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
2.6.4 薬物動態試験の概要文

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 8
2.6.4.3 吸収 13
2.6.4.4 分布 20
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較） 23
2.6.4.6 排泄 28
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 29
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 30
2.6.4.9 考察及び結論 30
2.6.4.10 図表 32

表の目次

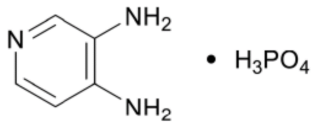
表 2.6.4.2-1 ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果 8
表 2.6.4.2-2 ラット血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果 9
表 2.6.4.2-3 イヌ血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果.10
表 2.6.4.2-4 ラット K_2EDTA 血漿中 3-N-アセチル体濃度測定法のバリデーション結果 11
表 2.6.4.2-5 イヌ K_2EDTA 血漿中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度測定法のバリデーション結果.....12
表 2.6.4.2-6 ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果 12
表 2.6.4.2-7 ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度測定法のバリデーション結果.....13
表 2.6.4.3-1 ラットにアミファンプリジンのリン酸塩又は遊離塩基を単回経口投与後の PK パラメータ 14
表 2.6.4.3-2 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回静脈内投与したときのアミファンプリジン 及び 3-N-アセチル体の PK パラメータ 16
表 2.6.4.3-3 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回経口投与したときのアミファンプリジン 及び 3-N-アセチル体の PK パラメータ 17
表 2.6.4.3-4 ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回腹腔内投与したときの PK パラメータ 18

表 2.6.4.3-5　イヌにリン酸塩又は遊離塩基を単回経口投与したときのアミファンプリジンの PK パラメータ.....20
表 2.6.4.4-1　[^{14}C]アミファンプリジンのラット、イヌ、サル及びヒト血漿におけるタンパク結合率.....21

図の目次

図 2.6.4.5-1　ラットにおけるアミファンプリジンの 3-N-アセチル体への生体内変換.....26

【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
A to B	Apical-to-basolateral	頂端膜側から基底外側膜側方向
$AUC_{0\text{-}6h}$	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to 6 hours	0 から 6 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the last measurable concentration	最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the plasma concentration versus time curve from time zero extrapolated to infinity	無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳がん耐性タンパク
BCS	Biopharmaceutics Classification System	生物薬剤学分類システム
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
B to A	Basolateral-to-apical	基底外側膜側から頂端膜側方向
CL	Clearance	クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FMO	Flavin mono-oxygenase	フラビン含有モノオキシゲナーゼ
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
HPLC-ECD	High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection	高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出
IC_{50}	Median inhibitory concentration	阻害濃度の中央値
ICH	International Conference on Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
K_m	Michaelis constant	ミカエリス定数
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析
LEMS	Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome	ランバート・イートン筋無力症候群
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
mRNA	Messenger RNA	メッセンジャーRNA

略号	省略しない表現	日本語
NADPH	ß-Nicotinamide adenine dinucleotide 2′-phosphate	β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 2’-リン酸
NAT	N-acetyltransferase	N-アセチルトランスフェラーゼ
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporter polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
qRT-PCR	quantitative real time-polymerase chain reaction	定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応
Radio-HPLC	High-performance liquid chromatography equipped with a radiochemical detector	ラジオ HPLC
SFSTP	Société Française Sciences et Techniques Pharmaceutiques	
SLC	Solute carrier	溶質担体
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
T_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血中濃度到達時間
UGT	UDP-glucuronosyltransferase	UDP‐グルクロノシルトランスフェラーゼ
V_{max}	Maximum reaction rate	最大反応速度
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.6.4.1 まとめ

非臨床薬物動態（PK）プログラムは、ランバート・イートン筋無力症候群（LEMS）患者集団におけるアミファンプリジンリン酸塩の長期使用を支持するためにデザインされた。アミファンプリジンの非臨床 PK 試験を以下に示す。

（a）アミファンプリジン遊離塩基及びそのリン酸塩の PK パラメータの比較のためのラット及びイヌにおける単回投与試験、(b) 絶対的バイオアベイラビリティ並びに未変化体及び主代謝物である 3-N-アセチル体の PK を評価するためのラットにおける単回静脈内及び経口投与（1 日 3 回）試験、(c) アミファンプリジンの PK を評価するためのラット単回腹腔内投与試験、(d) [^{14}C]アミファンプリジンを用いたラット及びイヌにおける単回静脈内及び経口投与マスバランス試験並びにラット組織分布試験、(e) ラット、イヌ、サル及びヒトにおける *in vitro* 血漿タンパク結合並びにヒトにおける血液－血漿分配、(f) アミファンプリジンとその 3-N-アセチル体が P-糖タンパク質（P-gp）排出トランスポーターの基質又は阻害薬となる可能性を検討する *in vitro* 試験、(g) アミファンプリジンとその 3-N-アセチル体がヒト取り込みトランスポーター［有機カチオントランスポーター（OCT）1、OCT2、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT 3、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 及び OATP1B3］及び排出トランスポーター［胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）及び乳がん耐性タンパク（BCRP)］の基質又は阻害薬となる可能性を検討する *in vitro* 試験、(h) ラット、ウサギ、イヌ、サル、ミニブタ及びヒト肝細胞を用いた *in vitro* 代謝安定性試験並びにヒト代謝物の分析、(i) チトクローム P450（CYP)、フラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）及び N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT1 及び NAT2）との潜在的な代謝相互作用を検討するための *in vitro* 試験、(j) CYP 阻害及び誘導に関する *in vitro* 薬物相互作用試験、(k) 主な消失経路を検討するためのラット及びイヌにおける[^{14}C]アミファンプリジンを単回静脈内及び経口投与後の排泄試験。

アミファンプリジンリン酸塩の *in vitro* 及び *in vivo* の PK 特性を評価した非臨床プログラムで得られたいくつかの重要な知見から、薬物の消失及び曝露の特性は以下のように要約される。初めに、アミファンプリジンはラット及びヒトで 3-N-アセチル化を受け、単一の 3-N-アセチル体が生成されるが、イヌでは生成されない。イヌにおけるアミファンプリジン代謝の欠如は、この種において NAT 酵素経路が欠如していることと一致する。次に、イヌにおける N-アセチル化の欠如は、イヌでのアミファンプリジンの曝露がラットに比べて高い結果につながる。ヒトでは、NAT 経路は多型性が非常に高く、低代謝群及び高代謝群が存在し、その結果、PK 及び曝露量が変動する。したがって、非げっ歯類として選択されたイヌは、未変化体であるアミファンプリジンの曝露が高い slow acetylator を表している。この種とラット（代謝速度が比較的速い）との組み合わせは、ヒトにおける未変化体及び代謝物の曝露を表すモデルと考えられる。最後に、アミファンプリジンリン酸塩を用いて実施された PK 試験から得られた重要な結論は、血漿タンパク結合、トランスポーター阻害、CYP 阻害又は CYP 誘導に関して、著しい臨床薬物相互作用は予測されないということである。

2.6.4.2 分析法

ラット及びイヌ血漿中のアミファンプリジンを定量するため、複数の生物学的分析法を開発し、バリデートした。これらの測定法を以下に要約する。また、本項では、ラット血漿中のアミファンプリジンの 3-N-アセチル体を定量するためのバリデート済みの生物学的分析法を要約する。更に、溶媒中のアミファンプリジンの濃度と安定性の評価のために投与製剤分析法を開発し、バリデートした（試験番号 BMN125-10-044（4.2.2.1.01））。また、ラットの薬物乱用に関する試験（試験番号 [redacted]5604（4.2.3.7.4.01）、[redacted]5336（4.2.3.7.4.02））に使用するための投与製剤分析法を開発し、バリデートした（試験番号 [redacted]5344（4.2.2.1.02））。

2.6.4.2.1 ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン濃度測定法（試験番号 BMN125-10-045（4.2.2.1.03））

液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）によるラット血漿中アミファンプリジン濃度測定法を開発し、バリデートした。この方法は誘導体化を行わず、感度が改善されており、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したラットの試験で使用された。

本試験は、現行の米国食品医薬品局（FDA）GLP ガイドラインに従って実施した。本測定法は、選択性、感度、検量線、真度、精度、回収率、希釈の妥当性、堅牢性、キャリーオーバー、安定性、定量下限（LLOQ）及び投与後試料の再分析について、バリデートされた。バッチ内及びバッチ間の真度及び精度は、許容できることが示された。マトリックス中の内因性成分に対する選択性を確認した。キャリーオーバー及び顕著なマトリックス効果は見られなかった。アミファンプリジンは、ラット血漿中において 5 回の凍結融解サイクル及び室温保存で 22 時間、血漿抽出後試料中において 0～10℃のオートサンプラー内で 5 日間及び凍結保存ラット血漿中で 29 日間安定であった。本測定法の定量範囲は 0.250～250 ng/mL で、LLOQ は 0.250 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-1 に示す。

表 2.6.4.2-1　　ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果

Calibration Range	0.250 to 250 ng/mL
Assay Volume	25 µL
Dilution Factor	1/20
Stability in matrix	22 hours at room temperature 29 days in a freezer -70°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Five freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	5 days in the automatic injector at approximately 10°C
Stability of stock solutions	29 days in a refrigerator at 4°C
Stability of working solutions	16 days in a refrigerator at 4°C

更に、N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide（3-N-アセチル体）及び N-(3-aminopyridin-4-yl)

acetamide（4-N-アセチル体）を含むアミファンプリジンのアセチル化代謝物を、本測定法を用いて非 GLP 下で探索的に定量した。

以上より、本測定法はラット K_2EDTA 血漿試料中のアミファンプリジンの定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.2　ラット血漿中アミファンプリジン濃度測定法（試験番号 ■065501（4.2.2.1.04））

LC-MS/MS によるラット血漿中アミファンプリジン濃度測定法を開発し、バリデートした。

本試験は、経済協力開発機構（OECD）の GLP 及び欧州指令 2004/10/EC に準拠した。選択性、直線性、精度、真度、安定性及び LLOQ を評価した。本測定法は 5.00～1000 ng/mL において直線性を示し、バッチ内及びバッチ間の精度及び真度は、許容できるものであった。キャリーオーバー及び顕著なマトリックス効果は見られなかった。LLOQ は 5.00 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-2 に示す。

表 2.6.4.2-2　　ラット血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果

Calibration range	5.00 to 1000 ng/mL
Assay volume	50 µL
Dilution factor	1/10
Stability in matrix	25 hours at room temperature 110 days in a freezer at -24°C 110 days in a freezer at -75°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Three freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	94 hours in the automatic injector at approximately 10°C
Stability of stock solutions	21 days in a refrigerator at 5°C 6 hours at room temperature
Stability of working solutions	8 days in a refrigerator at 5°C

以上より、本測定法はラット血漿試料中のアミファンプリジンの定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.3　イヌ血漿中アミファンプリジン濃度測定法（試験番号 ■065547（4.2.2.1.05））

LC-MS/MS によるイヌ血漿中アミファンプリジン濃度測定法を開発し、バリデートした。

本試験は、OECD の GLP 及び欧州指令 20■/■/EC に準拠した。選択性、直線性、精度、真度、安定性及び LLOQ を評価した。マトリックス中の内因性成分に対する選択性を確認した。本測定法は 5.00～1000 ng/mL において直線性を示し、バッチ内及びバッチ間の精度及び真度は、許容できるものであった。キャリーオーバー及び顕著なマトリックス効果は見られなかった。LLOQ は 5.00 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-3 に示す。

表 2.6.4.2-3　　イヌ血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果

Calibration range	5.00 to 1000 ng/mL
Assay volume	50 µL
Dilution factor	1/10
Stability in matrix	24 hours at room temperature 96 days in a freezer at -24°C 96 days in a freezer at -75°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Three freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	65 hours in the automatic injector at approximately 10°C
Stability of stock solutions	21 days in a refrigerator at 5°C 6 hours at room temperature
Stability of working solutions	8 days in a refrigerator at 5°C

以上より、本測定法はイヌ血漿試料中のアミファンプリジンの定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.4　高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出による血漿中アミファンプリジン濃度測定法（試験番号 23377（4.2.2.1.06）、参考資料）

高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出（HPLC-ECD）による血漿中アミファンプリジン濃度測定法を開発し、バリデートした。

本測定法は、ラット及びイヌにおけるリン酸塩と遊離塩基の PK 比較試験（試験番号 [redacted] 266/009（4.2.2.2.02）及び [redacted] 266/008（4.2.2.2.06））並びにラット及びイヌの 4 週間反復投与毒性試験（試験番号 [redacted] 266/013（4.2.3.2.03）及び [redacted] 266/014（4.2.3.2.08））に使用された。

本試験は Société Française Sciences et Techniques Pharmaceutiques（SFSTP）及び医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに準拠して実施した。選択性、直線性、真度、精度及び LLOQ を評価した。本測定法はアミファンプリジンに特異的であり、内部標準（phenylephrine）又はマトリックス成分からの干渉はみられなかった。直線性を統計学的に検証した結果、本測定法は 15.0～500 ng/mL の範囲で正確であると判定された。また、5.00～500 ng/mL の範囲で精度が高いと考えられた。LLOQ は 15.0 ng/mL であった。

以上より、本測定法は血漿試料中のアミファンプリジンの定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.5　ラット K_2EDTA 血漿中 3-N-アセチル体濃度測定法（試験番号 BMN125-10-074（4.2.2.1.07））

LC-MS/MS によるラット K_2EDTA 血漿中 3-N-アセチル体の濃度測定法を開発し、バリデートした。

本試験は、現行の FDA GLP ガイドラインに従って実施した。本測定法は、選択性、感度、検量線、真度、精度、回収率、希釈の妥当性、キャリーオーバー、手動ピペッティング、溶血の影響、安定性及び LLOQ について、バリデートされた。

本法のバッチ内及びバッチ間精度及び真度は、許容できることが示された。マトリックス中の内因性成分に対する選択性を確認した。キャリーオーバー及び顕著なマトリックス効果はみられなかった。3-N-アセチル体は、ラット血漿中において 4 回の凍結融解サイクル及び室温保存で 20 時間、血漿抽出物中において 0～10℃のオートサンプラー内で 1 日間及び凍結保存ラット血漿中で 26 日間安定であった。定量範囲は 2.00～2000 ng/mL で、LLOQ は 2.00 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-4 に示す。

表 2.6.4.2-4　　ラット K_2EDTA 血漿中 3-N-アセチル体濃度測定法のバリデーション結果

Calibration Range	2.00 to 2000 ng/mL
Assay Volume	25 µL
Dilution Factor	1/20
Stability in matrix	20 hours at room temperature 26 days in a freezer -70°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Four freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	1 day in the automatic injector at approximately 10°C

以上より、本測定法は、ラット K_2EDTA 血漿試料中 3-N-アセチル体の定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.6　イヌ K_2EDTA 血漿中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度測定法（試験番号 TRTPS13-053（4.2.2.1.08））

LC-MS/MS によるイヌ K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン及びその主代謝物 3-N-アセチル体の濃度測定法を開発し、バリデートした。

