込みの可能性を評価するための酵素パネルに対するオフターゲット効果を評価することであった。

アミファンプリジンの 3-N-アセチル体を 38 種類の異なる受容体又はチャネルベースの細胞系とインキュベートした。各 *in vitro* スクリーニングアッセイは、3-N-アセチル体を公称濃度 10 µmol/L で標的受容体又はチャネル細胞とインキュベートした。測定結果は、特異的結合又は活性の阻害率又は刺激率として示した。有意な反応は 50%以上の阻害又は刺激と定義した。

評価した 38 種類の受容体／チャネルにおいて、3-N-アセチル体の 10 µmol/L では、有意な阻害又は刺激のいずれの反応もみられなかった。このパネルスクリーニングでは有意な変化は観察されなかったが、3-N-アセチル体は 10 µmol/L でエンドセリン A 型受容体に対して弱い（40%）阻害作用を示した。

In vitro の酵素阻害アッセイのパネルから得られた結果では、10 µmol/L の 3-N-アセチル体とインキュベートしても、活性の有意な阻害や刺激はみられなかった。

2.6.2.3.4　Hit Profiling Screen：アミファンプリジンリン酸塩とその 3-N-アセチル体のオフターゲット活性（試験番号 100034669（4.2.1.2.04））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体が、乱用の可能性のある標的を含む *in vitro* 受容体結合アッセイのパネルに対して、オフターゲット効果を示すかを評価することであった。

アミファンプリジンリン酸塩と 3-N-アセチル体を 44 種類の異なる受容体、イオンチャネル又は輸送体ベースの細胞系とインキュベートした。評価対象とした受容体、チャネル、輸送体は、FDA Guidance for Industry: Assessment of Abuse Potential of Drugs（2017）に概説されている中枢神経系標的タイプであり、例えば、ドパミン、セロトニン（5-HT）、γ-アミノ酪酸（GABA）、オピオイド（δ、κ、µ サブタイプ）、ベンゾジアゼピン、フェンシクリジン（PCP）、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）、カンナビノイド（CB1 及び CB2 サブタイプ）などである。各 *in vitro* スクリーニング試験では、標的受容体、チャネル、輸送体をアミファンプリジンリン酸塩 10 µmol/L 又は 3-N-アセチル体 10 µmol/L とインキュベートし、これを 2 回繰り返した。測定結果は、特異的結合又は活性の阻害率又は刺激率として示した。有意な反応は、50%以上の阻害又は刺激と定義した。

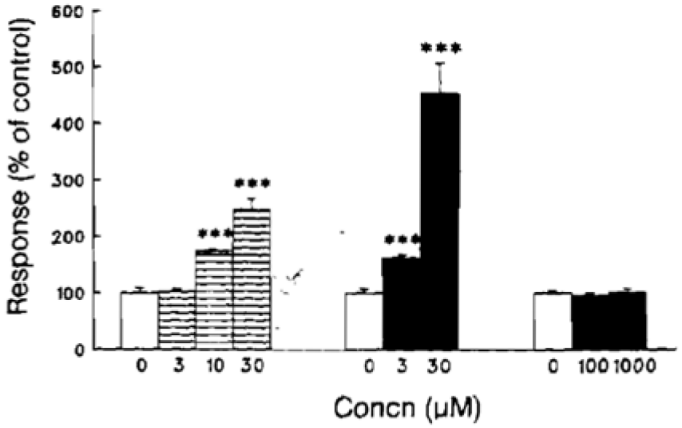
評価した 44 種類の受容体／チャネル／輸送体において、アミファンプリジンリン酸塩 10 µmol/L 及び 3-N-アセチル体 10 µmol/L とのインキュベーションでは、有意な阻害又は刺激のいずれの反応もみられなかった。

2.6.2.3.5　中枢神経系におけるドパミン放出 [14)]

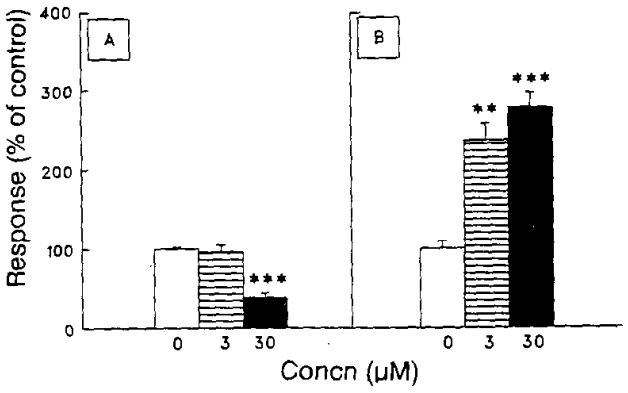
ラット線条体切片における ^{3}H-ドパミン放出に対するアミファンプリジンの作用をパルギリン及びノミフェンシン（各々10 µmol/L）の存在下で検討した。

図 2.6.2.3-1A に示すように、アミファンプリジン（3 及び 30 µmol/L）は用量依存的に自発性 ^{3}H-ドパミン放出を増加させたが、テトラエチルアンモニウム（100 及び 1000 µmol/L）は影響を及ぼさなかった。自発性放出に対するアミファンプリジンの促進作用は、Ca^{2+}及び K^{+}に依存していた。さらに、ドパミン放出は TTX により消失したことから、電位依存性 Na^{+}チャネルも放出メカニズムに関与していることが示された。アミファンプリジンにより、K^{+}脱分極による ^{3}H-ドパミン放出は抑制され、ベラトリジン（5 µmol/L）による ^{3}H-ドパミン放出は増加した（図 2.6.2.3-1B）。

図 2.6.2.3-1　　自発性及び誘発性ドパミン放出に対する作用



Panel A: Effects of 4-AP (3, 10, 30 µmol/L) (left), amifampridine (3, 30 µmol/L) (center) and tetraethylammonium (100, 1000 µmol/L) (right) on spontaneous release of ^{3}H-dopamine. Results are Sp2/Sp1 ratios expressed as % of respective control values. Each data point represents the mean ± standard error of the mean of 4 to 6 determinations. *** p<0.001, Student's t-test.[14)]



Panel B: Effects of amifampridine on evoked ^{3}H-dopamine release. A: K^{+} depolarization (25 mmol/L). B: Veratridine depolarization (5 µmol/L). Results are S2/Sl ratios expressed as % of respective control values. Each data point represents the mean ± standard error of the mean of 4 to 6 determinations. ** p<0.0l; *** p<0.001, Student's t-test.[14)]
出典：Boireau A et al. (1991)[14)], Fig. 1 (Panel A) 及び Fig. 4 (Panel B)

いくつかの実験で、アミファンプリジンが脳における神経伝達物質放出を増強することが示されているので、次に、アミファンプリジンを用いて ACh、グルタミン酸（GLU）及びドパミンのアップレギュレーションについて評価した。実験の結果、無酸素状態では Ca^{2+}存在下でドパミン及び GLU 放出が増加したが、ACh 放出は抑制された [15]。無酸素状態の培養液から Ca^{2+}を除去すると、GLU 及びドパミン放出がさらに亢進され、ACh 放出が抑制された。正常状態では、アミファンプリジン（100 μmol/L）は 3 つの神経伝達物質すべての放出を増加させた。

しかし、アミファンプリジンに対する線条体切片の感受性はプレインキュベーション培地中のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の有無により変化した。

無酸素インキュベーション中、アミファンプリジンは無酸素誘発、K^+刺激による ACh 放出障害を改善しなかったが、K^+刺激による GLU とドパミンの放出を有意に減少させた。これらの結果は、低酸素がシナプス前欠損を誘発し、それがシナプス後の虚血誘発性変化の背景にあるという仮説と一致する。神経伝達物質放出におけるこれらのシナプス前変化の改善は、低酸素誘発損傷を防止する有効なアプローチであるかもしれない。

2.6.2.3.6　血管・心筋に対する作用

ウサギ及びイヌの冠動脈及び腎動脈に対するアミファンプリジンの作用を評価した文献があり、その結果を本項で紹介する。

2.6.2.3.6.1　動脈平滑筋に対する作用 [16), 17), 18)]

弓状動脈平滑筋細胞の膜電位を決定する K^+チャネルの種類を明らかにするために、単離細胞のパッチクランプ記録と、雄ウサギの無傷で加圧された腎弓状動脈の内腔径の測定を行った [16]。アミファンプリジンを K^+チャネル遮断薬として用いた場合、アミファンプリジン感受性遅延整流性 K^+チャネル電流が脱分極によって誘発されることが示されたが、無傷動脈における静止電位又は収縮は影響を受けなかった。

平滑筋弛緩の機序を理解するために、他の研究者らはアミファンプリジンを K^+チャネル遮断薬として用い、イヌ摘出冠動脈左前下行枝の K^+収縮標本に律動性収縮を誘発し、この冠動脈律動性収縮モデルを用いてアデノシンと Ca^{2+}チャネル遮断薬の区別を試みた [17]。左冠動脈を心筋から摘出し、付着している結合組織を除去し、2 mm 幅のリングに切断した。新鮮なリングをステンレス鋼の保持器に取り付け、酸素化 Krebs-Henseleit 溶液を入れた 10 mL の臓器浴槽中でインキュベートした。リングの等尺性張力を張力トランスデューサーで測定し、記録した。持続的で再現性のある律動性収縮が得られた後、種々の薬物を累積的に槽内に添加し、濃度反応曲線を得た。本試験では、アミファンプリジンを用いると律動性収縮が誘発され、アデノシンとその類縁体の弛緩作用は Ca^{2+}チャネル遮断薬のそれらとは明らかに区別された。

