目次

目次 1
Tables 4
Figures 5
略語一覧及び用語の定義 7
1. 概要 10
2. 分析法 16
2.1 投与製剤の分析法 16
2.1.1 Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）の定量法 16
2.1.1.1 Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション 16
2.1.1.2 Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーの拡張バリデーション 17
2.1.2 Oral Mix 中 sepiapterin（有効成分）の定量法 18
2.1.2.1 Oral Mix 中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション 18
2.1.2.2 Oral Mix 中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーの拡張バリデーション 19
2.1.3 Oral Plues 中 sepiapterin（有効成分）の定量法 20
2.1.3.1 Oral Plues 中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション 20
2.1.4 脱イオン水で調製した投与製剤中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション 21
2.1.4.1 脱イオン水で調製した投与製剤中の sepiapterin を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション 21
2.1.5 ジメチルスルホキシド中の sepiapterin（混合製剤）の定量法 22
2.1.5.1 ジメチルスルホキシド中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション 22
2.1.5.2 ジメチルスルホキシド中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーの拡張バリデーション 23
2.1.6 外液中の sepiapterin（有効成分）の定量法 23
2.1.6.1 外液中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション 23
2.1.7 原薬の不純物の測定方法 24
2.1.7.1 アセトン製剤中の CC-02 の分析法のバリデーション及び安定性試験 24
2.1.7.2 ジメチルスルホキシド製剤中の CC-14 の分析法のバリデーション及び安定性試験 25

2.2 生体マトリックス中の sepiapterin 及び BH_4 を測定するバリデートされた生体試料分析法 25
2.2.1 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法によるラット血漿中 sepiapterin 及びテトラヒドロビオプテリン（BH_4）の測定 26
2.2.2 Sprague Dawley ラットの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin（11.1～5,560 ng/mL）及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション 27
2.2.3 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法によるサル血漿中 sepiapterin 及びテトラヒドロビオプテリン（BH_4）の定量 28
2.2.4 サルの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin（11.1～5,560 ng/mL）及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション 29
2.2.5 ニュージーランド白色ウサギ血漿中の sepiapterin（11.1～5,560 ng/mL）及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション 30
2.2.6 1%アスコルビン酸処理をした CD-1 マウスの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin（10～5,000 ng/mL）及び BH_4（10～5,000 ng/mL）を定量する LC-MS/MS 生体試料分析法のバリデーション 31
2.3 生体マトリクス中の sepiapterin 及び BH_4 の測定に適格性が確認された生体試料分析法（非 GLP） 32
3. 吸収 34
3.1 単回投与試験 34
3.1.1 Sepiapterin 及び BH_4 の C57BL/6 マウス単回経口投与試験 34
3.1.2 雄 CD-1 マウスに sepiapterin を経口投与したときの血漿中薬物動態の評価 38
3.1.3 雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの sepiapterin 及び BH_4 の血漿、肝臓、腎臓及び脳組織中の薬物動態評価 39
3.1.4 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を単回経口投与したときの血漿中薬物動態の評価 40
3.1.5 Non-Naïve 雄イヌに sepiapterin の各種経口製剤を単回経口投与したときの薬物動態の検討 41
3.1.6 Non-Naïve 雄サルに sepiapterin の各種経口製剤を単回経口投与したときの薬物動態の検討 45
3.2 反復投与試験 47
3.2.1 マウス反復投与トキシコキネティクス試験 47
3.2.2 ラット反復投与トキシコキネティクス試験 51
3.2.3 マーモセットにおける反復投与トキシコキネティクス 53
4. 分布 59
4.1 In vitro 血漿タンパク結合 59
4.2 透過性試験 59

4.3 各種動物種を用いた経口投与による非臨床試験 59
4.3.1 C57BL/6 マウスに sepiapterin 又は BH_4 を単回経口投与したときの肝臓、腎臓及び尿への分布（剖検後） 59
4.3.2 雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの肝臓、腎臓及び脳への分布 60
4.3.3 雄 Long-Evans ラットに強制経口投与し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）を用いて血中、血漿中及び組織内分布を検討する[^{14}C]-sepiapterin の単回投与試験 61
5. 代謝 65
5.1 内因性 sepiapterin の推定代謝経路 65
5.2 Sepiapterin 代謝の補足的検討 66
5.2.1 組織 S9 画分における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性 66
5.2.2 ヒト腸内細菌叢における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性 67
5.2.3 ラットに[^{14}C]-Sepiapterin を単回経口投与したときの代謝 68
5.2.4 カニクイザルに[^{14}C]-Sepiapterin を単回経口投与したときの代謝 68
6. 排泄 70
6.1 雄 Sprague Dawley ラットにおける[^{14}C]-Sepiapterin の単回強制経口投与による薬物動態、マスバランス及び胆汁中排泄の検討 70
6.2 雄カニクイザルにおける[^{14}C]-sepiapterin の単回強制経口投与による薬物動態及びマスバランスの検討 71
7. 薬物動態学的薬物相互作用 74
7.1 CYP を介した薬物相互作用 74
7.2 トランスポーターを介した薬物相互作用 74
8. その他の薬物動態試験 75
8.1 ラットを用いた in vivo 遺伝毒性試験のトキシコキネティクス 75
8.1.1 雄 Sprague Dawley ラットにおける小核及び DNA 損傷誘発性の評価（GLP） 75
8.2 ラットの胚・胎児発生に関する反復投与試験のトキシコキネティクス 75
8.2.1 ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生に関する用量設定試験（非 GLP） 76
8.2.2 ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生に関する試験（GLP） 77
8.3 ウサギ胚・胎児発生に関する反復投与試験のトキシコキネティクス 78
8.3.1 ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験 78
8.3.2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 80
8.4 幼若ラットの反復投与毒性試験のトキシコキネティクス 83
8.4.1 新生児 Sprague Dawley ラットの 6 日間強制経口投与パイロット忍容性試験（非 GLP） 83
8.4.2 新生児 Sprague Dawley ラット 6 日間強制経口投与トキシコキネティクス試験（GLP） 85
8.4.3 Sepiapterin の幼若ラット 10 週間（強制）経口投与試験及び 4 週間回復性試験 87

9. 考察及び結論 90
10. 参考文献 94

Tables

Table 1. 薬物動態特性を特徴付ける Sepiapterin の非臨床試験の一覧 12
Table 2. 投与液及び製剤中の sepiapterin 及び原薬不純物を測定するために用いた生体試料分析法の概要 16
Table 3. 非臨床動物種における sepiapterin 及び BH_4 の非 GLP 薬物動態を裏付けるために用いた適格性が確認された生体試料分析法の概要 33
Table 4. 16H0208S-X01 試験の投与スケジュール 35
Table 5. 雄 CD57BL/6 マウスに sepiapterin を経口投与したときの sepiapterin の血漿中薬物動態パラメータの平均値 35
Table 6. 雄 C57BL/6 マウスに BH_4 又は sepiapterin を選択した用量で単回経口投与したときの BH_4 及び sepiapterin の薬物動態パラメータの平均値 36
Table 7. CNSA-PK-001-2017 試験の投与スケジュール 38
Table 8. 雄 CD-1 マウスにおける PTC923-2023-046 試験の試験デザイン 39
Table 9. PTC923-2023-046 試験において sepiapterin を単回経口投与したときの BH_4 の薬物動態パラメータ 40
Table 10. PTC923-2020-001 試験において、雄 Sprague Dawley ラットに sepiapterin DP 又は sepiapterin API を単回経口投与したときの BH_4 の薬物動態パラメータの平均値 41
Table 11. 各種 sepiapterin 製剤を雄イヌに単回強制経口投与したときの sepiapterin の血漿中薬物動態パラメータ 43
Table 12. 各種 sepiapterin 製剤を雄イヌに単回強制経口投与したときの BH_4 の血漿中薬物動態パラメータ 44
Table 13. Sepiapterin を雄サルに単回強制経口投与したときの BH_4 の血漿中薬物動態パラメータ 46
Table 14. マウス 28 日間及び 26 週間試験の sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータの平均値 49
Table 15. マウス 28 日間及び 26 週間試験の BH_4 のトキシコキネティクスパラメータの平均値 50
Table 16. Sprague Dawley ラットの 14 日間、13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験における BH_4 のトキシコキネティクスパラメータの平均値 52
Table 17. マーモセットの 14 日間、13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験における sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータの平均値（SD） 55
Table 18. マーモセットの 14 日間、13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験における BH_4 のトキシコキネティクスパラメータの平均値（SD） 57
Table 19. Long-Evans ラットにおける[^{14}C]-sepiapterin の単回強制経口投与試験の試験デザイン 61

Table 20. 雄 Long-Evans ラットに[^{14}C]-sepiapterin を 30 mg/kg（259 µCi/kg）の用量で経口投与したときの血漿中及び組織中の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の薬物動態パラメータ 63
Table 21. ラットに sepiapterin を反復経口投与したときの Day 3 の投与後 3 時間の sepiapterin 及び BH_4 の平均血漿中濃度（CNSA-TOX-005-2017 試験） 75
Table 22. 妊娠 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を強制経口投与したときの BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-005 試験） 77
Table 23. 妊娠 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を強制経口投与したときの BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-023 試験） 78
Table 24. 妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を経口投与したときの sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-006 試験） 80
Table 25. 妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を経口投与したときの BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-006 試験） 80
Table 26. 雌妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を 100、300 及び 1000 mg/kg で経口投与したときの血漿中 sepiapterin トキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-024） 82
Table 27. 雌妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を 100、300 及び 1000 mg/kg で経口投与したときの血漿中 BH_4 トキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-024） 82
Table 28. 新生児 Sprague Dawley ラットの非 GLP 6 日間強制経口投与試験の試験デザイン（ PTC923-2020-005 試験） 84
Table 29. 新生児 Sprague　Dawley ラットに sepiapterin を生後 4 日目～生後 9 日目まで強制経口投与したときの生後 9 日目における BH_4 のトキシコキネティクスパラメータのまとめ（PTC923-2020-005 試験） 84
Table 30. 新生児 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を連日強制経口投与したときのベースライン値で補正した sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2020-006 試験） 86
Table 31. 新生児 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を連日強制経口投与したときのベースライン値で補正した BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2020-006 試験） 87
Table 32. GLP 試験の TC923-2023-045 試験の試験デザイン 88
Table 33. 幼若ラットに sepiapterin を連日経口投与したときのトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2023-045 試験） 88
Table 34. 幼若ラットに Sepiapterin を連日経口投与したときのベースライン値で補正した BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2023-045 試験） 89

Figures

Figure 1. 2 種類の製剤を 180 mg/kg で単回投与したときの平均血漿中 sepiapterin 濃度.....39
Figure 2. Sepiapterin の推定主要代謝経路.....65

Figure 3. ラット、ミニブタ、サル及びヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分における sepiapterin の推定主要代謝経路 67
Figure 4. 胆管カニューレを挿入した雄 Sprague Dawley ラット（第 2 群）に[^{14}C]-Sepiapterin 100 mg/kg（約 250 µCi/kg）を単回強制経口投与したときの排泄物中の放射能の累積回収率 71
Figure 5. 雄カニクイザル 3 匹に[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg（200 µCi/kg）を単回強制経口投与したときの[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の血中及び血漿中濃度-時間曲線下面積の平均値（±標準偏差） 72
Figure 6. 雄カニクイザル 3 匹に[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg（200 µCi/kg）を単回強制経口投与したときの[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の平均（±標準偏差）回収率（投与量の%） 73

略語一覧及び用語の定義

略語又は特殊な用語	用語	説明
$\%AUC_{Extrap}$	% area under the concentration-time curve extrapolated from the time of the last measurable concentration to infinity	最終測定可能濃度時点から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積（%）
%CV	percent coefficient of variation	変動係数%
ABC	ATP-binding cassette	ATP 結合カセット
AGMO	alkyglycerol monooxygenase	アルキルグリセロールモノオキシゲナーゼ
AME	absorption, metabolism, and excretion	吸収、代謝及び排泄
API	active pharmaceutical ingredient	有効成分
AR	aldose reductase	アルドース還元酵素
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}10h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 10 hours postdose	投与後 0 時間から 10 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}12h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 12 hours postdose	投与後 0 時間から 12 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose	投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}48h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 48 hours postdose	投与後 0 時間から 48 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the concentration-time curve from time zero extrapolated to infinity	0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	area under the concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time	0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
CAR	carbonyl reductase	カルボニル還元酵素
BDC	bile duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BH_2	7,8-dihydrobiopterin	7, 8-ジヒドロビオプテリン
BH_4	tetrahydrobiopterin	テトラヒドロビオプテリン
BH_4-OH	4α-hydroxy-tetrahydrobiopterin	4α-ヒドロキシテトラヒドロビオプテリン
BQL	below the quantifiable limit	定量限界未満
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CC-02	[redacted]	[redacted]
CC-14	[redacted]	[redacted]
C_{last}	concentration at last measured timepoint	最終測定時点の濃度
CMC	carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
CNS	central nervous system	中枢神経系
CR	carbonyl reductase	カルボニル還元酵素

略語又は特殊な用語	用語	説明
CYP450	cytochrome P450	チトクロム P450
DCoH1	dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1α	肝細胞核因子 1α の二量体化補因子
DETAPAC	diethylenetriaminepentaacetic acid	ジエチレントリアミン五酢酸
DHFR	dihydrofolate reductase	ジヒドロ葉酸還元酵素
DHPR	dihydropteridine reductase	ジヒドロプテリジン還元酵素
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DP	drug product	製剤
DQC	Dilution Quality Control	希釈 QC サンプル
DTE	dithioerythritol	ジチオエリスリトール
DTT	dithiothreitol	ジチオスレイトール
EMS	ethyl methanesulfonate	メタンスルホン酸エチル
ENT	equilibrative nucleoside transporter	平衡型ヌクレオシドトランスポーター
ESI	electrospray ionization	エレクトロスプレーイオン化法
F	female	女性／雌
FQC	Formulation Quality Control	製剤 QC サンプル
GC	gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
GD	Gestation Day	妊娠日齢
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-MS	high-performance liquid chromatography with mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー／質量分析法
HPLC-MS/MS	high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法
HSDH2	3α-hydroxysteroid dehydrogenase type 2	3α-ヒドロキシステロイド脱水素酵素 2 型
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IS	internal standard	内標準物質
ISR	incurred sample reanalysis	Incurred sample reanalysis
K_2EDTA	dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectroscopy	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法
LE	Long-Evans	Long-Evans
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計測法
M	male	男性／雄
MATE	multidrug and toxin extrusion	多剤排出輸送体
max	maximum	最大値
MDCKII	Madin-Darby canine kidney strain II cells	Madin-Darby イヌ腎臓細胞株 II
MDR1	multidrug resistance protein 1	多剤耐性タンパク質 1
min	minimum	最小値
MRM	multiple reaction monitoring	多重反応モニタリング
n.e.	nonenzymatic	非酵素的
NA	not applicable	該当せず

略語又は特殊な用語	用語	説明
NADP(H)	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NC	not calculated; not calculable	算出せず、算出不能
ND	not determined	未確定
NOS	nitric oxide synthase	一酸化窒素合成酵素
NR	not reported	報告なし
NRR	no reportable result	報告可能な結果なし
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting 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
Oral Mix	ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup	ORAL MIX™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup
PAH	phenylalanine hydroxylase	フェニルアラニン水酸化酵素
PCD	pterin-4α-carbinolamine dehydratase	プテリン-4α-カルビノールアミン脱水酵素
P-gp	p-glycoprotein	P-糖タンパク
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PKU	phenylketonuria	フェニルケトン尿症
PND	Postnatal Day	出生後日数
QC	Quality Control	品質管理
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
R^2	coefficient of determination	決定係数
R_{AUC}	ratio of $AUC_{0\text{-last}}$ after repeat dosing divided by the $AUC_{0\text{-last}}$ during the initial dosing interval	反復投与後の $AUC_{0\text{-last}}$ を初回投与間隔中の $AUC_{0\text{-last}}$ で除した比
RE	relative error	相対誤差
RSD	relative standard deviation	相対標準偏差
SD	standard deviation	標準偏差
SPR	sepiapterin reductase	Sepiapterin 還元酵素
SR	sepiapterin reductase	Sepiapterin 還元酵素
TH	tyrosine hydroxylase	チロシンヒドロキシラーゼ
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{last}	time of last measurable concentration	最終測定可能濃度時点
TPH	tryptophan hydroxylases	トリプトファン水酸化酵素
TRA	total radioactivity	総放射能
XH_2	7,8-dihydroxanthopterin	7, 8-ジヒドロキサントプテリン
XOR	xanthine oxidoreductase	キサンチン酸化還元酵素

1. 概要

PTC Therapeutics（PTC）社は、小児及び成人におけるフェニルケトン尿症（PKU）の治療薬として sepiapterin（旧名：PTC923 及び CNSA-001）を開発中である。Sepiapterin はテトラヒドロビオプテリン（BH_4）生合成のサルベージ経路において天然に存在する内因性前駆体であり、外因性に送達された sepiapterin は、肝臓及びその他の組織で速やかに代謝され、BH_4 が生成される。In vivo における sepiapterin から BH_4 への変換は、文献で十分に証明されている（Sawabe 2002, Sawabe 2004, Sawabe 2008, Werner 2011）。

マウス、ラット及びサルでは、sepiapterin の吸収及び sepiapterin から BH_4 への変換は速やかかつ広範であった。これらの動物種では、循環血中の sepiapterin 濃度が低く（概ね BH_4 の 5%未満）、通常、定量限界（BQL）未満まで速やかに低下する。体循環からの BH_4 の消失は速く、$T_{1/2}$ は通常 6 時間未満である。ラット（CNSA-TOX-001-2017）及びマーモセット（CNSA-TOX-002-2017）に 1,000 mg/kg までの用量で連日反復投与したところ、BH_4 の明らかな蓄積は認められず、また、ラット及びマーモセットでは BH_4 曝露量に明らかな性差も認められなかった（PTC923-2020-003、PTC923-2020-004）。同様に、新生仔ラット及び妊娠ラットでも、sepiapterin から BH_4 への速やかでかつ広範な変換が認められた。Sepiapterin を 100 mg/kg までの用量で出生後 4 日目（PND4）～PND9 の新生仔ラットに 6 日間連日投与したところ、BH_4 の蓄積は認められなかったが、同用量の sepiapterin を投与した成熟ラットと比較して、新生仔では BH_4 の消失が緩徐で、BH_4 曝露量の増加が認められた。

プロトタイプ製剤を含む各種 sepiapterin 製剤を評価し、開発中に使用した。これらの製剤の相対的経口バイオアベイラビリティをラット、イヌ又はサルで検討した。BH_4 曝露量は、検討した各種製剤で同程度であった。

0.1%ジチオスレイトール（DTT）の存在下、pH 7.31～7.71（インキュベート後）では、0.1～10 µM の濃度で sepiapterin のヒト血漿タンパクへの結合率は低かった（平均 15.4%）。0.5% β-メルカプトエタノールの存在下、pH 7.2 で BH_4 を安定化させたときの BH_4 のヒト血漿タンパク結合率は、2、5、及び 15 µM の sepiapterin で中程度～低度（平均血漿タンパク結合率は、それぞれ 41.3%、33.0%、及び 24.1%）であった。

In vitro 試験により、sepiapterin は多剤耐性タンパク質 1（MDR1）／P-糖タンパク（P-gp）トランスポーターの基質ではないことが示されている（PTC923-2020-002 試験）。Sepiapterin の細胞への取り込みは、平衡型ヌクレオシドトランスポーター（ENT）2 など能動輸送体によって促進されると考えられる（Ohashi 2011）。BH_4 は in vitro 試験により P-gp の基質であることが確認されているが、sepiapterin は（Sawabe 2002, Sawabe 2008）様々な組織に BH_4 がより効率的に送達されることが示されている（Sawabe 2002, Sawabe 2008）。マウスに sepiapterin を経口投与すると、血漿、肝臓、腎臓、脳中の BH_4 濃度が有意に上昇し（PTC923-2023-046 試験）、sepiapterin を投与したときの方が同様の用量で BH_4 を投与したときよりも、BH_4 濃度が高かった（16H208S-X01/6016-2880 試験）。PTC が評価したマウス以外のすべての動物種（ラット、ウサギ、イヌ、マーモセット及びカニクイ

ザル）でも、sepiapterin の経口投与により、血漿中 BH_4 が有意に増加することが明らかになっている。

[^{14}C]-sepiapterin 経口投与後の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は速やかかつ全身に広く分布した。ほとんどの組織で投与後 4～8 時間に最高濃度が認められ、[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は大分部の組織において BQL の濃度で、投与後 168 時間までに徐々に消失した。組織の約 63%で組織／血漿比が 1 を超えた。中枢神経系（CNS）組織への分布は測定可能であったが、概ね、他のほとんどの組織よりも低値で、組織／血漿比は 1 を下回った。

Sepiapterin から BH_4 への変換は、sepiapterin 還元酵素（SR）及びジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）を介して行われる（Smith 2019）。カルボニル還元酵素（CR）など他の酵素も、sepiapterin から中間代謝物 7, 8-ジヒドロビオプテリン（BH_2）への変換の最初の段階に関与している可能性がある（Werner 2011）。経口投与された sepiapterin により増加した BH_4 は、内因性 BH_4 と同じ経路をたどると考えられる。BH_4 は、フェニルアラニン水酸化酵素（PAH）、チロシン水酸化酵素（TH）、トリプトファンヒドロキシラーゼ（TPH）、アルキルグリセロールモノオキシゲナーゼ（AGMO）及び一酸化窒素合成酵素（NOS）の補酵素として働く場合には、酸化される。また、4α-ヒドロキシ-テトラヒドロビオプテリン（BH_4-OH）のようにこの過程で生成された代謝物の一部は、プテリン-4α-カルビノールアミン脱水素酵素（PCD）及びジヒドロプテリジン還元酵素（DHPR）により BH_4 を再生するためにリサイクルされる可能性がある（Werner 2011）。BH_2、キサントプテリン、イソキサントプテリン、7, 8-ジヒドロキサトプテリン（XH_2）、ルマジン類及びその他のプテリジン誘導体などのさらなる代謝物も報告されている（Nichol 1985, Sawabe 2008, Rasmussen 2022）。