本試験は、現行の FDA GLP ガイドラインに従って実施した。本測定法は、選択性、感度、検量線、真度、精度、回収率、希釈の妥当性、キャリーオーバー、溶血の影響、安定性及び LLOQ について、バリデートされた。

本測定法のバッチ内及びバッチ間精度及び真度は、許容できることが示された。マトリックス中の内因性成分に対する選択性を確認した。キャリーオーバー及び顕著なマトリックス効果はみられなかった。未変化体及び 3-N-アセチル体は、イヌ血漿中において 4 回の凍結融解サイクル及び室温保存で 20 時間、また、凍結保存イヌ血漿中で 13 日間安定であった。本測定法の定量範囲はアミファンプリジンが 0.500～500 ng/mL、3-N-アセチル体が 1.00～1000 ng/mL であった。LLOQ は、未変化体及び代謝物でそれぞれ 0.500 及び 1.00 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-5 に示す。

表 2.6.4.2-5　　イヌ K_2EDTA 血漿中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度測定法のバリデーション結果

Calibration Range	Amifampridine: 0.500 to 500 ng/mL 3-N-acetyl metabolite: 1.00 to 1000 ng/mL
Assay Volume	25 µL
Dilution Factor	1/10
Stability in matrix	20 hours at room temperature 13 days in a freezer -20°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Four freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	93 hours at approximately 4°C

以上より、本測定法は、イヌ K_2EDTA 血漿試料中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.7　ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン濃度測定法（試験番号 [redacted]4959（4.2.2.1.09））

LC-MS/MS を用いた K_2EDTA ラット血漿中のアミファンプリジン濃度の測定法を開発し、バリデートした。この方法は、ラット薬物乱用に関する試験（試験番号 [redacted]5336（4.2.3.7.4.02））で使用するためにバリデートされた。

LC-MS/MS 法は、現行の OECD GLP ガイドラインに従ってバリデートされた。選択性、検量線、真度、精度、回収率、希釈の妥当性、キャリーオーバー、安定性、LLOQ、投与後試料の再分析を評価した。本法のバッチ内及びバッチ間精度及び真度は、許容できることが示された。顕著なキャリーオーバー及びマトリックス効果はみられなかった。アミファンプリジンは、ラット血漿中において 3 回の凍結融解サイクル及び室温保存で 24 時間、血漿抽出物中において室温で 68 時間、並びに凍結保存ラット血漿中で 38 日間安定であった。本測定法の定量範囲は 0.250～250 ng/mL で、LLOQ は 0.250 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-6 に示す。

表 2.6.4.2-6　　ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン濃度測定法のバリデーション結果

Calibration Range	0.250 to 250 ng/mL
Assay Volume	50 µL
Dilution Factor	1/100
Stability in matrix	24 hours at room temperature 38 days in a freezer -80°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Three freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	68 hours at room temperature
Stability of stock and working solutions	25 days in a refrigerator at 4°C

以上より、本測定法は、ラット K_2EDTA 血漿試料中アミファンプリジンの定量に適用できると考えられた。

2.6.4.2.8 ラット K_2EDTA 血漿中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度測定法（試験番号 [redacted]5547（4.2.2.1.10））

LC-MS/MS を用いたラット K_2EDTA 血漿中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の濃度測定法を開発し、バリデートした。この方法は、ラットの薬物乱用に関する試験（試験番号 [redacted]5401（4.2.3.7.4.03）、[redacted]5604（4.2.3.7.4.01）、[redacted]5336（4.2.3.7.4.02））に使用するためにバリデートされた。

LC-MS/MS 法は、現行の OECD GLP ガイドラインに従ってバリデートした。選択性、検量線、真度、精度、回収率、希釈の妥当性、キャリーオーバー、安定性、LLOQ、投与後試料の再分析に関して、LC-MS/MS 法のバリデートに成功した。本法のバッチ内及びバッチ間精度及び真度は、許容できることが示された。顕著なキャリーオーバー及びマトリックス効果はみられなかった。アミファンプリジンは、ラット血漿中において 3 回の凍結融解サイクル及び室温保存で 6 時間、血漿抽出物中において室温保存で 29 時間、ラット凍結保存血漿中で 99 日間安定であった。本測定法の定量範囲は 0.250～250 ng/mL であり、LLOQ は 0.250 ng/mL であった。バリデーション結果の要約を表 2.6.4.2-7 に示す。

表 2.6.4.2-7　　ラット K_2EDTA 血漿中アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度測定法のバリデーション結果

Calibration Range	0.250 to 250 ng/mL
Assay Volume	50 µL
Dilution Factor	1/100
Stability in matrix	6 hours at room temperature 99 days in a freezer -80°C
Stability in matrix after freeze/thaw cycles	Three freeze/thaw cycles
Stability of the extracts to re-injection	29 hours at room temperature
Stability of stock and working solutions	18 days in a refrigerator at 4°C

以上より、本測定法はラット K_2EDTA 血漿試料中のアミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の定量に適用できると考えられた。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 アミファンプリジンの Caco-2 細胞単層膜透過性（試験番号 BMN125-10-042（4.2.2.2.01））

本試験の目的は、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の膜透過性を、Caco-2 細胞単層膜を用いて評価することであった。

Caco-2 細胞単層膜の完全性は、インキュベーションの前後に経上皮電気抵抗値を測定することにより確認した。マンニトール（傍細胞輸送マーカー）の見かけの膜透過係数は、頂端膜側から基底外側膜側方向（A to B）及び基底外側膜側から頂端膜側方向（B to A）にそれぞれ 0.73 及び 0.32×10^{-6} cm/s、カフェイン（経細胞輸送マーカー）の見かけの膜透過係数は、A to B 及び B to A それぞれ 29.5 及び 33.9×10^{-6} cm/s であった。これらの結果は、Caco-2 細胞単層膜が正常に機能していることを示しており、本試験で得られた結果は信頼性が高いと考えられた。

[^{14}C]アミファンプリジンの Caco-2 細胞単層膜における見かけの膜透過係数は 2×10^{-6} cm/s 未満であり、膜透過性は低かった。水溶性（125 mg/mL）と膜透過性に基づき、アミファンプリジンは生物薬剤学分類システム（BCS）において高溶解性 - 低透過性化合物（BCS クラス III）に分類される。

2.6.4.3.2 ラットにアミファンプリジンのリン酸塩及び遊離塩基を単回経口投与後の薬物動態の比較（試験番号 [redacted] 266/009（4.2.2.2.02）、参考資料）

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンのリン酸塩及び遊離塩基を単回経口投与した際の PK を比較評価することであった。雌雄 Sprague-Dawley ラット（雌雄各 12 例／群）に、アミファンプリジン 1 mg/kg に相当する遊離塩基（1 mg/kg）又はリン酸塩（1.9 mg/kg）を単回経口投与した。いずれの被験物質も 1%カルボキシメチルセルロース懸濁液として調製した。

投与後 5、15、30、45 分及び 1、1.5、2、2.5、3、4、10 及び 24 時間（雌雄各 3 例／群／時点）に採血し、HPLC-ECD 法により血漿中濃度を測定した。PK パラメータを算出し、その結果を表 2.6.4.3-1 に示した。

表 2.6.4.3-1　　ラットにアミファンプリジンのリン酸塩又は遊離塩基を単回経口投与後の PK パラメータ

Gender	Test Article	Dose* (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	AUC_{inf} (ng·min/mL)	$t_{1/2}$ (min)
Male	Amifampridine phosphate	1	16.5	5	2762	134
	Amifampridine free base	1	15.0	5	3080	164
Female	Amifampridine phosphate	1	16.7	5	2564	105
	Amifampridine free base	1	28.3	15	2330	62

AUCinf = area under the plasma concentration versus time curve from time zero extrapolated to infinity; Cmax = maximum plasma concentration; Tmax = time to maximum plasma concentration; t1/2 = terminal half-life.

* Equivalent to amifampridine free base dose level of 1 mg/kg

全体として、ラットにおける PK 比較試験の結果から、アミファンプリジン遊離塩基とア

ミファンプリジンリン酸塩との間に顕著な PK の差はないことが示された。最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は、両被験物質で雌雄ともに 15 分以下であり、吸収は比較的速やかであった。本試験ではアミファンプリジンの消失半減期（$t_{1/2}$）が 60 分を超えると考えられた。無限大時間までの血漿中濃度－-時間曲線下面積（AUC_{inf}）及び最高血漿中濃度（C_{max}）で示される曝露量は、投与した化学形態（遊離塩基又はリン酸塩）にかかわらず、おおむね雌雄で同程度であった。

2.6.4.3.3　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を静脈内又は経口投与後の薬物動態（試験番号 BMN125-10-036（4.2.2.2.03））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回静脈内及び経口（1 日 3 回）投与した際の絶対的バイオアベイラビリティ並びにアミファンプリジン及びその 3-N-アセチル体の PK を評価することであった。

Sprague-Dawley ラット（雌雄各 6 例）にアミファンプリジンリン酸塩 0.8 mg/kg（アミファンプリジン遊離塩基投与量 0.4 mg/kg に相当）を生理食塩水に溶解して静脈内ボーラス投与した。また、ラット（雌雄各 12 例／群）にアミファンプリジンリン酸塩の水溶液を 6、24 及び 75 mg/kg/日（アミファンプリジン遊離塩基として 3.2、12.6 及び 39.5 mg/kg に相当）の用量で 1 回目は絶食下、2 及び 3 回目は摂餌下で、1 日 3 回経口投与した（約 6 時間間隔）。血液試料（3 例／性／時点）は、以下の時点で採取した：静脈内及び 1 回目の経口投与後は、投与前及び投与後 0.083（静脈内投与のみ）、0.17、0.25、0.33、0.5、0.75、1、1.25（静脈内投与のみ）、1.5、2、2.5、3 及び 6 時間、2 回目の経口投与後は、0.17、0.5 及び 6 時間、3 回目の経口投与後は、0.17、0.25、0.33、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8 及び 10 時間。LC-MS/MS 法によりラット血漿試料中のアミファンプリジン、3-N-アセチル体及び 4-N-アセチル体を定量した。血漿中に検出された 4-N-アセチル体は低濃度であったことから、この代謝物について PK 解析は実施しなかった。雌雄ラットの平均血漿中アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体濃度データをノンコンパートメント PK 解析により評価した。

投与後 0 時間から 6 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}6h}$）及び C_{max} により評価したアミファンプリジンの曝露量は、2～25 mg/kg の用量範囲で増加した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の増加は用量比を上回り、初回通過代謝が飽和した可能性が示された。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の値は、絶食下の初回投与後の方が、摂餌下の 2 及び 3 回目投与後よりも高かった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ は、1 回目の経口投与後でそれぞれ 22.5～1499 ng/mL 及び 14.9～1920 ng·h/mL、2 回目の経口投与後でそれぞれ 5.26～120 ng/mL 及び 16.0～386 ng·h/mL、3 回目の経口投与でそれぞれ 9.27～298 ng/mL 及び 9.49～320 ng·h/mL であった。これらの結果は、食事の影響を示している可能性がある。アミファンプリジンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ について、性差はおおむね 2 倍未満であり、雌の方が高い曝露量を示した。1 及び 3 回目投与後の雄／雌比は、C_{max} で 0.357～1.02、$AUC_{0\text{-}6h}$ で 0.499～0.882 であった。初回経口投与後のアミファンプリジンの絶対的バイオアベイラビリティは 12.2～156%であり、投与量に応じて上昇したことから、初回通過代謝の飽和を示していると考えられる。

3-N-アセチル体の曝露量も 2～25 mg/kg の用量範囲において増加した。$AUC_{0\text{-}6h}$ について未変化体に対する代謝物の比は 4.34～71.6 であり、ラットに経口投与後、アミファンプリジンは 3-N-アセチル体に著しく変換されることが示された。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の増加は用量比を下回ったことから、アミファンプリジンの N-アセチル化代謝は高用量で飽和することが示唆される。3-N-アセチル体の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$ の性差は 2 倍未満であり、雌の方が高い曝露量を示した。1 及び 3 回目投与後の雄／雌比は、C_{max} で 0.894～1.61、$AUC_{0\text{-}6h}$ で 0.913～1.16 であった。

表 2.6.4.3-2 に、単回静脈内投与後のラット血漿中アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の主な PK パラメータの要約を示す。

表 2.6.4.3-2　　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回静脈内投与したときのアミファンプリジン 及び 3-N-アセチル体の PK パラメータ

アミファンプリジン

Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	CL (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)
Male	0.8	119	0.083	49.2	0.436	16130	6654
Female	0.8	94	0.083	39.2	0.364	20313	8129

3-N-アセチル体

Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)
Male	0.8	218	0.083	326	1.20
Female	0.8	238	0.083	415	1.71

$AUC_{0\text{-}6h}$ = area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the 6 hour timepoint; CL = clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; T_{max} = time to maximum plasma concentration; $t_{1/2}$ = terminal half-life; Vss = volume of distribution at steady state.

* Equivalent to amifampridine free base dose level of 0.4 mg/kg.

単回経口投与後のラット血漿中アミファンプリジン及び 3-N-アセチル体の主な PK パラメータの要約（注:1 回目投与後のデータのみを示す）を表 2.6.4.3-3 に示す。

表 2.6.4.3-3　　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回経口投与したときのアミファンプリジン 及び 3-N-アセチル体の PK パラメータ

アミファンプリジン

Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{0-6h} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	F (%)
Male	2	22.5	0.33	14.9	0.424	12.2
	8	179	0.50	146	0.404	29.1
	25	1393	0.50	1405	0.580	90.7
Female	2	52.1	0.25	27.8	0.329	28.1
	8	503	0.33	294	0.502	74.6
	25	1499	0.50	1920	0.581	156

3-N-アセチル体

Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{0-6h} (ng·h/mL)	$t_{1/2}$ (h)
Male	2	542	0.50	870	1.32
	8	1246	0.75	2668	1.05
	25	3873	0.75	8513	1.12
Female	2	545	0.50	953	1.20
	8	1393	1.0	2588	1.17
	25	3840	1.0	8329	1.56

AUC_{0-6h} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the 6 hour timepoint; C_{max} = maximum plasma concentration; F = bioavailability; T_{max} = time to maximum plasma concentration; $t_{1/2}$ = terminal half-life.

* Equivalent to amifampridine free base dose levels of 1.1, 4.2, and 13.2 mg/kg/dose, respectively.