他の実験では、アミファンプリジンが種々の動物種の異なる動脈に律動性収縮を誘発する可能性が研究された [18]。簡単に述べると、狭心症患者における律動性冠動脈れん縮の基

礎をなす機序を理解するために、著者らは K^+チャネルを遮断する薬剤によりイヌ摘出冠動脈において律動性収縮が誘発されるかどうかを検討した。アミファンプリジン濃度が 10^{-2} mol/L の場合、すべての症例でイヌ冠動脈の律動性収縮が誘発された。濃度が低いほど、律動性収縮はまれであるか、又はみられなかった。また、ヒト、ブタ、サルの冠動脈、イヌの脳底動脈、頸動脈、腎動脈、大腿動脈において律動性収縮を引き起こした。冠動脈の律動性収縮の周期長は 30 秒から 1 時間であった。

形態学的には、冠動脈平滑筋に血管れん縮の特徴的変化である核周囲空胞化がみられた。これらの律動性収縮は、TTX、アトロピン、フェントラミン、ヨヒンビンによって阻害されなかったが、K^+チャネルを活性化するニコランジルと遅い Ca^{2+}チャネルを遮断するニフェジピンによって消失した。K^+チャネル遮断薬は律動性動脈収縮に関与することが示唆された。

主に雑種犬の冠動脈を用い、冠動脈リングを等尺性トランスデューサーに接続して張力を記録計に記録した。3 系列の実験を行った。

第 1 系列では、2.5×10^{-2} mol/L KCl に対する反応を最初に測定し、次に K^+チャネル遮断薬（アミファンプリジンなど）を栄養液中に添加して律動性収縮を記録した。観察 2 時間以内に律動性収縮が生じなかった場合には、収縮を誘発できないと判断した。第 2 系列では、静止張力とアミファンプリジンによる律動性収縮のピーク張力との相関を検討した。第 3 系列では、27 例のイヌから得られた 27 標本を用いて、周期長（1 回の収縮の開始から次の収縮まで）、収縮の持続時間（収縮の開始から弛緩の開始まで）、収縮相のピーク張力及び弛緩相の最小張力の経時変化を調べた。

同様に、イヌ摘出脳底動脈、頸動脈、腎動脈、大腿動脈のアミファンプリジンに対する反応を調べた。心外膜冠動脈も摘出し、アミファンプリジンに対する反応を調べた。また、ブタ、アカゲザル、ヒト死体から心外膜冠動脈を摘出した。血管れん縮の特徴的変化である平滑筋細胞の核周囲空胞を電子顕微鏡検査で評価した。

表 2.6.2.3-1 に示すように、アミファンプリジン 1×10^{-2} mol/L を適用すると、イヌ冠動脈標本のすべてで律動性収縮が誘発された。1×10^{-2} mol/L 未満では律動性収縮の出現頻度が低くなり、アミファンプリジンが 3×10^{-4} mol/L 以下になると消失した。2 g 静止張力下の標本では、律動性収縮の出現に要する時間は 3～70 分（48 ± 10 分、n=27）であった。

アミファンプリジン誘発律動性収縮の変化の経時変化を 27 標本で調べた。律動性収縮の出現後 30 分から 2 時間以内に、多ピーク収縮から単一ピーク収縮への移行がみられた。11 時間の観察期間中、弛緩相の周期長、収縮持続時間、ピーク張力、張力は変化しなかった（図 2.6.2.3-2）。収縮持続時間と周期長は動物間で異なっていたが、所定の標本では通常一定であった。収縮持続時間は 30 秒～80 分であった。収縮中に固定したイヌ 7 標本すべてにおいて、平滑筋の大部分に核周囲空胞がみられた（図 2.6.2.3-3）。

これらの変化は、アミファンプリジン非存在下で K^+収縮が起こった場合には観察されなかった。Ca^{2+}フリー溶液では、アミファンプリジンは収縮を誘発しなかった。律動性収縮を誘発するのに必要な Ca^{2+}濃度は、3×10^{-4}～1.5×10^{-3} mol/L であった。

アミファンプリジンによる律動性収縮は冠動脈に特異的ではなく、脳底動脈、頸動脈、腎動脈及び大腿動脈のいずれの標本においても誘発された（表 2.6.2.3-2）。収縮誘発に必要なアミファンプリジンの濃度は、すべての動脈で同一であった。

ブタ及びアカゲザルでは、アミファンプリジンの 6×10^{-3} mol/L 又はそれ以上で冠動脈の律動性収縮が誘発された（表 2.6.2.3-2A）。周期長はイヌ冠動脈と差がなかった。

また、ヒトにおいてもアミファンプリジンは律動性収縮を誘発することができた（表 2.6.2.3-2B）。1 人の死体から採取した 2 つの標本では、K^+収縮に使用した溶液を除去した後に律動性収縮が発現した。他の標本では、6×10^{-3}～10^{-2} mol/L のアミファンプリジンにより律動性収縮が誘発された（表 2.6.2.3-2）。周期長は 30 秒～6 分で、発生張力は 2.5 g までの範囲であった（図 2.6.2.3-4）。

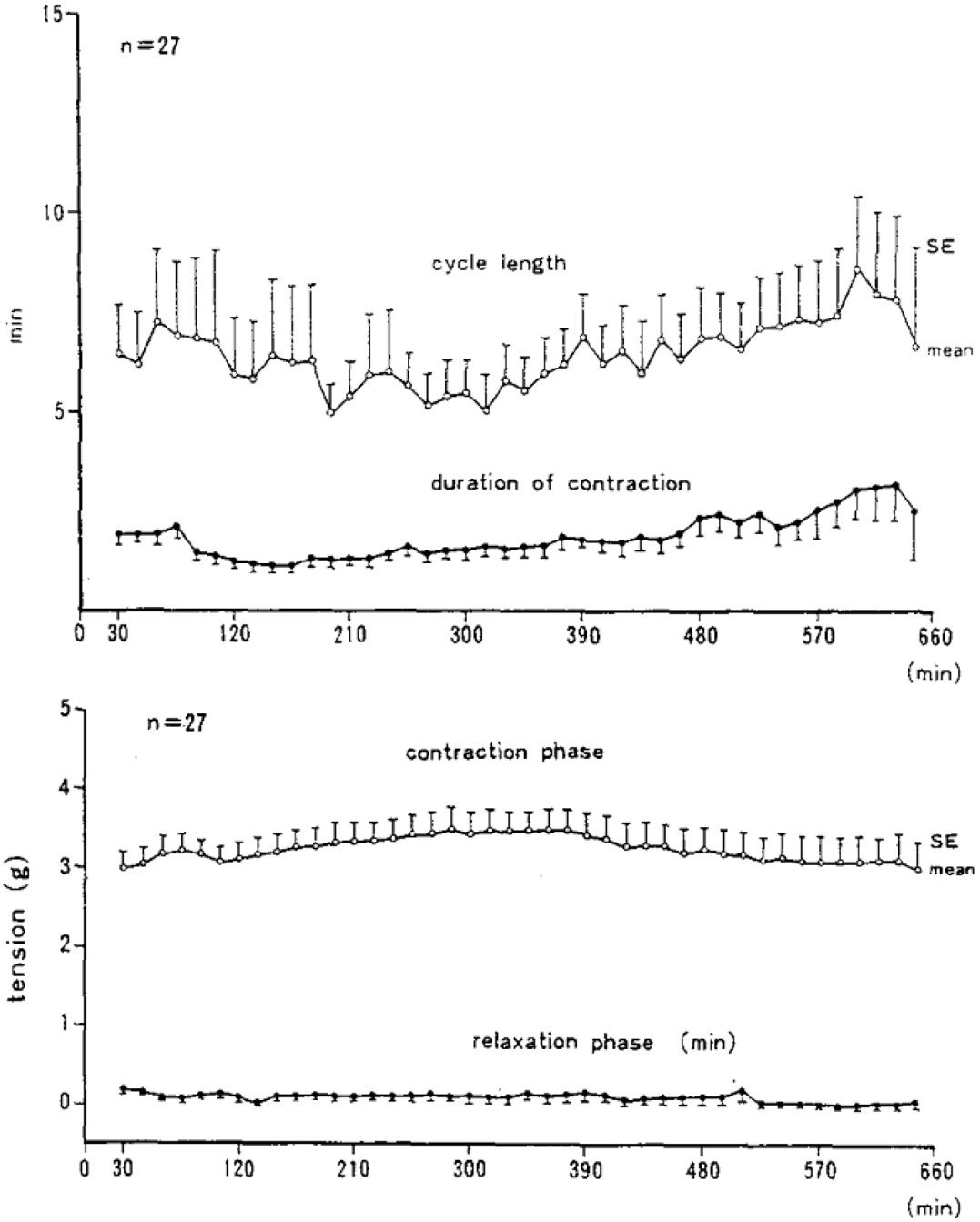
アミファンプリジン及び他の K^+チャネル遮断薬は、*in vitro* で律動性動脈収縮を誘発することが示唆された。しかし、これには患者でみられる血漿中濃度よりもはるかに高い濃度が必要である。