ラット及びサルに[^{14}C]-sepiapterin を単回経口投与したところ、sepiapterin は広範に代謝された。主要な代謝経路には、酸化／脱水素化、還元／水素化、酸化的脱アミノ化、脱水、側鎖切断、メチル化などが単独又は複合的に関与していた。ラット、サル及びヒトにおける主要代謝経路はほぼ同様であった。

[^{14}C]-sepiapterin を単回経口投与したところ、投与量の大部分は糞中に排泄され（ラット 84.7%、サル 31.1%）、尿中への排泄はわずかであった（ラット 9.21%、サル 7.1%）。胆管カニューレを挿入した（BDC）ラットのデータによると、胆汁中に排泄されるのは、投与量のうち極めてわずかであった（0.57%）。

チトクロム P450（CYP450）酵素の阻害及び誘導が関与する sepiapterin の薬物相互作用の有無について、男女のプールしたヒト肝ミクロソーム（阻害）及び 3 名のドナーから採取した凍結保存ヒト肝細胞（誘導）を用いて in vitro で検討した。データから、sepiapterin は 0.00545～50 μM の濃度で CYP450 アイソザイム 1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 を阻害しないことが示された。また、0.1、1 及び 10 μM sepiapterin で酵素活性及び mRNA 発現量を測定したところ、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6 及び 3A4 は誘導されなかった。

Sepiapterin の透過性及びトランスポーターを介した薬物相互作用の有無を in vitro で検討した。Sepiapterin の双方向透過性を、3、300 μM 及び 3,000 μM の濃度で、MDCKII-BCRP 及び Abcb1KO-MDCKII-MDR1 細胞単層を用いて検討した。MDCKII-BCRP 及び Abcb1KO-MDCKII-MDR1 細胞で

は、sepiapterin の透過性は低かった（1×10^{-6} cm/s 未満）。Sepiapterin は MDR1 の基質ではなかったが、乳癌耐性タンパク質（BCRP）の基質であることが確認された。Sepiapterin は BCRP を 50%阻害濃度（IC_{50}）647.7 μM で阻害し、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1（3,000 μM で 25%阻害）、ENT1（IC_{50}：2,377 mM）、ENT2（IC_{50}：1,180 mM）をわずかに阻害した。Sepiapterin は、トランスポーターMDR1、胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）、多剤排出輸送体（MATE）1、MATE2-K、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、OATP1B3、有機カチオントランスポーター（OCT）1 及び OCT2 を阻害しなかった。また、sepiapterin は MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT2 及び ENT1 の基質である可能性は低かった。ENT2 による sepiapterin の取り込みは、検討した最高濃度（3000 μM）で認められ、100 μM までは取り込みはみられなかった。この濃度は、治療用量の 60 mg/kg における sepiapterin の C_{max}（sepiapterin の C_{max} が 2.82 ng/mL、11.9 nM に相当）の 8,400 倍であり、臨床濃度には到達しなかった。したがって、sepiapterin は ENT2 の基質ではないと考えられる。

BH_4 の透過性及びトランスポーターを介した薬物相互作用の有無についても検討した。BH_4 は安定性に欠けるため、透過性については信頼できる評価ができなかった。BH_4 は、BCRP の基質かつ阻害剤であり（IC_{50}：778.4 μM）、MDR1 の基質かつ阻害剤であった（IC_{50}：992.9 μM）。BH_4 は 250 μM までの濃度では、BSEP を介したタウロコール酸の輸送を阻害しなかった。BH_4 が取り込みトランスポーターMATE1、OAT1、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、ENT1 及び ENT2 の基質である可能性は低かった。安定化剤 0.1% DTT の存在下で、BH_4 は OAT3 の基質ではなかった。BH_4 は取り込みトランスポーターENT1、ENT2、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害しなかった。BH_4 は、安定化剤 0.1% DTT の存在下で、OCT1（1,500 μM で 32%）及び OCT2（150 μM で 23%）に対してわずかな阻害作用を示した。

Sepiapterin の吸収、分布、代謝、排泄及び薬物動態（PK）／トキシコキネティクス（TK）を裏付ける又は特性を明らかにする非臨床試験の一覧を Table 1 に示す。

Table 1. 薬物動態特性を特徴付ける Sepiapterin の非臨床試験の一覧

試験番号	**試験内容**	**GLP 適合状況**
分析法		
投与製剤の分析法		
0016-3250	Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）及び DMSO 中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション	GLP
0018-1460	Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）を定量する分析法のパーシャルバリデーション	GLP
PTC923-2021-015	DMSO 中の sepiapterin（API）を定量する分析法の拡張バリデーション	GLP
PTC923-2020-009	Oral Mix 中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2021-014	Oral Mix 中の sepiapterin（API）を定量する分析法の拡張バリデーション	GLP
PTC923-2023-060	Oral Mix 中の sepiapterin（API）を定量する分析法の拡張バリデーション	GLP
PTC923-2023-065	Oral Plus 中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション	GLP

試験番号	試験内容	GLP 適合状況
0017-1210	外液中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2021-011	脱イオン水で調製した投与製剤中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2021-020	アセトン製剤中の CC-02 のバリデーション及び安定性試験	GLP
PTC923-2021-021	DMSO 投与製剤中の CC-14 のバリデーション及び安定性試験	GLP
生体マトリックス中の sepiapterin 及び BH_4 を測定するバリデートされた生体試料分析法		
[redacted]-170502	HPLC-MS/MS によるラット血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の定量	GLP
PTC923-2021-001	Sprague Dawley ラットの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション	GLP
[redacted]-170501	HPLC-MS/MS によるマーモセット血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の定量	GLP
PTC923-2021-002 試験	サルの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2021-016	ニュージーランド白色ウサギの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2023-064	1%アスコルビン酸処理をした CD-1 マウスの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4 を定量する LC-MS/MS 生体試料分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2023-093	1%アスコルビン酸処理をした Sprague Dawley ラットの K_2EDTA 添加血漿中の 7, 8-ジヒドロキサントプテリン（XH_2）を定量する LC-MS/MS 生体試料分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2023-094	1%アスコルビン酸処理をしたニュージーランド白色ウサギの K_2EDTA 添加血漿中の 7, 8-ジヒドロキサントプテリン（XH_2）を定量する LC-MS/MS 生体試料分析法のバリデーション	GLP
PTC923-2024-109	1%アスコルビン酸処理をしたカニクイザルの K_2EDTA 添加血漿中の 7, 8-ジヒドロキサントプテリン（XH_2）を定量する LC-MS/MS 生体試料分析法のバリデーション	GLP
吸収		
単回投与試験		
16H0208S-X01/ 6016-2880	Sepiapterin 及び BH_4 の C57BL/6 マウス単回経口投与試験	非 GLP
CNSA-PK-001-2017	雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの血漿中 PK の評価	非 GLP
PTC923-2023-046	雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの血漿、肝臓、腎臓及び脳組織中の sepiapterin 及び BH_4 の PK 評価	非 GLP
PTC923-2020-001	Sprague Dawley ラットにおける sepiapterin の単回投与 PK 試験	非 GLP
PTC923-2020-007	Non-Naïve 雄イヌに sepiapterin の各種経口製剤を単回投与したときの PK の検討	非 GLP
PTC923-2020-008	Non-Naïve 雄サルに sepiapterin の各種経口製剤を単回投与したときの PK の検討	非 GLP
反復投与試験		
PTC923-2023-053	野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス 5 日間及び 28 日間強制経口投与試験	GLP
PTC923-2023-070	CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス 26 週間強制経口投与がん原性試験	GLP
CNSA-TOX-001-2017	Sepiapterin：Sprague Dawley ラット 14 日間強制経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験	GLP

試験番号	試験内容	GLP 適合状況
CNSA-TOX-001-2018	Sepiapterin：Sprague Dawley ラット 13 週間強制経口投与毒性試験及び 28 日間回復性試験	GLP
PTC923-2020-003	Sepiapterin：Sprague Dawley ラット 26 週間（強制）経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験	GLP
CNSA-TOX-002-2017	Sepiapterin のマーモセット 14 日間（強制）経口投与毒性試験及びトキシコキネティクス並びに 14 日間回復性試験	GLP
CNSA-TOX-002-2018	Sepiapterin のマーモセット 13 週間（強制）経口投与毒性試験及びトキシコキネティクス並びに 28 日間回復性試験	GLP
PTC923-2020-004	Sepiapterin：マーモセット 9 ヵ月間（強制）経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験	GLP
分布		
PTC923-2021-013	Sepiapterin のヒト血漿タンパク結合率の in vitro 測定、ヒト ENT1 及び ENT2 取り込みトランスポーターと sepiapterin の in vitro 相互作用試験（血漿タンパク結合率）	非 GLP
PTC923-2022-030	BH_4 のヒト血漿タンパク結合率の in vitro 測定	非 GLP
PTC923-2020-002	MDCKII-BCRP 及び Abcb1KO-MDCKII-MDR1 細胞単層膜における sepiapterin の透過性	非 GLP
PTC923-2021-012	MDCKII-BCRP 及び Abcb1KO-MDCKII-MDR1 細胞単層膜における BH_4 の透過性	非 GLP
16H0208S-X01/6016-2880	Sepiapterin 及び BH_4 の C57BL/6 マウス単回経口投与試験	非 GLP
PTC923-2023-046	雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの血漿、肝臓、腎臓及び脳組織中の sepiapterin 及び BH_4 の PK 評価	非 GLP
PTC923-2022-032	QWBA を用いた[^{14}C]-sepiapterin 単回投与後の組織分布	非 GLP
代謝		
PTC923-2022-035	ラットに[^{14}C]-sepiapterin を単回投与したときの代謝物の同定	非 GLP
PTC923-2022-036	サルに[^{14}C]-sepiapterin を単回投与したときの代謝物の同定	非 GLP
PTC923-2023-081	組織 S9 画分における [^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性	非 GLP
PTC923-2023-082	ヒト腸内細菌叢における [^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性	非 GLP
排泄		
PTC923-2022-031	無処置及び胆管カニューレを挿入した Sprague Dawley ラットを用いた[^{14}C]-sepiapterin の AME 試験	非 GLP
PTC923-2022-033	カニクイザルを用いた[^{14}C]-sepiapterin の AME 試験	非 GLP
薬物動態学的薬物相互作用		
CNSA-ADME-001-2017	ヒト CYP450 誘導の検討	非 GLP
CNSA-ADME-002-2017	ヒト CYP450 阻害の検討	非 GLP
PTC923-2020-002	ヒト BCRP、BSEP 及び MDR1 排出（ABC）トランスポーター並びにヒト MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 取り込みトランスポーターの阻害剤及び基質としての sepiapterin の in vitro 評価	非 GLP
PTC923-2021-013	ヒト ENT1 及び ENT2 取り込みトランスポーターを用いた sepiapterin の in vitro 相互作用試験	非 GLP
PTC923-2021-012	テトラヒドロビオプテリン（BH_4）とヒト BCRP、BSEP 及び MDR1 排出（ABC）トランスポーター並びにヒト ENT1、ENT2、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 取り込みトランスポーターとの in vitro 相互作用試験	非 GLP
その他の薬物動態試験		

試験番号	試験内容	GLP 適合状況
CNSA-TOX-005-2017	Sepiapterin を投与した雄 Sprague Dawley ラットにおける小核及び DNA 損傷誘発性の評価	GLP
PTC923-2021-005	Sepiapterin のラット胚・胎児発生に関する用量設定試験	非 GLP
PTC923-2021-023	Sepiapterin のラット胚・胎児発生に関する試験	GLP
PTC923-2021-006	ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験	非 GLP
PTC923-2021-024	ウサギ胚・胎児発生に関する試験	GLP
PTC923-2020-005	新生仔 Sprague Dawley ラット 6 日間パイロット忍容性試験（用量設定試験）	非 GLP
PTC923-2020-006	新生仔ラット 6 日間トキシコキネティクス試験	GLP
PTC923-2023-045	幼若ラット 10 週間投与試験及び 4 週間回復性試験	GLP
PTC923-2023-097	（強制）経口投与による sepiapterin のラット 14 日間反復投与薬物動態試験	GLP
PTC923-2023-096	経口強制投与による sepiapterin の妊娠ウサギ反復投与薬物動態試験	GLP
PTC923-2024-108	Sepiapterin のマーモセット 14 日間反復（強制）経口投与薬物動態試験	GLP

略語：ABC＝ATP 結合カセット、AME＝吸収、代謝及び排泄、API＝有効成分、BCRP＝乳癌耐性タンパク質、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、BSEP＝胆汁酸塩排出ポンプ、CC-02＝[redacted]、CC-14＝[redacted]、CYP450＝チトクロム P450、DMSO＝ジメチルスルホキシド、ENT＝平衡型ヌクレオシドトランスポーター、HPLC-MS/MS＝高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法、K_2EDTA＝エチレンジアミン四酢酸二カリウム、LC-MS/MS＝液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法、MATE＝多剤排出輸送体、MDCKII＝Madin-Darby イヌ腎臓細胞株 II、MDR1＝多剤耐性タンパク質 1、OAT＝有機アニオントランスポーター、OATP＝有機アニオン輸送ポリペプチド、OCT＝有機カチオントランスポーター、PK＝薬物動態、QWBA＝定量的全身オートラジオグラフィー

注：溶媒 Oral Mix は、Oral Mix™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup であった。

2. 分析法

2.1 投与製剤の分析法

様々な分析法が開発され、in vivo 及び in vitro 試験のための投与液及び製剤中の sepiapterin 及び原薬不純物の測定のために用いられている。これらの分析法の主な特徴を Table 2 に要約する。

Table 2. 投与液及び製剤中の sepiapterin 及び原薬不純物を測定するために用いた生体試料分析法の概要

分析対象物質	マトリックス	方法	濃度	試験番号
Sepiapterin 混合製剤	Oral Mix	HPLC-UV	6.00 mg/mL 及び 66.7 mg/mL	0016-3250
			0.9 mg/mL	0018-1460
Sepiapterin API	Oral Mix	HPLC-UV	0.5 mg/mL 及び 50 mg/mL	PTC923-2020-009
			100 mg/mL	PTC923-2021-014
			400 mg/mL	PTC923-2023-060
Sepiapterin API	Ora Plus	HPLC-UV	0.5 mg/mL 及び 400 mg/mL	PTC923-2023-065
Sepiapterin 製剤	脱イオン水	HPLC-UV	0.5、80 及び 100 mg/mL	PTC923-2021-011
Sepiapterin API	DMSO	HPLC-UV	1 mg/mL 及び 100 mg/mL	0016-3250
		HPLC-UV	0.005 mg/mL 及び 0.1 mg/mL	PTC923-2021-015
Sepiapterin API	外液	HPLC-UV	25.0～1,000 ng/mL	0017-1210
CC-02	アセトン	GC	0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL	PTC923-2021-020
CC-14	DMSO	HPLC-UV	0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL	PTC923-2021-021

略語：API＝有効成分、CC-02＝[redacted]、CC-14＝[redacted]、DMSO＝ジメチルスルホキシド、HPLC＝高速液体クロマトグラフィー、GC＝ガスクロマトグラフィー
注：溶媒 Oral Mix は、Oral Mix™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup であった。

2.1.1 Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）の定量法

2.1.1.1 Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション

0016-3250 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、Oral Mix（2.5%[w/w]グリセリン、27%[w/w]ショ糖水溶液）中で、濃度 6.00 mg/mL 及び 66.7 mg/mL の sepiapterin（混合製剤）を測定する高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法をバリデートすることであった。

8 種類の検量線用標準溶液を用いて 1.00～50.00 µg/mL の範囲の検量線で、分析法の直線性を検討した。定量下限（LLOQ）は 1.00 µg/mL であった。簡潔に述べると、この分析法では Poroshell HPH-C18（4.6 mm×150 mm、2.7 µm）分析カラムと波長を 425 nm に設定した UV 検出器を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC システムを使用した。移動相の構成は、2%アセトニトリル水溶液及び 0.1%ギ酸（移動相 A）並びに 0.1%ギ酸のアセトニトリル溶液（移動相 B）であった。

決定係数（R^2）は 0.999 以上であり、判定基準の 0.990 以上を上回った。検量線から濃度を逆算して、各検量線用標準溶液中の sepiapterin 濃度を求めた。3 回の精度及び真度の測定において、すべての検量線用標準サンプルは判定基準を満たし、検討したブランクサンルでも、LLOQ での平均レスポンスの 20.0%を超える妨害ピークは認められなかった。

Oral Mix 中の sepiapterin（製剤化 sepiapterin）を定量する分析法のバリデーションでは、分析内及び分析間の精度・真度、直線性・範囲、堅牢性、特異性（感度を含む）、希釈の妥当性、短期安定性（希釈液及び溶媒中）、凍結融解安定性、長期安定性及び再投与の安定性のすべてが判定基準に適合した。

低濃度及び高濃度の希釈 QC サンプル（DQC）の分析内精度［%相対標準偏差（RSD）］は、それぞれ 0.6 及び 0.4 であり、低濃度及び高濃度 DQC の分析内真度［%相対誤差（RE）］は、それぞれ-7.9 及び-6.4 であった。低濃度及び高濃度 DQC の分析間精度（%RSD）は、それぞれ 1.4 及び 0.6 であり、低濃度及び高濃度 DQC の分析間真度（%RE）は、それぞれ-7.7 及び-6.5 であった。

Oral Mix 中の特異性の評価では、いずれのブランクサンプルにおいても、分析対象物質の保持時間に最低濃度の検量線用標準溶液の平均レスポンスの 20.0%を超える妨害ピークは認められなかった。また、すべての LLOQ サンプルは判定基準内にあった（LLOQ サンプルの%RE の平均値が±10.0%以内、%RSD が 10.0%以下、6 回の LLOQ 注入のうち 4 回以上で%RE が±10.0%以内でなければならない）。

Oral Mix の希釈の妥当性は、2,000 倍（DQC：6 mg/mL）及び 1600 倍（DQC：66.67 mg/mL）希釈で確認した。Oral Mix 中の sepiapterin の 2℃～8℃での長期安定性は、34 日間と確認された。Oral Mix 中の sepiapterin のベンチトップ安定性は、室温で約 25 時間と確認された。Oral Mix 中での再投与の再現性は、約 72 時間維持されることが確認された。

分析法は、以下の試験において、投与製剤中の sepiapterin の濃度測定及び投与製剤の均一性試験に適していた：CNSA-TOX-001-2017 試験及び CNSA-TOX-001-2018 試験（それぞれ、ラット 14 日間及び 13 週間毒性試験）、CNSA-TOX-002-2017 試験及び CNSA-TOX-002-2018 試験（それぞれ、マーモセット 14 日間及び 13 週間毒性試験）、 PTC923-2020-005 試験及び PTC923-2020-006 試験（新生仔ラット毒性試験）並びに CNSA-TOX-005-2017 試験（in vivo 遺伝毒性試験）。

2.1.1.2 Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーの拡張バリデーション

0018-1460 試験（[redacted]）

Oral Mix 中の sepiapterin（混合製剤）0.900 mg/mL の濃度を測定するための、[redacted]0016-3250 試験に記載のバリデート済みの方法を拡張するために、0018-1460 試験でパーシャルバリデーションを実施した。Oral Mix 中の製剤化 sepiapterin 濃度を測定するパーシャルバリデーションには、溶媒中 0.900 mg/mL の低濃度 DQC を用いる分析内精度・真度、特異性、希釈の再現性、再投与の再現性、短期安定性、長期安定性が含まれた。

低濃度（0.9 mg/m）及び高濃度（30 mg/mL）DQC の分析内精度（%RSD）は、それぞれ 0.3 及び 0.1 であり、低濃度及び高濃度 DQC の分析内真度（%RE）は、それぞれ 3.3 及び 2.9 であった。Oral Mix の希釈の妥当性は、100 倍（DQC：0.900 mg/mL）及び 1000 倍（DQC：30.0 mg/mL）希釈で確認した。Oral Mix 中 sepiapterin の、濃度 0.900 mg/mL 及び 2℃～8℃での長期安定性は、17 日間と確認された。再投与の再現性は 78 時間サイクルで確認され、ベンチトップ安定性は室温で 48 時間であると確認された。

すべての評価は判定基準を満たし、この方法は CNSA-TOX-001-2018 試験及び CNSA-TOX-002-2018 試験の分析に適していた。

2.1.2 Oral Mix 中 sepiapterin（有効成分）の定量法

2.1.2.1 Oral Mix 中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション

PTC923-2020-009 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、Oral Mix 中の sepiapterin 有効成分（API）0.5 mg/mL 及び 50 mg/mL の濃度を測定するための、UV 検出器を用いる HPLC 法をバリデートすることであった。

7 種類の検量線用標準溶液を用いて 1.00～50.0 µg/mL の範囲の検量線で、分析法の直線性を検討した。LLOQ は 1.00 µg/mL であった。簡潔に述べると、この分析法では Poroshell HPH-C18（4.6 mm×150 mm、2.7 µm）分析カラムと波長を 425 nm に設定した UV 検出器を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC システムを使用した。移動相の構成は、移動相 A ではアセトニトリル：水：ギ酸が 2：98：0.1 （v/v/v)、移動相 B では 0.1%ギ酸のアセトニトリル溶液であった。