2.6.4.3.4　ラットに腹腔内投与後のアミファンプリジンの薬物動態（試験番号 [redacted]4932（4.2.2.2.04））

本試験の目的は、ラットにアミファンプリジンリン酸塩を遊離塩基換算で 2.5、7.5、25 mg/kg の用量で単回腹腔内投与し、アミファンプリジンの PK を評価することであった。本 PK 試験は、ラット薬物弁別試験（試験番号 [redacted]5604（4.2.3.7.4.01））において、アミファンプリジンリン酸塩の腹腔内投与を支持するようデザインされた。

雌雄 Sprague-Dawley ラットにアミファンプリジンを 2.5 及び 7.5 mg/kg 単回腹腔内投与したときの全身曝露量を評価した。血漿中アミファンプリジンは、最終定量可能時点が投与後 2 時間であった 2.5 mg/kg 投与群の 1 例を除き、少なくとも投与後 6 時間まですべての動物で定量可能であった。評価したすべての用量において T_{max} の中央値はおおむね 0.08～0.25 時間であった。

アミファンプリジンの全身曝露量は、2.5 から 7.5 mg/日の用量範囲において用量比を超えて増加した。C_{max} は雄ラットで 7.5 倍、雌ラットで 5.8 倍増加し、最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-t}）は、雄ラットで 8.3 倍、雌ラットで 6.8 倍増加した。

この結果は、全身曝露に対する性の影響を示唆した。雄は雌に比べてアミファンプリジンの曝露量が低かった。

アミファンプリジンを 25 mg/kg 単回腹腔内投与したとき、3 例のラット（雄 1 例及び雌 2 例）に投与後約 15 分に痙攣が認められ、血液サンプル採取後直ちに安楽死させた。これらの動物における血漿中アミファンプリジン濃度は 4497～8283 ng/mL であった。2.5 mg/kg 投与時の雄ラットの平均 C_{max} は 218 ng/mL であったことから、アミファンプリジンの全身曝露量は用量比を大きく上回って増加することが確認された。

以上より、雌雄 Sprague-Dawley ラットにアミファンプリジンを 2.5、5.0 及び 25 mg/kg 単回腹腔内投与し、全身曝露量を検討した。毒性のため、25 mg/kg を投与した動物について PK パラメータを算出できなかった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は用量比を上回って増加した。アミファンプリジンの C_{max} 及び AUC_{0-t} は、2.5 及び 7.5 mg/kg において雌が雄よりも一貫して高かった。2.5 及び 7.5 mg/kg の用量において C_{max} は約 1.6 及び 1.2 倍、AUC_{0-t} は 1.7 及び 1.4 倍、それぞれ雌が雄よりも高かった。

ラットにアミファンプリジンを単回腹腔内投与後の主な PK パラメータの要約を表 2.6.4.3-4 に示す。

表 2.6.4.3-4　　ラットにアミファンプリジンリン酸塩を単回腹腔内投与したときの PK パラメータ

Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)
Male	2.5	218	0.25	97.4
	7.5	1630	0.08	812
Female	2.5	346	0.08	167
	7.5	2020	0.08	1130

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Doses of amifampridine phosphate are expressed as the free base dose levels.

2.6.4.3.5　イヌに[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を静脈内又は経口投与後の薬物動態及び排泄（試験番号 BMN125-10-004（4.2.2.2.05））

本試験の目的は、イヌに[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を単回経口及び静脈内投与し、その PK 及び排泄経路を評価することであった。

[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩をビーグル（雄 3 例、雌 3 例）にクロスオーバーデザインで単回経口投与（0.5 mg/kg，30 µCi/kg）及び単回静脈内投与（0.05 mg/kg，12.8 µCi/kg）して、PK、排泄率及び排泄経路を評価した。投与後 168 時間まで血液及び排泄物の試料を採取し、血漿、血液及び血球中の放射能濃度を測定した。採取した各排泄物試料中の総放射能も測定した。

この試験では、代謝物プロファイルの検討と代謝物の同定を行う別の代謝試験（試験番号

BMN125-10-006（4.2.2.4.05））のため生体試料も採取した。

静脈内投与後、雌雄で投与後 5 分（最初の試料採取時点）に C_{max} がみられた。血漿中濃度はその後徐々に低下し、投与後 72 時間までに雌雄ともに定量下限未満となった。

経口投与後、0.75～2 時間に C_{max} が認められ、体循環への速やかな吸収が示された。その後、血漿中濃度は徐々に低下し、雌では投与後 144 時間までに定量下限未満となったが、雄 1 例では投与後 168 時間まで定量可能であった。いずれの投与経路においても、投与後の血漿中濃度推移に明らかな性差は認められなかった。また、投与後のすべての採血時点で血漿と血球への放射能の分布は等しかった。

[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を経口及び静脈内投与したときの薬物関連放射能の全身曝露量は雌雄で同程度であった。また、排泄率及び排泄経路に性差は認められなかった。放射能の主な排泄経路は尿であり、両投与経路ともに投与後 168 時間までに投与量の 89%超が回収された。したがって、経口投与後に少なくともこの割合が、消化管から吸収されたと考えられる。いずれの投与経路においても、薬物関連物質の消失は速やかであり、総尿中回収放射能の 96%超が投与後 24 時間までに回収された。排泄は投与後 168 時間までにほぼ完了した（表 2.6.5.12-2）。

2.6.4.3.6　イヌにアミファンプリジンリン酸塩及びアミファンプリジン遊離塩基を単回経口投与後の薬物動態の比較（試験番号 [redacted] 266/008（4.2.2.2.06）、参考資料）

本試験の目的は、イヌにアミファンプリジンリン酸塩及びアミファンプリジン遊離塩基を単回経口投与後の PK を比較評価することであった。

雌雄各 1 例のビーグルに、アミファンプリジン 1 mg/kg に相当する遊離塩基（1 mg/kg）又はリン酸塩（1.9mg/kg）の 1% カルボキシメチルセルロース液をクロスオーバー法により単回経口投与した。投与前及び投与後 5、15、30、45 分及び 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、12、24 時間に血液を採取し、適格性が確認された HPLC-ECD 法により血漿中濃度を測定した。PK パラメータを算出し、その結果を表 2.6.4.3-5 に示した。

表 2.6.4.3-5　　イヌにリン酸塩又は遊離塩基を単回経口投与したときのアミファンプリジンの PK パラメータ

Gender	Test Article	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	AUC_{inf} (ng·min/mL)
Male	Amifampridine phosphate	1	441.7	15	65303
	Amifampridine free base	1	363.0	30	78747
Female	Amifampridine phosphate	1	335.7	45	75671
	Amifampridine free base	1	395.7	15	66127

AUC_{inf} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero extrapolated to infinity; C_{max} = maximum plasma concentration; T_{max} = time to maximum plasma concentration; $t_{1/2}$ = terminal half-life.
*　Equivalent to amifampridine free base dose level of 1 mg/kg

4 回のうち 3 回で、イヌは投与後 45 分～1 時間に嘔吐した。これら 3 回の AUC は、嘔吐を伴わない単回投与と同様であったことから、吸収過程は投与後 45 分から 1 時間までに完了すると思われた。全体として、イヌを用いた PK 比較試験の結果から、アミファンプリジン遊離塩基とアミファンプリジンリン酸塩との間及び性別間に著しい PK の差はないことが示された。血漿中 T_{max} は雌雄イヌで 0.25～0.75 時間であり、消化管からの吸収が速やかであることが示され、C_{max} は 336～442 ng/mL であった。C_{max} に達した後、血漿中濃度は約 1.7～2.5 時間の終末 $t_{1/2}$ で低下した。C_{max} 及び AUC で示される全身曝露量は、アミファンプリジンの化学形態（遊離塩基又はリン酸塩）にかかわらず、雌雄イヌで同程度であった。

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　ラット、イヌ、サル及びヒトの血漿における[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩のタンパク結合及びヒトにおける血液—血漿分配（試験番号 BMN125-10-041（4.2.2.3.01））

本試験の目的は、ラット、イヌ、サル及びヒトの血漿に対する[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の *in vitro* タンパク結合率及びヒトの血液における血液－血漿分配を測定することであった。

ビーグル、カニクイザル及びヒト血漿中の[^{14}C]アミファンプリジンのタンパク結合率を 0.3、1、3 及び 10 µmol/L の濃度で平衡透析法により測定した。Sprague-Dawley ラットにおけるタンパク結合率は 0.3、3、10、及び 30 µmol/L の濃度で測定した。ヒト血液における血液－血漿分配もまた、0.3、1、3、及び 10 µmol/L の[^{14}C]アミファンプリジンの濃度で測定した。血漿タンパク結合率の結果を表 2.6.4.4-1 に示した。

表 2.6.4.4-1　　[^{14}C]アミファンプリジンのラット、イヌ、サル及びヒト血漿におけるタンパク結合率

Amifampridine（μmol/L）	Mean % Bound [^{14}C]Amifampridine			
	Rat	Dog	Monkey	Human
0.3	4.8 ± 10.8	14.5 ± 2.5	10.8 ± 3.1	11.5 ± 1.6
1	ND	10.8 ± 2.3	10.7 ± 0.9	11.4 ± 0.2
3	9.1 ± 1.5	9.04 ± 1.0	10.4 ± 1.2	8.76 ± 0.99
10	9.6 ± 2.0	9.5 ± 0.9	11.3 ± 2.1	12.0 ± 2.1
30	8.7 ± 1.5	NT	NT	NT

NT = not tested, SD = standard deviation
Values are mean (n=3 determinations) ± SD

[^{14}C]アミファンプリジンは、本試験で用いた実験条件下で、ラット、イヌ、サル及びヒトの血漿中で安定であった。[^{14}C]アミファンプリジンのラット、イヌ、サル及びヒト血漿タンパクとの結合率は低く、4.8%～14.5%（非結合率：85.5%～95.2%）であった。ラット、イヌ、サル及びヒトの血漿では、[^{14}C]アミファンプリジン濃度 0.3～30 μmol/L の範囲で、血漿タンパク結合の濃度依存性は認められなかった。

[^{14}C]アミファンプリジンの代謝は、15 分のインキュベーション時間にわたり、ヒトドナー1 及びドナー3 の全血から調製した血漿中でわずかに観察された（それぞれ 4.17%及び 2.54%）。平均血液－血漿分配比は 0.89 から 1.11 であり、[^{14}C]アミファンプリジンは血漿と血球に均等に分布することが示された。血液の細胞成分に分布する[^{14}C]アミファンプリジン関連放射能の平均パーセントは、ドナー全体で 39.9%～50.8%であり、0.3～10 μmol/L の範囲では濃度依存性はみられなかった（表 2.6.5.6-2）。

結論として、[^{14}C]アミファンプリジンの血漿タンパク結合率は低く、高い結合性を有する薬物との薬物動態学的薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。また、[^{14}C]アミファンプリジンは血漿と血球に均等に分配した。また、血球への捕捉による細胞毒性の可能性は低いと考えられた。

2.6.4.4.2　[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩単回静脈内及び経口投与後のラットにおける吸収・分布・排泄試験（試験番号 BMN125-10-005（4.2.2.3.02））

本試験の目的は、ラットに[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を単回経口及び静脈内投与時の PK、分布及び排泄経路を評価することであった。

雌雄 Sprague-Dawley ラットに、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を 25 mg/kg の用量で単回経口及び 2.5 mg/kg の用量で単回静脈内投与した（それぞれ、アミファンプリジン遊離塩基として 13.2 及び 1.3 mg/kg と同等）。血球、血漿及び排泄物中の放射能濃度を測定した。尿及び糞を 7 日間採取し、試験終了時に屠体を保存した。経口投与後のみ、呼気 CO_2 を 2 日間採取し、選択した時点で定量的全身オートラジオグラフィーにより組織中の血液及び組織中放射能濃度を測定した。

この試験では、代謝物のプロファイルと同定を行うための生物学的サンプルも採取されたが、これは別の代謝試験（試験番号 BMN125-10-006（4.2.2.4.05））で評価された。

静脈内投与後、雄では投与後 5 分（初回サンプリング時点）に、雌では投与後 10 分に最高血漿中放射能濃度が認められた。血漿中放射能はその後着実に低下し、投与後 24 時間までに雌雄ともに検出限界未満となった。

放射能は静脈内投与後速やかに排泄され、雄ラット及び雌ラットからそれぞれ 168 時間までに約 95%及び 93%が尿中に回収された。静脈内.投与後の糞中回収率はわずかであり、投与量の約 3%であった。屠体には投与量の 0.5%以下が存在し、雌雄の平均総回収率は約 99%であった。投与した放射能の排泄は投与後 168 時間の試料採取期間終了時までにほぼ完了した（表 2.6.5.12-1）。

経口投与後、雌雄ともに投与後 2 時間に血漿中の最大放射能が認められた。血漿中放射能はその後徐々に低下し、投与後 12 時間までに雌雄ともに検出限界未満となった。

分布試験において、アミファンプリジンに関連した放射能は消化管から速やかに吸収され、経口投与後 0.25 時間までにほぼすべての組織に存在したが、ほとんどの組織では投与後 2 時間で最高濃度を示した。血漿中放射能が測定可能であった期間（投与後 0.25～8 時間）では、組織中放射能濃度は血漿中放射能濃度とおおむね同程度又はそれ以上であり、排泄臓器（肝臓、腎臓及び消化管）及び腺機能の一部組織（涙腺、唾液腺、粘液腺、下垂体及び甲状腺）に最も多く存在した。放射能濃度が最も低かったのは眼の水晶体、脂肪、中枢神経系（脳、松果体、脊髄）であり、投与後 2～8 時間の間に放射能が測定可能であったが、血漿中濃度よりもかなり低い濃度であった。最高濃度に達した後、濃度は低下し、投与後 72 時間までに測定可能な放射能を含む組織はわずかであった（肝臓、鼻粘膜、食道及び小腸壁並びに甲状腺）。経口投与後 168 時間に安楽死させたラットでは、雌動物の甲状腺及び食道壁のみで放射能濃度が検出限界を超えていた。放射能の分布パターンは雌雄で類似していたが、雌ラットの放射能の組織濃度は雄よりもわずかに高く、雌ラットの甲状腺には雄には見られない顕著な放射能の残存がみられた（表 2.6.5.5-1）。

経口投与後の放射能の消失は速やかで、主に尿中に認められ、雌雄共に投与量の約 88%が 168 時間までに回収されたことから、少なくともこれだけの量は消化管から吸収されることが示された。糞中回収率は経口投与量の約 6～7%であった。屠殺体には経口投与量の 0.3%以下が存在し、平均総回収率は雄で約 98%、雌で約 96%であった。投与した放射能の排泄は投与後 168 時間の試料採取期間終了時までにほぼ完了した（表 2.6.5.12-1）。

結論として、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩は、雌雄ラットへの経口投与後、迅速かつ広範に吸収されると思われ、尿中排泄データから、投与放射能の少なくとも約 88%が消化管から吸収されると推定された。吸収後、薬物に関連した放射能は広範囲に分布し、排泄臓器及び腺/分泌組織で最も高かった。放射能の消失は速やかで、主に尿を介し、投与経路にかかわらず投与後 168 時間までにほぼ完了した。血漿中濃度推移のパターン、排泄速度及び排泄経路並びに組織分布に明らかな性差は認められなかった。しかし、組織中のアミファンプリジンに関連した放射能濃度は、雄ラットよりも雌ラットの方が高く、雌ラットの甲状腺