表 2.6.2.3-1　　アミファンプリジン及び他のアミノピリジン類によって誘発される律動性収縮

Test Material	Concentration (mol/L)	Phasic Contractions[a]
2-AP	10^{-3} 3×10^{-3} 10^{-2}	0/2 0/2 0/2
3-AP	10^{-3} 3×10^{-3} 10^{-2}	0/1 0/3 0/6
4-AP	10^{-3} 3×10^{-3} 10^{-3}	0/3 0/3 2/9
2,3-DAP	10^{-2}	0/3
2,5-DAP	10^{-3} 10^{-2}	0/5 0/5
2,6-DAP	10^{-2}	0/3
3,4-DAP (amifampridine)	10^{-4} 3×10^{-4} 10^{-3} 6×10^{-3} 10^{-2}	0/3 0/2 1/12 2/6 11/11
TEA	10^{-3} 10^{-2} 1.5×10^{-2}	0/6 1/8[b] 4/7[b]

a　Number of preparations in which phasic contractions were induced/total number of the preparations tested.
b　Transient.
AP: aminopyridine, DAP: diaminopyridine, TEA: tetraethylammonium
出典：Uchida Y et al. (1986)[18], Table I（一部改変）

図 2.6.2.3-2　　律動性収縮周期長及び持続時間、並びに収縮相の最大張力及び弛緩相の最小張力に対するアミファンプリジンの作用



Upper figure: time-course of changes in cycle length and duration of contraction of amifampridine-induced phasic contractions of canine coronary arteries. Lower figure: time-course of changes in peak tension during the contraction phase and minimum tension during the relaxation phase.[18)]
SE: Standard error
出典：Uchida Y et al. (1986)[18)], Fig. 3 及び Fig. 4

表 2.6.2.3-2　　種々の動物種の動脈に対するアミファンプリジンの作用

A. Phasic Contractions Induced by Amifampridine[a]				
	Concentration of Amifampridine (mol/L)			
	10^{-3}	**3×10^{-3}**	**6×10^{-3}**	**10^{-2}**
Dog				
femoral artery	0/3	0/3	0/3	2/3
carotid artery	0/3	0/3	1/3	2/3
basilar artery	0/5	1/5	1/5	3/5
renal artery	0/3	0/3	1/3	2/3
Pig				
coronary artery	0/4	0/4	1/4	2/4
Rhesus monkey				
coronary artery	0/4	0/4	0/4	4/4
basilar artery	1/2	0/2	1/2	NA
B. Phasic Contractions of Human Coronary Artery[a]				
1) Spontaneous	8/28 (7 cadavers)			
2) Amifampridine induced	**Concentrations of Amifampridine (mol/L)**			
	10^{-3}	**3×10^{-3}**	**6×10^{-3}**	**10^{-2}**
	0/20	0/20	5/20	15/20 (6^{b})

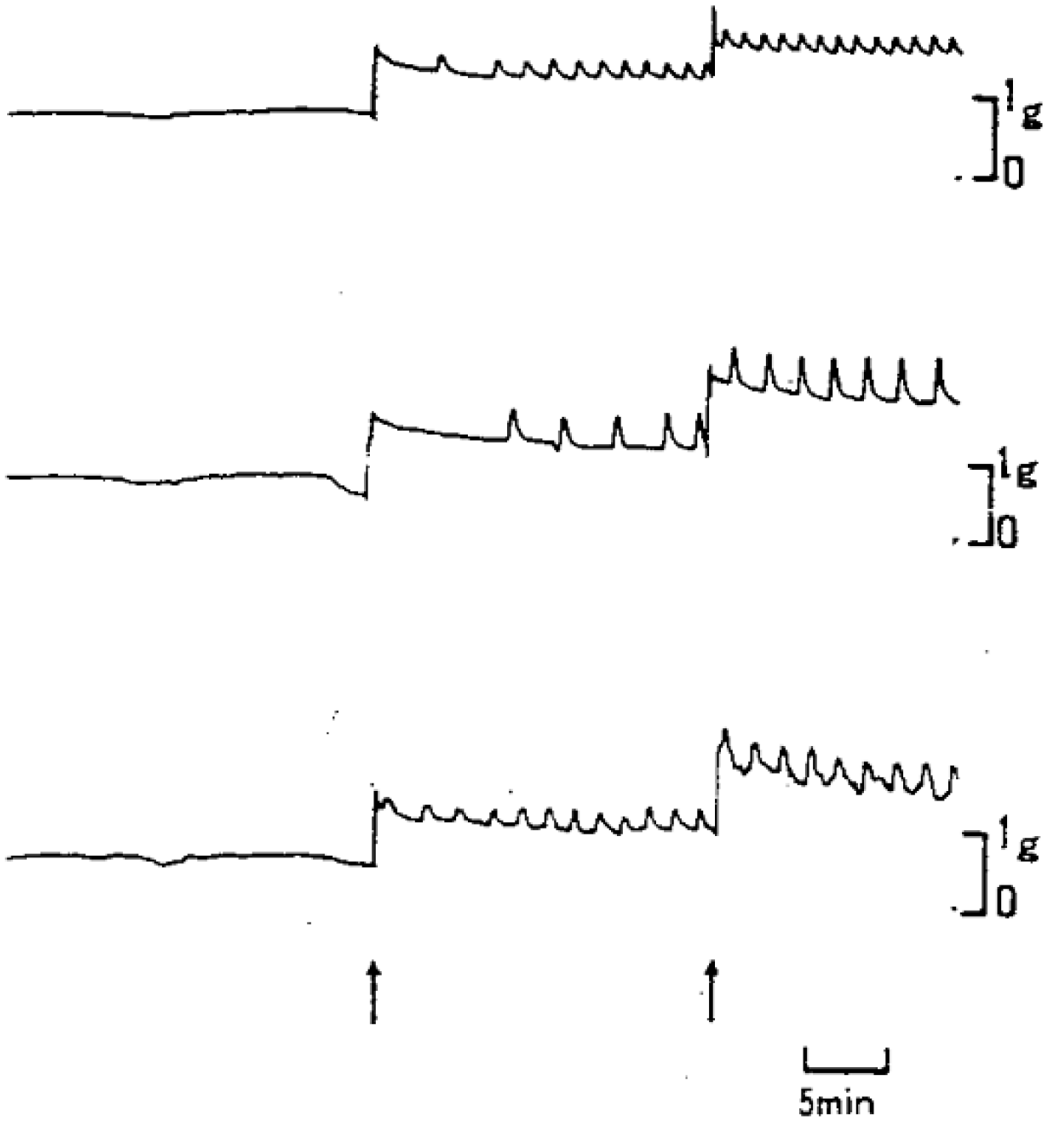
a Number of preparations in which phasic contractions were induced/total number of the preparations tested.
b Phasic contractions were replaced by tonic ones.
NA: Not applicable
出典：Uchida Y et al. (1986)[18], Table II（一部改変）

図 2.6.2.3-3　　アミファンプリジン誘発律動性収縮の 10 分後に出現する核周囲空胞



Electron microscopic changes in canine circular coronary smooth muscles caused by amifampridine. Upper panel: control. Lower panel: 30 min after appearance of phasic contractions. Arrows indicate perinuclear vacuoles. Horizontal bar at the bottom indicates 10 μm.[18)]
出典：Uchida Y et al. (1986)[18)], Fig. 7

図 2.6.2.3-4　　ヒト冠動脈に対するアミファンプリジンの作用



Three adjacent rings of the left anterior descending coronary artery removed from a cadaver (61 year old male). Phasic contractions were induced by elevation of the resting tension in all of these preparations.[18)]
出典：Uchida Y et al. (1986)[18)], Fig. 6

2.6.2.3.6.2　心筋細胞に対する作用 [19)]

心肥大に伴う活動電位延長の根拠となる一過性外向き K^+電流（I_{to}）の変化を検討する試験を実施した[19)]。成熟雄フェレットの慢性的な肺動脈収縮により右室肥大を誘発した。4～6 週間後、心臓を切除し、動脈狭窄手術及び擬似手術（対照）動物の右心室から酵素処理により単一筋細胞を単離した。I_{to} は、ホールセルパッチクランプ法を用いて記録した。−90 mV の保持電位から 10 mV ずつ 500 ms の脱分極パルスを 0.1 Hz の周波数で適用し、一過性外向き電流を誘発した。