R^2 は 0.999 以上であった。検量線から濃度を逆算して、各検量線用標準溶液中の sepiapterin 濃度を求めた。すべての検量線用標準サンプルは判定基準を満たした。

Oral Mix 中の sepiapterin を定量する分析法のバリデーションは、直線性・範囲、選択性／特異性、感度、キャリーオーバー及び後期ピーク、分析内及び分析間の精度・真度、希釈再現性、堅牢性、希釈液中の安定性（室温及び 2℃～8℃）、溶媒中の安定性（室温及び 2℃～8℃）、処理後の製剤安定性／再投与の再現性（室温及び 2℃～8℃）及び原液の安定性（室温及び 2℃～8℃）はすべて、判定基準を満たした。

低濃度（0.5 mg/mL）及び高濃度（50 mg/mL）の製剤 QC サンプル（FQC）の分析内精度（%RSD）は、それぞれ 0.7 及び 0.3 であり、低濃度及び高濃度 FQC の分析内真度（%RE）は、それぞれ 8.2 及び 2.9 であった。低濃度及び高濃度 FQC の分析間精度（%RSD）は、それぞれ 0.7 及び 2.6 であり、低濃度及び高濃度 FQC の分析間真度（%RE）は、それぞれ 8.5 及び 1.0 であった。Oral Mix の希釈の妥当性は、50 倍（FQC：0.500 mg/mL）及び 1600 倍（FQC：50.0 mg/mL）で確認した。

Oral Mix 中の特異性の評価では、いずれのブランクサンプルにおいても、分析対象物質の保持時間に最低濃度の検量線用標準溶液の平均レスポンスの 20.0%を超える妨害ピークは認められなかっ

た。また、すべての LLOQ サンプルは判定基準内にあった（LLOQ サンプルの%RE の平均値が実際の濃度の±10.0%以内、%RSD が 10.0%以下、かつ、6 回の LLOQ 注入のうち 4 回以上で%RE が±10.0%以内でなければならない）。

希釈液［アセトニトリル：水＝5：95（v/v）］中の sepiapterin は、室温で少なくとも 27 時間、及び 2℃～8℃で 49 時間安定であることを確認した。溶媒（Oral Mix）中での安定性を確認するために、FQC 原液の一定量を室温で 9 日間以上、及び 2℃～8℃で 15 日間以上保存した後に希釈し、新たに調製した検量線を用いて分析した。すべての安定性サンプルは判定基準を満たした。

処理済みの FQC サンプルの安定性は、溶媒中で希釈した FQC を室温及び 2℃～8℃で 24 時間以上放置した後に求めた濃度を、新たに調製した検量線と比較することにより決定した。溶媒中で処理した FQC サンプルは、室温で少なくとも 26 時間、2℃～8℃では少なくとも 48 時間安定であった。

名目濃度 100 µg/mL の sepiapterin 原液は、室温で少なくとも 26 時間、及び 2℃～8℃で少なくとも 10 日間安定であった。

分析法は、以下の試験における sepiapterin 濃度の測定に適していた：PTC923-2020-003 試験（ラット 26 週間毒性試験）、PTC923-2020-004 試験（マーモセット 9 ヵ月間毒性試験）、PTC923-2022-028 試験（ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験）、PTC923-2023-048 試験（ラット出生前及び出生後の発生試験）及び PTC923-2023-045 試験（幼若ラット毒性試験）。

2.1.2.2 Oral Mix 中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーの拡張バリデーション

PTC923-2021-014 試験及び PTC923-2023-060 試験（[redacted]）

PTC923-2021-014 試験の目的は、Oral Mix 中 sepiapterin（API）100 mg/mL の濃度測定に用いる HPLC-UV 検出法のバリデーションを拡張することであった。最初のバリデーション（PTC923-2020-009、2.1.2.1 項で述べる）は、Oral Mix 中 sepiapterin の濃度範囲 0.5～50 mg/mL を対象とした。新たにバリデードする定量法の選択性、直線性、キャリーオーバー、精度・真度、及び希釈の妥当性を検討し、許容できることが確認された。

分析内の精度及び真度は判定基準を満たした。（逆算した濃度の平均値の%RE が実際の濃度の±15%以内であり、各濃度につき FQC 6 本のうち 4 本以上が実際の濃度の±15%以内にあること、かつ、逆算した濃度の RSD が各濃度で 10%以下でなければならない。）100 mg/mL の FQC の分析間の精度（%RSD）は 1.2、分析間の真度（%RE）は 3.8 であった。処理済みの製剤の安定性・再投与の再現性は、室温及び 2℃～8℃で 24 時間保存した後に確認した。溶媒サンプル中の安定性は、室温で 9 日間、及び 2℃～8℃で 15 日間保存した後に確認した。このバリデートされた方法を用いて、PTC923-2021-005 試験、PTC923-2021-006 試験、PTC923-2021-023 試験及び PTC923-2021-024 試験（ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験）で使用する投与製剤の分析を行った。

Oral Mix 製剤中の sepiapterin の実行可能な最高濃度として 400 mg/mL を設定した非 GLP 試験 PTC923-2023-071 に従い、Oral Mix 中の sepiapterin（API）400 mg/mL の濃度測定に用いる HPLC-UV

法のバリデーションを拡張するために PTC923-2023-060 試験を実施した。新たにバリデートされた定量法は、精度・真度、工程の安定性、製剤の真度及び均一性、製剤の安定性、及び再懸濁液の均一性について試験し、許容可能であることが示された。

本分析法は、400 mg/mL FQC の精度（%RSD、0.9）及び真度（各濃度で、添加サンプル 6 本中 5 本以上で理論濃度の±15%以内）の判定基準を満たした。処理済みの製剤の安定性・再投与の再現性は、室温及び 2℃～8℃で 24 時間保存した後に確認した。溶媒サンプル中の安定性及び再懸濁液の均一性は、室温で 9 日間、及び 2℃～8℃で 15 日間保存した後に確認した。

このバリデートされた方法を、PTC923-2023-053 試験［野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス 5 日及び 28 日間試験］の投与製剤の分析に用いた。このバリデーションは、GLP 毒性試験における再懸濁液の均一性評価の裏付にもなる。

2.1.3 Oral Plues 中 sepiapterin（有効成分）の定量法

2.1.3.1 Oral Plues 中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション

PTC923-2023-065 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、Oral Plus 中の sepiapterin（API) 0.5 mg/mL 及び 400 mg/mL の濃度を測定するための、UV 検出器を用いる HPLC 法をバリデートすることであった。

6 種類の検量線用標準溶液を用いて 1.00～50.0 µg/mL の範囲の検量線で、分析法の直線性を検討した。LLOQ は 1.00 µg/mL であった。簡潔に述べると、この分析法では Poroshell HPH-C18（4.6 mm×150 mm、2.7 µm）分析カラムと波長を 425 nm に設定した UV 検出器を備えた HPLC システムを使用した。移動相の構成は、移動相 A ではアセトニトリル：水：ギ酸が 2：98：0.1 （v/v/v)、移動相 B では 0.1%ギ酸のアセトニトリル溶液であった。

Ora Plus 中の sepiapterin を定量する分析法のバリデーションでは、直線性・範囲、精度・真度、4℃での注入溶媒中の安定性、処理済みサンプルの安定性（室温及び 5℃）、及び製剤及び再懸濁液サンプル中の安定性（室温及び 5℃）がすべて、判定基準を満たした。

本分析法は、低濃度（0.5 mg/mL）及び高濃度（400 mg/mL）FQC の精度（%RSD、それぞれ 0.2 及び 1.0）及び真度（各濃度で、添加サンプル 6 本中 5 本以上で理論濃度の±15%以内）の判定基準を満たした。注入溶媒中の Sepiapterin の安定性は、低濃度及び高濃度の FQC を用いて、4℃では、それぞれ少なくとも 42 時間及び 34 時間は安定であることが確認された。また、処理済み sepiapterin サンプルの安定性は、低濃度及び高濃度 FQC を用いて、室温及び 5℃で少なくとも 24 時間は安定であることが確認された。

溶媒（Ora Plus）中の安定性を確認するために、FQC 原液の一定量を室温で 8 日間以上、5℃で 15 日間以上保存した後に、希釈して、新たに調製した検量線を用いて分析した。すべての安定性サンプルは判定基準に適合した。［0.5 mg/mL での Day 8 の室温での安定性評価の結果は許容基準を満

たさなかった（平均 77.4%、0.394 mg/mL）。ただし、同じ時点及び同じ保存条件におけるにおける再懸濁液の均一性評価は、許容できる結果であった。］

このバリデートされた方法を、PTC923-2023-045 試験（幼若ラット毒性試験）の製剤分析に用いた。

2.1.4 脱イオン水で調製した投与製剤中の sepiapterin（API）を定量する分析法のバリデーション

2.1.4.1 脱イオン水で調製した投与製剤中の sepiapterin を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション

PTC923-2021-011 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、脱イオン水の投与製剤中の sepiapterin を測定するための分析法をバリデートすること、及びこの方法を使用して、0.5、80、及び 100 mg/mL の濃度で sepiapterin 製剤（DP）の投与製剤を脱イオン水で調製するときの手順をバリデーションすることであった。

分析法の直線性は、濃度が 0 でない 6 種類の検量線用標準溶液を用いて、0.001～0.05 mg/mL の範囲の検量線で検討した。LLOQ は 0.001 mg/mL であった。簡潔に述べると、この分析法では Poroshell HPH-C18（4.6 mm×150 mm、2.7 µm）分析カラムと波長を 425 nm に設定した UV 検出器を備えた HPLC システムを使用した。移動相の構成は、移動相 A ではアセトニトリル：水：ギ酸が 2：98：0.1 （v/v/v）、移動相 B では 0.1%ギ酸のアセトニトリル溶液であった。

この方法は、脱イオン水の投与製剤中の sepiapterin を定量するのに、クロマトグラフィーの選択性、直線性及び真度・精度に問題がないことが示された。

R^2 は 0.999 であった。この分析法は、低濃度（0.5 mg/mL）及び高濃度（100 mg/mL）の FQC の精度（%RSD：それぞれ 0.3 及び 0.2）及び真度（各濃度で、添加サンプル 6 本中 5 本以上で理論濃度の±10%以内）の判定基準を満たした。注入溶媒中の sepiapterin の安定性は、低濃度、中濃度及び高濃度 FQC では、4℃でそれぞれ少なくとも 33 時間、33 時間及び 48 時間は安定であることが確認された。

脱イオン水中の安定性を確認するために、FQC 原液の一定量を室温で 9 日間以上、4℃で 15 日間以上保存した後に希釈して、新たに調製した検量線を用いて分析した。0.5、80 及び 100 mg/mL の製剤及び再懸濁液の安定性試験用サンプルは、すべて判定基準に適合した。

投与液中の sepiapterin の真度、均一性、安定性及び再懸濁を検討した。また、脱イオン水中、0.5 mg/mL（2.114 mg/mL 調整）、80 mg/mL（338.3 mg/mL 調整）及び 100 mg/mL（422.8 mg/mL 調整）を含有する正確で均一な製剤を調製する手順が検証された。このバリデートされた方法を PTC923-2021-007 試験（ラットにおける不純物の安全性確認試験）で用いた。

2.1.5 ジメチルスルホキシド中の sepiapterin（混合製剤）の定量法

2.1.5.1 ジメチルスルホキシド中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション

0016-3250 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、ジメチルスルホキシド（DMSO）中の sepiapterin（API）を 1.00 mg/mL 及び 100 mg/mL の濃度で測定する HPLC 法をバリデートすることであった。

8 種類の検量線用標準溶液を用いて 1.00～50.00 µg/mL の範囲の検量線で、分析法の直線性を検討した。LLOQ は 1.00 µg/mL であった。簡潔に述べると、この分析法では Poroshell HPH-C18（4.6 mm×150 mm、2.7 µm）分析カラムと波長を 425 nm に設定した UV 検出器を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC システムを使用した。移動相の構成は、2%アセトニトリル水溶液及び 0.1%ギ酸（移動相 A）並びに 0.1%ギ酸のアセトニトリル溶液（移動相 B）であった。

R^2 は 0.999 以上であり、判定基準の 0.990 以上を上回った。検量線から濃度を逆算して、各検量線用標準溶液中の sepiapterin 濃度を求めた。3 回の精度及び真度の測定において、すべての検量線用標準サンプルは判定基準を満たし、検討したブランクサンルでも、LLOQ での平均レスポンスの 20.0%を超える妨害ピークは認められなかった。

DMSO 中の sepiapterin を定量する分析法のバリデーションでは、分析内精度及び真度のすべての判定基準を満たした。低濃度及び高濃度 DQC の分析内精度（%RSD）は、それぞれ 2.5 及び 1.1 であり、低濃度及び高濃度 DQC の分析内真度（%RE）は、それぞれ-1.1 及び-6.0 であった。

DMSO 中の特異性の評価では、いずれのブランクサンプルにおいても、分析対象物質の保持時間に最低濃度の検量線用標準溶液の平均レスポンスの 20.0%を超える妨害ピークは認められなかった。また、すべての LLOQ サンプルでは判定基準内にあった（LLOQ サンプルの%RE の平均値が±10.0%以内、%RSD が 10.0%以下、6 回の LLOQ 注入のうち 4 回以上で%RE が±10.0%以内でなければならない）。

DMSO の希釈の妥当性は、250 倍（DQC：1 mg/mL）及び 3,125 倍（DQC：100 mg/mL）希釈で確認した。

DMSO 中 sepiapterin の長期安定性は、2℃～8℃で 41 日間と確認された。また、DMSO 中 sepiapterin の凍結融解安定性は 3 サイクル、ベンチトップ安定性は、室温で約 54 時間と確認された。DMSO 中での再投与の再現性は、77 時間維持されることが確認された。

この分析法は、in vitro 遺伝毒性試験 CNSA-TOX-003-2017 及び CNSA-TOX-004-2017 において DMSO 中 sepiapterin の濃度測定に適していた。

2.1.5.2 ジメチルスルホキシド中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーの拡張バリデーション

PTC923-2021-015 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、DMSO 中の sepiapterin API 5 µg/mL 及び 0.1 mg/mL の濃度を測定するための、UV 検出器を用いる HPLC 法の拡張バリデーションを実施することであった。最初のバリデーション（0016-3250 試験、2.1.5.1 項で述べる）は、溶媒（DMSO）中 sepiapterin の濃度範囲 1～100 mg/mL を対象とした。新たにバリデートする定量法の直線性・範囲、キャリーオーバー、精度・真度、及び希釈の妥当性を検討し、許容できることが確認された。

分析内の精度及び真度は判定基準を満たした。（逆算した濃度の平均値の%RE が実際の濃度の±15%以内であり、各濃度につき FQC 6 本のうち 4 本以上が実際の濃度の±15%以内にあること、かつ、逆算した濃度の RSD が各濃度で 10%以下でなければならない。）低濃度及び高濃度 FQC の分析間精度（%RSD）は、それぞれ 3.4 及び 1.7 であり、低濃度及び高濃度 FQC の分析間真度（%RE）は、それぞれ 6.7 及び 4.3 であった。処理済みの製剤の安定性・再投与の再現性は、環境室温及び 2℃～8℃で 24 時間保存して確認された。溶媒サンプル中の安定性は、室温で 24 時間及び 2℃～8℃で 14 日間保存して確認された。

このバリデートされた方法を、PTC923-2021-010 試験（光毒性試験）の製剤分析に用いた。

2.1.6 外液中の sepiapterin（有効成分）の定量法

2.1.6.1 外液中の sepiapterin（有効成分）を定量する UV 検出器付き高速液体クロマトグラフィーのバリデーション

0017-1210 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、外液中の sepiapterin を定量するための UV 検出器を用いる HPLC 法をバリデートすることであった。外液の組成は、注射用滅菌水中、137 mM 塩化ナトリウム、4 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、10 mM グルコース及び 10 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）で、pH は 7.4 である。8 種類の検量線用標準溶液を用いて 25.0～1,000.0 ng/mL の検量線範囲で、分析法の直線性を検討した。LLOQ は 25.0 ng/mL であった。簡潔に述べると、この分析法では Poroshell HPH-C18（4.6 mm×150 mm、2.7 µm）分析カラムと波長を 425 nm に設定した UV 検出器を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC システムを使用した。移動相の構成は、2%アセトニトリル水溶液及び 0.1%ギ酸（移動相 A）並びに 0.1%ギ酸のアセトニトリル溶液（移動相 B）であった。

R^2 は 0.999 以上であり、判定基準の 0.990 以上を上回った。検量線から濃度を逆算して、各検量線用標準溶液中の sepiapterin 濃度を求めた。2 つの検量線用標準サンプルは、注入バイアル内に気泡が存在したため「不完全な分析」と読み替えられた。その他の検量線用標準サンプルはいずれも判定基準を満たした。検討したブランクサンプルで、妨害ピークが LLOQ の平均レスポンスの 20.0%を超えたものはなかった。

外液中の sepiapterin を定量する分析法のバリデーションでは、分析内及び分析間の精度・真度、直線性・範囲、堅牢性、特異性（感度を含む）、希釈の妥当性、短期安定性、長期安定性及び再投与の安定性のすべてが判定基準に適合した。

低濃度（71.2 ng/mL）及び高濃度（23,722 ng/mL）の DQC の分析内精度（%RSD）は、それぞれ 2.9 及び 1.0 であり、低濃度及び高濃度 DQC の分析内真度（%RE）は、それぞれ 1.7 及び-2.5 であった。低濃度及び高濃度 DQC の分析間精度（%RSD）は、それぞれ 2.4 及び 6.4 であり、低濃度及び高濃度 DQC の分析間真度（%RE）は、それぞれ 2.5 及び-2.4 であった。外液の希釈の妥当性は、2 倍（DQC：71.2 ng/mL）及び 50 倍（DQC：23,722 ng/mL）希釈で確認した。

外液中の特異性の評価では、いずれのブランクサンプルにおいても、分析対象物質の保持時間に最低濃度の検量線用標準溶液の平均レスポンスの 20.0%を超える妨害ピークは認められなかった。また、LLOQ サンプルでは判定基準内にあった（LLOQ サンプルの%RE の平均値が±10.0%以内、%RSD が 10.0%以下、6 回の LLOQ 注入のうち 4 回以上で%RE が 10.0%以内でなければならない）。

外液中 sepiapterin の 2℃～8℃での長期安定性は、12 日間と確認された。外液中の sepiapterin のベンチトップ安定性は、少なくとも約 73 時間であると確認された。外液中の sepiapterin は、2℃～8℃で少なくとも約 72 時間は再投与の再現性が維持された。本分析法は、in vitro ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）阻害試験の CNSA-PHARM-001-2017 試験において、sepiapterin の濃度測定及び均一性試験に適していた。

2.1.7 原薬の不純物の測定方法

2.1.7.1 アセトン製剤中の CC-02 の分析法のバリデーション及び安定性試験

PTC923-2021-020 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、アセトン中の[redacted]（CC-02）濃度を測定する水素炎イオン化検出を用いたガスクロマトグラフィー法をバリデートすることであった。アセトン製剤における被験物質の溶解性、並びに室温及び冷凍（約-70℃）保存後の安定性も評価した。

5.00～100 µg/mL の検量線について、CC-02 濃度測定法の評価を行った。分析法バリデーションの結果、特異性／選択性、検量線の再現性、精度・真度、原液の安定性、及び被験物質の安定性はすべて、判定基準を満たしていた。

この分析法は、低濃度（0.01 mg/mL）及び高濃度（50 mg/mL）FQC の精度（%RSD、それぞれ 1.071 及び 0.833）及び真度（各濃度で、添加サンプル 6 本中 5 本以上で理論濃度の±10%以内）の判定基準を満たした。5.00 及び 100 µg/mL で調製した検量線用標準溶液は、室温で 4 日間及び 5 日間保存したときの安定性の基準を満たした。このことからも、100 µg/mL で調製した原液（検量線用標準溶液として最高濃度の検量線用標準原液）の安定性が確認された。0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL

で調製した処理済みサンプルは、室温で 4 日間及び 5 日間保存したときの安定性の基準を満たした。

さらに、製剤の溶解性及び安定性も確認された。目標濃度 50 mg/mL で調製した製剤は、溶解性の適用基準を満たした。0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL で調製した製剤は室温で 25 時間保存したとき、及び凍結（約-70℃）して 8 日間保存したときの安定性の基準に適合した。

このバリデートされた CC-02 濃度測定法は、in vitro PTC923-2021-025 試験（変異原性不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験）に使用した。

2.1.7.2 ジメチルスルホキシド製剤中の CC-14 の分析法のバリデーション及び安定性試験

PTC923-2021-021 試験（[redacted]）

本 GLP 試験の目的は、DMSO 中の[redacted]（CC-14）の濃度を測定するための UV 検出を用いた HPLC 法をバリデートすることであった。

1.00～100 µg/mL の範囲の検量線について、CC-014 濃度測定法の評価を行った。分析法バリデーションの結果、特異性／選択性、検量線の再現性、精度・真度、原液の安定性、及び被験物質の安定性はすべて、判定基準を満たしていた。

この分析法は、低濃度（0.01 mg/mL）及び高濃度（50 mg/mL）FQC の精度（%RSD、それぞれ 0.281 及び 0.664）及び真度（各濃度で、添加サンプル 6 本中 5 本以上で理論濃度の±10%以内）の判定基準を満たした。1.00 µg/mL 及び 100 µg/mL に調製した検量線用標準溶液は、23 時間静置したとき、及び 8 日間冷蔵保存したときの安定性の基準を満たした。DMSO で 1.00 mg/mL に調製した原液（ただし、検量線用標準溶液の最高濃度は、アセトニトリルで 0.100 mg/mL に調製した作業用標準原液）は、検量線用標準溶液の安定性試験で示されるように、23 時間保存したとき及び 8 日間冷蔵保存したときの安定性の基準を満たした。0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL に調製した処理済みサンプルは、22 時間静置したとき、及び 8 日間冷蔵保存したときの安定性の基準を満たした。