には顕著な放射能の残留が認められたが、雄ラットでは認められなかった。

2.6.4.5　代謝（動物種間の比較）

2.6.4.5.1　ラット、イヌ、サル及びヒト凍結肝細胞を用いたアミファンプリジンリン酸塩のクリアランスの動物種間比較（試験番号 PR6958/CC22[redacted]（4.2.2.4.01））

本試験の目的は、ラット、イヌ、サル及びヒト凍結肝細胞を用いて、アミファンプリジンリン酸塩のクリアランスについて、動物種間比較を行うことであった。

アミファンプリジンリン酸塩を、Sprague-Dawley ラット、ビーグル、カニクイザル及びヒト由来の単層培養した肝細胞とインキュベートした。肝細胞は単離した凍結保存細胞から調製した。動物種由来の肝細胞は、第 1 相酵素活性、エトキシレゾルフィン O - デエチラーゼ（CYP1A）と第 2 相酵素活性、アセトアミノフェングルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）を測定することにより特徴付けた。ヒト肝細胞は、2 つの第 1 相酵素活性、フェナセチン O-デエチラーゼ（CYP1A2）とニフェジピンオキシダーゼ（CYP3A4/5）及び 1 つの第 2 相酵素活性、アセトアミノフェングルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT1A6）を測定することにより特徴付けた。

アミファンプリジンリン酸を、1、10 及び 100 µmol/L で 0、0.25、0.5、1、2 及び 4 時間、各動物種のすべての細胞バッチとインキュベートした。対照として、被験物質なしで細胞と 4 時間インキュベートしたものと被験物質を細胞なしで 0、0.25、0.5、1、2 及び 4 時間インキュベートしたものを調製した。各インキュベーション時間の終わりに、細胞を超音波処理した。プレートを遠心分離した後、上清を回収し、LC-MS/MS で分析するまで約−80℃で保存した。

形態学的観察に基づき、被験物質は 1、10 及び 100 µmol/L の濃度で 4 時間インキュベーションした際、試験に用いたいずれの肝細胞に対しても細胞毒性を示さないと思われた。インキュベーション中に採取した検体中に残存したアミファンプリジン濃度を、バリデート済みの LC-MS/MS 法を用いて測定した。

その結果、アミファンプリジンはラット及びサル肝細胞とインキュベートした場合には広範に代謝され、イヌ肝細胞とインキュベートした場合には代謝されないことが示された。アミファンプリジンは、ラット及びサルの肝細胞と比較してヒト肝細胞で代謝される程度が低く、ヒトにおける個体間のばらつきを反映して、被験者間の反応にはばらつきがみられた。ラット肝細胞、サル肝細胞及び 3 つのヒト肝細胞バッチのうち 2 つについて、固有代謝クリアランスを算出した。濃度が高いほど固有代謝クリアランスが低下しており、酵素系が飽和していることが示唆された。それぞれの動物種における代謝クリアランスを表 2.6.5.9-1 に示す。

結論として、これら動物種はアミファンプリジンの固有クリアランスが高い順に次のように分類できた：ラット肝細胞>サル肝細胞>ヒト肝細胞。イヌは、ヒトと同様にアミファンプリジンの肝細胞クリアランスが全体的に比較的低いことから、ヒトを反映する非げっ歯類の動物種として選択された。

2.6.4.5.2　ラット、ウサギ、イヌ、サル、ミニブタ及びヒト肝細胞による[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の *in vitro* 代謝（試験番号 BMN125-10-038（4.2.2.4.02））

本試験の目的は、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の代謝の程度、代謝プロファイル及び代謝物の特性を数種の動物種で明らかにすることであった。

[^{14}C]アミファンプリジンの代謝を、Sprague-Dawley ラット、New Zealand White ウサギ、ビーグル、カニクイザル、ゲッチンゲンミニブタ、及びヒト由来の単離肝細胞で調べた。インキュベーション試料を、放射化学検出器を装備した高速液体クロマトグラフィー（ラジオ HPLC）により[^{14}C]アミファンプリジンとその代謝物について分析した。選択した試料については、観察された代謝物の構造的特徴を知るために LC-MS 法を用いて分析した。

[^{14}C]アミファンプリジンの主要な代謝は、単一代謝物 M1（3-N-アセチル体）への代謝で、ラット、サル及びヒトの新鮮肝細胞の存在下でラジオ HPLC により観察された。[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を 10 µmol/L の濃度で 4 時間インキュベーションしたとき、ウサギの凍結肝細胞では低レベルの M1 生成が観察されたが、ミニブタ凍結肝細胞では代謝は観察されなかった。また、イヌの新鮮肝細胞でも M1 を生成しなかったが、イヌの肝細胞とのインキュベーションではマイナーな代謝物（M2）が一貫して観察された。LC-MS 法を用いて M2 を同定することはできなかったが、これはおそらく低レベルにしか存在しなかったこととイオン化不良によるためと考えられた。また、LC-MS によりアミファンプリジン配糖体代謝物（M3）が認められ、微量代謝物と考えられた。

3 例のヒトドナーの肝細胞において、[^{14}C]アミファンプリジン代謝速度に大きな差が認められた。これらの違いは、おそらくアミファンプリジンの主要代謝酵素と考えられている N-アセチルトランスフェラーゼの多型によると考えられる。ドナー肝細胞について得られた遺伝子型タイピングデータは、観察された代謝速度と良く相関した。アミファンプリジン由来放射能の消失と、それに対応する 3-N-アセチル体由来放射能の増加の時間経過を、それぞれの動物種について表 2.6.5.9-2 に示す。

代謝物 M1 の生成速度は、ラットの方がヒトよりわずかに高く、次いでサル、ウサギの順であった。イヌとミニブタは M1 を生成しなかった。N-アセチル化が主要経路であることが観察され、N-アセチルトランスフェラーゼの遺伝的多型がヒトに多くみられることから、ヒト集団ではアミファンプリジン曝露の変動は大きいと考えられる。N-アセチル代謝物の生成に基づくと、ラット又はサルは、ヒトにおいて未変化体及び M1 の両方への曝露を示す代表的なモデルとなり、イヌ又はミニブタは、ヒトにおいて高濃度の未変化体への曝露を示す代表的な動物になると考えられた。

2.6.4.5.3　ヒト肝細胞による amifampridine リン酸塩の代謝（試験番号 BMN125-10-037（4.2.2.4.03））

本試験の目的は、ヒト肝細胞を用いて、アミファンプリジンリン酸塩の代謝に関する予備的情報を得ることであった。

ヒトから単離・プール（n=10；男性 5 例、女性 5 例）した凍結肝細胞を用いて、アミファンプリジンの代謝を検討した。アミファンプリジンリン酸塩（10 μmol/L）を 1×10^6 肝細胞/mL の肝細胞懸濁液中で 0、60 及び 240 分間インキュベートした。肝細胞はウィリアムズ培地 E に懸濁し、37°C、5% CO_2 及び 95%湿度の中でアミファンプリジンリン酸塩とインキュベートした。肝細胞のインキュベーションは、内部標準の 0.5 μmol/L アセトアミノフェンを含むアセトニトリルの添加により終了し、LC-MS/MS によりアミファンプリジンとその N-アセチル化代謝物を分析した。

ヒト肝細胞の存在下でアミファンプリジンの多くの N-アセチル化が観察された。ヒト肝細胞は選択的に N-(4-aminopyridin-3-yl) acetamide（3-N-アセチル体）を生成すると思われた。N-(3-aminopyridin-4-yl) acetamide（4-N-アセチル体）及び N,N-3,4-pyridinylbisacetamide（3,4-N,N'-ビスアセチル体）は肝細胞インキュベーション試料では認められなかった。本試験の条件における 3-N-アセチル体の生成率は、対照資料（肝細胞なし）中の未変化体に対して約 40%であった。3-N-アセチル体の生成量の経時的な増加を表 2.6.5.9-3 に要約する。

2.6.4.5.4 [^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の代謝に関与するヒトチトクローム P450、N-アセチルトランスフェラーゼ及びフラビン含有モノオキシゲナーゼの役割の評価（試験番号 BMN125-10-040（4.2.2.4.04））

本試験の目的は、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の生体内変換における CYP アイソザイム、NAT 及び FMO の役割を評価することであった。[^{14}C]アミファンプリジンの代謝における特異的 CYP アイソザイム、NAT 及び FMO の関与を、ヒト肝ミクロソーム、S9 画分及び個々の組換えヒト酵素を含むミクロソームとのインキュベーションにより検討した。最適なインキュベーション条件を確立するために、インキュベーション時間、ミクロソームタンパク質濃度及び代謝速度の間の関係を調べる予備試験を、ヒト肝ミクロソーム及び S9 画分を用いて実施した。

[^{14}C]アミファンプリジンの酸化的代謝に対する CYP アイソザイムの寄与を評価するためにプールしたヒト肝ミクロソームを用いた実験では、検出可能な代謝物は認められなかった。したがって、[^{14}C]アミファンプリジンは CYP アイソザイムによって容易に代謝されるとは考えられない。

プールしたヒト肝 S9 画分とアセチル補酵素 A を補因子として用いた実験では、[^{14}C]アミファンプリジンの単一の代謝物（M1）への代謝が示された。代謝物 M1 は、これまでの肝細胞代謝試験で認められた代謝物との比較に基づき、アミファンプリジンの 3-N-アセチル体として同定された（試験番号 BMN125-10-037（4.2.2.4.03）、BMN125-10-038（4.2.2.4.02））。3-N-アセチル体の生成は、K_m が 62.3 μmol/L、V_{max} が 112 pmol/minute/mg protein であり、特異的阻害剤を用いた検討と個別に発現した組換え酵素の検討から、NAT1 と NAT2 アイソフォームの両方によって媒介されることが示された。しかし、個別に発現した酵素データから、NAT2 が NAT1 と比較して[^{14}C]アミファンプリジンをより効率的に代謝する可能性が示された（表 2.6.5.9-4）。

個々に発現した FMO（具体的には FMO1、FMO3 及び FMO5）を用いた実験から、これらの酵素は[^{14}C]アミファンプリジンの代謝には寄与しないことが示された。

2.6.4.5.5　ラット及びイヌを用いた[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の代謝物プロファイリング及び同定試験（試験番号 BMN125-10-006（4.2.2.4.05））

本試験の目的は、ラット及びイヌにおける[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の経口及び静脈内投与後の代謝物プロファイリング及び代謝物同定を行うことであった。

Sprague-Dawley ラット（試験番号 BMN125-10-005（4.2.2.3.02））及びビーグル（試験番号 BMN125-10-004（4.2.2.2.05））に、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を経口及び静脈内投与したとき［ラット：25 mg/kg（経口）及び 2.5 mg/kg（静脈内）。イヌ： 0.5 mg/kg（経口）及び 0.05 mg/kg（静脈内）］のマスバランス試験を実施した。薬物関連物質の経口バイオアベイラビリティは両動物種で高かった（雄ラットで約 92%、雌ラットで約 75%、イヌで 100%超）。薬物関連物質は主に腎経路を介して排泄された（ラット及びイヌ共に尿中に用量の 88%超）。

本試験では、ラジオ HPLC を用いた代謝物プロファイリングと LC-MS/MS を用いた構造同定によって、ラット血漿中に未変化体であるアミファンプリジンは検出できなかった。3-N-アセチル体は、分析した 3 時点でラット血漿中の主要放射能成分であった。ラットの尿中では、アミファンプリジンは存在しない（雄）か又は少量の放射能成分（雌）であったが、3-N-アセチル体として投与量の 80%～85%排泄された（表 2.6.5.8-1）。アミファンプリジンの 3-N-アセチル体の構造を図 2.6.4.5-1 に示す。

図 2.6.4.5-1　　ラットにおけるアミファンプリジンの 3-N-アセチル体への生体内変換



イヌに[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を静脈内及び経口投与したとき、血漿中の検出可能な唯一の放射能成分は未変化体（アミファンプリジン）であったが、アミファンプリジンの濃度は静脈内投与後 2～3 時間又は経口投与後 6～8 時間以降定量できなかった。一方、放射能濃度は投与後 24 時間（最終サンプリング時間）まで定量可能であった。経口投与後のイヌ血漿抽出物中にマイナーな代謝物があるというあいまいな証拠が得られたが、ラジオ HPLC では定量下限未満であり、バックグラウンドとの区別ができなかった。イヌに[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を経口投与したとき、投与量の約 50%が未変化体として尿中に排泄され、他に 9 種類以下の放射能成分（D1～D9）が検出された。そのうち D3、D7 及び D8 が最も多かった（雄イヌではそれぞれ投与量の 10、9 及び 5%、雌イヌではそれぞれ投与量の 6、5 及び 6%）。本試験において、これらの代謝物のいずれも構造的に特徴づける

ことができなかった。ただ、D3 については m/z=192 が決定されている。

ラットとイヌの血漿と尿の両方で行われた、β-グルクロニダーゼとスルファターゼによる酵素脱抱合実験では、未処理試料と酵素処理試料の間で顕著な差異は認められなかった。このことは、グルクロン酸及び硫酸抱合は、いずれの動物種においても、アミファンプリジン及び/又はその第 1 相代謝物（生成した場合）の直接的な生体内変換の経路ではないことを示唆している。

結論として、両動物種においてアミファンプリジンは広範な経口吸収と腎臓を介した尿中への排泄を示したが、げっ歯類と非げっ歯類の間で明らかに異なる代謝が観察された。ラットでは、[^{14}C]アミファンプリジンは主に 3 位でアセチル化されて排泄されたが、イヌでは未変化のまま排泄されるか、又は[^{14}C]アミファンプリジンが代謝されて、クロマトグラフィー上明らかに極性の低いいくつかの代謝物に変化した。本試験ではイヌで生成された極性の低い代謝物の構造を決定することはできなかった。

2.6.4.5.6　アミファンプリジンリン酸塩のヒトチトクローム P450 阻害能の *in vitro* 評価（試験番号 BMN125-10-054（4.2.2.4.06））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩が、CYP アイソザイム（CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4）の特異的プローブ基質によって生成する代謝物を指標に、CYP 活性を阻害する可能性を評価することであった。

CYP 特異的プローブ基質を CYP 特異的阻害剤又はアミファンプリジン（0.1、0.3、1、3、10 及び 30 µmol/L）の存在下及び非存在下で、プールしたヒト肝ミクロソームとインキュベートした。更に、同濃度のアミファンプリジンリン酸塩を、CYP 特異的プローブ基質を加える前に、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 2'-リン酸（NADPH）の存在下及び非存在下で、プールしたヒト肝ミクロソームと 30 分間プレインキュベートし、時間依存的阻害の可能性を評価した。CYP 特異的阻害剤及びアミファンプリジンが、該当するプローブ基質代謝物の生成速度に及ぼす影響を評価した。阻害が有意なレベル（50%超）に達した場合、直接及び時間依存的阻害の両方に対する阻害濃度の中央値（IC_{50}）を測定した。

その結果、アミファンプリジンは 30 µmol/L までの濃度で CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 アイソフォームを有意に阻害しなかった。したがって、これらのアイソフォームについて IC_{50} 値を算出することはできなかった（表 2.6.5.11-1）。