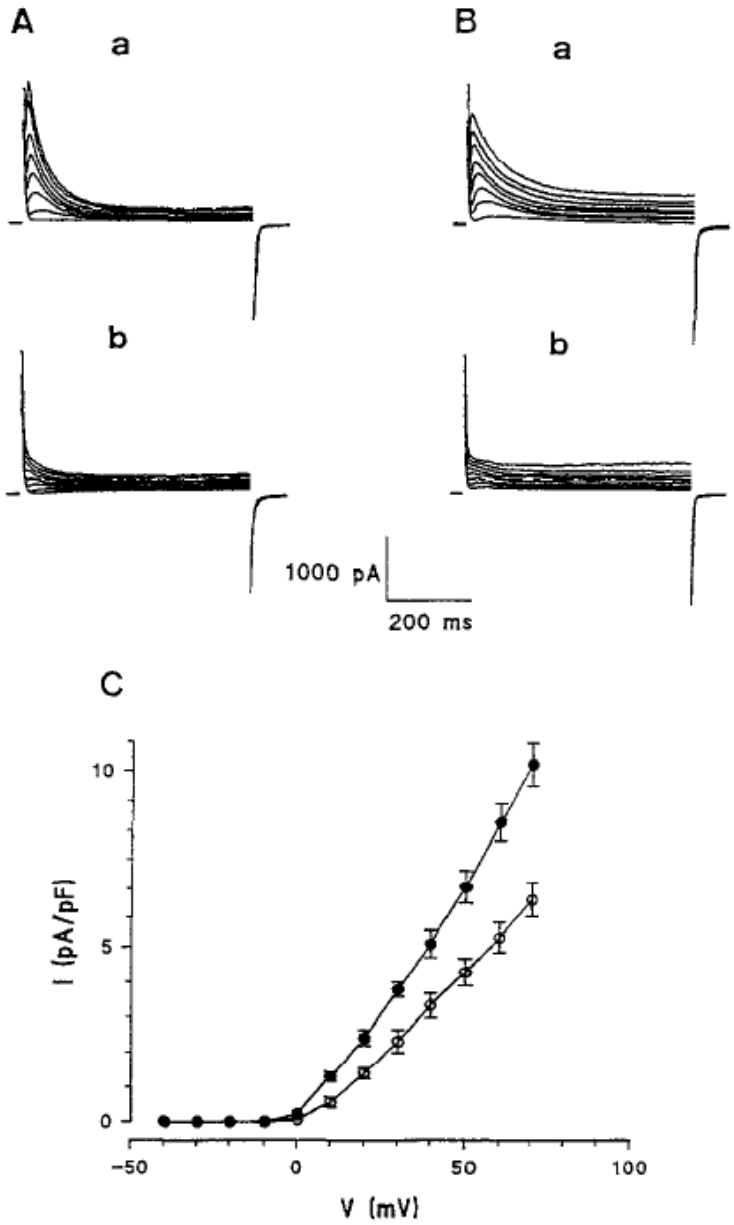
図 2.6.2.3-5 の A、B は、対照細胞（A）及び試験液を表面潅流させた肥大細胞（B）において、0 から+70 mV までの脱分極ステップで得られた典型的な I_{to} の記録を示し、アミファ

ンプリジン 3 mmol/L 添加後の記録である。その結果、(1) 細胞の大きさは増大しているものの、肥大した筋細胞では正常筋細胞に比べて I_{to} のピーク振幅が減少していること、(2) いずれの場合もアミファンプリジンによりほぼ完全に I_{to} が抑制されていること、(3) 肥大により電流のアミファンプリジン非感受性成分が増加していることが示された。電流／電位関係からさらに、I_{to} の密度（それぞれの膜容量に対して正規化）が正常細胞と比較して肥大細胞で減少し、両電流は同様の電位依存性を示すことが確認された（図 2.6.2.3-5C）。肥大した筋細胞では、対照の筋細胞と比較して I_{to} 減衰の経時変化が遅い。I_{to} を直接解析したところ、両群の細胞において、その不活化相はすべての電位において単一指数関数でよく表されていた。直接フィット解析によって得られた平均不活化時定数 τ を電位の関数としてプロットした。この曲線から、τ はどちらの群の細胞でも基本的に+20～+70 mV の範囲で電位非感受性であったが、肥大した筋細胞では対照の筋細胞よりも有意に高かった。

要約すると、この結果から Ca^{2+}非依存性でアミファンプリジンに感受性のある一過性外向き電流が、圧力負荷による肥大でみられた APD の延長に関与する唯一ではないが主要な電流であることが明確に示唆された。

これらのデータは、I_{to} 密度の低下は、機能的なチャネルが過剰に発現していないことに起因するという仮説を支持するものであり、動態パラメータの変化は、筋線維膜タンパク質のコンフォメーション変化によって説明できる。このような I_{to} の変化は、肥大した心臓の電気的機能と収縮機能の両方を制御する重要な因子であると考えられる。

図 2.6.2.3-5　　正常及び肥大心室由来筋細胞の I_{to} に対するアミファンプリジンの作用



Voltage-dependent transient outward current in hypertrophied cells compared to normal controls. A and B: representative current traces recorded during 500 ms depolarizing steps from 0 to +70 mV (10 mV increments, Holding potential = –90 mV) applied at 0.1 Hz before (a) and after (b) addition of 3 mmol/L amifampridine in control (A) and hypertrophied cells (B). C; Relationship between peak I_{to}, current density and voltage in control (filled circles) and hypertrophied cells (open circles) respectively. Data points are expressed as mean values ± standard error of the mean from 16 cells in each group.[19)]
出典：Potreau D et al. (1995)[19)], Fig. 1

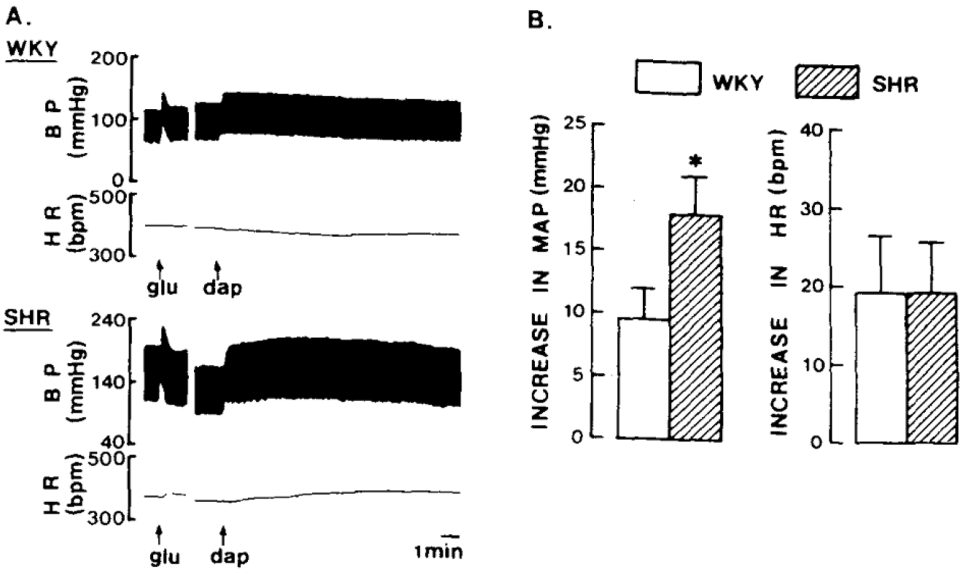
2.6.2.3.7　心血管系に対する作用 [20)]

アミファンプリジンは血圧を上昇させることが示されている [1)]。他の研究チームは、正常血圧 Wistar-Kyoto ラット（WKY）及び高血圧自然発症ラット（SHR）を用いて、心血管系の中枢調節における吻側延髄腹外側野（RVL）に存在する ACh 受容体の役割など、血圧に

対するアミファンプリジンの作用機序を研究した[20]。RVL へのアミファンプリジン（500 pmol/site）の片側微量注入により、WKY、SHR ともに昇圧及び頻脈がみられた（図 2.6.2.3-6B）。アミファンプリジンによる血圧変化は、SHR ではベースラインから平均 18.2 ± 2.9 mmHg（n=13、$p < 0.001$）、WKY では 9.4 ± 2.5 mmHg（n=13、$p < 0.01$）であり、血圧変化は WKY よりも SHR で有意に大きかった。アミファンプリジンは頻脈も誘発し、その変化は SHR ではベースラインから平均 19.2 ± 6.7 bpm（n=13、$p < 0.05$）、WKY では 19.2 ± 6.9 bpm（n=13、$p < 0.05$）であり、正常血圧動物と高血圧動物との間に有意差はみられなかった。

要約すると、RVL に投与したアミファンプリジンに対する心血管反応は、RVL の昇圧神経細胞を神経支配するコリン作動性神経細胞の終末から放出される内因性 ACh を介している可能性があると考えられた。

図 2.6.2.3-6　　ラット血圧及び心拍数に対するアミファンプリジンの中枢神経系内投与の作用



Effect of amifampridine microinjection into the RVL on blood pressure (BP) and heart rate (HR, bpm; beats per min). (A) RVL was functionally identified by microinjection of L-glutamate (glu, 1 nmol/site) then of amifampridine (dap, 500 pmol/site) into the same site. (B) Changes in mean arterial pressure (MAP) and HR after unilateral microinjection of amifampridine (500 pmol/site) into the RVL of the WKY and the SHR. The values are means ± standard error. *p<0.05, compared with WKY animals, Student's t-test.[20]
出典：Lee SB et al. (1991)[20], Fig. 3

2.6.2.4　安全性薬理試験

2.6.2.4.1　心血管系に対する作用

2.6.2.4.1.1　CHO-K1 細胞の hERG K^+電流に及ぼすアミファンプリジンリン酸塩の影響（試験番号 1711/AGE/03（4.2.1.3.01））

本 *in vitro* 試験（GLP）の目的は、アミファンプリジンリン酸塩が、hERG によりコードさ

れる I_{Kr} に対する作用を評価することにより、QT 延長を引き起こす可能性があるかどうかを明らかにすることであった。

アミファンプリジンリン酸塩 0.3 mmol/L 原液を潅流液（150 mmol/L NaCl、4 mmol/L KCl、1.2 mmol/L $CaCl_2$、1 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L Hepes、pH 7.4）で調製した。この溶液を希釈し、最終濃度を 0.3、3 及び 30 µmol/L とした。hERG を導入した CHO-K1 細胞は、ホールセルパッチクランプ実験のために、滅菌した組織培養プレートでダルベッコ改変イーグルス培地 F12（DMEM-F12）を用いて、5%CO_2 を含む加湿環境下、37°C で培養した。培養した個々の細胞を、潅流チャンバー内のカバーガラス上に置き、対照緩衝液（潅流液）で潅流し、細胞からの電気生理学的シグナルを記録した。表面潅流液による対照記録後、少なくとも 5 個の細胞をアミファンプリジンリン酸塩の 3 段階の漸増濃度（0.3、3 及び 30 µmol/L）で曝露した。3 個の細胞を陽性対照（E-4031、3 µmol/L）に曝露した。