また、目標濃度 0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL で調製した製剤は均一性の適用基準に適合した。0.01 mg/mL 及び 50 mg/mL に調製した製剤は、室温で 24 時間保存したとき、及び凍結（約-70℃）して 9 日間保存したときの安定性の基準に適合した。

このバリデートされた CC-14 濃度測定法は、in vitro PTC923-2021-026 試験（変異原性不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験）に使用した。

2.2 生体マトリックス中の sepiapterin 及び BH_4 を測定するバリデートされた生体試料分析法

GLP 試験中に採取したラット、ウサギ及びマーモセットの血漿サンプルの分析に用いる、sepiapterin 及び BH_4 を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC-MS/MS）法をバリデートした。

2.2.1 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法によるラット血漿中 sepiapterin 及びテトラヒドロビオプテリン（BH_4）の測定

[redacted]-170502 試験

ラットの 1%アスコルビン酸含有、エチレンジアミン四酢酸二カリウム（K_2EDTA）添加血漿（10%アスコルビン酸処理血漿）中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を測定するための生体試料分析法をサンプル容量 50.0 µL で、それぞれ 11.1～5,556 ng/mL 及び 22.2～5,556 ng/mL の濃度範囲でバリデートした。ラット血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は、それぞれ 11.1 及び 22.2 ng/mL であった。Sepiapterin 及び BH_4 の両方の内標準物質（IS）として、d_3-ビオプテリンを使用した。

血漿サンプルからの分析対象物質及び IS の抽出は、タンパク質沈殿抽出法を用いて行い、抽出物の分析は高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（HPLC-MS/MS）法で実施した。分析対象物質の検出は、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析法及びポジティブイオンの多重反応モニタリング（MRM）により行った。Sepiapterin、BH_4 及び d_3-ビオプテリン（IS）のモニタリングには、それぞれプリカーサーイオン→プロダクトイオンとして m/z 238.2→165.2、m/z 242.2→166.2 及び m/z 241.2→165.2 を用いた。理論濃度（x）に対する検量線用サンプル中の分析対象物質ピーク面積／IS ピーク面積の比（y）に $1/x^2$ を重み付けとした線形回帰により直線を当てはめた。本定量法の真度、精度、選択性、抽出物回収率、希釈直線性、マトリックス効果及び安定性についてバリデーションを実施した。検量線用標準溶液の逆算した濃度の許容範囲は 85%～115%（ただし、LLOQ では逆算した濃度が 80%～120%以内）で、結果はすべてこの範囲内にあった。品質管理（QC）サンプルの許容範囲は、名目濃度の 85%～115%で、結果はすべてこの範囲内にあった。システム適合性サンプル（55.60 及び 5,556 ng/mL の検量線用標準溶液）を各連続測定の開始時に注入した。結果は判定基準（シグナル／ノイズ比は 10 以上、かつピーク面積比の RSD は 10%以下）に適合した。ブランクサンプルでは、sepiapterin 及び BH_4 が LLOQ（それぞれ、11.1 ng/mL 及び 22.2 ng/mL）を超えて検出されることはなかった。

分析法バリデーション中に、酸性化ラット血漿で低濃度（33.33 ng/mL）及び高濃度（4,444 ng/mL）で調製した sepiapterin 及び BH_4 の QC サンプルを分析まで約-70℃で保存した場合、少なくとも 213 日間は安定（目標濃度の±15%）であることが確認された。酸性化ラット血漿中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度（33.33 ng/mL）及び高濃度（4,444 ng/mL）の QC サンプルを-70℃で凍結し 4℃で融解した場合、3 回の凍結融解サイクルで安定しており、ベンチトップ安定性は、4℃で 4 時間であると確認された。Sepiapterin 及び BH_4 は、オートサンプラー内で 4℃で 6 日間、安定であることが確認された。バリデーションの一部として、incurred sample reanalysis（ISR）を実施したときの結果は良好であり、BH_4 の基準を満たしていた。Sepiapterin 濃度は LLOQ であり、ISR 解析に適合しなかった。

ラット血漿を用いてバリデートされたこの定量法は、様々な GLP 試験［CNSA-TOX-001-2017（14 日間毒性試験）、CNSA-TOX-001-2018（13 週間毒性試験）及び CNSA-TOX-005-2017（in vivo 小核及びコメット試験）］、並びに非 GLP 試験 PTC923-2020-001（単回投与 PK 試験）の裏付けに使用された。

2.2.2 Sprague Dawley ラットの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin（11.1～5,560 ng/mL）及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション

PTC923-2021-001 試験

1%酸性化（10%アスコルビン酸処理）ラットの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を同時に測定する生体試料分析法を、サンプル容量 25 µL で、11.1～5,560 ng/mL の濃度範囲でバリデートした。ラット血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は 11.1 ng/mL であった。この方法では、sepiapterin 及び BH_4 の IS として、それぞれ d_3-sepiapterin 及び d-ネオプテリン-$^{13}C_5$ を使用した。この方法では、sepiapterin 及び BH_4 の新たな IS として、それぞれ $^{15}N_3$-sepiapterin 及び d_3-BH_4 を用いて、パーシャルバリデーションを実施した。血漿サンプルからの分析対象物質及び IS の抽出は、タンパク質沈殿抽出法を用いて行い、抽出物の分析は HPLC-MS/MS で実施した。分析対象物質の検出は、ESI 質量分析法及びポジティブイオンの MRM により行った。Sepiapterin、BH_4、$^{15}N_3$-sepiapterin（IS）及び d_3-BH_4（IS）のモニタリングには、それぞれプリカーサーイオン→プロダクトイオンとして m/z 238.2→165.2、242.2→166.2、241.2→195.2 及び 245.2→166.1 を用いた。理論濃度（x）に対する検量線用サンプル中の分析対象物質ピーク面積／IS ピーク面積の比（y）に $1/x^2$ を重み付けとした線形回帰により直線を当てはめた。本定量法の真度、精度、選択性、感度、希釈直線性、キャリーオーバー、回収率、マトリックス効果及び安定性についてバリデーションを行った。検量線用標準溶液の逆算した濃度の許容範囲は 85%～115%（ただし、LLOQ では逆算した濃度が 120%以内）で、結果はすべてこの範囲内にあった。QC サンプルの許容範囲は、名目濃度の 85%～115%で、結果はすべてこの範囲内にあった。ブランクサンプルでは、sepiapterin 及び BH_4 が LLOQ（11.1 ng/mL）を超えて検出されることはなかった。

分析法バリデーション中に、酸性化ラット血漿で低濃度（33.3 ng/mL）及び高濃度（4,170 ng/mL）で調製した sepiapterin 及び BH_4 の QC サンプルを分析まで約-80℃で保存した場合、少なくとも 74 日間は安定（目標濃度の±15%）であることが確認された。さらに、ラット全血中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度及び高濃度の QC サンプルを 10%アスコルビン酸溶液（溶液と血液の比率は 1：9）で処理したところ、氷冷下で 1 時間安定であることが確認された。酸性化ラット血漿中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度（33.3 ng/mL）及び高濃度（4,170 ng/mL）の QC サンプルを-80℃で凍結し 4℃で融解したところ、7 回の凍結融解サイクルで安定しており、ベンチトップ安定性は、4℃で 10 時間であると確認された。Sepiapterin 及び BH_4 ともに、調製後の抽出物は、5℃で 75 時間安定であり、再投与の再現性は 5℃で 175 時間維持された。

酸性化ラット血漿を用いてバリデートされたこの定量法は、様々な GLP 試験［PTC923-2020-003（26 週間反復投与毒性試験）、PTC923-2020-006（6 日間新生仔 TK 試験）、PTC923-2021-023（胚・胎児発生に関する試験）、及び PTC923-2023-045（10 週間試験及び 4 週間回復性試験）］、並びに非 GLP 毒性試験［PTC923-2020-005（6 日間新生仔ラットパイロット忍容性試験）及び PTC923-2021-005（用量設定胚・胎児発生に関する試験）］における TK 分析を裏付けるために使用した。

2.2.3 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法によるサル血漿中 sepiapterin 及びテトラヒドロビオプテリン（BH_4）の定量

[redacted]-170501 試験

1%酸性化（10%アスコルビン酸処理）サルの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を測定する生体試料分析法をサンプル容量 50.0 µL で、それぞれ 11.11～5,556 ng/mL 及び 22.22～5,556 ng/mL の濃度範囲でバリデートした。バリデーションは酸性化したカニクイザル血漿を用いて実施した。また、酸性化したマーモセット血漿を用いて、同等かつ許容できる精度及び真度が示された。サル血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は、それぞれ 11.11 ng/mL 及び 22.22 ng/mL であった。この方法では、d_3-ビオプテリンを sepiapterin 及び BH_4 の IS として使用した。

血漿サンプルからの分析対象物質及び IS の抽出は、タンパク質沈殿抽出法を用いて行い、抽出物の分析は HPLC-MS/MS で実施した。分析対象物質の検出は、ESI 質量分析法及びポジティブイオンの MRM により行った。Sepiapterin、BH_4 及び d_3-ビオプテリン（IS）のモニタリングには、それぞれプリカーサーイオン→プロダクトイオンとして m/z 238.2→165.2、242.2→166.2 及び 241.2→165.2 を用いた。理論濃度（x）に対する検量線用サンプル中の分析対象物質ピーク面積／IS ピーク面積の比（y）に $1/x^2$ を重み付けとした線形回帰により直線を当てはめた。本定量法の真度、精度、選択性、希釈直線性、キャリーオーバー、回収率、マトリックス効果及び安定性についてバリデーションを実施した。検量線用標準溶液の逆算した濃度の許容範囲は 85%～115%（ただし、LLOQ では逆算した濃度が 120%以内）で、結果はすべてこの範囲内にあった。QC サンプルの許容範囲は、名目濃度の 85%～115%で、マーモセット血漿を用いたマトリックス同等性試験の精度及び真度の結果を含め、すべての結果はこの範囲内にあった。システム適合性サンプル（55.60 ng/mL 及び 5,556 ng/mL の検量線用標準溶液）を各連続測定の開始時に注入した。結果は判定基準（シグナル／ノイズ比は 10 以上、かつピーク面積比の RSD は 10%以下）に適合した。ブランクサンプルでは、sepiapterin 及び BH_4 が LLOQ（それぞれ、11.11 ng/mL 及び 22.22 ng/mL）を超えて検出されることはなかった。

分析法バリデーション中に、酸性化サル血漿で低濃度（33.33 ng/mL）及び高濃度（4,444 ng/mL）で調製した sepiapterin 及び BH_4 の QC サンプルを分析まで約-70℃で保存したところ、少なくとも 213 日間は安定（目標濃度の±15%）であることが確認された。酸性化サル血漿中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度（33.33 ng/mL）及び高濃度（4,444 ng/mL）の QC サンプルを-70℃で凍結し 4℃で融解したところ、3 回の凍結融解サイクルで安定しており、ベンチトップでは、4℃で 4 時間安定であることが確認された。Sepiapterin 及び BH_4 ともにオートサンプラー内で 4℃で 8 日間安定であることが示された。

サル血漿を用いてバリデートされたこの定量法は、様々な GLP 毒性試験［CNSA-TOX-002-2017（14 日間反復投与毒性試験）及び CNSA-TOX-002-2018（13 週間反復投与毒性試験）］における TK 解析を裏付けるために使用した。

2.2.4 サルの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin（11.1～5,560 ng/mL）及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション

PTC923-2021-002 試験

1%酸性化（10%アスコルビン酸処理）カニクイザルの K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を同時に測定する生体試料分析法を、サンプル容量 25 µL で 11.1～5,560 ng/mL の濃度範囲でバリデートした。マーモセット血漿では、精度及び真度について、本分析法のパーシャルバリデーションを実施した。サル血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は 11.1 ng/mL であった。この方法では、sepiapterin 及び BH_4 の IS として、それぞれ d_3-sepiapterin 及び d-ネオプテリン-$^{13}C_5$ を使用した。この方法では、sepiapterin 及び BH_4 の新たな IS として、それぞれ $^{15}N_3$-sepiapterin 及び d_3-BH_4 を使用して、パーシャルバリデーションを実施した。血漿サンプルからの分析対象物質及び IS の抽出は、タンパク質沈殿抽出法を用いて行い、抽出物の分析は HPLC-MS/MS で実施した。分析対象物質の検出は、ESI 質量分析法及びポジティブイオンの MRM により行った。Sepiapterin、BH_4、$^{15}N_3$-sepiapterin（IS）及び d_3-BH_4（IS）のモニタリングには、それぞれプリカーサーイオン→プロダクトイオンとして m/z 238.2→165.2、242.2→166.2、241.2→195.2 及び 245.2→166.1 を用いた。理論濃度（x）に対する検量線用サンプル中の分析対象物質ピーク面積／IS ピーク面積の比（y）に $1/x^2$ を重み付けとした線形回帰により直線を当てはめた。本定量法の真度、精度、選択性、希釈直線性、キャリーオーバー、回収率、マトリックス効果及び安定性についてバリデーションを実施した。検量線用標準溶液の逆算した濃度の許容範囲は 85%～115%（ただし、LLOQ では逆算した濃度が 120%以内）で、結果はすべてこの範囲内にあった。QC サンプルの許容範囲は、名目濃度の 85%～115%で、結果はすべてこの範囲内にあった。ブランクサンプルでは、sepiapterin 及び BH_4 が LLOQ（11.1 ng/mL）を超えて検出されることはなかった。

この分析法バリデーション中に、酸性化マーモセット及びカニクイザルの血漿で低濃度（33.33 ng/mL）及び高濃度（4170 ng/mL）で調製した sepiapterin 及び BH_4 の QC サンプルを分析まで約-80℃で保存したところ、少なくとも 181 日間は安定（目標濃度の±15%）であることが確認された。さらに、マーモセット及びカニクイザルの血液中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度及び高濃度の QC サンプルを 10%アスコルビン酸溶液（溶液と血液の比率は 1：9）で処理したところ、4℃で 1 時間安定であることが確認された。酸性化カニクイザル及びマーモセット血漿中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度（33.3 ng/mL）及び高濃度（4,170 ng/mL）の QC サンプルを-80℃で凍結し 4℃で融解したところ、3 回の凍結融解サイクルで安定しており、ベンチトップ安定性は、4℃で 14 時間であると確認された。Sepiapterin 及び BH_4 ともに、調製後の抽出物は、5℃で 104 時間安定であり、再投与の再現性は、5℃で 105 時間維持された。

酸性化サル血漿を用いてバリデートされたこの定量法は、GLP 毒性試験 PTC923-2020-004（9 ヵ月間反復投与毒性試験）の TK 解析を裏付けるために使用した。

2.2.5 ニュージーランド白色ウサギ血漿中の sepiapterin（11.1～5,560 ng/mL）及び BH_4（11.1～5,560 ng/mL）を定量する液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法のバリデーション

PTC923-2021-016 試験

1%酸性化（10%アスコルビン酸処理）ニュージーランド白色ウサギ K_2EDTA 添加血漿中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を同時に測定する生体試料分析法を、サンプル容量 25 µL で 11.1～5,560 ng/mL の濃度範囲でバリデートした。サル血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は 11.1 ng/mL であった。この方法では、sepiapterin 及び BH_4 の IS として、それぞれ $^{15}N_3$-sepiapterin 及び d_3-BH_4 を使用した。血漿サンプルからの分析対象物質及び IS の抽出は、タンパク質沈殿抽出法を用いて行い、抽出物の分析は HPLC-MS/MS で実施した。分析対象物質の検出は、ESI 質量分析法及びポジティブイオンの MRM により行った。Sepiapterin、BH_4、$^{15}N_3$-sepiapterin（IS）及び d_3-BH_4（IS）のモニタリングには、それぞれプリカーサーイオン→プロダクトイオンとして m/z 238.2→165.2、242.2→166.2、241.2→168.2 及び 245.2→166.1 を用いた。理論濃度（x）に対する検量線用サンプル中の分析対象物質ピーク面積／IS ピーク面積の比（y）に $1/x^2$ を重み付けとした線形回帰により直線を当てはめた。本定量法の真度、精度、選択性、希釈直線性、キャリーオーバー、回収率、マトリックス効果及び安定性についてバリデーションを実施した。検量線用標準溶液の逆算した濃度の許容範囲は 85%～115%（ただし、LLOQ では逆算した濃度が 120%以内）で、結果はすべてこの範囲内にあった。QC サンプルの許容範囲は、名目濃度の 85%～115%で、結果はすべてこの範囲内にあった。ブランクサンプルでは、sepiapterin 及び BH_4 が LLOQ（11.1 ng/mL）を超えて検出されることはなかった。

この分析法バリデーション中に、酸性化ウサギ血漿で低濃度（33.3 ng/mL）及び高濃度（4,170 ng/mL）で調製した sepiapterin 及び BH_4 の QC サンプルを分析まで約-80℃で保存したところ、少なくとも 54 日間は安定（目標濃度の±15%）であることが確認された。さらに、ウサギ血液中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度及び高濃度の QC サンプルを 10%アスコルビン酸溶液（溶液と血液の比率は 1：9）で処理したところ、4℃ で 1 時間安定であることが確認された。酸性化ウサギ血漿中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度（33.3 ng/mL）及び高濃度（4,170 ng/mL）の QC サンプルを-80℃で凍結し 4℃で融解したところ、それぞれ 5 及び 4 回の凍結融解サイクルで安定しており、ベンチトップ安定性は、4℃でそれぞれ 21 及び 3 時間であると確認された。Sepiapterin 及び BH_4 ともに、調製後の抽出物は、5℃で 56 時間安定であり、再投与の再現性は 5℃で 58 時間維持された。

酸性化ウサギ血漿を用いてバリデートされたこの定量法は、GLP 毒性試験 PTC923-2021-024（胚・胎児発生に関する試験）の TK 解析を裏付けるために使用した。

2.2.6 1%アスコルビン酸処理をしたCD-1マウスのK2EDTA添加血漿中のsepiapterin（10～5,000 ng/mL）及びBH4（10～5,000 ng/mL）を定量するLC-MS/MS生体試料分析法のバリデーション

PTC923-2023-064 試験

1%酸性化（10%アスコルビン酸処理）CD-1 マウス血漿中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を同時に測定する生体試料分析法を、サンプル容量 25 µL で 10～5,000 ng/mL の濃度範囲でバリデートした。マウス血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は 10 ng/mL であった。また、この分析法は、GLP 毒性試験 PTC923-2023-053 及び GLP がん原性試験 PTC923-2023-070 を裏付けるために、酸性化野生型 rasH2 マウス血漿を用いて、同じ検量線範囲でパーシャルバリデーションを実施した。この方法では、sepiapterin 及び BH_4 の IS として、それぞれ $^{15}N_3$-sepiapterin 及び d_3-BH_4 を使用した。血漿サンプルからの分析対象物質及び IS の抽出は、タンパク質沈殿抽出法を用いて行い、抽出物の分析は HPLC-MS/MS で実施した。分析対象物質の検出は、ESI 質量分析法及びポジティブイオンの MRM により行った。Sepiapterin、BH_4、$^{15}N_3$-sepiapterin（IS）及び d_3-BH_4（IS）のモニタリングには、それぞれプリカーサーイオン→プロダクトイオンとして m/z 238.2→165.2、242.2→166.2、241.2→168.2 及び 245.2→166.2 を用いた。理論濃度（x）に対する検量線用サンプル中の分析対象物質ピーク面積／IS ピーク面積の比（y）に $1/x^2$ を重み付けとした線形回帰により直線を当てはめた。

本定量法の真度、精度、選択性、希釈直線性、キャリーオーバー、回収率、マトリックス効果及び安定性についてバリデーションを実施した。検量線用標準溶液の逆算した濃度の許容範囲は 85%～115%（ただし、LLOQ では逆算した濃度が 120%以内）で、結果はすべてこの範囲内にあった。QC サンプルの許容範囲は、名目濃度の 85%～115%で、1%酸性化（10%アスコルビン酸で処理）CD-1 マウス血漿及び野生型 rasH2 マウス血漿の結果は、すべてこの範囲内にあった。ブランクサンプルでは、sepiapterin 及び BH_4 が LLOQ（10 ng/mL）を超えて検出されることはなかった。

分析法バリデーション中に、酸性化マウス血漿で低濃度（30 ng/mL）及び高濃度（3,750 ng/mL）で調製した sepiapterin 及び BH_4 の QC サンプルを分析まで約-80℃で保存したところ、少なくとも 29 日間は安定（目標濃度の±15%）であることが確認された。さらに、マウス血液中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度及び高濃度の QC サンプルを 10%アスコルビン酸水溶液［血液と 10%アスコルビン酸水溶液の比率は 100：11.1 （v/v）］で処理したところ、氷冷下で 2 時間安定であることが確認された。酸性化マウス血漿中の sepiapterin 及び BH_4 は、低濃度（30 ng/mL）及び高濃度（3,750 ng/mL）の QC サンプルを-80℃で凍結し氷冷して融解したところ、4 回の凍結融解サイクルで安定しており、ベンチトップ安定性は、氷冷下で 19 時間であると確認された。Sepiapterin 及び BH_4 ともに、調製後の抽出物は、5℃で 148 時間安定性であった。

酸性化マウス血漿を用いてバリデートされた定量法は、GLP 毒性試験 PTC923-2023-053（5 日間及び 28 日間反復投与用量設定毒性試験）及び GLP 試験 PTC923-2023-070（26 週間がん原性試験）の TK 解析を裏付けるために使用した。