同様に、NADPH と 30 分間プレインキュベーションした結果、アミファンプリジンは CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 に対して有意な阻害を示さず、アミファンプリジンはこれらのアイソフォームの時間依存的阻害剤ではないことが示された（表 2.6.5.11-1）。

この *in vitro* CYP 阻害試験の結果から、アミファンプリジンは、併用する薬剤の CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 代謝阻

害に基づく臨床薬物-薬物相互作用には関与しないと考えられた。したがって、本試験の結果から、アミファンプリジンを介した肝 CYP 阻害による薬物－薬物相互作用は、LEMS 患者に治療効果があるアミファンプリジンの血漿中濃度の範囲において、他の同時投与された薬物の CYP を介した代謝に影響を及ぼすことはないか、最小限であろうと結論された。

2.6.4.5.7　ヒト初代培養肝細胞におけるアミファンプリジンリン酸塩の誘導能の *in vitro* 評価（試験番号 BMN125-10-053（4.2.2.4.07））

本試験の目的は、ヒト初代培養肝細胞を利用して、アミファンプリジンリン酸塩が *in vitro* で肝 CYP 酵素を誘導する可能性を評価することであった。

アミファンプリジンリン酸塩（0.3、3、及び 30 µmol/L）及び既知の CYP 誘導物質、オメプラゾール、フェノバルビタール及びリファンピシンを、3 例の異なるドナー由来のヒト肝細胞の培養液中で連続 3 日間インキュベートした。試料を採取し、選択的 CYP アイソフォーム基質を用いて CYP 特異的代謝物マーカーの生成により CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の活性を測定した。これら 3 つの CYP アイソザイム（48 時間インキュベーション後）及び特異的 UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼアイソザイム（UGT1A1）のメッセンジャーRNA（mRNA）含量を、TaqMan®ベースの定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）を用いて分析した。

各陽性対照について、平均誘導データ（n=3）を作成し、それらの平均値から対応する平均溶媒対照値を差し引いて調整した陽性対照反応を得た。アミファンプリジンアッセイからの誘導結果を 3 回のサンプルから平均し、対応する調整後の陽性対照と比較した。所定の CYP アイソフォーム特異的陽性対照を 100%として、陽性対照に対する誘導レベルをパーセントで表した。

3 ドナーの肝細胞培養物のいずれにおいても、アミファンプリジンに 72 時間曝露した後、アミファンプリジンは陽性対照と比較して CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の酵素活性を顕著に上昇させないことが示された。また、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1 酵素の mRNA 発現量に著しい変化（qRT-PCR 法による）は認められなかった（表 2.6.5.11-2）。

結論として、本試験の結果、アミファンプリジンが検討した濃度（0.3、3 及び 30 µmol/L）において、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の酵素誘導による薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられた。

2.6.4.6　排泄

Sprague-Dawley ラット（試験番号 BMN125-10-005（4.2.2.3.02））及びビーグル（試験番号 BMN125-10-004（4.2.2.2.05））に、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩を経口及び静脈内投与した際［ラット：25 mg/kg（経口）及び 2.5 mg/kg（静脈内）。イヌ： 0.5 mg/kg（経口）及び 0.05 mg/kg（静脈内）］のマスバランス試験を実施した。これらのラット及びイヌの試験の一部として排泄も評価され、薬物関連放射能は主に腎経路を介して排泄されることが示された（ラット及びイヌともに尿中に用量の 88%超）。ラット及びイヌのマスバランス試験は、

それぞれ 2.6.4.4.2 項及び 2.6.4.3.5 項に要約されている。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1 [^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の P-糖タンパク質基質及び阻害剤としての評価（試験番号 BMN125-10-042（4.2.2.2.01））

本試験の目的は、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の P-糖タンパク質（P-gp）相互作用を、Caco-2 細胞単層を用いて評価することであった。

Caco-2 細胞単層が完全な単層になっているかどうかは、インキュベーションの前後に経上皮電気抵抗値を測定することにより確認した。また、マンニトール（傍細胞マーカー）及びカフェイン（経細胞マーカー）の A to B 及び B to A の透過性（2.6.4.3.1 項参照）、並びに既知の P-gp 阻害剤（10 µmol/L のシクロスポリン A 又は 2 µmol/L のゾスキダル）の非存在下及び存在下におけるジゴキシン（P-gp 基質）の流出比（非存在下：6.40～7.29、シクロスポリン A 存在下：1.65、ゾスキダル存在下：0.64）から、Caco-2 細胞単層が正常に機能することが示された。したがって、本試験で[^{14}C]アミファンプリジンについて得られた結果の信頼性は高いと考えられた。

P-gp 阻害剤（10 µM のシクロスポリン A 又は 2 µmol/L のゾスキダル）の非存在下及び存在下で、[^{14}C]アミファンプリジン（1、10、30 µmol/L）の Caco-2 細胞単層における見かけの透過性を A to B 及び B to A 方向の両方で測定した。

[^{14}C]アミファンプリジンに対する流出比はすべての濃度で 2 より小さかった。P-gp 阻害剤の存在は見かけの透過性又は流出比に何ら影響を及ぼさなかった。加えて、1～100 µmol/L の濃度のアミファンプリジンは[^{3}H]ジゴキシン輸送の流出比を有意に減少させなかった（表 2.6.5.14-1）。したがって、本試験で用いた条件下では、アミファンプリジンは P-gp の基質又は阻害剤ではなかった。

2.6.4.7.2 アミファンプリジンリン酸塩とその 3-N-アセチル体のヒト取り込み及び排出トランスポーター阻害剤としての評価（試験番号 BMN125-12-008（4.2.2.6.01））

本試験の目的は、アミファンプリジンリン酸塩がヒトの取り込み（OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3）又は排出（BSEP 及び BCRP）トランスポーターによる基質の *in vitro* 輸送を阻害する可能性、及び 3-N-アセチル体が P-gp による基質の *in vitro* 輸送を阻害するかどうかを評価することであった。

溶質担体（SLC）ファミリー（OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、OATP1B1 及び OATP1B3）に代表される輸送体の取り込み試験系には、透過性支持体上で増殖した極性のある MDCK-II 細胞の単層を用いた。MDCK-II 細胞を目的のトランスポーター遺伝子を含むベクターで処理して発現させるか又は対照ベクターで処理した。BCRP の試験系には、透過性支持体上で増殖し、極性のある Caco-2 細胞の単層を用いた。P-gp 輸送の試験系には、透過性支持体上で増殖し、極性のある MDCK-MDR1 細胞の単層を用いた。BSEP の試験系には、ヒト BSEP を発現する Sf9 膜小胞を用いた。小胞を懸濁液として 96 ウェル平底アッセイプレート上に

添加し、96 ウェルガラス繊維濾過プレートによって反応混合物から分離した。基質の輸送は放射活性により測定した。

溶媒対照（0.5% DMSO）での基質の輸送を、30 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩、40 µmol/L の 3-N-アセチル体又はトランスポーター特異的な阻害剤存在下での取り込みと比較した。試験で用いられたアミファンプリジンリン酸塩及び代謝物の濃度は、健康被験者を対象とした臨床試験で認められた濃度の約 10 倍高かった。

その結果、アミファンプリジンリン酸塩（30 µmol/L）は、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、BSEP 及び BCRP を介したプローブ基質の輸送を有意に阻害しなかった。溶媒対照と比較して、30 µmol/L のアミファンプリジンリン酸塩は OATP1B3 を介したプローブ基質輸送を 16.8%阻害した（p=0.0091）。OATP1B3 は類洞膜の基底外側の肝細胞に発現し血流から肝臓へ基質を輸送するため、基質の肝臓での消失を媒介することができる。

アミファンプリジンリン酸塩の 3-N-アセチル体（40 µmol/L）は検討したいずれのトランスポーター（OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、BSEP、BCRP 及び P-gp）に対しても有意な阻害作用を示さなかった（表 2.6.5.14-2）。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施されていない。

2.6.4.9　考察及び結論

アミファンプリジン（遊離塩基又はリン酸塩として投与）の吸収及び消失は、ラット及びイヌで速やかであることが示されたが、化学形態間で著しい相違は認められなかった。アミファンプリジンリン酸塩の PK 試験の結果、ラットとイヌで PK プロファイルに大きな差異が認められた。イヌにアミファンプリジンリン酸塩を経口投与したときのアミファンプリジンの曝露量（C_{max} 及び AUC）は、ラットに比べてかなり高かった。イヌの曝露量がより高いのは、ラットやヒトを含む他の種に存在する N-アセチル化代謝経路がないためと考えられる。したがって、イヌは、ヒトにおけるアミファンプリジンの slow acetylator を反映する動物種として最適であった。

ラットにおけるアミファンプリジンの PK を評価するため、単回経口投与（1 日 3 回）、静脈内及び腹腔内投与 PK 試験を実施した。ラットにおける経口投与（6～75 mg/kg/日）PK 試験では、AUC 及び C_{max} に基づくアミファンプリジンの曝露量が用量比を超えて増加し、より高い用量における曝露量は著しく高く、初回通過代謝を受ける可能性が示された。また、アミファンプリジンの曝露量は、非絶食ラットよりも絶食ラットの方が大きいと思われた。主代謝物である 3-N-アセチル体の血漿中濃度は、いずれの測定時点においてもアミファンプリジンよりも著しく高く、$t_{1/2}$ は 1 時間を超え、アミファンプリジン（$t_{1/2}$ は約 0.5 時間）よりも長かった。加えて、3-N-アセチル体の血漿中濃度は、アミファンプリジンリン酸塩の用量の増加に伴って用量比を下回って増加し、またアミファンプリジンに対する代謝物の比はアミファンプリジンリン酸塩の用量の増加に伴って減少したことから、この主要代謝

経路の飽和が示唆された。ラットにおける静脈内投与では、アミファンプリジンのクリアランスは 16 L/h/kg 超と大きかった。また、分布容積は 6 L/kg 超と体内総水分量よりも大きく、全身への広範な分布が示唆された。絶対的経口バイオアベイラビリティは用量依存的（12%～>100%）であり、最高用量（25 mg/kg）で最高値を示し、初回通過代謝の飽和が疑われた。ラットに 2.5、7.5 及び 25 mg/kg を腹腔内投与したときの全身曝露量は、用量比を上回って増加した。性差も明らかであり、アミファンプリジンを 2.5 及び 7.5 mg/kg を投与したときの C_{max} 及び AUC_{0-t} 値は、雄よりも雌の方が高かった。毒性のため、25 mg/kg 腹腔内投与後の全身曝露量は評価されなかった。

[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩のラット及びイヌを用いた PK 試験では、[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩は経口投与後迅速かつ広範に吸収され、投与後 168 時間までに主要な消失経路である腎排泄を経て、ほぼ完全に排泄された。

ラットを用いた組織分布試験の結果、[^{14}C]アミファンプリジンは、血液及び血漿と同等以上の濃度で広く分布していたが、中枢神経系（脳）、脂肪、眼では、いずれの時点においても血液及び血漿に比べ数倍低いことが認められた。

ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞を用いて実施した初期の *in vitro* 試験におけるアミファンプリジンの代謝から、アミファンプリジンはラット及びサルの肝細胞により速やかに消失することが示された。一方で、アミファンプリジンはイヌ肝細胞によってほとんど代謝されなかった。ヒト肝細胞では、代謝はドナー依存的であったが、概して低かった。したがって、イヌはヒトにおいてアミファンプリジン投与後の曝露が最も高い場合のモデルであると結論された。

ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞を用いた[^{14}C]アミファンプリジンリン酸塩の次の *in vitro* 代謝試験で、完全な代謝プロファイルが得られた。ラット、サル及びヒトの肝細胞では、単一の 3-N-アセチル体が認められたが、イヌでは認められなかった。個々のヒトドナー由来の肝細胞では、様々な程度の 3-N-アセチル体の生成が観察され、これはすでに知られている N-アセチルトランスフェラーゼの個体間多型を示すものである。ラットと同様に、ヒト肝細胞（男女混合プール）は、かなりの量のアミファンプリジン（約 40%）を単一の 3-N-アセチル体に変換した。

ヒト肝組織におけるアミファンプリジンの CYP 阻害及び誘導の可能性を評価するため *in vitro* 試験を実施した。アミファンプリジンは、0.1～30 µmol/L の濃度において、9 つの主要なヒト CYP アイソザイムに対して阻害作用を示さず、IC_{50} 値は算出できなかった。これらの濃度は、臨床で観察された最高血漿中濃度（1.6 µmol/L；178 ng/mL；DAPSEL 試験（5.3.1.1.01））の 10 倍超の範囲を含んでいた。同様に、アミファンプリジンは、0.3～30 µmol/L の濃度において、生体異物によりアップレギュレーションを受けやすい CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 及び UGT1A1 酵素を誘導する可能性が低いことが示された。また、アミファンプリジン 0.3～10 µmol/L の *in vitro* 血漿タンパク結合率は 15%未満と低かった。以上の *in vitro* 試験の結果から、アミファンプリジンの推奨される治療範囲（単回最大用量 20 mg 未満）とそれに伴うヒトの血漿中濃度の範囲内では、CYP 阻害、CYP 誘導あるいは血漿タンパク結

合に関連した臨床薬物－薬物相互作用のリスクは低いと考えられる。

Caco-2 細胞を用いて[^{14}C]アミファンプリジンの見かけの透過性と P-gp を介した相互作用の可能性を評価した結果、アミファンプリジンは P-gp の基質及び阻害剤ではないことが示された。

アミファンプリジンリン酸塩及びその 3-N-アセチル体の *in vitro* トランスポーター試験の結果、アミファンプリジンは OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、BSEP 及び BCRP を介したプローブ基質の輸送を有意に阻害しなかったが、OATP1B3 を介した輸送を 16.8%阻害した。アミファンプリジンリン酸塩の 3-N-アセチル体は、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、BSEP、BCRP 及び P-gp を含む検討したいずれのトランスポーターに対しても有意な阻害作用を示さなかった。

総括すると、アミファンプリジンは、その PK 試験から、迅速かつ広範な吸収、幅広い組織分布、単一の主要代謝物である 3-N-アセチル体の生成（ラット及びヒトでみられ、イヌではみられない）、CYP 阻害又は誘導の欠如、及び迅速かつ広範な腎排泄の特徴を有することが示された。

2.6.4.10 図表

関連する各項目の本文中に記載した。

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
2.6.5 薬物動態試験概要表

ダイドーファーマ株式会社

目次

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 4
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 6
2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 7
2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収 12
2.6.5.5 薬物動態試験：分布 13
2.6.5.6 薬物動態試験：タンパク結合及び血球中への移行 15
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 17
2.6.5.8 薬物動態試験：代謝（*in vivo*） 18
2.6.5.9 薬物動態試験：代謝（*in vitro*） 20
2.6.5.10 薬物動態試験：推定代謝経路 24
2.6.5.11 薬物動態試験：肝薬物代謝酵素の誘導／阻害 25
2.6.5.12 薬物動態試験：排泄 27
2.6.5.13 薬物動態試験：胆汁中排泄 29
2.6.5.14 薬物動態試験：薬物動態学的相互作用 30
2.6.5.15 薬物動態試験：その他 32