E-4031 は電流を完全に阻害（96%）したが、アミファンプリジンリン酸塩は 30 µmol/L までの濃度で阻害しなかった。0.3、3 及び 30 µmol/L でのアミファンプリジンリン酸塩の平均阻害率は、それぞれ 0%、3%及び 4%であった。アミファンプリジンリン酸塩が hERG K^+電流に影響を与えなかったため、IC_{50} 値を求めることができなかった。

結論として、アミファンプリジンリン酸塩は、30 µmol/L までの濃度（ヒトでのアミファンプリジンリン酸塩 20 mg 投与後の平均 C_{max} 値の約 50 倍、DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））で、hERG CHO-K1 細胞の K^+電流に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.1.2　ウサギプルキンエ線維の APD に及ぼすアミファンプリジンリン酸塩の影響（試験番号 1710/AGE/03（4.2.1.3.02））

本 *ex vivo* 試験（GLP）の目的は、ウサギプルキンエ線維の APD に及ぼすアミファンプリジンリン酸塩の影響を評価することであった。

雌ニュージーランド白色ウサギの左心室からプルキンエ線維を採取した。摘出したプルキンエ線維を 36°C、2.5 mL/min で潅流した組織浴槽に取り付け、静止膜電位が−60 mV に達するまで 10 分間安定化させた。2 Hz で 20 分間電気的ペーシングを行い、その後安定するまで 1 Hz で刺激した。APD_{50} 及び APD_{90}、活動電位振幅（APA）、最大立ち上がり速度（V_{max}）及び静止膜電位（RMP）に及ぼすアミファンプリジン 0.1、1.0、10 及び 30 µmol/L の影響を 2 つの別々の実験で測定した。対照のベースラインを 30 分間記録した後、各プルキンエ線維をアミファンプリジンの各濃度に 30 分間、漸増して曝露した。まず、2 つの標本を 0.1、1、10 及び 30 µmol/L に曝露し、次に 4 つの標本を 1、10、30 及び 100 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩に曝露した。陽性対照（キニジン、10 µmol/L）は、最高濃度のアミファンプリジン曝露の 20 分後に投与した。ベースライン対照期間と 4 回の各テスト期間中、20〜25 分の間に刺激周波数を 1 Hz から 0.2 Hz（徐脈）に変化させた。

1 Hz 及び 0.2 Hz での刺激後、キニジンは対照期間と比較して APD_{50} 及び APD_{90} を有意に増加させたことから、測定系の性能が確認された。1 Hz と 0.2 Hz の刺激後、アミファンプリジンリン酸塩は 30 及び 100 µmol/L で有意に APD_{50} 及び APD_{90} を延長し、徐脈（0.2 Hz 刺

激）時に APD_{90} をそれぞれ 18%及び 40%延長した。アミファンプリジンリン酸塩は APA、V_{max} 及び RMP に影響を及ぼさなかった。

以上より、高濃度のアミファンプリジンリン酸塩（30 及び 100 µmol/L）は、徐脈の場合と同様に 1 Hz の刺激頻度を用いた場合にも APD を増加させ、このことはおそらく K^+チャネルの遮断を示している。ウサギのプルキンエ線維において、アミファンプリジンリン酸塩 30 及び 100 µmol/L でクラス III の抗不整脈作用がみられたが、この濃度はヒトに 20 mg を投与した際に得られた平均 C_{max} 値（DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））の 50 倍以上であった。

2.6.2.4.1.3　テレメトリー送信器埋め込みイヌにおける心血管系に及ぼすアミファンプリジンリン酸塩経口投与の影響（試験番号 BMN125-10-059（4.2.1.3.03））

本 *in vivo* 試験（GLP）の目的は、テレメトリー送信器埋め込みビーグル（雄）に、アミファンプリジンリン酸塩をラテン方格投与法で経口投与した際の心血管系への影響を評価することであった。

本試験のために、8 例の雄ビーグルを 2 組の（4 × 4）ラテン方格クロスオーバーデザインに割り当てた。各動物には、投与期間の 1、4、9、12 日目に 4 用量のうち 1 用量を所定の順序で投与した。ラテン方格法による投与法では、すべての投与レベルが 4 回の投与日のそれぞれに投与され、同じ投与量を 2 回以上受けた動物はおらず、各方格に同じ投与順序を示した動物は 2 例もいないことが保証された。投与調製液は強制経口投与した。各投与日に媒体（純水）又はアミファンプリジンリン酸塩 0.05、0.15 及び 0.50 mg/kg（アミファンプリジン遊離塩基用量として、それぞれ 0.03、0.08 及び 0.26 mg/kg に相当）を投与し、投与容量は 5 mL/kg とした。試験デザインを表 2.6.2.4-1 に示す。死亡率、一般状態観察、定性的摂餌量、体重及び体温に基づき、動物の全身健康状態を評価した。

表 2.6.2.4-1　　イヌ心血管系安全性薬理試験のデザイン

Treatment	Dose Level (mg/kg)	Free Base Equivalents Dose Level (mg/kg)	Dose Volume (mL/kg)	Dose Concentration (mg/mL)[b]
Control[a]	0.00	0.00	5	0.00
Low	0.05	0.03	5	0.01
Mid	0.15	0.08	5	0.03
High	0.50	0.26	5	0.10

a　Control animals received vehicle control article.
b　Dose concentrations were based on the test article as supplied (phosphate salt); a correction factor was not used.
試験番号 BMN125-10-059（4.2.1.3.03）の要約中の表を改変

心血管機能は、血行動態（心拍数、動脈血圧、左室拡張末期圧及び dP/dt_{max}）及び ECG パラメータ（RR 間隔、QT 間隔、QTc、PR 間隔及び QRS 持続時間）について評価した。テレメトリーデータは、投与前に少なくとも 90 分間、投与開始後少なくとも 7 時間連続して収

集した。連続データ収集後、動物飼育室の消灯時間の終了時（投与後少なくとも 19 時間）まで、テレメトリーデータを 60 分ごとに少なくとも 15 分間記録した。ECG 及び血行動態パラメータは、投与後 7 時間までは 1 時間平均値、投与後 8～19 時間までは 3 時間平均値として解析した。投与前、投与後約 0.5、2、4、8 及び 18 時間に、ECG 波形を定性的に評価した。データは、解析のために試験室の明暗サイクルで分けた。

死亡及び病的状態はみられず、すべての動物は試験終了時まで生存した。アミファンプリジンリン酸塩は一般状態、定性的摂餌量、体重及び体温に明らかな影響を及ぼさなかった。

アミファンプリジンリン酸塩はすべての用量で、PR 間隔の共変量で調整した総平均値を用量依存的に有意に短縮した；0.50 mg/kg で−8%という大きな PR 間隔短縮がみられた。PR 間隔に対する作用は、投与後 10～13 時間までに消失すると考えられた。アミファンプリジンリン酸塩は QRS 持続時間、QT 間隔及び QTc に明らかな影響を及ぼさず、アミファンプリジンリン酸塩に起因すると考えられる定性的な ECG 波形の異常はみられなかった。

アミファンプリジンリン酸塩は 0.15 又は 0.50 mg/kg で、主に投与後 1～3 時間まで、共変量で補正した総平均動脈圧を+7%と軽度に上昇させた。その他の血行動態への影響はアミファンプリジンリン酸塩ではみられなかった。

アミファンプリジンリン酸塩の血漿中曝露量は、1:3:10 の用量比に対して 1:3:8 の比で用量相関性及び用量比例性がみられ、適切に投与されていることが確認された。

結論として、心血管機能に対するアミファンプリジンリン酸塩の影響の可能性を評価するために、8 例のテレメトリー送信器埋め込み雄イヌに媒体又はアミファンプリジンリン酸塩 0.05、0.15 又は 0.50 mg/kg を、2 組のラテン方格試験デザインで強制経口投与した。アミファンプリジンリン酸塩は、死亡及び病的状態、一般状態観察、定性的摂餌量、体重、心拍数及び体温に有意な影響を及ぼさなかった。アミファンプリジンリン酸塩投与により、PR 間隔は最大−8%短縮し、動脈圧は最大+7%上昇した。

2.6.2.4.1.4　CHO-K1 細胞の hERG K^+電流に及ぼすアミファンプリジンリン酸塩の代謝物である 3-N-アセチル体の影響（試験番号 100014186（4.2.1.2.03））

hERG を導入した CHO-K1 細胞を用いてオートパッチクランプ法により hERG 電流に対する作用を 3-N-アセチル体の 0.01～100 µmol/L の濃度で検討した。3-N-アセチル体は濃度依存的に hERG 電流を抑制し、IC_{50} 値は 39 µmol/L であった。

NAT2 遺伝子型に基づくアセチル化速度の表現型が fast acetylator の健常成人に対して本剤 1 回 30 mg を経口投与した臨床試験（FIR-001 試験、CTD 5.3.3.1.01）における 3-N-アセチル体の C_{max} は 350 ng/mL であり、非結合型 C_{max} はヒト血漿中タンパク結合率がアミファンプリジンと同じ（8%～12%）と仮定して計算すると 2.02～2.12 µmol/L である。hERG 電流抑制作用の IC_{50} 値はその約 20 倍と高濃度であることから臨床使用時に hERG 電流に対する作用が発現する可能性は低いと考えられる。