2.3 生体マトリクス中の sepiapterin 及び BH_4 の測定に適格性が確認された生体試料分析法（非 GLP）

非臨床試験の動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサル）を用いた非 GLP PK 試験を裏付けるため、蛍光、電気化学検出又はタンデム質量分析法を用いた様々な HPLC 法が開発され、裏付けに使用されている。これらの分析法の主な特徴を Table 3 に要約する。

Table 3. 非臨床動物種における sepiapterin 及び BH_4 の非 GLP 薬物動態を裏付けるために用いた適格性が確認された生体試料分析法の概要

分析対象物質	方法	動物種/系統	生体マトリックス	安定化剤	内標準物質	直線範囲	裏付けられた試験
Sepiapterin 及び BH_4	HPLC-蛍光（励起波長：425 nm、蛍光波長：530 nm） 電気化学的	マウス／C57BL/6	肝臓、腎臓、脳、血漿（K_2EDTA）、尿	10%アスコルビン酸（血漿及び組織）、1 mg/mL DTE/0.1 mg/mL DETAPAC（1：1）（尿）	NA	150 fmol～20 pmol	16H0208S-X01、[redacted]6016-2880 試験
Sepiapterin	HPLC-蛍光（励起波長：425 nm、蛍光波長：530 nm） 電気化学的	マウス/CD-1	血漿（K_2EDTA）	10%アスコルビン酸	NA	150 fmol～20 pmol	CNSA-PK-001-2017
Sepiapterin 及び BH_4	LC-MS/MS	イヌ／ビーグル	血漿（K_2EDTA）	10%アスコルビン酸	d_3-Sepiapterin、[$^{13}C_5$]-D-ネオプテリン	11.1～5,560 ng/mL	PTC923-2020-007
Sepiapterin 及び BH_4	LC-MS/MS	サル／カニクイザル	血漿（K_2EDTA）	10%アスコルビン酸	d_3-Sepiapterin、[$^{13}C_5$]-D-ネオプテリン	11.1～5,560 ng/mL	PTC923-2020-008
Sepiapterin 及び BH_4	LC-MS/MS	ウサギ／ニュージーランド白色	血漿（K_2EDTA）	10%アスコルビン酸	$^{15}N_3$-sepiapterin 及び d_3-BH_4	11.1～5,560 ng/mL	PTC923-2021-006
Sepiapterin 及び BH_4	LC-MS/MS	マウス/CD-1	血漿、肝臓、腎臓、脳（K_2EDTA）	10%アスコルビン酸	$^{15}N_3$-sepiapterin 及び d_3-BH_4	10.0～5,000 ng/mL	PTC923-2023-046

略語：BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、DTE＝ジチオエリスリトール、DETAPAC＝ジエチレントリアミン五酢酸、HPLC＝高速液体クロマトグラフィー、IS＝内標準物質物質、K_2EDTA＝エチレンジアミン四酢酸二カリウム、LC-MS/MS＝液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法、NA＝該当せず
注：分析対象物質は、LC-MS/MS でポジティブイオンモードを用いて検出及び定量した。分析対象物質及び内標準物質として、sepiapterin、d_3-sepiapterin（IS）、$^{15}N_3$-sepiapterin（IS）、BH_4、d_3-BH_4（IS）及び[$^{13}C_5$]--D-ネオプテリン（IS）をモニタリングするために、プリカーサーイオン→プロダクトイオンとしてそれぞれ、m/z 238.2→165.2、m/z 241.2→195.2、m/z 241.2→168.2、m/z 242.2→166.2、m/z 245.2→166.1/2、m/z 259.2→210.2 を用いた。

3. 吸収

マウス、ラット、ウサギ、イヌ、マーモセット及びカニクイザルを含む、非臨床試験で検討したすべての動物種において、sepiapterin は経口投与後に速やかに吸収された。最高血漿中 sepiapterin 濃度到達時間（T_{max}）は、概ね投与後 1～2 時間であった。BH_4 への変換は速かった。最高血漿中 BH_4 濃度到達時間（T_{max}）は約 2～4 時間であった。マウス、ラット及びサルでは、sepiapterin から BH_4 への変換は広範であった。マウス、ラット及びサルにおける sepiapterin の C_{max} は、概ね BH_4 の 5%未満であり、sepiapterin の血漿中濃度は、通常投与後 8 時間までに BQL に低下した。全身循環血中からの BH_4 の消失は速やかで、終末相の $T_{1/2}$ は、検討したすべての動物種で推定可能な場合、投与後約 3～6 時間であった。

3.1 単回投与試験

3.1.1 Sepiapterin 及び BH_4 の C57BL/6 マウス単回経口投与試験

16H0208S-X01 試験／6016-2880 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.3A）

この非 GLP 試験のうち生存期間中の評価は 16H0208S-X01 試験で、及び PK 評価は 6016-2880 試験で報告した。この試験の目的は、雄 C57BL/6 マウスに被験物質の sepiapterin 及び BH_4 を単回経口投与したときの PK を評価することであった。被験物質の分布は 4.3.1 項に示す。

試験期間中、尿サンプルを除き、血液・血漿採取後及び組織サンプル処理中に安定化剤は添加しなかった。なお、その後の開発中に、BH_4 及び sepiapterin は生体マトリックス中では安定でないことが判明した。本試験の結果の解釈には注意が必要である。

非絶食動物に、0.5% （w/v）カルボキシメチルセルロースを含有するクエン酸緩衝液で調製した sepiapterin 又は BH_4 を 20、60 又は 180 mg/kg の用量で単回強制経口投与した。概要を Table 4 に示す。投与日の投与前（対照群のみ）、投与後 0.5、1、2、4 及び 8 時間に、各時点で 1 群あたり 3 匹の動物から血液、肝臓、腎臓及び尿（剖検後）サンプル（可能な場合）を採取した。サンプル中の sepiapterin 又は BH_4 の濃度を測定し（血漿中では定量せず）、ノンコンパートメント PK 解析を実施した。

各時点の PK サンプルとして血液約 0.8～1.0 mL を心穿刺により採取した。サンプルはクエン酸ナトリウム入り採血管に採取し、直ちに 8～10 回静かに転倒混和した。血漿を調製するまで室温で最長 60 分間保存した。血漿はラベルを貼付したスクリュートップ管に移して保存し、液体窒素中で急速冷凍し、分析のために発送するまで約-60℃～-80℃で保存した。

最終採血後、各動物から肝臓、腎臓及び脳を摘出し、重量を測定した。脳は左右半球に分けた。すべての組織を液体窒素中で急速凍結し、分析のために発送するまで-60℃～-80℃で保存した。

屠殺予定時点に、可能であれば各動物の尿をマイクロ遠心チューブに採取した。尿は直ちに 1 mg/mL ジチオエリスリトール（DTE）/0.1 mg/mL ジエチレントリアミン五酢酸（DETAPAC）と 50/50 で混合し、急速冷凍した。

採取した血漿サンプルは、マウス血漿中の sepiapterin 濃度測定に適格性が確認された HPLC-蛍光・電気化学検出法を用いて分析した。肝臓、腎臓及び尿中の sepiapterin 及び BH_4 の濃度測定は、適格性が確認された方法を用いて、150 fmol の LLOQ で分析した（2.3 項参照）。本試験では、血漿中 BH_4 濃度は測定しなかった。

投与日にすべての動物の生死及び一般状態を観察した。詳細な臨床観察は実施しなかった。予定した採取時点終了後に動物を安楽死させた。

Table 4. 16H0208S-X01 試験の投与スケジュール

群	被験物質	N	投与経路	用量（mg/kg）	投与濃度（mg/mL）
1	BH_4	15	PO	20	3
2	BH_4	15	PO	60	9
3	BH_4	15	PO	180	27
4	Sepiapterin	15	PO	20	3
5	Sepiapterin	15	PO	60	9
6	Sepiapterin	15	PO	180	27
7	対照（T＝0）	6	NA	NA	NA

略語：BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、NA＝該当せず
注：血液サンプルは、投与前、投与後 0.5、1、2、4 及び 8 時間に各時点につき 3 匹から採取した。
出典：16H0208S-X01 試験報告書、本文中の表 1

全動物が投与した被験物質に忍容性を示し、異常な反応の所見は認められなかった。全動物が試験期間を通じて正常で健康であった。すべての血液及び組織サンプルを所定の時点で採取し、治験実施計画書に従って処理し、解析のために提出した。全群とも、いずれの動物でも尿は入手しなかった。

Sepiapterin の PK パラメータを Table 5 に示す。Sepiapterin 及び BH_4 の血漿中、腎臓中、肝臓中及び尿中 PK（該当する場合）を Table 6 に示す。肝臓、腎臓及び尿中の BH_4 及び sepiapterin 曝露量（C_{max}）は、用量の増加に伴い増加した。サンプル採取数が少なく、個体間変動が大きかったため、用量比例性は評価しなかった。

組織（肝臓、腎臓）における BH_4 曝露量は、sepiapterin を投与したときの方が同様の用量で BH_4 を投与したときよりも大きく、このことは、sepiapterin の方が、組織への取り込み及び組織内での BH_4 への変換が大きいことと一致していた。

Table 5. 雄 CD57BL/6 マウスに sepiapterin を経口投与したときの sepiapterin の血漿中薬物動態パラメータの平均値

群	被験物質	用量（mg/kg）	T_{max}（時間）	C_{max}（nmol/g）	$AUC_{0\text{-}last}$[a]（h•nmol/g）
4	Sepiapterin	20	2.00	9.29	26.7
5	Sepiapterin	60	0.50	28.8	85.9
6	Sepiapterin	180	0.50	439	898

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝0 時点から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、T_{last}＝最終測定可能濃度時点
[a] T_{last} は 8 時間であった。
出典：6016-2880 試験報告書、本文中の表 1

Table 6. 雄 C57BL/6 マウスに BH_4 又は sepiapterin を選択した用量で単回経口投与したときの BH_4 及び sepiapterin の薬物動態パラメータの平均値

投与	群番号（用量）	分析対象物質	BH_4			Sepiapterin			
		マトリックス	腎臓	肝臓	尿	腎臓	肝臓	尿	血漿
BH_4	1 (20 mg/kg)	T_{max}（時間）	1.00	1.00	4.00	BQL			
		C_{max}（nmol/g）	3.42	2.36	385				
		T_{last}（時間）	8.00	8.00	8.00				
		C_{last}（nmol/g）	0.426	1.59	252				
		$T_{1/2}$（時間）	NA	NA	NA				
		$AUC_{0\text{-}last}$（h•nmol/g）	8.83	14.9	2,100				
BH_4	2 (60 mg/kg)	T_{max}（時間）	1.00	1.00	4.00	BQL			
		C_{max}（nmol/g）	8.55	4.89	1,040				
		T_{last}（時間）	8.00	8.00	8.00				
		C_{last}（nmol/g）	0.753	1.81	604				
		$T_{1/2}$（時間）	2.50	NA	NA				
		$AUC_{0\text{-}last}$（h•nmol/g）	23.6	23.3	6,060				
BH_4	3 (180 mg/kg)	T_{max}（時間）	2.00	2.00	8.00	BQL			
		C_{max}（nmol/g）	14.8	11.8	1,400				
		T_{last}（時間）	8.00	8.00	8.00				
		C_{last}（nmol/g）	1.81	2.47	1,400				
		$T_{1/2}$（時間）	NA	NA	NA				
		$AUC_{0\text{-}last}$（h•nmol/g）	47.2	38.6	5,980				
Sepiapterin	4 (20 mg/kg)	T_{max}（時間）	2.00	0.50	4.00	NA	BQL	8.00	2.00
		C_{max}（nmol/g）	4.62	9.46	592	0.294		171	9.29
		T_{last}（時間）	8.00	8.00	8.00	NA		8.00	8.00
		C_{last}（nmol/g）	0.964	1.92	470	NA		171	1.56
		$T_{1/2}$（時間）	NA	NA	NA	NA		NA	NA
		$AUC_{0\text{-}last}$（h•nmol/g）	20.5	32.9	3,400	NA		1020	26.7
Sepiapterin	5 (60 mg/kg)	T_{max}（時間）	0.50	2.00	2.00	NA	NA	0.50	0.50
		C_{max}（nmol/g）	9.72	13.8	830	0.281	0.813	312	28.8
		T_{last}（時間）	8.00	8.00	8.00	NA	NA	4.00	8.00
		C_{last}（nmol/g）	1.34	2.48	89.9	NA	NA	171	6.28
		$T_{1/2}$（時間）	2.47	NA	NA	NA	NA	NA	NA

投与	群番号（用量）	分析対象物質	BH_4			Sepiapterin			
		マトリックス	腎臓	肝臓	尿	腎臓	肝臓	尿	血漿
		$AUC_{0\text{-}last}$（h•nmol/g）	35.6	63.1	3,530	NA	NA	706	85.9
Sepiapterin	6 (180 mg/kg)	T_{max}（時間）	1.00	2.00	2.00	NA	NA	0.50	0.50
		C_{max}（nmol/g）	31.5	26.6	1,540	4.44	19.3	1,120	439
		T_{last}（時間）	8.00	8.00	8.00	NA	NA	2.00	8.00
		C_{last}（nmol/g）	3.13	4.12	144	NA	NA	364	24.3
		$T_{1/2}$（時間）	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		$AUC_{0\text{-}last}$（h•nmol/g）	75.1	112	8,110	NA	NA	1,400	898

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝0 時点から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、BQL＝定量限界未満、C_{last}＝最終測定時点の濃度、NA＝該当せず、T_{last}＝最終測定可能濃度時点
出典：6016-2880 試験報告書、本文中の表 1

3.1.2 雄 CD-1 マウスに sepiapterin を経口投与したときの血漿中薬物動態の評価

CNSA-PK-001-2017 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.3B）

本非 GLP 試験の目的は、製剤化した sepiapterin DP 及びクエン酸緩衝液に懸濁した sepiapterin API を単回経口投与したときの雄 CD-1 マウスにおける血漿中 sepiapterin 曝露量を評価することであった。

2 群の非絶食マウスに、クエン酸緩衝液に懸濁した sepiapterin 有効成分又は製剤化した sepiapterin DP として、sepiapterin 180 mg/kg を単回経口投与した。投与日に、被験物質濃度が 27 mg/mL（0.5%カルボキシメチルセルロース含有クエン酸緩衝液中の sepiapterin API）及び 58.3 mg/mL（Oral Mix 懸濁溶媒中の sepiapterin DP）となるように、投与懸濁液を調製した。概要を Table 7 に示す。

Table 7. CNSA-PK-001-2017 試験の投与スケジュール

群 [a]	投与	溶媒	投与濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）	用量（mg/kg/日）	雄動物数
1	Sepiapterin API	クエン酸緩衝液中 0.5%CMC	27	6.67	180	9
2	Sepiapterin DP	Oral Mix	58.3	3.086	180	9

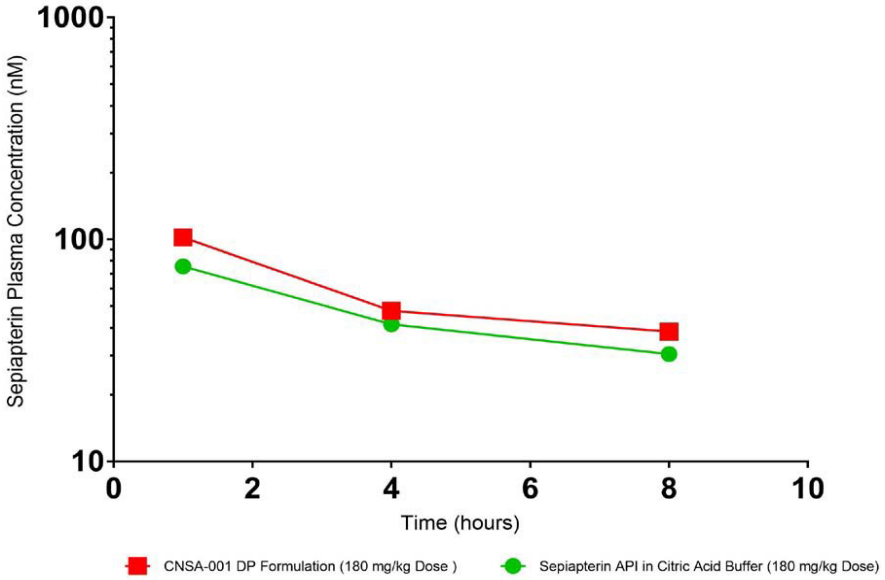
略語：API＝有効成分、CMC＝カルボキシメチルセルロース、DP＝製剤
[a] 第 2 群の動物には、ORAL MIX™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup を投与した。
出典：CNSA-PK-001-2017 試験報告書、表 4-1

投与後 1、4 及び 8 時間に血液サンプルを K_2EDTA 入り採血管に採取し、氷冷下で遮光して保存した。血液採取後 30 分以内に血漿を分離し、10%アスコルビン酸溶液と混合した（血漿 0.1 mL 当たり 10%アスコルビン酸 11.1 µL を添加）。すべてのサンプルを個別の 96 ウェルプレート（マトリックスチューブ）に移し、発送又は分析まで-80℃で保存した。

本試験では、HPLC-蛍光法を用いて血漿中の sepiapterin 濃度を測定した（本試験では、血漿中 BH_4 濃度はモニタリングしなかった）（2.3 項）。本試験の結果の解釈には注意が必要である。

平均血漿中濃度-時間推移を Figure 1 に示す。

Figure 1. 2 種類の製剤を 180 mg/kg で単回投与したときの平均血漿中 sepiapterin 濃度



略語：API＝有効成分、DP＝製剤
出典：CNSA-PK-001-2017 試験報告書、図 4-1

サンプル採取時点が少なく（3 時点）、また、各時点の動物数も少なかった（N＝3）ために、データの PK 解析は実施しなかった。両製剤とも、血漿中 sepiapterin 濃度が最も高かったのは、PK 用サンプルを最初に採取した時点（投与後 1 時間）であった。Sepiapterin DP を投与したときの平均 C_{max} は、sepiapterin API を投与したときよりも高かった（それぞれ、102.3 及び 75.7 nM）。

3.1.3 雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの sepiapterin 及び BH_4 の血漿、肝臓、腎臓及び脳組織中の薬物動態評価

PTC923-2023-046 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.3C）

本非 GLP 試験の目的は、sepiapterin（Oral Mix に懸濁）を単回経口投与したときの雄 CD-1 マウスにおける sepiapterin 及び BH_4 の血漿、肝臓、腎臓及び脳中曝露量を評価することであった。

摂餌雄 CD-1 マウスに、Table 8 に示すデザインで sepiapterin を単回経口投与した。

Table 8. 雄 CD-1 マウスにおける PTC923-2023-046 試験の試験デザイン

群	投与	用量（mg/kg/日）	投与容量（mL/kg）	投与濃度（mg/mL）	雄動物数
1	溶媒	0	10	0	6
2	Sepiapterin	100	10	10	21
3	Sepiapterin	300	10	30	21

注：溶媒 Oral Mix は、Oral Mix™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup であった。
出典：PTC923-2023-046 試験報告書、「試験デザイン」の本文中の表

投与前、投与後 0.5、1、2、4、7、10 及び 24 時間の各時点で、抗凝固剤として K_2EDTA 入りの採血管に血液サンプルを採取した。対照群の動物からは投与前及び投与後 24 時間時点で、また、高用量群（300 mg/kg）の動物からは投与後の全時点で、肝臓、腎臓及び脳組織を採取した。血液サンプルは安定化させるために、採取後直ちに血液：10%アスコルビン酸＝100：11.1（v：v）の比率で 10%アスコルビン酸（使用の 2 日以内に調製）と混和した。採血後 0.5 時間以内に 4℃、3,000 g で 5

分間遠心分離して血漿を得た。血漿サンプルは、発送（ドライアイス同梱）及び分析まで-70℃で凍結した。最終時点で、肝臓（左葉）及び腎臓を摘出し、重量を測定した後急速凍結し、褐色試験管に入れて、発送（ドライアイス同梱）及び分析まで-70℃で保存した。脳組織を採取し、軽く生理食塩水に浸漬した後水分を吸い取り、直ちに重量を測定した後、急速凍結し、褐色試験管に入れて、発送（ドライアイス同梱）及び分析まで-70℃で保存した。

適格性が確認された HPLC-MS/MS を用いて、血漿中並びに肝臓、腎臓及び脳組織中の sepiapterin 及び BH_4 濃度を定量的に測定した（2.3 項）。

ベースラインの BH_4 濃度の平均値［標準偏差（SD）］は、血漿中が 102（11.9） ng/mL で、肝臓、腎臓及び脳組織中がそれぞれ、992（91.3）、291（47.7）及び 108（14.5） ng/g であった。最大用量の 300 mg/kg を投与した 3 匹を除き、血漿中 sepiapterin 濃度は、概ね LLOQ（10 ng/mL）未満であった。BH_4 の PK パラメータを Table 9 に要約する。

Table 9. PTC923-2023-046 試験において sepiapterin を単回経口投与したときの BH_4 の薬物動態パラメータ

容量（mg/kg）	マトリックス	未補正 BH_4				ベースライン値補正 BH_4				
		T_{max}（時間）	C_{max}（μg/mL）	$T_{1/2}$（時間）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	T_{max}（時間）	C_{max}（μg/mL）	$T_{1/2}$（時間）	AUC_{0-10h}（h•ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）
100	血漿	2	3.29	NR	16.5	2	3.19	NR	14.1	14.1
300	血漿	2	5.52	2.24	38.2	2	5.41	1.14	31.9	35.8
300	肝臓	2	48	2.35	292	2	47	2.62	235	268
300	腎臓	4	23.4	3.34	175	4	23.1	1.91	149	168
300	脳	4	0.221	22.8	3.92	4	0.113	4.28	0.823	1.32
300（血漿に対する比）	肝臓	NR	8.70	NR	7.64	NR	8.69	NR	7.37	7.49
	腎臓	NR	4.24	NR	4.58	NR	4.27	NR	4.67	4.69
	脳	NR	0.040	NR	0.103	NR	0.021	NR	0.026	0.037