表の目次

表 2.6.5.1-1 一覧表 4
表 2.6.5.2-1 分析方法及びバリデーション試験 6
表 2.6.5.3-1 ラット単回経口投与試験 7
表 2.6.5.3-2 ラット単回静脈内及び経口投与試験 8
表 2.6.5.3-3 ラット単回腹腔内投与試験 9
表 2.6.5.3-4 イヌ単回静脈内及び経口投与試験 10
表 2.6.5.3-5 イヌ単回経口投与試験 11
表 2.6.5.5-1 ラット組織内分布 13
表 2.6.5.6-1 血漿タンパク結合 15
表 2.6.5.6-2 ヒトにおける血液ー血漿分配 16
表 2.6.5.8-1 代謝（*in vivo*） 18
表 2.6.5.9-1 動物及びヒト肝細胞における代謝速度 20
表 2.6.5.9-2 動物及びヒト肝細胞における代謝 21
表 2.6.5.9-3 ヒト肝細胞による代謝 22
表 2.6.5.9-4 ヒト肝 S-9 及び NAT による代謝 23
表 2.6.5.11-1 CYP 阻害 25

表 2.6.5.11-2　CYP 誘導.....26
表 2.6.5.12-1　ラットに単回静脈内及び経口投与後の尿・糞中放射能排泄率.....27
表 2.6.5.12-2　イヌに単回静脈内及び経口投与後の尿・糞中放射能排泄率.....28
表 2.6.5.14-1　P-gp 基質性及び阻害評価.....30
表 2.6.5.14-2　トランスポーター阻害試験 31

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表

表 2.6.5.1-1　一覧表

Test Article: Amifampridine Phosphate

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study Reference	Location
Absorption	Rat/ Sprague-Dawley	Oral	[redacted], France	[redacted] 266/009 （参考資料）	4.2.2.2.02
Absorption	Rat/ Sprague-Dawley	Oral, Intravenous	[redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN125-10-036	4.2.2.2.03
Absorption	Rat/ Sprague-Dawley	Intraperitoneal	[redacted], [redacted], Italy	[redacted]4932	4.2.2.2.04
Absorption	Dog/ Beagle	Oral, Intravenous	[redacted], [redacted], UK	BMN125-10-004	4.2.2.2.05
Absorption	Dog/ Beagle	Oral	[redacted], France	[redacted] 266/008 （参考資料）	4.2.2.2.06
Distribution	Plasma: Rat/ Sprague-Dawley, Dog/ Beagle, Monkey/ Cynomolgus, Human	*In vitro*	[redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN125-10-041	4.2.2.3.01
Distribution	Rat/ Sprague-Dawley	Oral	[redacted], [redacted], UK	BMN125-10-005	4.2.2.3.02
Metabolism	Hepatocytes: Rat/ Sprague-Dawley, Dog/ Beagle, Monkey/ Cynomolgus, Human	*In vitro*	[redacted], France	PR6958/CC22[redacted]	4.2.2.4.01
Metabolism	Hepatocytes: Rat/ Sprague-Dawley, Rabbit/ NZW, Dog/ Beagle, Monkey/ Cynomolgus, Pig/ Göttingen, Human	*In vitro*	[redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN125-10-038	4.2.2.4.02

Type of Study	Test System Species/Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study Reference	Location
Metabolism	Hepatocytes: Human	*In vitro*	[redacted], USA	BMN125-10-037	4.2.2.4.03
Metabolism	Liver microsomes and S9 fractions: Human	*In vitro*	[redacted], USA	BMN125-10-040	4.2.2.4.04
Metabolism	Rat/ Sprague-Dawley, Dog/ Beagle	Oral, Intravenous (dog only)	[redacted], UK	BMN125-10-006	4.2.2.4.05
Metabolism	Liver microsomes: Human	*In vitro*	[redacted], USA	BMN125-10-054	4.2.2.4.06
Metabolism	Hepatocytes: Human	*In vitro*	[redacted], USA	BMN125-10-053	4.2.2.4.07
Excretion	Rat/ Sprague-Dawley	Oral, Intravenous	[redacted], UK	BMN125-10-005	4.2.2.3.02
Excretion	Dog/ Beagle	Oral, Intravenous	[redacted], UK	BMN125-10-004	4.2.2.2.05
Drug-drug interactions	Caco-2 cells	*In vitro*	[redacted], USA	BMN125-10-042	4.2.2.2.01
Drug-drug interactions	Caco-2 cells, MDCK-II cells, MDCK-MDR1 cells, Sf9 vesicle	*In vitro*	[redacted], USA	BMN125-12-008	4.2.2.6.01

NZW = New Zealand White.

2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験

表 2.6.5.2-1　分析方法及びバリデーション試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study Description	Species	Analytical Range	LLOQ	Analysis Facility	Study Reference
LC-MS/MS, for quantitation of amifampridine in rat K_2EDTA plasma	Rat/ Sprague-Dawley	0.250 to 250 ng/mL	0.250 ng/mL	[redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN125-10-045 （4.2.2.1.03）
LC-MS/MS, for quantitation of amifampridine in rat plasma	Rat/ Sprague-Dawley	5.00 to 1000 ng/mL	5.00 ng/mL	[redacted], [redacted], France	[redacted]065501 （4.2.2.1.04）
LC-MS/MS, for quantitation of amifampridine in dog plasma	Dog/ Beagle	5.00 to 1000 ng/mL	5.00 ng/mL	[redacted], [redacted], France	[redacted]065547 （4.2.2.1.05）
HPLC-ECD, for quantitation of amifampridine in rat and dog plasma	Rat/ Sprague-Dawley, Dog/ Beagle	15 to 150 ng/mL	15 ng/mL	[redacted], [redacted], France	23377 （4.2.2.1.06） （参考資料）
LC-MS/MS, for quantitation of the 3-N-acetyl metabolite in rat K_2EDTA plasma	Rat/ Sprague-Dawley	2.00 to 2000 ng/mL	2.00 ng/mL	[redacted], [redacted], [redacted], USA	BMN125-10-074 （4.2.2.1.07）
LC-MS/MS, for quantitation of amifampridine and the 3-Nacetyl metabolite in dog K_2EDTA plasma	Dog/ Beagle	Amifampridine: 0.500 to 500 ng/mL; 3-N-acetyl metabolite: 1.00 to 1000 ng/mL	Amifampridine: 0.500 ng/mL; 3-N-acetyl metabolite: 1.00 ng/mL	[redacted], [redacted], [redacted], USA	TRTPS13-053 （4.2.2.1.08）
LC-MS/MS, for quantitation of amifampridine in rat K_2EDTA plasma	Rat/ Sprague-Dawley	0.250 to 250 ng/mL	0.250 ng/mL	[redacted], [redacted], Italy	[redacted]4959 （4.2.2.1.09）
LC-MS/MS, for quantitation of amifampridine and 3-N-acetyl metabolite in rat K_2EDTA plasma	Rat/ Sprague-Dawley	0.250 to 250 ng/mL	0.250 ng/mL	[redacted], [redacted], Italy	[redacted]5547 （4.2.2.1.10）

HPLC-ECD = high performance liquid chromatography with electrochemical detection; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; LLOQ = lower limit of quantitation.

2.6.5.3　薬物動態試験：単回投与後の吸収

表 2.6.5.3-1　ラット単回経口投与試験

Test Article: Amifampridine Phosphate, Amifampridine Free Base

Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley		**Postdose Sampling Times (h):** 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 10, and 24		**Study Reference:** [redacted] 266/009		
Initial Age: Approximately 8 weeks		**Method of Administration:** Oral		**Location in CTD:** 4.2.2.2.02		
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted]		**Feeding Conditions:** Ad libitum		**GLP Compliance:** No		
Number of Animals/Sex/Group: 12		**Vehicle/Formulation:** Suspension, 1% CMC		**Assay:** HPLC-ECD		
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 3		**Sample:** Plasma				
Gender	**Test Article**	**Dose (mg/kg equivalent amifampridine free base)**	**Cmax (ng/mL)**	**Tmax (min)**	**AUC_{inf} (ng·min/mL)**	**$t_{1/2}$ (min)**
Male	Amifampridine phosphate	1	16.5	5	2762	134
	Amifampridine free base	1	15.0	5	3080	164
Female	Amifampridine phosphate	1	16.7	5	2564	105
	Amifampridine free base	1	28.3	15	2330	62

AUC_{inf} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero extrapolated to infinity; C_{max} = maximum plasma concentration; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; HPLC-ECD = high performance liquid chromatography with electrochemical detection; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

表 2.6.5.3-2　ラット単回静脈内及び経口投与試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley		**Postdose Sampling Times (h):** i.v. and oral dose 1: 0.083 (i.v. only), 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.25 (i.v. only), 1.5, 2, 2.5, 3, and 6; oral dose 2: 0.17, 0.5, and 6; oral dose 3: 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, and 10			**Study Reference:** BMN125-10-036			
Initial Age: Approximately 12 weeks		**Method of Administration:** i.v. and oral (t.i.d.)			**Location in CTD:** 4.2.2.2.03			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		**Feeding Conditions:** Fasted (oral dose 1) and ad libitum (i.v., and oral doses 2 and 3)			**GLP Compliance:** Yes			
Number of Animals/Sex/Group: 6 (i.v.) and 12 (oral)		**Vehicle/Formulation:** Solution, saline (i.v.) and water (oral)			**Assay:** LC-MS/MS			
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 3		**Sample:** Plasma						
Gender (Route)	**Dose* (mg/kg)**	**Cmax (ng/mL)**	**Tmax (h)**	**$AUC_{0\text{-}6h}$ (ng·h/mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**Cl (mL/h/kg)**	**Vss (mL/kg)**	**F (%)**
Male (i.v.)	0.8	119	0.083	49.2	0.436	16130	6654	NA
Female (i.v.)	0.8	94	0.083	39.2	0.364	20313	8129	NA
Male (oral)	2	22.5	0.33	14.9	0.424	NA	NA	12.2
	8	179	0.50	146	0.404	NA	NA	29.1
	25	1393	0.50	1405	0.580	NA	NA	90.7
Female (oral)	2	52.1	0.25	27.8	0.329	NA	NA	28.1
	8	503	0.33	294	0.502	NA	NA	74.6
	25	1499	0.50	1920	0.581	NA	NA	156

$AUC_{0\text{-}6h}$ = area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the 6 hour timepoint; Cl = clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; CTD = Common Technical Document; F = bioavailability; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; NA = not applicable; t.i.d. = three times daily; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration; Vss = volume of distribution at steady state.

* Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0.4 mg/kg (i.v.) and 1.1, 4.2, and 13.2 mg/kg/dose (oral), respectively.

表 2.6.5.3-3　ラット単回腹腔内投与試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley		**Postdose Sampling Times (h):** 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 2, and 6		**Study Reference:** [redacted]4932	
Initial Age: Not provided		**Method of Administration:** i.p.		**Location in CTD:** 4.2.2.2.04	
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted]		**Feeding Conditions:** Ad libitum		**GLP Compliance:** No	
Number of Animals/Sex/Group: 3		**Vehicle/Formulation:** Solution, saline		**Assay:** LC-MS/MS	
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 3		**Sample:** Plasma			
Gender	**Test Article**	**Dose (mg/kg equivalent amifampridine free base)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (h)**	**AUC_{0-t} (ng·h/mL)**
Male	Amifampridine phosphate	2.5	218	0.25	97.4
		7.5	1630	0.08	812
Female	Amifampridine phosphate	2.5	346	0.08	167
		7.5	2020	0.08	1130

AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the last measurable concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; i.p. = intraperitoneal; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

表 2.6.5.3-4　イヌ単回静脈内及び経口投与試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Dog/ Beagle		**Postdose Sampling Times (h):** 0.083 (i.v. only), 0.17 (i.v. only), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168			**Study Reference:** BMN125-10-004	
Initial Age: Approximately 6 months		**Method of Administration:** i.v. and oral			**Location in CTD:** 4.2.2.2.05	
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted]		**Feeding Conditions:** Fed			**GLP Compliance:** Yes	
Number of Animals/Sex/Group: 3		**Vehicle/Formulation:** Solution, saline (i.v.); suspension, 1% CMC (oral)			**Assay:** LSC	
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 3		**Sample:** Plasma				
[^{14}C]Amifampridine Phosphate Dose* (mg/kg)	**Animal No./Gender (Route)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (h)**	**AUC_{0-t} (ng·h/mL)**	**AUC_{inf} (ng·h/mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**
0.05	1M (i.v.)	16.3	0.083	46.6	51.3	3.7
	2M (i.v.)	16.5	0.083	53.2	54.7	5.2
	3M (i.v.)	16.2	0.083	56.3	56.8	6.9
0.05	4F (i.v.)	16.0	0.083	39.2	41.5	7.3
	5F (i.v.)	15.7	0.083	53.7	54.2	7.5
	6F (i.v.)	14.8	0.083	37.2	40.6	3.6
0.5	1M (oral)	89.9	2	702	731	78.6
	2M (oral)	102	1	780	866	166.5
	3M (oral)	114	0.75	746	778	67.4
0.5	4F (oral)	84.3	2	611	631	38.9
	5F (oral)	107	1	688	714	53.6
	6F (oral)	62.0	2	571	599	60.4

AUC_{inf} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero extrapolated to infinity; AUC_{0-t} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero to the last measurable timepoint; C_{max} = maximum plasma concentration; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous; LSC = liquid scintillation counting; M = male; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

* Equivalent to amifampridine free base dose levels of 0.03 mg/kg (i.v.) and 0.26 mg/kg (oral), respectively.

表 2.6.5.3-5　イヌ単回経口投与試験

Test Article: Amifampridine Phosphate, Amifampridine Free Base

Species/Strain: Dog/ Beagle		**Postdose Sampling Times (h):** 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 12, and 24		**Study Reference:** [redacted] 266/008		
Initial Age: Approximately 10 to 16 months		**Method of Administration:** Oral		**Location in CTD:** 4.2.2.2.06		
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted]		**Feeding Conditions:** Fed		**GLP Compliance:** No		
Number of Animals/Sex/Group: 1		**Vehicle/Formulation:** Suspension, 1% CMC		**Assay:** HPLC-ECD		
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 1		**Sample:** Plasma				
Gender	**Test Article**	**Dose (mg/kg equivalent amifampridine free base)**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (min)**	**AUC_{inf} (ng·min/mL)**	**$t_{1/2}$ (min)**
Male	Amifampridine phosphate	1	441.7	15	65303	104
	Amifampridine free base	1	363.0	30	78747	136
Female	Amifampridine phosphate	1	335.7	45	75671	135
	Amifampridine free base	1	395.7	15	66127	148

AUC_{inf} = area under the plasma concentration versus time curve from time zero extrapolated to infinity; C_{max} = maximum plasma concentration; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; HPLC-ECD = high performance liquid chromatography with electrochemical detection; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration.