2.6.2.4.2　中枢神経系

2.6.2.4.2.1　ラットにおけるアミファンプリジンリン酸塩単回経口投与後の行動試験（Irwin 変法）（試験番号 20070139PGR（4.2.1.3.04））

本試験（GLP）の目的は、アミファンプリジンリン酸塩をラットに単回経口投与した場合の神経学的影響を評価することであった。試験デザインを表 2.6.2.4-2 に示す。

表 2.6.2.4-2　　ラット中枢神経系安全性薬理試験のデザイン

Group	Treatment[a]	Dose[b] (mg/kg)	Dosing Frequency	No. and Gender per Group
1	Vehicle[d]	0	Once	8M
2	Positive Control[c]	3	Once	8M
3	Amifampridine Phosphate	5	Once	8M
4	Amifampridine Phosphate	10	Once	8M
5	Amifampridine Phosphate	20	Once	8M
6	Amifampridine Phosphate	40	Once	8M

a　amifampridine phosphate lot #[redacted].
b　Groups 1-6 were dosed at a volume of 10 mL/kg.
c　Clonidine, 3 mg/kg, oral.
d　1% (w/v) carboxymethylcellulose in water.
M　male
試験番号 20070139PGR（4.2.1.3.04）の Table 1 を改変

雄 Wistar ラットは 6～8 週齢で、試験開始時の体重は 165.2～193.7 g であった。動物を 6 群に割り付け、アミファンプリジンリン酸塩を単回経口投与した。アミファンプリジンリン酸塩 40 mg/kg（アミファンプリジン遊離塩基用量 21 mg/kg に相当）を Irwin 試験の最高用量としたのは、ラットに 50 mg/kg を単回経口投与すると、重度の臨床症状がみられ、4 例中 1 例が死亡したためである（試験番号 [redacted] 266/004（4.2.3.1.03））。

Irwin 変法を用い、合計 58 の異なるパラメータについて各動物を神経行動学的に観察した。アミファンプリジンの C_{max} 及び消失半減期を含めるため、投与前、投与後 5、30、60、120 及び 240 分に動物を観察した。アミファンプリジンの曝露は、1 群 9 例のサテライト動物からなる 4 群で、投与前、投与後 5、10、15、30、60、120、240 及び 360 分に血液を採取して評価した。

投与後 24 時間の予定終了まで、全例が生存した。アミファンプリジンリン酸塩投与群のいくつかの神経行動学的パラメータは統計学的に有意であった。その内訳は、投与後 1 時間での自発運動が消失した動物数の増加（20 及び 40 mg/kg）、投与後 2 時間での指アプローチに対する反応の増加（40 mg/kg）、投与後 30 分での立ち上がり回数の減少（10 mg/kg）であった。しかし、これらの変化はわずかで軽微なものであり、偶発的な変動（発現率が低く、用量又は時間依存性がみられないこと）に起因するものと考えられた。アミファンプリジンリン酸塩は、いずれの用量においても体温に影響を及ぼさなかった。血漿中アミファンプリ

ジンの定量により、投与前の動物の血漿中にアミファンプリジンは存在せず、アミファンプリジンリン酸塩投与動物が用量依存的に本薬に曝露されたことが示された。

結論として、雄 Wistar ラットにおけるアミファンプリジンリン酸塩の単回経口投与での無毒性量は 40 mg/kg であった。

2.6.2.4.3　呼吸系

2.6.2.4.3.1　ラット呼吸系に及ぼすアミファンプリジンリン酸塩経口投与の影響（試験番号 BMN125-10-058（4.2.1.3.05））

本試験（GLP）の目的は、アミファンプリジンリン酸塩を強制経口投与により単回投与した際の、一回換気量、呼吸数及び分時換気量によって示される呼吸機能への影響の可能性を、雄ラットを用いて評価することであった。さらに、雄ラットを用いて、アミファンプリジンリン酸塩の強制経口投与による単回投与の被験物質曝露分析を実施した。

雄 Sprague-Dawley ラットを表 2.6.2.4-3 に示す試験デザインに従って割り付け、表に示す用量を投与した。

表 2.6.2.4-3　　ラット呼吸系安全性薬理試験のデザイン

Group	No. of Animals	Dose Level	Free Base Equivalents Dose Level	Dose Concentration[c,d]
	Male	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/mL)
Plethysmography Animals[a]				
1 (Control)[b]	8	0	0.00	0.00
2 (Low)	8	1	0.58	0.20
3 (Mid)	8	3	1.58	0.60
4 (High)	8	10	5.27	2.00
Test Article Exposure Animals[a]				
1 (Control)[b]	3	0	0.00	0.00
2 (Low)	3	1	0.58	0.20
3 (Mid)	3	3	1.58	0.60
4 (High)	3	10	5.27	2.00

a　Plethysmography animals were designated as Subgroup 1. Test article exposure animals were designated as Subgroup 2.
b　Group 1 animals received vehicle control article only (reverse osmosis water).
c　Animals were dosed at a volume of 5 mL/kg.
d　Dose concentrations were based on the test article as supplied (phosphate salt); a correction factor was not used.
試験番号 BMN125-10-058（4.2.1.3.05）の要約中の表を改変

呼吸機能の評価は、一回換気量、呼吸数、分時換気量の解析に基づいて行った。ベースラインのプレチスモグラフィーデータは、投与前日に少なくとも 2.5 時間連続して収集した。プレチスモグラフィーパラメータは、ベースライン時、投与後 0.5～6 時間、投与後約 24 時間に解析した。さらに、死亡及び症状観察に基づいて一般状態を評価した。体重は、投与容量の算出のためだけに測定した。

投与後 2 日目に予定安楽死するまで、全動物が生存した。アミファンプリジンリン酸塩のいずれの用量においても、死亡及び一般状態の異常はみられなかった。一回換気量、呼吸数及び分時換気量に本薬に関連した変化はみられなかった。

アミファンプリジンの血漿中曝露量は用量の増加に伴い増加したが、1:3:10 の用量比で曝露量は 1:4:19 となり、用量比を上回った。曝露量の分析結果から動物に本薬が適切に投与されたことが示された。

以上、雄 Sprague-Dawley ラットを用い、アミファンプリジンリン酸塩を純水に溶解して 1、3 及び 10 mg/kg で単回経口投与したときの呼吸機能への影響及び血漿中曝露量を評価した。一般状態及び呼吸機能（一回換気量、呼吸数及び分時換気量）は、投与後 0.5～6 時間及び投与後約 24 時間にモニターした。投与後の死亡はなく、一般状態、呼吸系パラメータの測定値に本薬に関連した影響はみられなかった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用を検討した非臨床試験は実施していない。

2.6.2.6　考察及び結論

アミファンプリジンリン酸塩の薬理作用は、その作用機序、すなわち電位依存性 K^+チャネルの遮断によって定義される。

非臨床薬理試験プログラムでは、*in vitro* での効力を裏付ける試験 2 試験（ヒト K^+チャネル阻害試験）、*in vitro* での副次的薬理試験 4 試験（受容体結合及び酵素阻害試験）、安全性薬理試験 5 試験（心血管系：3 試験、中枢神経系：1 試験、呼吸系：1 試験）において、アミファンプリジンリン酸塩を評価した。薬理情報の残りの部分は、アミファンプリジン遊離塩基を評価した関連文献のデータで確認されている。これらの研究はアミファンプリジン遊離塩基を用いて行われたが、(a) アミファンプリジンリン酸塩が生理的条件下で遊離塩基に変換することから、リン酸塩でも同様の結果が予想される、(b) アミファンプリジンは、遊離塩基として投与してもリン酸塩として投与しても、同様の薬物動態（PK）特性を有する。これはラット及びイヌを用いた 2 つの PK 試験で示されている（試験番号 [redacted] 266/008（4.2.2.2.06）及び [redacted] 266/009（4.2.2.2.02））。

LEMS 患者の治療に関連したアミファンプリジンの薬理学的プロファイルとその作用機序については、公表文献に記載されている。本項では、作用機序及び薬力学的作用との関連性を裏付ける証拠として、主要な研究の文献に基づいた概要を示している。

アミファンプリジンは、非特異的な電位依存性 K^+チャネル遮断薬である。神経筋接合部での K^+チャネルの抑制は、脱分極の延長とそれに伴う Ca^{2+}の流入を引き起こし、その結果 ACh の放出が増加する。アミファンプリジンの平滑筋緊張に対する直接刺激は、アトロピンによって部分的に拮抗されるが [1]、これはアミファンプリジンの提唱されている薬理作用（すなわち、シナプス前 K^+チャネルの遮断を介した ACh の放出増加）と一致している。

哺乳動物細胞に導入した一連のヒト K^+チャネルを用いた *in vitro* での効力を裏付ける試

験では、アミファンプリジンリン酸塩による hKv1.1、hKv1.2、hKv1.3、hKv1.4、hKv1.5 及び hKv1.7 の用量依存的な阻害が示された。アミファンプリジンリン酸塩の IC_{50} 値を、各ヒト K^+チャネルサブタイプについて求めた（試験番号 BMN125-10-111（4.2.1.1.01）及び BMN125-10-112（4.2.1.1.02））。