略語：AUC_{0-10h}＝投与後 0 時間から 10 時間までの濃度-時間曲線下面積、AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、NR＝報告なし
注：組織では、C_{max} の単位は μg/g、及び AUC の単位は h•μg/g であった。
出典：PTC923-2023-046 試験報告書、表 6

Sepiapterin の経口投与後、sepiapterin は速やかに吸収され、広範に BH_4 に代謝されることが示された。この結果は、他の非臨床試験の結果と一致した。血漿中 BH_4 曝露量は、sepiapterin の用量増加に伴い増加したが、用量比を下回っていた。

Sepiapterin を投与したときの肝臓、腎臓及び脳における BH_4 の分布は 4.3.2 項に記載する。

3.1.4 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を単回経口投与したときの血漿中薬物動態の評価

PTC923-2020-001 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.3D）

この非 GLP 試験では、成熟雄 Sprague Dawley ラットに Oral Mix に懸濁した sepiapterin 第 1/2 相試験用製剤（重量あたり 25%で sepiapterin を含有）又は sepiapterin API を 100 mg/kg で単回経口投与したときの sepiapterin DP と sepiapterin API の相対的バイオアベイラビリティを評価した。

各投与群に動物は 6 匹とし、ラット 1 匹ずつに Oral Mix に懸濁した sepiapterin 第 1/2 相試験用製剤又は sepiapterin API を単回投与した。各動物から投与前、投与後 0.5、1、2、4、6、8、12、16 及び 24 時間に連続血液サンプルを採取した。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 は、HPLC-MS/MS を用いて測定した（[redacted]-170502 試験、2.2.1 項）。LLOQ は、sepiapterin 及び BH_4 ともに 10 ng/mL であった。経口投与後、sepiapterin は速やかに BH_4 に変換され、血漿中濃度が測定可能であったのは、sepiapterin の第 1/2 相試験用製剤群の 1 匹（投与後 8 時間で 52.7 ng/mL）及び sepiapterin API 群の 1 匹（投与後 4 時間で 25.5 ng/mL、投与後 6 時間で 15.7 ng/mL）のみであった。投与前の内因性 BH_4 の平均濃度は、sepiapterin の第 1/2 相試験用製剤群で 26.0 ng/mL、sepiapterin API 群で 26.3 ng/mL であった。両製剤の曝露量に有意差は認められなかった。両製剤とも、BH_4 の終末相半減期は約 4 時間で、T_{max} は 2～3 時間であった。これらの投与製剤を単回経口投与した後の BH_4 の平均 PK パラメータを Table 10 に示す。

Table 10. PTC923-2020-001 試験において、雄 Sprague Dawley ラットに sepiapterin DP 又は sepiapterin API を単回経口投与したときの BH_4 の薬物動態パラメータの平均値

投与群（sepiapterin 用量）	PK パラメータ					
	測定値	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	$AUC_{0\text{-last}}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-inf}}$（h•ng/mL）
1（100 mg/kg、第 1/2 相試験用製剤）	平均値	3.9	2 (2, 4)	1,049	7,408	7,534
	SD	0.37	-	158	432	431
	%RSD	10	-	15	5.8	5.7
2（100 mg/kg、sepiapterin API）	平均値	4.2	3 (2, 6)	1,104	8,154	8,480
	SD	0.55	-	96	1,230	1,379
	%RSD	13	-	8.7	15	16

略語：API＝有効成分、$AUC_{0\text{-inf}}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-last}}$＝0 時点から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、DP＝製剤、PK＝薬物動態、RSD＝相対標準偏差、SD＝標準偏差
注：T_{max} は平均値、SD 及び%CV ではなく、中央値（最小値、最大値）として報告した。
出典：PTC923-2020-001 試験報告書、表 4

3.1.5 Non-Naïve 雄イヌに sepiapterin の各種経口製剤を単回経口投与したときの薬物動態の検討

PTC923-2020-007 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.3E）

この非 GLP 試験では、non-naïve 成熟雄ビーグル犬を用いて、第 3 相試験用の 2 種類のプロトタイプ製剤（PTC-A 及び PTC-E）及び第 1/2 相試験用製剤（基準製剤）を 30 mg/kg の用量で単回経口投与したときのプロトタイプ製剤／基準製剤の相対的バイオアベイラビリティを評価した。4 匹の動物に、Oral Mix に懸濁した第 1/2 相試験用製剤、並びに脱イオン水に懸濁した PTC-A 及び PTC-E を順次投与した。投与と投与の間に、4 日間以上のウォッシュアウト期間を設けた。

全動物を一晩絶食させ、投与の約 30 分前に低脂肪食（脂肪 4 g、タンパク質 17 g 及びカルシウム 19 mg からなる 150 カロリーの飼料 178 g）を与えた。投与後約 4 時間に Certified Primate Diet #5048（PMI, Inc.）を与えた。

投与前、投与後 0.5、1、2、4、6、9、12、16 及び 24 時間に血液サンプルを採取し、氷冷下で遮光した。適量の 10% w/v アスコルビン酸水溶液を血液に添加した（血漿 1 mL に対して 10% w/v ア

スコルビン酸 111 μL）。採血後 30 分以内に血液サンプルを処理し、血漿を得た。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 濃度は、HPLC-MS/MS を用いて測定した（2.3 項）。

血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は 11.1 ng/mL であった。ベースライン（投与前）の血漿中 sepiapterin 濃度はすべて BQL であった。経口投与後、sepiapterin は速やかに吸収され、最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は、PTC-A 及び PTC-E では投与後約 1 時間、第 1/2 相試験用製剤では投与後約 2 時間であった（Table 11）。3 種類の製剤とも、平均消失半減期は 1.50～2.50 時間にあった。血漿中 sepiapterin 濃度は、LLOQ をわずかに上回った 1 匹（15.9 ng/mL）を除き、投与後 24 時間までにすべて BQL となった。

Sepiapterin の C_{max} の平均値は、PTC-A、PTC-E 及び第 1/2 相臨床試験用製剤で、それぞれ 967、746 及び 808 ng/mL であった。また、投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積（AUC_{0-24h}）の平均値は、それぞれ 2,210、2,960 及び 2,470 h•ng/mL であった（Table 11）。第 3 相試験用プロトタイプ製剤 PTC-A 及び PTC-E の基準製剤に対する C_{max} の平均比率（%）は、それぞれ 120%及び 92.4%であった。第 3 相試験用プロトタイプ製剤 PTC-A 及び PTC-E の基準製剤に対する AUC_{0-24h} の平均比率（%）は、それぞれ 89.7%及び 120%であった（PTC923-2020-007 試験報告書、表 8）。

投与前の血漿中 BH_4 濃度は 14.3～20.1 ng/mL で、測定可能であった。いずれの 3 製剤でも、sepiapterin は投与後速やかに BH_4 に変換され、最高血漿中 BH_4 濃度に到達した（T_{max}）のは、投与後 2～4 時間であった。$T_{1/2}$ は 3 製剤で同程度であり、群平均値は 6.08～7.01 時間であった（Table 12）。

BH_4 の（ベースライン値で）未補正 C_{max} の群平均値は、PTC-A、PTC-E 及び第 1/2 相試験用製剤でそれぞれ 867、861 及び 1,010 ng/mL であった、また、未補正 AUC_{0-24h} の群平均値は、それぞれ 5,980、7,080 及び 6,920 h•ng/mL であった（Table 12）。第 3 相臨床試験用製剤 PTC-A 及び PTC-E の基準製剤に対する C_{max} の平均比率（%）は、それぞれ 86%及び 85%であった。また、第 3 相臨床試験用製剤 PTC-A 及び PTC-E の基準製剤に対する AUC_{0-24h} の平均比率（%）は、それぞれ 86%及び 102%であった（PTC923-2020-007 試験報告書、表 9）。

3 製剤ともに、血漿中 sepiapterin／BH_4 の平均比（%）は、C_{max} で 80%～112%、AUC_{0-24h} で 36%～40%であり、吸収された sepiapterin の大部分は、全身循環血中で BH_4 に変換されることが示された（Table 12）。

Table 11. 各種 sepiapterin 製剤を雄イヌに単回強制経口投与したときの sepiapterin の血漿中薬物動態パラメータ

用量（mg/kg）	期	被験物質	測定値	C_{max}（ng/mL）	T_{max}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}inf}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
30	1	Sepiapterin の第 1/2 相試験用製剤（基準製剤）	平均値	808	1.75	2,420	2,470	2,490	1.50
			SD	72.5	0.500	315	309	319	0.358
			%CV	8.97	28.6	13.0	12.5	12.8	23.8
			中央値	813	2.00	2,390	2,440	2,470	1.49
			最小値	734	1.00	2,070	2,150	2,150	1.08
			最大値	871	2.00	2,810	2,850	2,870	1.94
			N	4	4	4	4	4	4
	2	PTC-A	平均値	967	0.750	2,150	2,210	2,280	2.50
			SD	188	0.289	113	125	164	1.29
			%CV	19.4	38.5	5.26	5.65	7.17	51.6
			中央値	941	0.750	2,170	2,250	2,310	2.84
			最小値	767	0.500	2,020	2,040	2,110	1.07
			最大値	1,220	1.00	2,260	2,310	2,430	3.58
			N	4	4	4	4	3	3
	3	PTC-E	平均値	746	0.875	2,560	2,960	2,460	1.72
			SD	74.5	0.250	821	1,510	NA	0.165
			%CV	9.99	28.6	32.1	51.0	NA	9.56
			中央値	747	1.00	2,390	2,430	2,460	1.81
			最小値	663	0.500	1,770	1,790	2,420	1.53
			最大値	827	1.00	3,710	5,180	2,500	1.82
			N	4	4	4	4	2	3

略語：%CV＝変動係数%、$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$＝投与後 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、Max＝最大値、Min＝最小値、NA＝該当せず、SD＝標準偏差
出典：PTC923-2020-007 試験報告書、表 4

Table 12. 各種 sepiapterin 製剤を雄イヌに単回強制経口投与したときの BH_4 の血漿中薬物動態パラメータ

用量（mg/kg）	期	被験物質	測定値	C_{max}（ng/mL）	T_{max}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}inf}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	Sepiapterin：BH_4	
										C_{max}	$AUC_{0\text{-}24h}$
30	1	Sepiapterin の第 1/2 相試験用製剤（基準製剤）	平均値	1,010	2.50	6,830	6,920	7,210	6.34	0.798	0.356
			SD	53.2	1.00	765	698	708	1.52	0.0637	0.0185
			%CV	5.25	40.0	11.2	10.1	9.82	24.0	7.98	5.18
			中央値	1,020	2.00	6,870	7,050	7,310	6.12	0.793	0.351
			最小値	950	2.00	6,050	6,050	6,400	4.77	0.728	0.342
			最大値	1,070	4.00	7,520	7,520	7,830	8.36	0.878	0.383
			N	4	4	4	4	4	4	4	4
	2	PTC-A	平均値	867	2.50	5,980	5,980	6,310	7.01	1.12	0.373
			SD	116	1.00	628	628	579	2.27	0.175	0.0343
			%CV	13.4	40.0	10.5	10.5	9.18	32.4	15.7	9.20
			中央値	840	2.00	5,820	5,820	6,210	6.35	1.19	0.366
			最小値	768	2.00	5,460	5,460	5,750	5.13	0.860	0.340
			最大値	1,020	4.00	6,790	6,790	7,050	10.2	1.25	0.420
			N	4	4	4	4	4	4	4	4
	3	PTC-E	平均値	861	3.50	7,080	7,080	6,870	6.08	0.903	0.403
			SD	214	1.00	1,290	1,290	866	0.350	0.204	0.131
			%CV	24.8	28.6	18.3	18.3	12.6	5.75	22.6	32.5
			中央値	932	4.00	7,050	7,050	7,050	6.00	0.813	0.346
			最小値	549	2.00	5,550	5,550	5,930	5.78	0.779	0.323
			最大値	1,030	4.00	8,660	8,660	7,630	6.47	1.21	0.598
			N	4	4	4	4	3	3	4	4

略語：%CV＝変動係数%、$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$＝投与後 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、Max＝最大値、Min＝最小値、SD＝標準偏差

出典：PTC923-2020-007 試験報告書、表 6

3.1.6 Non-Naïve 雄サルに sepiapterin の各種経口製剤を単回経口投与したときの薬物動態の検討

PTC923-2020-008 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.3F）

この非 GLP 試験では、non-naïve 成熟雄カニクイザルを用いて、第 3 相試験用の 2 種類のプロトタイプ製剤（PTC-A 及び PTC-E）及び第 1/2 相試験用製剤（基準製剤）を 50 mg/kg の用量で単回経口投与したときのプロトタイプ製剤／基準製剤の相対的バイオアベイラビリティを評価した。

4 匹の動物に、Oral Mix で懸濁液として調製した第 1/2 相試験用製剤、並びに脱イオン水で懸濁液として調製した PTC-A 及び PTC-E を順次投与した。投与と投与の間に、5 日間以上のウォッシュアウト期間を設けた。全動物を一晩絶食させ、投与の約 30 分前に低脂肪食（脂肪 4 g、タンパク質 17 g、及びカルシウム 19 mg からなる 150 カロリーの飼料 178 g）を与えた。投与後約 4 時間に Certified Primate Diet 5048（PMI, Inc.）を与えた。低脂肪食は均質化し、一匹あたり約 30 mL を強制経口投与した。

投与前、投与後 0.5、1、2、4、6、9、12、16 及び 24 時間の時点で、血液サンプル（1 mL）を氷冷下で 10% w/v アスコルビン酸 111 µL を予め添加した採血管に採取した。採血後 30 分以内に血液サンプルを処理し、血漿を得た。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 濃度は、HPLC-MS/MS を用いて測定した（2.3 項）。

血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ は 11.1 ng/mL であった。ベースライン（投与前）の血漿中 sepiapterin 濃度はすべて BQL であった。経口投与後、sepiapterin は速やかに吸収され、BH_4 に変換された。血漿中 sepiapterin 濃度は、すべてのサンプル採取時点で BQL であった。投与前の血漿中 BH_4 濃度は BQL（LLOQ： 11.1 ng/mL）又はわずかに BQL を上回った（測定可能な場合は 12.8～26.5 ng/mL）。3 種類の製剤すべてで、最高血漿中 BH_4 濃度に到達した時間（T_{max}）は、投与後約 2 時間であった。3 製剤とも、$T_{1/2}$ は 3.21～4.2 時間に認められた。

BH_4 の（ベースライン値で）未補正 C_{max} の群平均値は、PTC-A、PTC-E 及び第 1/2 相試験用製剤でそれぞれ、908、893 及び 715 ng/mL であった、また、未補正 $AUC_{0\text{-}24h}$ の群平均値は、それぞれ 4,560、4,320 及び 4,300 h•ng/mL であった（Table 13）。第 3 相試験用製剤 PTC-A 及び PTC-E の基準製剤に対する C_{max} の平均比率（%）は、それぞれ 127%及び 125%であった。また、第 3 相試験用製剤 PTC-A 及び PTC-E の基準製剤に対する $AUC_{0\text{-}24h}$ の平均比率（%）は、それぞれ 106%及び 100%であった（PTC923-2020-008 試験報告書、表 6）。

Table 13. Sepiapterin を雄サルに単回強制経口投与したときの BH_4 の血漿中薬物動態パラメータ

用量（mg/kg）	期	被験物質	測定値	C_{max}（ng/mL）	T_{max}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}inf}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
50	1	Sepiapterin の第 1/2 相試験用製剤（基準製剤）	平均値	715	2.50	4,240	4,300	4,370	4.10
			SD	117	1.00	911	875	856	0.818
			%CV	16.4	40.0	21.5	20.4	19.6	20.0
			中央値	723	2.00	4,420	4,480	4,540	4.26
			最小値	587	2.00	3,020	3,160	3,250	3.04
			最大値	826	4.00	5,070	5,070	5,160	4.84
			N	4	4	4	4	4	4
	2	PTC-A	平均値	908	2.00	4,540	4,560	4,630	4.20
			SD	278	0.00	1,760	1,740	1,750	0.156
			%CV	30.7	0.00	38.8	38.1	37.8	3.72
			中央値	839	2.00	4,190	4,190	4,260	4.20
			最小値	652	2.00	2,790	2,870	2,920	4.00
			最大値	1,300	2.00	6,980	6,980	7,060	4.38
			N	4	4	4	4	4	4
	3	PTC-E	平均値	893	2.00	4,270	4,320	4,600	3.21
			SD	95.2	0.00	793	741	722	0.822
			%CV	10.7	0.00	18.6	17.2	15.7	25.6
			中央値	876	2.00	4,130	4,160	4,270	3.56
			最小値	810	2.00	3,460	3,600	4,110	2.27
			最大値	1,010	2.00	5,350	5,350	5,430	3.80
			N	4	4	4	4	3	3

略語：%CV＝変動係数%、$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$＝投与後 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、Max＝最大値、Min＝最小値、SD＝標準偏差

出典：PTC923-2020-008 試験報告書、表 5

3.2 反復投与試験

マウス、ラット及びマーモセットに、連日反復経口投与したとき sepiapterin 及び／又は sepiapterin の代謝物 BH_4 の血漿中 TK パラメータを評価した。

3.2.1 マウス反復投与トキシコキネティクス試験

モジュール 2.6.7、2.6.7.1、2.6.7.2、2.6.7.3、2.6.7.7 及び 2.6.7.10 項で表に示した以下の試験で、BH_4 のトキシコキネティクスパラメータをマウスで評価した。

- PTC923-2023-053 試験：CByB6F1/J（野生型、ハイブリッド-nonTg）雌雄マウス 5 日間及び 28 日間強制経口投与試験（モジュール 2.6.6、3.1.1.1 項；モジュール 2.6.7、表 2.6.7.7A）
- PTC923-2023-070 試験：CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic ヘミ接合体トランスジェニックマウス 26 週間経口強制投与がん原性試験（モジュール 2.6.6、5.1.1 項；モジュール 2.6.7、表 2.6.7.10）。
  注：TK 評価には CByB6F1/J（野生型、ハイブリッド-nonTg）マウスを用いた。

PTC923-2023-053 試験の B 期 28 日間において、雌雄の CByB6F1/J（野生型、ハイブリッド-nonTg）マウスに 30、100、300 及び 1,000 mg/kg/日を強制経口投与した。血液サンプルの採取は、Day 1 及び Day 28 に対照群では投与後 3 時間に、sepiapterin 投与群では投与前及び投与 1、3、6、12、24 時間後に行った。26 週間がん原性試験（PTC923-2023-070 試験）において、雄及び雌の CByB6F1/J（野生型、ハイブリッド-nonTg）マウスから、sepiapterin を 0、30（雄のみ）、100、300 及び 1,000 mg/kg/日（雌のみ）で 26 週間 1 日 1 回経口投与後の Day 180 に、対照群では投与 1 時間後に、sepiapterin 投与群では投与 0、1、3、6、12 及び 24 時間後に血液サンプルを採取した。血液サンプルは直ちに 1%アスコルビン酸で処理して分析物を安定化させ、バリデートされた高速液体クロマトグラフィー／質量分析（HPLC-MS）法を用いて血漿中 sepiapterin 及び BH_4 濃度を測定した（2.2.6 項）。

PTC923-2023-053 試験の 28 日間では、血漿中の内因性 sepiapterin は検出されなかった（LLOQ 10 ng/mL）。内因性 BH_4 濃度は、対照群の雄性マウスで 61.7～65.4 ng/mL、雌性マウスで 71.3～73.2 ng/mL であり、これは Day 1 に sepiapterin を投与したすべてのマウスの投与前サンプルのレベルと同等であった。28 日間反復投与後、投与前の BH_4 濃度は 300 mg/kg/日投与群の BH_4 濃度と同等であり、1,000 mg/kg/日投与群及び 4,000 mg/kg/日投与群ではそれぞれ 87.3 ng/mL 及び 116 ng/mL（雌雄合計）とわずかに高いだけであった。このことから、蓄積は非常に軽度であり、最小蓄積比（雌雄合計の $AUC_{0\text{-}24h}$ に基づき 1.09～1.69、用量非依存的）に反映されていることが示された。Sepiapterin と BH_4 の薬物動態パラメータをそれぞれ Table 14 及び Table 15 に要約する。

26 週間投与の PTC923-2023-070 試験では、Day 180 の対照群及び投与前サンプルでは sepiapterin は検出されなかった。Day 180 の内因性 BH_4 濃度は、対照群の雌性マウスで 54.7～65.0 ng/mL、雄性マウスで 34.2～51.9 ng/mL であった。Day 180 の投与前 BH_4 濃度は用量にかかわらず 41.9～88.3 ng/mL の範囲であった。Sepiapterin の薬物動態パラメータ及びベースラインで未補正の BH_4 濃度を、それぞれ Table 14 及び Table 15 に要約する。補正後 BH_4 濃度はモジュール 2.6.7、表 2.6.7.3 及び表 2.6.7.10 に示す。