2.6.5.4　薬物動態試験：反復投与後の吸収

該当なし。反復投与による薬物動態試験は実施していない。

ラット及びイヌにおける反復投与のトキシコキネティックデータについては表 2.6.7.2-1 を参照。

2.6.5.5　薬物動態試験：分布

表 2.6.5.5-1　ラット組織内分布

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Postdose Sacrifice Times (h):** 0.25, 2, 4, 8, 24, 72, and 168	**Study Reference:** BMN125-10-005
Initial Age: Approximately 6 to 9 weeks	**Method of Administration:** Oral	**Location in CTD:** 4.2.2.3.02
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted]	**Feeding Conditions:** Ad libitum	**GLP Compliance:** Yes
Number of Animals: 7/sex	**Vehicle/Formulation:** Suspension, 1% CMC	**Assay:** Quantitative whole body autoradiography
Number of Animals/Timepoint: 1/sex	**Samples:** Whole body sections	

[^{14}C]AP Dose (mg/kg)	**Tissues/Organs[a]**	**Radioactivity Concentration (µg equivalent/g)**						
		0.25 h	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Males								
25	Blood	0.444	1.11	0.473	0.143	BLQ	BLQ	BLQ
	Brain	BLQ	0.191	0.259	0.087	BLQ	BLQ	BLQ
	Spinal cord	0.075	0.128	0.159	0.070	BLQ	BLQ	BLQ
	Eye (lens)	0.056	0.250	0.365	0.254	BLQ	BLQ	BLQ
	Kidney (cortex)	2.82	4.07	3.42	0.531	0.082	BLQ	BLQ
	Liver	4.86	5.39	1.79	0.577	0.082	0.056	BLQ
	Lung	0.624	1.59	0.233	0.121	BLQ	BLQ	BLQ
	Heart	0.791	2.09	0.669	0.216	BLQ	BLQ	BLQ
	Spleen	0.970	2.72	1.06	0.294	0.101	BLQ	BLQ
	Adrenal gland	0.734	3.51	3.93	1.63	0.116	BLQ	BLQ
	Pancreas	0.747	3.77	1.48	0.460	0.075	BLQ	BLQ
	Pituitary	0.588	5.29	3.16	1.03	BLQ	BLQ	BLQ
	Thyroid	1.16	5.58	2.19	1.09	0.146	BLQ	BLQ
	Testis	0.134	1.16	1.14	0.737	0.084	BLQ	BLQ
	Esophagus	0.707	1.77	0.610	0.406	0.230	BLQ	BLQ
	Stomach	4.93	4.11	4.04	1.95	0.099	BLQ	BLQ
	Small intestine	4.38	5.45	6.19	0.400	0.160	0.079	BLQ
	Large intestine	0.477	2.18	1.94	2.34	BLQ	BLQ	BLQ
	Urinary bladder	0.544	NS	3.09	0.385	BLQ	BLQ	BLQ

表 2.6.5.5-1　ラット組織内分布（続き）

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Postdose Sacrifice Times (h):** 0.25, 2, 4, 8, 24, 72, and 168	**Study Reference:** BMN125-10-005
Initial Age: Approximately 6 to 9 weeks	**Method of Administration:** Oral	**Location in CTD:** 4.2.2.3.02
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted]	**Feeding Conditions:** Ad libitum	**GLP Compliance:** Yes
Number of Animals: 7/sex	**Vehicle/Formulation:** Suspension, 1% CMC	**Assay:** Quantitative whole body autoradiography
Number of Animals/Timepoint: 1/sex	**Samples:** Whole body sections	

[^{14}C]AP Dose (mg/kg)	**Tissues/Organs[a]**	**Radioactivity Concentration (µg equivalent/g)**						
		0.25 h	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Females								
25	Blood	0.819	2.35	1.05	0.156	BLQ	BLQ	BLQ
	Brain	BLQ	0.227	0.169	0.093	BLQ	BLQ	BLQ
	Spinal cord	0.057	0.197	0.138	0.058	BLQ	BLQ	BLQ
	Eye (lens)	BLQ	0.452	0.280	0.186	BLQ	BLQ	BLQ
	Kidney (cortex)	6.10	13.7	14.1	0.927	0.103	BLQ	BLQ
	Liver	7.02	7.20	3.82	0.552	0.078	BLQ	BLQ
	Lung	0.486	1.72	0.497	0.064	BLQ	BLQ	BLQ
	Heart	1.42	3.87	1.42	0.184	BLQ	BLQ	BLQ
	Spleen	1.82	5.42	2.27	0.283	BLQ	BLQ	BLQ
	Adrenal gland	1.70	7.51	4.16	2.33	0.195	BLQ	BLQ
	Pancreas	1.19	5.49	3.20	0.420	0.093	BLQ	BLQ
	Pituitary	1.15	8.33	3.14	0.536	BLQ	BLQ	BLQ
	Thyroid	1.24	6.01	2.88	3.66	0.223	0.419	0.444
	Ovary	0.884	3.48	1.60	0.219	0.103	BLQ	BLQ
	Esophagus	2.18	5.79	6.79	NS	0.056	0.130	0.053
	Stomach	19.2	6.34	7.06	1.94	BLQ	BLQ	BLQ
	Small intestine	10.1	4.52	2.94	0.484	0.165	BLQ	BLQ
	Large intestine	0.464	6.01	4.62	0.158	0.140	BLQ	BLQ
	Urinary bladder	0.480	2.67	2.54	0.213	0.066	BLQ	BLQ

AP = amifampridine phosphate; BLQ = below the limit of quantitation; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; NS = tissue not sectioned. [a] Only major tissues/organs were tabulated. The full tissue/organ list and data are presented in Study No. BMN125-10-005.

2.6.5.6　薬物動態試験：タンパク結合及び血球中への移行

表 2.6.5.6-1　血漿タンパク結合

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Rat/ Sprague-Dawley, Dog/ Beagle, Monkey/ Cynomolgus, Human		**Study Reference:** BMN125-10-041
Radionuclide: [^{14}C]Amifampridine Phosphate	**Sample:** Plasma	**Location in CTD:** 4.2.2.3.01
		GLP Compliance: No
Specific Activity: 53.5 mCi/mmol	**Method:** Equilibrium dialysis	**Assay:** LSC
Species	**Concentration Tested (µmol/L)**	**% Bound (Mean, n=3)**
Rat	0.3	4.8
	3	9.1
	10	9.6
	30	8.7
Dog	0.3	14.5
	1	10.8
	3	9.04
	10	9.5
Monkey	0.3	10.8
	1	10.7
	3	10.4
	10	11.3
Human	0.3	11.5
	1	11.4
	3	8.76
	10	12.0

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; LSC = liquid scintillation counting.

表 2.6.5.6-2　ヒトにおける血液ー血漿分配

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Human			**Study Reference:** BMN125-10-041
Radionuclide: [^{14}C]Amifampridine Phosphate	**Sample:** Blood, Plasma		**Location in CTD:** 4.2.2.3.01
			GLP Compliance: No
Specific Activity: 53.5 mCi/mmol			**Assay:** LSC
Species	**Concentration Tested (µmol/L)**	**Blood-to Plasma Concentration Ratio (Mean, n=3)**	**Percent Associated with Cellular Components (Mean, n=3)**
Donor 1	0.3	1.06	46.7
	1	1.11	49.3
	3	1.09	48.4
	10	1.11	49.2
Donor 2	0.3	1.05	50.8
	1	1.02	49.4
	3	1.03	49.7
	10	0.89	39.9
Donor 3	0.3	0.95	41.2
	1	1.05	46.9
	3	1.02	45.2
	10	0.97	42.5

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; LSC = liquid scintillation counting.

2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし。妊娠中又は授乳中の動物を対象とした薬物動態試験は実施していない。

2.6.5.8　薬物動態試験：代謝（*in vivo*）

表 2.6.5.8-1　代謝（*in vivo*）

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley, Dog/Beagle		**Postdose Sampling Times:** Rat: 0.5, 2, and 6 h (plasma), and 0 to 24 h (urine); dog: 0.083 (i.v. only), 0.17 (i.v. only), 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 24 h (plasma), and 0 to 24 h (urine)			**Study Reference:** BMN125-10-006
Initial Age: Rat: approximately 6 to 9 weeks; dog: approximately 6 months		**Method of Administration:** Oral (both species), i.v. (dog only)			**Location in CTD:** 4.2.2.4.05
Date of First Dose: Rat: [redacted] 20[redacted] (plasma), 20[redacted] (urine); dog: [redacted] 20[redacted]		**Feeding Conditions:** Ad libitum			**GLP Compliance:** Yes
Number of Animals/Sex/Group: 3/sex (both species)		**Vehicle/Formulation:** Rat: suspension, 1% CMC; dog: solution, saline (i.v.); suspension, 1% CMC (oral)			**Assays:** HPLC, LSC, LC-MS/MS
Number of Animals /Timepoint (Plasma): 1/sex (rat), 3/sex (dog)		**Sample:** Plasma and urine			
Sex, [^{14}C]AP Dose, Matrix	**Analyte**	**Radioactivity (% of total)**			
		0.5 h	**2 h**	**6 h**	**0-24 h**
Rat (oral)					
Male, 25 mg/kg, plasma	3-N-acetyl metabolite	98	99	96	NA
Female, 25 mg/kg, plasma	3-N-acetyl metabolite	96	96	80	NA
Male, 25 mg/kg, urine	AP	NA	NA	NA	BLQ
	4-N-acetyl metabolite	NA	NA	NA	1
	3-N-acetyl metabolite	NA	NA	NA	99
Female, 25 mg/kg, urine	AP	NA	NA	NA	7
	4-N-acetyl metabolite	NA	NA	NA	BLQ
	3-N-acetyl metabolite	NA	NA	NA	94

表 2.6.5.8-1　代謝（*in vivo*）（続き）

Test Article: Amifampridine Phosphate

Gender, [^{14}C]AP Dose, Matrix	Analyte	Radioactivity (% of total)											
		0.25 h	0.5 h	0.75 h	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h	0-24 h
Dog (oral)[a]													
Male, 0.5 mg/kg, plasma	AP	95	82	98	83	86	80	64	43	28	BLQ	BLQ	NA
Female, 0.5 mg/kg, plasma	AP	96	66	67	64	75	64	55	38	BLQ	BLQ	BLQ	NA
Male, 0.5 mg/kg, urine	AP[b]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	55
Female, 0.5 mg/kg, urine	AP[b]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	56

AP = amifampridine phosphate; BLQ = below the limit of quantitation; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; HPLC = high performance liquid chromatography; i.v. = intravenous; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; NA = not applicable.

[a] Only dog oral results were tabulated. The complete study results (i.e., including dog i.v. data) are presented in Study No. BMN125-10-006.

[b] Only values for parent drug in dog urine were tabulated. The complete study results (i.e., including all 9 urinary metabolites in dog) are presented in Study No. BMN125-10-006.

2.6.5.9　薬物動態試験：代謝（*in vitro*）

表 2.6.5.9-1　動物及びヒト肝細胞における代謝速度

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Hepatocytes: Rat/ Sprague-Dawley, Dog/ Beagle, Monkey/ Cynomolgus, and Human ***In Vitro* Interspecies Comparison of the Clearance of Amifampridine Phosphate Using Cryopreserved Hepatocytes from Rat, Dog, Monkey, and Humans**		**Study Reference:** PR6958/CC22[redacted] **Location in CTD:** 4.2.2.4.01 **GLP Compliance:** No **Assay**: LC-MS/MS	
Species[a]	**Amifampridine Phosphate Concentration (µmol/L)**	**Intrinsic Clearance**	
		$mL \cdot h^{-1}$	**$\mu L \cdot min^{-1}/10^6$ cells**
Rat hepatocytes	1	0.291	20.2
	10	0.250	17.4
	100	0.154	10.7
Monkey hepatocytes	1	0.308	17.1
	10	0.259	14.4
	100	0.180	10.0
Human hepatocytes (batch HEP187045)	1	0.218	12.1
	10	0.192	10.7
	100	0.145	8.07
Human hepatocytes (batch HEP187053)	1	0.136	7.57
	10	0.137	7.62
	100	0.149	8.28

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

[a] Dog is not included because no biotransformation of amifampridine was recorded following incubation with dog hepatocytes.

表 2.6.5.9-2　動物及びヒト肝細胞における代謝

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Hepatocytes: Rat/ Sprague-Dawley, Rabbit/ NZW, Dog/ Beagle, Monkey/ Cynomolgus, Pig/ Göttingen, Human **In Vitro Metabolism of [^{14}C]Amifampridine Phosphate by Rat, Rabbit, Dog, Monkey, Minipig, and Human Hepatocytes**			**Study Reference:** BMN125-10-038 **Location in CTD:** 4.2.2.4.02 **GLP Compliance:** No **Assays**: HPLC, LC-MS/MS				
Species[a]	**[^{14}C]Amifampridine Phosphate Concentration (µmol/L)[a]**	**Analyte**	**% Radioactivity in Chromatogram (Mean, n=3)**				
			0 h	**0.5 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**
Rat hepatocytes	1	AP	100	65.6	44.3	30.1	ND
		3-N-acetyl metabolite	ND	34.4	55.7	79.9	100
Rabbit hepatocytes	1	AP	100	100	93.7	100	100
		3-N-acetyl metabolite	ND	ND	ND	ND	ND
Dog hepatocytes	1	AP	85.8	100	76.4	100	100
		3-N-acetyl metabolite	ND	ND	ND	ND	ND
Monkey hepatocytes	1	AP	100	100	83.1	47.4	29.2
		3-N-acetyl metabolite	ND	ND	25.4	52.6	70.8
Minipig hepatocytes	1	AP	100	100	100	100	100
		3-N-acetyl metabolite	ND	ND	ND	ND	ND
Human hepatocytes (donor 1)	1	AP	100	100	100	100	81.2
		3-N-acetyl metabolite	ND	ND	ND	ND	28.2
Human hepatocytes (donor 2)	1	AP	100	100	89.8	52.7	32.3
		3-N-acetyl metabolite	ND	ND	ND	47.3	67.7
Human hepatocytes (donor 3)	1	AP	100	92.9	76.6	54.7	32.1
		3-N-acetyl metabolite	ND	NA	35.2	45.3	67.9

AP = Amifampridine Phosphate; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; HPLC = high performance liquid chromatography; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NA = not applicable; ND = not detected; NZW = New Zealand White.

[a] Only results for the incubations at 1 µM [^{14}C]amifampridine phosphate were tabulated. The complete study results (i.e., including incubations at 10 µM [^{14}C]amifampridine phosphate) are presented in Study No. BMN125-10-038.