アミファンプリジンリン酸塩のオフターゲット効果を評価した 2 試験で、一連の *in vitro* 受容体結合及び酵素阻害アッセイを実施した（試験番号 BMN125-10-084（4.2.1.2.01）及び BMN125-10-085（4.2.1.2.02））。評価した 29 種類の受容体／チャネル及び 40 種類の酵素パネルに対して、10 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩とインキュベーションしても、有意な反応（50%以上の阻害又は刺激）はみられなかった。これらのパネルスクリーンでは有意な変化はみられなかったが、10 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩とのインキュベーションで、K_{ATP} 及び hERG の K^+チャネルがそれぞれ 18%及び 7%と軽度に阻害された。同様の *in vitro* 試験（試験番号 100014186（4.2.1.2.03））で、アミファンプリジンリン酸塩の 3-N-アセチル体のオフターゲット効果の可能性を、*in vitro* の受容体結合アッセイパネルと、阻害及び取り込みの可能性を評価する酵素パネルを用いて評価した結果、有意な変化はみられなかった。別の *in vitro* 受容体結合試験（試験番号 100034669（4.2.1.2.04））では、乱用の可能性のある標的（例えば、ドパミン、5-HT、GABA、オピオイド、ベンゾジアゼピン、PCP、NMDA、カンナビノイド）を含む 44 種類の広範囲にわたる受容体、イオンチャネル又は輸送体に対するアミファンプリジンリン酸塩及び 3-N-アセチル体のオフターゲット効果の可能性を評価した結果、薬理学的に有意な作用は示されなかった。

アミファンプリジンは伝達に関わるイオンチャネルに作用することから、心筋や血管平滑筋への作用及び ACh 放出の特徴についても文献を調べた。アミファンプリジンリン酸塩（1～10 mmol/L、*in vitro*）は、高濃度では、心伝導を変化させ、ヒトを含む数種の動物種の異なる動脈に律動性収縮を誘発した [18]。

なお、*in vitro* で効果がみられなかった用量（1 mmol/L）と予想されるヒトでの平均最大血漿中濃度（C_{max}：20 mg 単回経口投与で約 0.6 µmol/L、DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））との間には、かなりの安全域（約 170 倍）があることから、この知見は臨床症状とは関係ないと考えられる。

アミファンプリジンリン酸塩の安全性薬理については、心血管系、中枢神経系及び呼吸系へ及ぼす影響を評価した。K^+チャネルに対するアミファンプリジンの既知の薬力学的特性を考慮して、心血管系に対する悪影響の可能性を GLP 遵守の 2 試験（*in vitro* hERG 試験及び *ex vivo* ウサギプルキンエ線維試験）及びテレメトリー送信器埋め込みイヌにおける心血管系試験（GLP）において評価した。

ウサギプルキンエ線維において、アミファンプリジンリン酸塩の 30 及び 100 µmol/L でクラス III の抗不整脈作用がみられたが（試験番号 1710/AGE/03（4.2.1.3.02））、これはヒトに 20 mg を単回投与したときの平均 C_{max} 値の 50 倍以上であった。アミファンプリジンリン酸塩は 30 及び 100 µmol/L で有意に APD_{50} 及び APD_{90} を延長し、徐脈（0.2 Hz 刺激）時に APD_{90} をそれぞれ 18%及び 40%延長した。この所見にもかかわらず、アミファンプリジンリン酸

塩を 30 µmol/L までの濃度（20 mg 投与後のヒトにおけるアミファンプリジンの平均 C_{max} 値の約 50 倍）を投与しても、hERG 系の I_{Kr} に及ぼす影響はみられなかった（試験番号 1711/AGE/03（4.2.1.3.01））。

アミファンプリジンリン酸塩を 0.5 mg/kg まで単回経口投与したところ、テレメトリー送信器埋め込みイヌで PR 間隔の短縮、動脈圧の上昇などの作用がみられた（試験番号 BMN125-10-059（4.2.1.3.03））。しかし、イヌを用いた反復投与毒性試験（GLP）において、血圧及び ECG に変化はみられなかった（試験番号 [redacted] 266/014（4.2.3.2.08）、[redacted] AA40847（4.2.3.2.09）及び S12032（4.2.3.2.10））。

中枢神経系に対する安全性薬理を検討した Irwin 試験（試験番号 20070139PGR（4.2.1.3.04））の結果、ラットに 40 mg/kg までのアミファンプリジンリン酸塩を経口投与しても、検討したいずれのパラメータにおいても、投与に関連した有意な中枢神経系作用はみられなかった。

アミファンプリジンリン酸塩を 10 mg/kg まで単回経口投与したとき、ラットの呼吸機能（一回換気量、呼吸数及び分時換気量）に投与に関連した影響はみられなかった（試験番号 BMN125-10-058（4.2.1.3.05））。

要約すると、アミファンプリジンリン酸塩の薬理作用は、その作用機序、すなわち電位依存性 K^+チャネルの遮断によって規定される。一連の受容体、チャネル、酵素に対するオフターゲット効果の評価から、本薬に関連した特異的活性や結合の有意な変化は明らかにされていない。アミファンプリジンの作用機序より過剰な薬理作用が予測されたことから、*in vitro* での心血管系を用いて評価した結果、ヒトと比較して比較的高い曝露濃度で変化がみられた。ラットの Irwin 機能観察試験（GLP）において中枢神経系パラメータの有意な変化はみられず、ラットの呼吸系試験（GLP）では呼吸機能に対して投与に関連した影響はみられなかった。アミファンプリジンリン酸塩の作用機序からは予想できないことだが、プルキンエ線維において K^+流出に対するクラス III の抗不整脈作用が確認された。しかし、その結果としての APD の延長は、高濃度（30 µmol/L）で観察されたが、これはヒトでの臨床投与後にみられた濃度（20 mg 単回経口投与後の平均 C_{max} 値は 0.6 µmol/L、DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））をはるかに上回るものだった。重要なことに、アミファンプリジンリン酸塩を用いた臨床 QTc 試験の結果から、心血管リスクの証拠は示されなかった（試験番号 QTC-002（5.3.4.1.01）、2.7.2.4.2 項の要約）。テレメトリー送信器埋め込みビーグルを用いた心血管系試験（GLP）では、PR 間隔の短縮及び動脈圧の上昇がみられた。しかし、このリスクは他の試験系には当てはまらなかった。hERG 試験では 30 µmol/L まで影響はみられず、イヌ反復投与毒性試験（GLP）では心伝導の異常はみられなかった。

2.6.2.7　図表

本文の適切な場所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1) Vohra MM, Pradhan SN. Pharmacology of 3,4-diaminopyridine. Arch Int Pharmacodyn Ther 1964;150:413-24.【4.3.02】
2) Thomsen RH, Wilson DF. Effects of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine on transmitter release at the neuromuscular junction. J Pharmacol Exp Ther 1983;227:260-5.【4.3.01】
3) Spillane J, Ermolyuk Y, Cano-Jaimez M, Lang B, Vincent A, Volynski KE, et al. Lambert-Eaton syndrome IgG inhibits transmitter release via P/Q Ca^{2+} channels. Neurology 2015;84:575-9.【4.3.04】
4) Siegel LS, Johnson-Winegar AD, Sellin LC. Effect of 3,4-diaminopyridine on the survival of mice injected with botulinum neurotoxin type A, B, E, or F. Toxicol Appl Pharmacol 1986;84:255-63.【4.3.14】
5) Simpson LL. A preclinical evaluation of aminopyridines as putative therapeutic agents in the treatment of botulism. Infect Immun 1986;52:858-62.【4.3.15】
6) Rowan EG, Harvey AL. Potassium channel blocking actions of β-bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals. Br J Pharmacol 1988;94:839-47.【4.3.16】
7) Molgó J, Dasgupta BR, Thesleff S. Characterization of the actions of botulinum neurotoxin type E at the rat neuromuscular junction. Acta Physiol Scand 1989;137:497-501.【4.3.17】
8) McGivern J, Scholfield CN, Dolly JO. Action of α-dendrotoxin on K^+ currents in nerve terminal regions of axons in rat olfactory cortex. Br J Pharmacol 1993;109:535-8.【4.3.18】
9) Kirsch GE, Narahashi T. 3,4-diaminopyridine. A potent new potassium channel blocker. Biophys J 1978;22:507-12.【4.3.19】
10) Augustine GJ. Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. J Physiol 1990;431:343-64.【4.3.08】
11) Scheer HW, Lavoie PA. Mechanism of aminopyridine-induced release of [^{3}H]dopamine from rat brain synaptosomes. Gen Pharmacol 1991;22:169-72. 【4.3.20】
12) van Lunteren E, Moyer M. Electrophysiologic and inotropic effects of K^+-channel blockade in aged diaphragm. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:820-6.【4.3.21】
13) Riesz M, Kápáti E, Szporny L. Antagonism of non-depolarising neuromuscular blockade by aminopyridines in cats. J Pharm Pharmacol 1986;38:156-8.【4.3.22】
14) Boireau A, Richard F, Olivier V, Aubeneau M, Miquet JM, Dubédat P, et al. Differential effects of potassium channel blockers on dopamine release from rat striatal slices. J Pharm Pharmacol 1991;43:798-801.【4.3.23】
15) Freeman GB, Mykytyn V, Gibson GE. Differential alteration of dopamine, acetylcholine, and glutamate release during anoxia and/or 3,4-diaminopyridine treatment. Neurochem Res 1987;12:1019-27.【4.3.24】
16) Prior HM, Yates MS, Beech DJ. Functions of large conductance Ca^{2+}-activated (BK_{Ca}), delayed rectifier (K_V) and background K^+ channels in the control of membrane potential in rabbit renal

arcuate artery. J Physiol 1998;511:159-69.【4.3.25】

17) Nakazawa M, Mustafa SJ. Effects of adenosine and calcium entry blockers on 3,4-diaminopyridine-induced rhythmic contractions in dog coronary artery. Eur J Pharmacol 1988;149:345-9.【4.3.26】

18) Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Sumino S, Kato A, Sugimoto T. Phasic contractions of canine and human coronary arteries induced by potassium channel blockers. Jpn Heart J 1986;27:727-40.【4.3.05】

19) Potreau D, Gomez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. Cardiovasc Res 1995;30:440-8. 【4.3.27】

20) Lee SB, Kim SY, Sung KW. Cardiovascular regulation by cholinergic mechanisms in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol 1991;205:117-23.【4.3.28】

アミファンプリジンリン酸塩
製造販売承認申請
CTD　第 2 部

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

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表

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.....4
2.6.3.3 副次的薬理試験.....5
2.6.3.4 安全性薬理試験.....6
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....7

表の目次

表 2.6.3.1-1 薬理試験：一覧表.....3
表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験.....4
表 2.6.3.3-1 副次的薬理試験.....5
表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験.....6

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

表 2.6.3.1-1　薬理試験：一覧表

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics	CHO cells transfected with human Kv1.7 potassium channels	*In vitro*	[redacted]	BMN125-10-111	4.2.1.1.01
Primary Pharmacodynamics	Mammalian cells (CHO and HEK293) transfected with human Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.4, and 1.5 potassium channels	*In vitro*	[redacted]	BMN125-10-112	4.2.1.1.02
Secondary Pharmacodynamics	Receptor panel screen (various species, including: mouse, rat, hamster, human)	*In vitro*	[redacted], Taiwan	BMN125-10-084	4.2.1.2.01
Secondary Pharmacodynamics	Enzyme inhibition panel screen (various species, including: mouse, rabbit, pig, bovine, human)	*In vitro*	[redacted], Taiwan	BMN125-10-085	4.2.1.2.02
Secondary Pharmacodynamics (3-N-acetyl metabolite of amifampridine phosphate)	Receptor panel and enzyme inhibition panel screen (various species, including rat and human)	*In vitro*	[redacted], France	100014186	4.2.1.2.03
Secondary Pharmacodynamics (amifampridine phosphate and 3-N-acetyl metabolite)	Receptor panel screen (various species, including rat and human)	*In vitro*	[redacted], France	100034669	4.2.1.2.04
Safety Pharmacology - Cardiovascular	CHO-K1 cells expressing hERG	*In vitro*	[redacted], Switzerland	1711/AGE/03	4.2.1.3.01
Safety Pharmacology - Cardiovascular	Rabbit Purkinje fibers	*Ex vivo*	[redacted], Switzerland	1710/AGE/03	4.2.1.3.02
Safety Pharmacology - Cardiovascular	Telemetered Beagle dogs	Oral gavage	[redacted], USA	BMN125-10-059	4.2.1.3.03
Safety Pharmacology - CNS	Irwin test in Wistar rats	Oral gavage	[redacted], France	20070139PGR	4.2.1.3.04
Safety Pharmacology - Respiratory	Plethysmography study in Sprague-Dawley rats	Oral gavage	[redacted], USA	BMN125-10-058	4.2.1.3.05

CHO = Chinese hamster ovary; CNS = central nervous system; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study Number	Test System	Test Drug/ Dose	Endpoint(s) Measured	Major Findings
BMN125-10-111（4.2.1.1.01）	CHO cells transfected with human Kv1.7 potassium channels	Amifampridine phosphate: 1, 10, 30, 100, 300, 1000, and 3000 µmol/L 3-N-acetyl metabolite: 100, 1000, and 3000 µmol/L	IC_{50}	Amifampridine phosphate IC_{50} for hKv1.7 = 338.4 µmol/L 3-N-acetyl metabolite IC_{50} for hKv1.7 > 3000 µmol/L
BMN125-10-112（4.2.1.1.02）	Mammalian cells (CHO and HEK293) transfected with human Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.4, and 1.5 potassium channels	Amifampridine phosphate: 1, 10, 30, 100, 300, 1000, and 3000 µmol/L 3-N-acetyl metabolite: 100, 1000, and 3000 µmol/L	IC_{50}	Amifampridine phosphate: hKv1.1 IC_{50} = 767.5 µmol/L hKv1.2 IC_{50} = 1278.8 µmol/L hKv1.3 IC_{50} = 524.8 µmol/L hKv1.4 IC_{50} = 1860.3 µmol/L hKv1.5 IC_{50} = 490.8 µmol/L 3-N-acetyl metabolite IC_{50} > 3000 µmol/L for all channels tested.

CHO = Chinese hamster ovary; HEK = human embryonic kidney; IC_{50} = median inhibitory concentration.

2.6.3.3　副次的薬理試験

表 2.6.3.3-1　副次的薬理試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study Number	Species (strain) (animals/group)	Test Drug/ Dose	Endpoint(s) Measured	Major Findings
BMN125-10-084 (4.2.1.2.01)	*In vitro* receptor panel screen (various species, including: mouse, rat, hamster, human)	Amifampridine phosphate: 10 µmol/L	29 different receptor or channel-based cell systems	Amifampridine phosphate (10 µmol/L) showed an 18% and 7% inhibition of the K_{ATP} and hERG potassium channel, respectively. Amifampridine phosphate also had weak stimulatory effects on adrenergic α1A (21%) and sodium channel, site 2 (24%).
BMN125-10-085 (4.2.1.2.02)	*In vitro* enzyme inhibition panel screen (various species, including: mouse, rabbit, pig, bovine, human)	Amifampridine phosphate: 10 µmol/L	40 different enzyme based cell systems	Of the 40 enzymes assessed, amifampridine phosphate (10 µmol/L) did not elicit a significant inhibition or stimulation of binding or activity (≥50%). Amifampridine phosphate had weak stimulatory effects on protein serine threonine phosphatase PPP3CA (47%) and protein serine/arginine-rich kinase SRPK1 activity (29%).
100014186 (4.2.1.2.03)	*In vitro* receptor panel screen and enzyme inhibition panel screen (various species, including rat and human)	3-N-acetyl metabolite of amifampridine phosphate: 10 µmol/L	38 different receptor channel, or enzyme-based cell systems	The 3-N-acetyl metabolite had weak inhibition of the endothelin type A receptor (40%). The results from the panel of *in vitro* enzyme inhibition assays showed no significant inhibition or stimulation of activity.
100034669 (4.2.1.2.04)	*In vitro* receptor panel screen (various species, including rat and human)	Amifampridine phosphate: 10 µmol/L; 3-N-acetyl metabolite of amifampridine phosphate: 10 µmol/L	44 different receptor, channel, or transporter-based cell systems representing abuse potential targets	Results showed no significant inhibition or stimulation of binding or activity at targets relevant to abuse potential.

hERG = human ether-a-go-go related gene; K_{ATP} = ATP-sensitive potassium channel

2.6.3.4　安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1　安全性薬理試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study Number (GLP status)	Organ System Evaluated	Species/Strain (Number/group)	Method of Administration	Dose Levels	Major Findings
1711/AGE/03 (GLP) (4.2.1.3.01)	Cardiovascular	CHO-K1 cells expressing hERG	*In vitro*	0.3, 3, and 30 µmol/L	Amifampridine phosphate had no effect on hERG potassium currents in CHO-K1 cells at concentrations of up to 30 µmol/L.
1710/AGE/03 (GLP) (4.2.1.3.02)	Cardiovascular	NZW rabbit Purkinje fibers	*Ex vivo*	0.1, 1, 10, 30, and 100 µmol/L	A potential class III anti-arrhythmic effect (increased APD) was observed in rabbit Purkinje fibers at concentrations of 30 and 100 µmol/L amifampridine phosphate.
BMN125-10-059 (GLP) (4.2.1.3.03)	Cardiovascular	Telemetered Beagle dogs (8 males; Latin square crossover design)	Oral gavage	0, 0.05, 0.15, and 0.50 mg/kg	Oral dosing of amifampridine phosphate shortened the PR interval up to -8% and increased arterial pulse pressure up to +7%.
100014186 (non-GLP) (4.2.1.2.03)	Cardiovascular (3-N-Acetyl metabolite of amifampridine phosphate)	CHO-K1 cells expressing hERG (automated patch-clamp)	*In vitro*	3-N-Acetyl metabolite of amifampridine phosphate 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µmol/L	3-N-Acetyl metabolite inhibited the hERG current in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 39 µmol/L.
20070139PGR (GLP) (4.2.1.3.04)	CNS	Irwin test in Wistar rats (8 males/group + 3 males/PK group)	Oral gavage	0, 5, 10, 20, and 40 mg/kg	No clear treatment-related effects on the neurobehavioral parameters. NOAEL was determined to be 40 mg/kg.
BMN125-10-058 (GLP) (4.2.1.3.05)	Respiratory	Plethysmography study in Sprague-Dawley rats (8 males/group + 3 males/PK group)	Oral gavage	0, 1, 3, and 10 mg/kg	No treatment-related effects on the respiratory parameters.

APD = action potential duration; CHO = Chinese hamster ovary; CNS = central nervous system; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-a-go-go related gene; NOAEL = no observed adverse effect level; NZW = New Zealand White; PK = pharmacokinetic.

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。