Sepiapterin の C_{max} は概ね 1～3 時間の間に認められ、濃度は 24 時間までに BQL まで低下した。Sepiapterin の C_{max} と AUC_{0-24h} は雌で高く、300～4,000 mg/kg/日の用量範囲における Day 1 及び Day 28 の雌雄比は、それぞれ C_{max} で 1.78 及び 4.32、AUC_{0-24h} で 1.85 及び 5.56 であり、この比は用量に依存しなかった（PTC923-2023-053 試験）。26 週間投与の PTC923-2023-070 試験では、100 mg/kg/日及び 300 mg/kg/日の用量で、Day 180 の C_{max} がそれぞれ 5.67 及び 8.41、AUC_{0-24h} がそれぞれ 5.27 及び 8.97 となり、雄に対して雌のほうが高い同様の傾向が認められた。28 日間反復投与後の sepiapterin の蓄積はほとんど認められなかった（PTC923-2023-053 試験）。Sepiapterin の C_{max} 及び AUC の増加は用量比例性を下回った。

これらの所見は、ラット、マーモセット、サル及びヒトを対象とした試験と同様であり、sepiapterin の曝露量（C_{max} 及び AUC）は BH_4 の曝露量の 5.6%未満であったことから、いずれの試験においても sepiapterin は BH_4 に広範に変換されたことが示された。

BH_4 の血漿中濃度のピークは投与後 3 時間に認められた。BH_4 の曝露量は 300～4,000 mg/kg/日の用量範囲で性差はなく、300 mg/kg/日で飽和し、用量の増加に伴う BH_4 の C_{max} 及び AUC_{0-24h} の増加はほとんどみられず、28 日間反復投与試験（PTC923-2023-053 試験）では 4,000 mg/kg/日までの用量で BH_4 の蓄積はみられなかった。

同様に、26 週間の PTC923-2023-070 試験では、Day 180 の BH_4 の曝露量には性差はなかった。BH_4 の C_{max} 及び AUC_{0-24h} の増加は、100～1000 mg/kg/日の範囲では用量比例性を下回った。Day 180 の投与前 BH_4 濃度の結果より、180 日間の反復投与後に BH_4 の蓄積はほとんどみられなかった。

Table 14. マウス 28 日間及び 26 週間試験の sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータの平均値

試験番号（GLP 適合状況）	用量（mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
PTC923-2023-053（GLP）	300	1	3	23.9	170	NR[a]	3	103	382	NR[a]
		28	1	118	318	NR[a]	1	211	992	NR[a]
	1000	1	3	44.7	143	NR[a]	1	91.7	792	NR[a]
		28	3	85.4	573	NR[a]	3	159	1060	NR[a]
	4000	1	1	55.8	463	NR[a]	12	101	1260	NR[a]
		28	1	86.7	482	NR[a]	6	196	1520	NR[a]
PTC923-2023-070（GLP）	30[b]	180	NC	NC	BQL	NR[a]	NA	NA	NA	NA
	100	180	1	23.2	85.1	NR[a]	1	132	448	NR[a]
	300	180	1	31.4	127	NR[a]	3	264	1140	NR[a]
	1000[c]	180	NA	NA	NA	NA	3	173	1330	NR[a]

略語：AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、NA＝該当せず、NC＝算出せず、NR＝報告なし

[a] 血漿中濃度時間データが不十分なため、$T_{1/2}$ の報告はない。

[b] 試験デザインに従い、雌動物には 30 mg/kg/日を投与しなかった。

[c] 試験デザインに従い、雄動物には 1000 mg/kg/日を投与しなかった。

注：T_{max} は中央値を示す。

PTC923-2023-070 試験については、ベースライン補正 BH_4 濃度を モジュール 2.6.7、表 2.6.7.3 及び表 2.6.7.10 に示す。

出典：PTC923-2023-053 試験、Appendix 16、表 1； PTC923-2023-070 試験、Appendix 10、表 1

Table 15. マウス 28 日間及び 26 週間試験の BH_4 のトキシコキネティクスパラメータの平均値

試験番号（GLP 適合状況）	用量（mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
PTC923-2023-053（GLP）	300	1	3	4680	23300	NR[a]	3	5460	25900	NR[a]
		28	3	5360	35100	3.65	3	6230	48200	NR[a]
	1000	1	3	4590	23500	NR[a]	3	5330	46500	NR[a]
		28	3	5510	46700	3.12	3	5230	49700	3.15
	4000	1	1	5310	49400	NR[a]	3	5380	47200	NR[a]
		28	3	4810	47000	3.21	3	6880	58400	3.06
PTC923-2023-070（GLP）	30[b]	180	1	1130	5670	NR[a]	NA	NA	NA	NA
	100	180	3	2530	14500	5.34	3	2910	13700	NR[a]
	300	180	3	5180	34500	3.50	3	4820	29600	4.22
	1000[c]	180	NA	NA	NA	NA	3	6340	46900	3.74

略語：AUC0-24h＝投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度曲線下面積、BH4＝テトラヒドロビオプテリン、NA＝該当せず、NC＝算出せず、NR＝報告なし

[a] 血漿中濃度時間データが不十分なため、T1/2 の報告はない。

[b] 試験デザインに従い、雌動物には 30 mg/kg/日を投与しなかった。

[c] 試験デザインに従い、雄動物には 1000 mg/kg/日を投与しなかった。

注：Tmax は中央値を示す。

PTC923-2023-070 試験については、ベースライン補正 BH4 濃度の TK 値をモジュール 2.6.7、表 2.6.7.3 及び表 2.6.7.10 に示す。

出典： PTC923-2023-053 試験、Appendix 16、表 4； PTC923-2023-070 試験、Appendix 10、表 4

3.2.2 ラット反復投与トキシコキネティクス試験

以下の試験でラットを用いて BH_4 の TK パラメータを評価し、モジュール 2.6.7、2.6.7.1 項、2.6.7.2 項、2.6.7.3 項及び 2.6.7.7 項に一覧にまとめた。

- CNSA-TOX-001-2017、雌雄ラット 14 日間 GLP 強制経口投与試験
- CNSA-TOX-001-2018、雌雄ラット 13 週間 GLP 強制経口投与試験
- PTC923-2020-003、雌雄ラット 26 週間 GLP 強制経口投与試験

雌雄 Sprague Dawley ラットに、14 日間試験では対照溶媒（Oral Mix）又は sepiapterin 100、300 若しくは 1,000 mg/kg、13 週間試験では対照溶媒又は sepiapterin 30、100 若しくは 300 mg/kg、26 週間試験では対照溶媒 Oral Mix 又は sepiapterin 30、100 若しくは 200 mg/kg を連日強制経口投与した。血液サンプルの採取は、Day 1 及び Day 14（14 日間試験）、Day 91（13 週間及び 26 週間試験）、並びに Day 182（26 週間試験）の投与前及び投与後 24 時間まで、抗凝固剤として K_2EDTA を用いて行った。分析対象物質を保存するために、適量の 10%アスコルビン酸を血漿（バリデーション報告書 [redacted]-170502、2.2.1 項）又は直接血液（バリデーション報告書 PTC923-2021-001、2.2.2 項）と混合した。バリデートされた HPLC-MS 法を用いて血漿中 sepiapterin 及び BH_4 濃度を測定した。

ベースラインの内因性 sepiapterin 濃度は概ね BQL であった。14 日間、13 週間及び 26 週間の試験では、sepiapterin の経口投与後の分析対象物質は、概ね測定不能であり（LLOQ：11.1 ng/mL）、TK パラメータは信頼できる推定ができなかった。

ベースライン時の内因性 BH_4 濃度は、雌雄ラットで測定可能であった。26 週間 GLP 毒性試験（PTC923-2020-003 試験）の Day 1 の対照群の雌雄ラットの投与前サンプルにおけるベースライン BH_4 濃度の平均値（SD）は、それぞれ 34.6（3.40）ng/mL 及び 41.2（7.51）ng/mL で、投与群の雌雄ラットでは、それぞれ 38.0（6.04）ng/mL 及び 54.2（11.1）ng/mL であった。BH_4 の TK パラメータは、すべてのラット試験でベースライン補正をしない BH_4 濃度から算出した。

経口投与後、sepiapterin の吸収は迅速で、sepiapterin は速やかかつ広範に BH_4 に変換された。血漿中 BH_4 の T_{max} は、投与後約 2～4 時間で、概ね投与後 24 時間以内に消失し、終末相 $T_{1/2}$ は、推定可能な場合、概ね 6 時間未満であった。BH_4 の曝露量に明らかな性差の傾向は認められなかった。14 日間試験及び 26 週間試験では、1,000 mg/kg までの用量で BH_4 の明らかな蓄積は認められなかったが、13 週間試験では軽度の蓄積（2.0 未満）が認められた。BH_4 曝露量は、30～100 mg/kg では、ほぼ用量に比例して増加し、100 mg/kg を超える用量では、曝露量の増加は用量比を下回った。14 日間試験（CNSA-TOX-001-2017 試験）において、300～1,000 mg/kg の用量で Day 14 における BH_4 の平均 C_{max} 及び 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-last}}$）の変化は±20%以内であり、BH_4 の曝露量は 300 mg/kg 以上の用量で飽和することが示された。

ラットの 14 日間毒性試験（CNSA-TOX-001-2017 試験）、13 週間毒性試験（CNSA-TOX-001-2018 試験）及び 26 週間毒性試験（PTC923-2020-003 試験）で採取した血液サンプルの TK 結果を Table 16 に要約する。

Table 16. Sprague Dawley ラットの 14 日間、13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験における BH_4 のトキシコキネティクスパラメータの平均値

試験	用量（mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
CNSA-TOX-001-2017	100	1	2.00	1,860	13,000	4.18	2.00	1,210	8,610	NA
		14	2.00	1,730	10,900	4.24	2.00	1,760	8,340	NA
	300	1	4.00	2,850	27,800	3.15	2.00	2,150	14,400	3.66
		14	2.00	3,440	24,600	2.86	2.00	4,110	25,600	3.56
	1000	1	4.00	4,930	47,800	2.66	2.00	3,720	31,000	3.33
		14	4.00	2,990	28,900	2.97	2.00	3,630	29,500	3.36
CNSA-TOX-001-2018	30	1	2.00	447	3,160	NC	4.00	308	2,060	5.11
		91	2.00	683	4,030	NC	2.00	601	2,930	NC
	100	1	4.00	1,080	7,790	NC	4.00	1,020	6,450	NC
		91	2.00	1,400	9,790	2.70	2.00	2,380	9,340	NC
	300	1	4.00	2,480	21,700	3.71	4.00	2,860	17,000	NC
		91	2.00	2,750	23,100	NC	2.00	3,630	20,900	NC
PTC923-2020-003	30	1	4.00	689	5,010	NC	1.00	615	4,120	NC
		91	4.00	623	4,540	NC	2.00	796	3,910	NC
		182	2.00	710	4,830	NC	2.00	915	4,410	11.5
	100	1	4.00	1,780	11,700	NC	4.00	2,060	11,900	NC
		91	4.00	1,490	11,300	3.82	2.00	1,920	10,400	NC
		182	4.00	1,680	14,000	3.64	2.00	1,770	9,590	NC
	200	1	4.00	3,320	21,400	4.22	2.00	3,140	21,200	NC
		91	4.00	2,440	20,200	3.20	2.00	2,580	12,900	6.00
		182	4.00	2,380	24,100	3.33	2.00	3,200	18,100	4.00

略語：AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、NA＝該当せず、NC＝算出せず
注：T_{max} は中央値を示す。
出典：CNSA-TOX-001-2017 試験報告書、本文中の表 9、CNSA-TOX-001-2018 試験報告書、本文中の表 2、PTC923-2020-003 試験報告書、トキシコキネティクス評価結果表

3.2.3　マーモセットにおける反復投与トキシコキネティクス

以下の試験において、マーモセットを用いて sepiapterin 及び BH_4 の TK パラメータを評価し、モジュール 2.6.7、2.6.7.1 項、2.6.7.2 項、2.6.7.3 項及び 2.6.7.7 項に一覧にまとめた。

- CNSA-TOX-002-2017、雌雄サル 14 日間 GLP 強制経口投与試験
- CNSA-TOX-002-2018、雌雄サル 13 週間 GLP 強制経口投与試験
- PTC923-2020-004、雌雄サル 9 ヵ月間 GLP 強制経口投与試験

雌雄マーモセットに、14 日間試験では対照溶媒 Oral Mix 又は sepiapterin 100、300 若しくは 1,000 mg/kg、13 週間試験及び 9 ヵ月間試験では対照溶媒又は sepiapterin 30、100 若しくは 300 mg/kg を連日（強制）経口投与した。血液サンプルの採取は、Day 1 及び Day 14（14 日間試験）、Day 91（13 週間試験）、又は Day 169 及び Week 39（9 ヵ月間試験）の投与前及び投与後 24 時間まで、抗凝固剤として K_2EDTA を用いて行った。分析対象物質を保存するために、適量の 10%アスコルビン酸を血漿（バリデーション報告書 [redacted]-170501、2.2.3 項）又は直接血液（バリデーション報告書 PTC923-2021-002、2.2.4 項）と混合した。バリデートされた HPLC-MS 法を用いて血漿中 sepiapterin 及び BH_4 濃度を測定した。

ベースラインの内因性 sepiapterin 濃度は概ね BQL であった。Sepiapterin は経口投与後に速やかに吸収され、sepiapterin の T_{max} 中央値は投与後約 2 時間であった。大多数の動物において、血漿中 sepiapterin は、広範に代謝物 BH_4 に変換されるか、又は全身循環血中から速やかに消失し、投与後 8 時間までに BQL に低下した。大多数の動物では、終末相 $T_{1/2}$ について信頼できる推定ができるだけの十分な測定時点がなかった。濃度が測定可能な時点が少なく、最終測定可能濃度時点（T_{last}）のばらつきが大きかったため、濃度-時間曲線下面積（AUC）に大きなばらつきが認められた。全体として、sepiapterin 曝露量（C_{max}）に明らかな性差は認められず、sepiapterin 蓄積の明らかな傾向も認められなかった。Sepiapterin の C_{max} は、30～300 mg/kg の範囲で用量比を下回って増加した。

ベースラインの内因性 BH_4 濃度は、雌雄マーモセットで測定可能であった。9 ヵ月間 GLP 毒性試験（PTC923-2020-004 試験）におけるベースライン BH_4 濃度の平均値（SD）は、対照群の雌雄サルで 73.6（33.2）ng/mL、及び投与群の Day 1 の投与前サンプルで 52.9（24.0）ng/mL であった。BH_4 の TK パラメータは、すべてのマーモセット試験でベースライン補正をしない BH_4 濃度から算出した。

経口投与後、sepiapterin の吸収は迅速で、sepiapterin は速やかかつ広範に BH_4 に変換された。血漿中 sepiapterin の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の平均値は、BH_4 の対応値の 5%未満であった（CNSA-TOX-002-2018 試験）。血漿中 BH_4 の T_{max} は投与後約 2 時間であり、概ね投与後 24 時間以内に消失し、終末相 $T_{1/2}$ は約 6 時間であった。BH_4 の曝露量に明らかな性差の傾向は認められなかった。30～300 mg/kg/日で反復投与したところ、13 週間試験で BH_4 の増加が認められた以外（Day 91／Day 1 の平均比：1.99）、14 日間及び 9 ヵ月間（Day 273）試験では、BH_4 の蓄積は認められなかった。BH_4 曝露量は、30～100 mg/kg では、ほぼ用量に比例して増加し、100 mg/kg を超える用量では、曝露量の増加は用量比を下回った。

マーモセットの 14 日間毒性試験（CNSA-TOX-002-2017 試験）、13 週間毒性試験（CNSA-TOX-002-2018 試験）及び 9 ヵ月間毒性試験（PTC923-2020-004 試験）で採取した血液サンプルの TK 結果をそれぞれ Table 17 及び Table 18 に要約する。

Table 17. マーモセットの 14 日間、13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験における sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータの平均値（SD）

試験	用量（mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
CNSA-TOX-002-2017	100	1	2（2, 4）	64.2（15.7）	137（32.4）	NC	2（1, 2）	90.5（93.2）	472（430）	NC
		14	2（2, 4）	42.2（38.7）	75.5（113）	NC	1.5（1, 2）	47.4（24.9）	36.9（30.1）	NC
	300	1	2（2, 8）	154（155）	1,236（1,697）	NC	2（1, 2）	106（52.4）	264（104）	NC
		14	1（0.5, 1）	53.2（18.0）	149（68.7）	NC	1（1, 2）	69.7（52.3）	392（596）	NC
	1,000	1	2（0.5, 2）	104（103）	391（466）	NC	2（0.5, 4）	331（147）	1,534（716）	NC
		14	2（1, 8）	62.1（48.3）	170（105）	NC	2（2, 2）	54.3（17.9）	218（151）	NC
CNSA-TOX-002-2018	30	1	2（2, 4）	40.6（23.9）	184（154）	NC	2（2, 2）	25.9（8.30）	26.2（18.3）	NC
		91	2（2, 4）	34.5（15.7）	50.9（10.7）	NC	1.5（1, 2）	14.7（4.80）	5.10（0.80）	NC
	100	1	2.5（1, 4）	49.3（11.7）	187（85.9）	NC	4（2, 4）	51.3（23.9）	174（133）	NC
		91	2（2, 4）	77.4（11.6）	156（49.2）	NC	0.5（0.5, 1）	29.5（13.3）	58.6（41.9）	NC
	300	1	2（1, 2）	77.7（23.3）	325（171）	NC	1.5（0.5, 2）	111（91.1）	370（447）	NC
		91	0.75（0.5, 8）	60.1（36.0）	113（35.9）	NC	1（1, 4）	26.2（5.00）	75.2（52.0）	NC
PTC923-2020-004	30	1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		169	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		273	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	100	1	0.6（0.5, 1）	42.3（15.7）	140（136）	NC	0.5（0.5, 0.5）	23.1（5.37）	NC	NC
		169	12.5（1, 24）	33.0（18.0	NC	NC	1.5（1, 2）	12.3（0.7	NC	NC

試験	用量（mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
				）				）		
		273	1.4（0.5, 4）	40.9（17.8）	72.8（20.5）	NC	NC	NC	NC	NC
	300	1	2.5（1, 8）	77.7（52.2）	415（342）	NC	2（0.5, 4）	79.2（30.3）	293（225）	NC
		169	1.5（1, 2）	15.4（4.9）	NC	NC	NC	NC	NC	NC
		273	2（1, 2）	24.6（8.2）	86.6（71.4）	NC	1.25（1.25, 84.9）	25.9（8.2）	NC	NC

略語：AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、NC＝算出せず、SD＝標準偏差
注）T_{max} は平均値（SD）ではなく中央値（最小値、最大値）を示す。
出典：CNSA-TOX-002-2017 試験報告書、付録 H（トキシコキネティクス報告書）表 6.2-1 及び 6.2-2、CNSA-TOX-002-2018 試験報告書、付録 H（トキシコキネティクス報告書）表 6.2-1 及び 6.2-2、PTC923-2020-004 試験報告書、付録 I（トキシコキネティクス報告書）表 4-1

Table 18. マーモセットの 14 日間、13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験における BH_4 のトキシコキネティクスパラメータの平均値（SD）

試験（GLP 適合状況） 動物種	用量 （mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
CNSA-TOX-002-2017（GLP）	100	1	1（1, 4）	1,697（518）	7,877（5,242）	5.93（1.65）	4（2, 4）	1,380（291）	13,221（5,774）	6.57（NC）
		14	2（2, 2）	1,993（811）	10,174（6,367）	5.30（0.99）	1.5（1, 2）	2,035（926）	10,827（4,002）	5.20（0.12）
	300	1	1（1, 1）	3,623（1,166）	21,389（17,168）	5.03（1.26）	2（2, 4）	5,670（3,005）	23,301（10,233）	4.41（1.15）
		14	2（2, 2）	5,247（3,531）	17,996（8,498）	4.77（0）	2（1, 2）	2,847（1,034）	13,101（5,456）	6.22（0.52）
	1,000	1	4（2, 4）	3,990（1,218）	26,026（3,450）	14.0（NC）	4（1, 4）	12,127（4,265）	99,082（32,180）	10.6（NC）
		14	2（1, 2）	3,527（1,760）	19,102（7,250）	5.29（2.16）	2（2, 2）	5,163（3,753）	31,986（18,898）	5.30（1.20）
CNSA-TOX-002-2018（GLP）	30	1	1.5（1, 8）	623（159）	5,374（3,250）	7.29（0.57）	2（1, 4）	192（65.3）	1,340（163.7）	NC
		91	2（2, 4）	443（68.2）	3,088（471）	6.71（0.77）	1.5（1, 2）	313（147）	2,077（1,109）	8.87（0.11）
	100	1	2（1, 4）	844（268）	5,540（693）	5.80（0.55）	2（2, 4）	728（512）	4,753（2,644）	7.16（1.22）
		91	2（2, 4）	2,457（627）	7,611（1,441）	NC	2（0.5, 4）	861（352）	5,850（4,064）	5.84（0.28）
	300	1	1（0.5, 4）	1,029（104）	6,763（998）	5.19（0.72）	1.5（1, 2）	867（124）	5,829（1,537）	6.15（1.556）
		91	1.5（1, 2）	1,435（477）	5,652（2,439）	3.90（2.08）	2（2, 4）	1,345（448）	8,970（3,307）	6.43（1.98）
PTC923-2020-004（GLP）	30	1	2（1, 4）	1,260（764）	6,090（2,990）	NC	2.4（2, 4）	998（448）	6,300（1,560）	6.53（1.01）
		169	2（2, 2）	905（253）	6,510（1,050）	7.25（1.58）	2.25（1, 4）	675（361）	4,470（1,200）	NC
		273	2.5（2, 4）	1,100（501）	6,480（3,170）	NC	2.9（0.5, 4）	928（629）	8,470（4,700）	NC
	100	1	1.6（1, 2）	2,560（	12,700（	NC	1.5（1, 2）	2,610（	12,200（	4.95（