表 2.6.5.9-3　ヒト肝細胞による代謝

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Human hepatocytes ***In Vitro* Metabolism of Amifampridine Phosphate by Human Hepatocytes**				**Study Reference:** BMN125-10-037 **Location in CTD:** 4.2.2.4.03 **GLP Compliance:** No **Assay**: LC-MS/MS	
Incubation Time (h)	**Amifampridine Phosphate**			**3-N-acetyl Metabolite of Amifampridine Phosphate**	
	Concentration in Media Control (µmol/L) (Mean, n=3)	**Concentration in Hepatocyte Samples (µmol/L) (Mean, n=3)**	**% of Media Control (%)**	**Concentration in Hepatocyte Samples (µmol/L) (Mean, n=3)**	**Expressed as % of Amifampridine Phosphate in Media Control**
0	8.31	8.45	102	ND	ND
1	9.38	7.14	76.1	1.24	13.2
4	9.02	6.01	66.6	3.62	40.1

CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ND = not detected.

表 2.6.5.9-4　ヒト肝 S-9 及び NAT による代謝

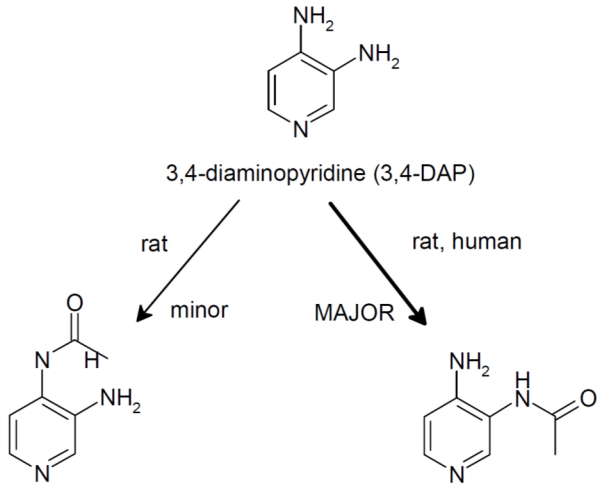
Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Human hepatic microsomes, S9 fractions, NAT isoenzymes, and FMO isoenzymes **Assessment of the Role of Human CYP, NAT, and FMO Enzymes Involved in the Metabolism of [^{14}C]Amifampridine Phosphate**	**Study Reference:** BMN125-10-040 **Location in CTD:** 4.2.2.4.04 **GLP Compliance:** No **Assay**: LC-MS/MS	
[^{14}C]Amifampridine Phosphate Concentration (µM)	**3-N-acetyl Metabolite of Amifampridine Phosphate**	
	% Radioactivity (replicates 1, 2, and 3)	**Mean Rate of Formation (pmol/min/mg protein)**
Incubations with S9 for 60 minutes		
0.5	20.1, 21.0, 18.2	1.65
1	22.0, 24.2, 22.6	3.82
3	22.0, 24.1, 21.0	11.2
6	19.4, 19.3, 20.0	19.6
10	ND, 17.9, 19.2	30.9
20	ND, 16.1, 16.6	54.4
30	15.0, 14.3, 14.1	72.4
50	12.6, ND, 11.4	99.8
Incubations with NAT1 for 60 minutes		
50	13.2, 12.1, 14.2	22000
Incubations with NAT2 for 60 minutes		
50	98.3, 98.9, 99.1	165000

CTD = Common Technical Document; CYP = cytochrome P450; FMO = flavin-containing monooxygenase; GLP = Good Laboratory Practice; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NAT = N-acetyltransferase; ND = not detected.

2.6.5.10 薬物動態試験：推定代謝経路

Test Article: Amifampridine Phosphate



Proposed metabolic pathways for amifampridine (3,4-diaminopyridine; 3,4-DAP) in rats and humans.（試験番号 BMN125-10-006（4.2.2.4.05））

2.6.5.11 薬物動態試験：肝薬物代謝酵素の誘導／阻害

表 2.6.5.11-1　CYP 阻害

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Human liver microsomes In Vitro Assessment of Human CYP Inhibition Potential of Amifampridine Phosphate	**Study Reference:** BMN125-10-054		
	Location in CTD: 4.2.2.4.06		
	GLP Compliance: No		
	Assay: LC-MS/MS		
CYP Isoenzyme	**IC_{50} (µmol/L)**		
	Direct Inhibition	**Time Dependent Inhibition Without NADPH**	**Time Dependent Inhibition With NADPH**
CYP1A2	>30	>30	>30
CYP2A6	>30	>30	>30
CYP2B6	>30	>30	>30
CYP2C8	>30	>30	>30
CYP2C9	>30	>30	>30
CYP2C19	>30	>30	>30
CYP2D6	>30	>30	>30
CYP2E1	>30	>30	>30
CYP3A4	>30	>30	>30

CTD = Common Technical Document; CYP = cytochrome P450; GLP = Good Laboratory Practice; IC_{50} = median inhibitory concentration; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NADPH = β-nicotinamide adenine dinucleotide 2′-phosphate

表 2.6.5.11-2　CYP 誘導

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Human hepatocytes **In Situ Assessment of the Induction Potential of Amifampridine Phosphate in Primary Cultures of Human Hepatocytes**		**Study Reference:** BMN125-10-053 **Location in CTD:** 4.2.2.4.07 **GLP Compliance:** No **Assays**: LC-MS/MS, qRT-PCR							
Donor	**Amifampridine Phosphate Concentration (µM)**	**Isoenzyme[a]**							
		CYP1A2		**CYP2B6**		**CYP3A4**		**UGT1A1**	
		Activity	**mRNA Content**	**Activity**	**mRNA Content**	**Activity**	**mRNA Content**	**Activity**	**mRNA Content**
Hu1201	0.3	1.1	1.91	0.9	0.912	1.1	0.742	NA	1.26
	3	1.3	1.12	0.9	1.63	1.0	1.10	NA	1.12
	30	1.7	1.03	0.9	1.03	1.0	0.871	NA	1.13
Hu1202	0.3	1.1	0.626	0.9	1.15	0.9	0.931	NA	0.720
	3	1.3	0.676	1.1	0.645	0.8	0.298	NA	1.09
	30	1.6	0.616	0.9	1.06	1.1	0.631	NA	0.736
Hu1203	0.3	1.0	0.738	0.9	1.62	1.2	1.21	NA	0.801
	3	1.1	0.848	1.2	1.70	1.1	1.39	NA	0.861
	30	1.8	0.958	1.1	1.10	1.1	0.834	NA	1.28

CTD = Common Technical Document; CYP = cytochrome P450; GLP = Good Laboratory Practice; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA = messenger ribonucleic acid; NA = not applicable; qRT-PCR = quantitative real time-polymerase chain reaction; UGT = UDP-glucuronosyltransferase.

[a] All values expressed as mean fold change of treated samples vs. control.

2.6.5.12 薬物動態試験：排泄

表 2.6.5.12-1　ラットに単回静脈内及び経口投与後の尿・糞中放射能排泄率

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain/Gender: Rat/ Sprague-Dawley/ male and female	**Postdose Sampling Times:** Urine: 0-6, 6-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, and 144-168 h; feces and cage wash: 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, and 144-168 h; carcass: 168 h	**Study Reference:** BMN125-10-005
Initial Age: Approximately 6 to 9 weeks	**Method of Administration:** i.v. and oral	**Location in CTD:** 4.2.2.3.02
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted] (intravenous) , [redacted]. 20[redacted] (oral)	**Feeding Conditions:** Ad libitum	**GLP Compliance:** Yes
Number of Animals/Sex/Group: 3	**Vehicle/Formulation:** Solution, saline (i.v.); suspension, 1% CMC (oral)	**Assay:** LSC
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 3	**Samples:** Urine, feces, cage wash, and carcass	

[^{14}C]AP Dose (mg/kg)	**Route**	**Gender**	**Mean Radioactivity Excretion Balance: 0-168 h (% Dose)**				
			Urine	**Feces**	**Cage Wash**	**Carcass**	**Total Recovery**
2.5	Intravenous	Male	94.79	2.71	1.42	0.30	99.23
		Female	92.86	2.74	2.51	0.45	98.56
25	Oral	Male	87.66	7.28	2.60	0.21	97.74
		Female	87.71	5.72	2.57	0.31	96.31

AP = amifampridine phosphate; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous; LSC = liquid scintillation counting.

表 2.6.5.12-2　イヌに単回静脈内及び経口投与後の尿・糞中放射能排泄率

Test Article: Amifampridine Phosphate

Species/Strain/Gender: Dog/ Beagle/ male and female	**Postdose Sampling Times:** Urine: 0-6, 6-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, and 144-168 h; feces and cage wash: 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, and 144-168 h	**Study Reference:** BMN125-10-004
Initial Age: Approximately 6 months	**Method of Administration:** i.v. and oral	**Location in CTD:** 4.2.2.2.05
Date of First Dose: [redacted]. 20[redacted] (intravenous), [redacted]. 20[redacted] (oral)	**Feeding Conditions:** Ad libitum	**GLP Compliance:** Yes
Number of Animals/Sex/Group: 3	**Vehicle/Formulation:** Solution, saline (i.v.); suspension, 1% CMC (oral)	**Assay:** LSC
Number of Animals/Sex/Group/Timepoint: 3	**Samples:** Urine, feces, and cage wash	

[^{14}C]AP Dose (mg/kg)	**Route**	**Gender**	**Mean Radioactivity Excretion Balance: 0-168 h (% Dose)**			
			Urine	**Feces**	**Cage Wash**	**Total Recovery**
0.05	Intravenous	Male	88.87	3.25	2.90	95.03
		Female	92.71	2.62	1.53	96.85
0.5	Oral	Male	90.99	5.17	3.41	99.56
		Female	92.47	4.64	2.94	100.05

AP = amifampridine phosphate; CMC = carboxymethylcellulose; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous; LSC = liquid scintillation counting.

2.6.5.13 薬物動態試験：胆汁中排泄

該当なし。胆汁排泄試験は実施していない。

2.6.5.14 薬物動態試験：薬物動態学的相互作用

表 2.6.5.14-1　P-gp 基質性及び阻害評価

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: Caco-2 cell monolayers **Permeability assessment of [^{14}C]amifampridine phosphate at 1, 10, and 30 µM in the absence and presence of two P-gp inhibitors (cyclosporine A and Zosquidar).** **P-gp inhibitory potency of amifampridine phosphate on [^{3}H]digoxin transport was evaluated at concentrations of 1, 3, 10, 30, and 100 µM.**		**Study Reference:** BMN125-10-042 **Location in CTD:** 4.2.2.2.01 **GLP Compliance:** No **Assay**: LSC	
Treatment	**A-B Direction: P_{app} (x 10^{-6} cm/s)**	**B-A Direction: P_{app} (x 10^{-6} cm/s)**	**Efflux Ratio**
Permeability in the Absence and Presence of P-gp Inhibitors[a] (Mean, n=3)			
[^{14}C]AP 1 µM	1.22	1.00	0.82
[^{14}C]AP 1 µM + CsA 10 µM	1.49	1.25	0.84
[^{14}C]AP 1 µM + Zos 2 µM	1.31	1.08	0.82
[^{14}C]AP 10 µM	1.24	1.47	1.19
[^{14}C]AP 10 µM + CsA 10 µM	1.14	1.39	1.22
[^{14}C]AP 10 µM + Zos 2 µM	1.23	1.53	1.24
[^{14}C]AP 30 µM	1.32	1.36	1.03
[^{14}C]AP 30 µM + CsA 10 µM	1.22	1.15	0.94
[^{14}C]AP 30 µM + Zos 2 µM	1.11	1.19	1.07
Inhibitory Potency on [^{3}H]Digoxin Transport			
Digoxin 1 µM	1.41	9.03	6.40
	1.34	9.79	7.29
Digoxin 1 µM + CsA 10 µM	2.14	3.53	1.65
Digoxin 1 µM + Zos 2 µM	3.31	2.13	0.64
Digoxin 1 µM + AP 1 µM	1.44	8.37	5.82
Digoxin 1 µM + AP 3 µM	1.52	9.06	5.94
Digoxin 1 µM + AP 10 µM	1.43	8.39	5.86
Digoxin 1 µM + AP 30 µM	1.35	8.67	6.41
Digoxin 1 µM + AP 100 µM	1.44	8.23	5.73

AP = amifampridine phosphate; CsA = cyclosporine A; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; LSC = liquid scintillation counting; P_{app} = apparent permeability; P-gp = P-glycoprotein; Zos = Zosquidar.

[a] Only 1 h incubation results were tabulated. The complete study results (i.e., 2, 3, and 4 h incubation data) are presented in Study No. BMN125-10-042.

表 2.6.5.14-2　トランスポーター阻害試験

Test Article: Amifampridine Phosphate

Study System: MDCK-II, Caco-2, and MDCK-MDR1 cell monolayers, Sf9 vesicle **Inhibition potential of 30 µM amifampridine phosphate on OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, BSEP, and BCRP mediated transport of probe substrates. Inhibition potential of 40 µM 3-N-acetyl metabolite on OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, BSEP, BCRP, and Pgp.**		**Study Reference:** BMN125-12-008 **Location in CTD:** 4.2.2.6.01 **GLP Compliance:** No **Assay**: LSC
Transporter	**Treatment**	**Inhibition (%) (Mean, n=3)**
OCT1	Vehicle	0.00
OCT1	AP 30 µM	14.1
OCT1	3-N-acetyl metabolite 40 µM	15.2
OCT1	Quinidine 100 µM	89.3
OCT2	Vehicle	0.00
OCT2	AP 30 µM	-1.84
OCT2	3-N-acetyl metabolite 40 µM	-14.1
OCT2	Quinidine 100 µM	80.3
OAT1	Vehicle	0.00
OAT1	AP 30 µM	-2.67
OAT1	3-N-acetyl metabolite 40 µM	3.96
OAT1	Probenecid 100 µM	87.6
OAT3	Vehicle	0.00
OAT3	AP 30 µM	4.24
OAT3	3-N-acetyl metabolite 40 µM	11.4
OAT3	Probenecid 100 µM	98.2
OATP1B1	Vehicle	0.00
OATP1B1	AP 30 µM	8.87
OATP1B1	3-N-acetyl metabolite 40 µM	14.2
OATP1B1	Rifampicin 100 µM	101
OATP1B3	Vehicle	0.00
OATP1B3	AP 30 µM	16.8
OATP1B3	3-N-acetyl metabolite 40 µM	-13.2
OATP1B3	Rifampicin 100 µM	99.4
P-gp	Vehicle	0.00
P-gp	3-N-acetyl metabolite 40 µM	6.89
P-gp	Verapamil 100 µM	80.4
BCRP	Vehicle	0.00
BCRP	AP 30 µM	2.20
BCRP	3-N-acetyl metabolite 40 µM	-1.32
BCRP	Chrysin 100 µM	98.8
BSEP	Vehicle	0.00
BSEP	AP 30 µM	8.08
BSEP	3-N-acetyl metabolite 40 µM	-9.58
BSEP	Rifampicin 300 µM	95.4

AP = amifampridine phosphate; BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP = bile salt export pump; CTD = Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; LSC = liquid scintillation counting; OAT = organic anion transporter; OCT = organic cation transporter; P-gp = P-glycoprotein.

2.6.5.15 薬物動態試験：その他

該当なし。その他の試験は実施していない。