試験（GLP 適合状況） 動物種	用量 （mg/kg/日）	Day	雄				雌			
			T_{max} （時間）	C_{max}（ ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（ h•ng/mL）	$T_{1/2}$ （時間）	T_{max} （時間）	C_{max}（ ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（ h•ng/mL）	$T_{1/2}$ （時間）
				41.5）	37.6）			885）	3,230）	0.57）
		169	1.8（1, 2）	1,940（ 757）	9,940（ 3,110）	5.09（ 1.00）	1.5（1, 2）	2,280（ 1,070）	10,100（ 3,060）	6.37（ 1.67）
		273	1.75（1, 2）	2,040（ 499）	11,900 （3,260）	6.80（ 2.95）	1.20（1, 2）	1,580（ 485）	7,980（ 1,660）	NC
	300	1	2.17（1, 4）	2,900（ 688）	20,000（ 7,820）	4.62（ 0.46）	2（1, 4）	3,150（ 947）	21,500（ 4,450）	5.85（ 1.80）
		169	2.33（2, 4）	2,800（ 581）	17,500（ 2,490）	4.43（ 0.23）	3（3, 47）	3,120（ 778）	17,800（ 3,080）	NC
		273	2.75（2, 4）	3,430（ 1,010）	24,200（ 10,500）	4.29（ 0.97）	2（2, 2）	3,060（ 1,470）	14,900（ 8,190）	5.93（ 1.36）

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、NC＝算出せず、SD＝標準偏差
注：T_{max} は平均値（SD）ではなく中央値（最小値、最大値）を示す。
出典：CNSA-TOX-002-2017 試験報告書、付録 H（トキシコキネティクス報告書）の表 6.2-3 及び 6.2-4、CNSA-TOX-002-2018 試験報告書、付録 H（トキシコキネティクス報告書）の表 6.2-6 及び 6.2-7、PTC923-2020-004 試験報告書、付録 I（トキシコキネティクス報告書）の表 4-2

4. 分布

4.1 In vitro 血漿タンパク結合

Sepiapterin 及び BH_4 ともに、ヒト血漿タンパク結合率は低かった。

0.1、1.0 及び 10 µmol/L の sepiapterin 濃度で、ヒト血漿タンパクへの結合を評価した［PTC923-2021-013 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.6 A）］。0.1% DTT の存在下、pH 7.31～7.71 で（インキュベーション後）、ヒト血漿中における sepiapterin の非結合率の幾何平均値は 84.6%、結合率の幾何平均値は 15.4%であった。

0.5% β-メルカプトエタノールの存在下、pH 7.2 で BH_4 を安定化させたところ、BH_4 のヒト血漿タンパク結合率は 2 µM で 41.3%、5 µM で 33.0%、15 µM で 24.1%であった［PTC923-2022-030 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.6 B）］。

安定化剤（0.1%DTT 又は 0.5% β-メルカプトエタノール）の存在が血漿タンパク質測定に与える影響は、完全にはわかっていない。実験から得られた数値は慎重に解釈すべきであり、他の生理学的パラメータを導き出すために使用してはならない。ただし、これらの試験では、血漿タンパクへの結合が sepiapterin と BH4 のいずれでも非常に低いことが確認されており、非臨床動物種間で著しい差はないと考えらえる。

4.2 透過性試験

MDCKII-BCRP 及び Abcb1KO-MDCKII-MDR1 細胞では、sepiapterin の透過性は低かった（1×10^{-6} cm/s 未満）［PTC923-2020-002 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.8A）］。詳細については、モジュール 2.7.2、2.1.4.1 項を参照のこと。

使用した測定法では、BH_4 が不安定であったため、BH_4 の透過性については信頼できる測定ができなかった［PTC923-2021-012 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.8 B）］。詳細については、モジュール 2.7.2、2.1.4.2 項を参照のこと。

4.3 各種動物種を用いた経口投与による非臨床試験

4.3.1 C57BL/6 マウスに sepiapterin 又は BH_4 を単回経口投与したときの肝臓、腎臓及び尿への分布（剖検後）

16H0208S-X01 試験/6016-2880 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.5A）

Sepiapterin 及びその代謝物 BH_4 の肝臓、腎臓及び尿への分布（剖検後）は、C57BL/6 マウスに、sepiapterin 又は BH_4 を 20、60 及び 180 mg/kg の用量で単回経口投与した非 GLP 試験で検討し、16H0208S-X01 試験及び 6016-2880 試験として報告した。試験の詳細は 3.1.1 項に示した。

内因性 BH_4 は、対照群の肝臓（1.4～2.5 nmol/g）及び腎臓（0.23～0.33 nmol/g）で検出された。尿中の内因性 sepiapterin（2/2 匹）及び BH_4（2/2 匹）は、それぞれ 11.6～19.7 nmol/g 及び 32.5～48.7 nmol/g であった。

Sepiapterin は、20 mg/kg の低用量群ではすべての時点で肝臓では定量限界未満であり、60 mg/kg の中用量群及び 180 mg/kg 高用量群では投与後 30 分でのみ測定可能であった。腎臓中の sepiapterin は、これらの全用量群で投与後 30 分でのみ測定可能であった。

1 回目の検体採取時点（投与 30 分後）の肝臓及び腎臓中の BH_4 濃度は、内因性濃度を上回った。肝臓及び腎臓における BH_4 の C_{max} は、sepiapterin 投与後概ね 0.5～2 時間の間に認められた。BH_4 の C_{max} は、肝臓では、sepiapterin の 1.4～17 倍、腎臓では 7.1～35 倍であった。Sepiapterin の投与後、肝臓及び腎臓中の未変化体濃度は低値で、速やかに消失し、肝臓及び腎臓中の BH_4 曝露量は未変化体よりも高かったことから、吸収後、sepiapterin は速やかに BH_4 に変換されることが示唆された。

マウスに sepiapterin 又は BH_4 を単回経口投与したところ、尿中の sepiapterin 及び BH_4 は測定可能であった。Sepiapterin 投与後の尿中曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$）は、BH_4 の方が sepiapterin よりも大きかった。BH_4 の尿中曝露量は sepiapterin に比べて大きかったことから、経口投与された sepiapterin の大部分は、吸収されると BH_4 に変換されることが示唆された。BH_4 を投与後したところ、投与後 30 分の尿中 BH_4 は内因性レベルを上回り、投与後 4～8 時間に C_{max} が認められた。BH_4 投与後の尿中 BH_4 曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$）は、低用量（20 mg/kg）及び高用量（180 mg/kg）では、sepiapterin 投与後と比較してわずかに低く（0.62～0.91 倍）、中用量（60 mg/kg）ではわずかに高かった（C_{max} で 1.25 倍、$AUC_{0\text{-}last}$ で 1.72 倍）。

4.3.2 雄 CD-1 マウスに sepiapterin を単回経口投与したときの肝臓、腎臓及び脳への分布

PTC923-2023-046 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.5B）

この非 GLP 試験では、雄 CD-1 マウスに sepiapterin（Oral Mix の懸濁液）を 0（溶媒）、100 及び 300 mg/kg の用量で単回経口投与したときの、肝臓、腎臓及び脳組織への sepiapterin 及び BH_4 の分布を検討した。試験の詳細及び血漿中 PK を 3.1.3 項に示す。

ベースラインの内因性 BH_4 濃度は脳と血漿で同程度で、それぞれ 108 ng/g 及び 102 ng/mL であった。腎臓及び肝臓では、ベースラインの BH_4 濃度がはるかに高く、それぞれ 291 及び 992 ng/g であった。

単回経口投与後、sepiapterin は速やかに吸収され、末梢組織に分布し、BH_4 に変換された。最高 BH_4 濃度は、血漿及び肝臓では投与後 2 時間、腎臓及び脳では投与後 4 時間で認められた。増加した BH_4 は血漿、腎臓及び肝臓から速やかに消失したが（$T_{1/2}$ は 1～3 時間）、脳からの消失速度は遅かった（$T_{1/2}$＝4.28 時間）。Sepiapterin を 300 mg/kg の用量で単回投与したときの投与後 24 時間では、脳、腎臓及び肝臓中の BH_4 濃度はベースライン値よりも高かった。

Sepiapterin の単回経口投与後、BH_4 は肝臓及び腎臓に良好に分布した。肝臓では、ベースライン値で補正した BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、血漿中のそれぞれ 8.69 倍及び 7.49 倍であった。腎臓では、BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の血漿に対する比は、それぞれ 4.27 及び 4.69 であった。Sepiapterin の経口投与による脳中の BH_4 のバイオアベイラビリティは、はるかに低く、ベースライン値で補正した脳中 BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、血漿中のそれぞれ 0.021 倍及び 0.037 倍であった。

4.3.3 雄 Long-Evans ラットに強制経口投与し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）を用いて血中、血漿中及び組織内分布を検討する[^{14}C]-sepiapterin の単回投与試験

PTC923-2022-032 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.5C）

本非 GLP 試験の目的は、雄 Long-Evans（LE）ラットに[^{14}C]-sepiapterin を単回投与し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）法を用いて[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の組織分布を測定することであった。

計 11 匹の無処置雄 LE ラットに[^{14}C]-sepiapterin 30 mg/kg を目標用量として単回強制経口投与した。投与後の規定の時点で各時点 1 匹をイソフルラン吸入により麻酔し、心穿刺により採血した後、イソフルランの大量投与により安楽死させた。その後、各屍体をドライアイス・ヘキサン浴中で凍結した。試験デザインを Table 19 に示す。

Table 19. Long-Evans ラットにおける[^{14}C]-sepiapterin の単回強制経口投与試験の試験デザイン

[^{14}C]-Sepiapterin				**動物数**	QWBA 及び血液／血漿の採取時点
用量	mg/kg	μCi/kg	**投与容量（mL/kg）**		
実測値	30.7	259	15	11 匹、うち 8 匹は投与後 168 時間までに QWBA を予定。1 匹は、追加の 1 時点（504 時間）に QWBA を実施した。残りの予備動物 2 匹は、投与・処置に供しなかった。	投与後 1、2、4、8、24、48、72、168 時間、さらに 504 時間を追加。

略語：QWBA＝定量的全身オートラジオグラフィー
出典：PTC923-2022-032 試験報告書「実験計画」本文中の表

血液及び血漿サンプル中の総放射能（TRA）濃度を液体シンチレーションカウンター（LSC）により測定した。組織中 TRA 濃度は、QWBA を用いて測定した。血液、血漿及び組織中の放射能の PK パラメータを可能な限り算出した。

雄 LE ラットに[^{14}C]-sepiapterin 30 mg/kg（259 μCi/kg）を単回強制経口投与したときの血漿中及び血中 C_{max} は、それぞれ 0.620 μg equivalent/g 及び 0.588 μg equivalent/g で、それぞれ投与後 2 時間及び 4 時間に到達した。血漿中総放射能は T_{max} 以降徐々に減少し、投与後 168 時間までに BQL（0.0277 μg equivalent/g 未満）となった。血中放射能濃度は、ほとんどの時点で血漿中濃度と同程度か若干高く、[^{14}C]-Sepiapterin 由来血中放射能は投与後 504 時間まで検出可能であった。

[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は全身に広く分布し、ほとんどの組織で投与後 4～8 時間に最高濃度に達した。まとめると、ラットでは[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は組織から徐々に消失した。すなわち、投与後 168 時間には大半の組織で放射能濃度が BQL（0.0703 μg equivalent/g 未満）となり、投与後 504 時間では、すべての組織で BQL となった。組織の約 63%で組織／血漿比が 1.00 を超えた（Table 20）。

内分泌系及び代謝/排泄系の組織、及び消化管の組織に[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能が最も多く分布していた。特定の時点で CNS 組織に測定可能な分布が認められたが、CNS 組織中の放射能濃度

は、他のほとんどの組織系の組織中濃度よりも低く、投与後 48 時間までにすべての CNS 組織で BQL となった。髄膜及びブドウ膜などのメラニン含有組織への放射能の分布は少なく、また長時間残留がなかったことから、[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能がこれらメラニン含有組織中のメラニンと結合している可能性は極めて低いと考えられた。同様に、有色皮膚中の濃度は白色皮膚と同程度であり、いずれの皮膚も投与後 72 時間では BQL であった。

Table 20. 雄 Long-Evans ラットに[^{14}C]-sepiapterin を 30 mg/kg（259 µCi/kg）の用量で経口投与したときの血漿中及び組織中の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の薬物動態パラメータ

組織群	組織名	C_{max}（µg eq/g）	T_{max}（時間）	$T_{1/2}$（時間）	$AUC_{0\text{-last}}$（h•µg eq/g）	$AUC_{0\text{-inf}}$（h•µg eq/g）	組織：血漿 [a]	R^2
血管	血漿（LSC）	0.620	2.0	16.0	16.0	16.7	1.00	0.9773
	血液（LSC）[b]	0.588	4.0	899.6	33.9	95.7	2.12	0.0893
	大動脈	0.552	8.0	NC	9.17	NC	0.57	NC
	血液（心臓）	0.803	4.0	NC	10.6	NC	0.67	NC
中枢神経系	脳（全体）	0.121	8.0	NC	1.79	NC	0.11	NC
	髄膜	0.549	8.0	NC	7.70	NC	0.48	NC
	脊髄	0.143	8.0	NC	0.286	NC	0.02	NC
眼	眼	0.205	8.0	NC	0.958	NC	0.06	NC
	水晶体	0.0732	8.0	NC	0.146	NC	0.01	NC
	ブドウ膜	0.485	8.0	NC	9.7	NC	0.60	NC
皮膚	白色皮膚	0.504	4.0	40.4	14.8	27.2	0.93	0.9921
	有色皮膚[b]	0.524	4.0	23.2	11.9	16.5	0.74	0.7883
内分泌	副腎皮質[b]	2.29	2.0	108.0	54.9	88.4	3.43	0.2853
	副腎[b]	1.88	2.0	319.9	49.9	127	3.12	0.2299
	副腎髄質	1.76	2.0	192.1	45.6	81.4	2.86	0.8744
	下垂体	1.04	8.0	NC	13.2	NC	0.83	NC
	甲状腺[b]	0.678	8.0	69.4	27.4	37.0	1.72	0.7695
脂肪組織	褐色脂肪	0.508	4.0	17.6	21.8	23.6	1.36	0.9972
	白色脂肪	0.220	8.0	NC	11.4	NC	0.72	NC
消化管（GI）	盲腸粘膜	50.2	8.0	12.9	475	478	29.73	0.8320
	食道壁[b]	6.39	8.0	16.0	84	86	5.25	0.7710
	大腸壁	28.5	8.0	9.4	348	349	21.77	0.9660
	口腔粘膜	1.44	8.0	NC	23.9	NC	1.50	NC
	小腸壁	136	1.0	11.1	234	241	14.61	0.9285
	胃壁（腺）	18.3	1.0	17.5	47.1	48.9	2.94	0.8406
	胃壁（腺以外）[b]	5.66	2.0	11.3	46.7	49.7	2.92	0.7725
リンパ	骨髄（大腿骨）	1.02	24.0	NC	43.9	NC	2.75	NC
	リンパ節（頸部）	0.590	4.0	30.9	16.5	25.0	1.03	0.9661
	脾臓	0.901	8.0	16.2	34.1	35.9	2.13	0.8839

組織群	組織名	C_{max} （μg eq/g）	T_{max} （時間）	$T_{1/2}$ （時間）	$AUC_{0\text{-}last}$ （h•μg eq/g）	$AUC_{0\text{-}inf}$ （h•μg eq/g）	組織：血漿 [a]	R^2
	胸腺	0.689	8.0	NC	17.4	NC	1.09	NC
代謝／排泄	胆汁（管中）	4.61	2.0	9.1	37.5	38.9	2.35	0.8078
	腎臓	3.48	4.0	27.8	65.1	71.3	4.07	0.8576
	腎皮質	3.54	4.0	52.2	79.4	85.3	4.96	0.8361
	腎髄質	3.58	8.0	26.1	62.1	66.9	3.89	0.8947
	肝臓	13.5	2.0	44.0	154	159	9.60	0.8427
	膀胱壁	637	8.0	NC	4262	NC	266.63	NC
筋肉	心臓	0.479	8.0	NC	8.53	NC	0.53	NC
	筋肉（大腿）[b]	0.370	8.0	35.9	14.6	19.0	0.92	0.7892
生殖器	精巣上体	0.397	8.0	NC	13.5	NC	0.84	NC
	前立腺	0.645	8.0	NC	16.4	NC	1.02	NC
	精嚢	0.609	4.0	31.9	23.8	30.9	1.49	0.9992
	精巣 [b]	0.254	8.0	45.0	10.9	15.5	0.68	0.6185
呼吸器	肺	0.757	4.0	23.0	21.4	23.9	1.34	0.8918
	鼻甲介	0.472	8.0	NC	5.43	NC	0.34	NC
	気管	0.699	8.0	NC	3.21	NC	0.20	NC
分泌	眼窩外涙腺	0.924	8.0	17.0	37.7	40.2	2.36	0.8774
	ハーダー腺	1.12	24.0	NC	50.8	NC	3.18	NC
	眼窩内涙腺	0.910	8.0	NC	26.4	NC	1.65	NC
	膵臓	3.53	8.0	43.5	46.2	57.2	2.89	0.9998
	唾液腺	1.01	8.0	NC	19.3	NC	1.21	NC
骨格	骨（大腿骨）	0.723	24.0	NC	36.4	NC	2.28	NC

略語：$AUC_{0\text{-}inf}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$＝投与後 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、LSC＝液体シンチレーション計測、NC＝算出せず、R^2＝決定係数

[a] $AUC_{0\text{-}last}$ に基づく組織／血漿比

[b] R^2 が 0.8 未満であるため、$T_{1/2}$ 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は近似値である。

出典：PTC923-2022-032 試験報告書、表 2

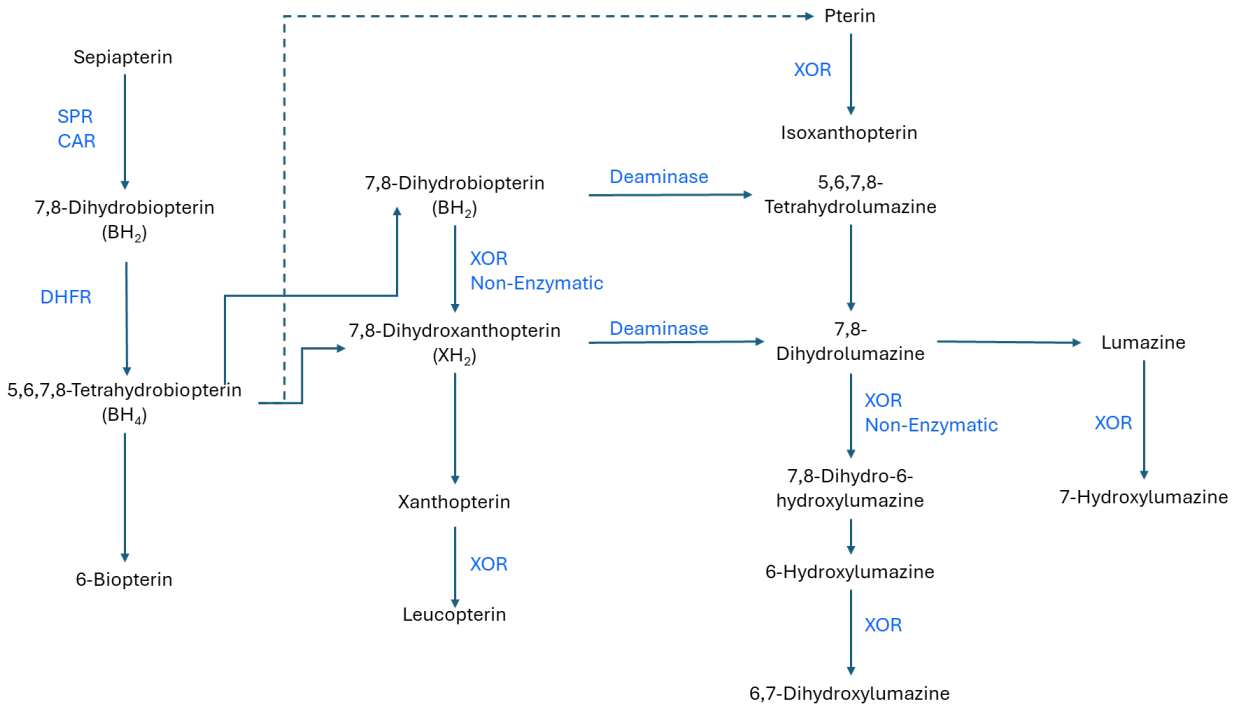
5. 代謝

5.1 内因性 sepiapterin の推定代謝経路

Sepiapterin は BH_4 の天然の内因性前駆体であり、プテリンサルベージ経路を介して BH_4 に代謝される（Figure 2）。マウス、ラット、マーモセット又はカニクイザルに sepiapterin を経口投与したところ、吸収された sepiapterin は速やかにかつ広範に BH_4 に代謝されることが明らかになっている（3項）。血漿中 sepiapterin 濃度は LLOQ 未満か、又は LLOQ 未満まで速やかに低下し、sepiapterin の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-last}}$ は、概ね代謝物 BH_4 の値の 5%未満であった。Sepiapterinha の代謝は、プテリンサルベージ経路内で一方向の 2 段階還元で、主として SR（補助的に CR が関与する可能性が高い）及び DHFR によって行われ BH_4 が生成される（Smith 2019）。

Sepiapterin の外因性に由来する BH_4 は、PAH、TH、TPH、AGMO 及び NOS の補酵素として働きながら、内因性 BH_4 と同様に、芳香族アミノ酸の触媒的水酸化の際に酸化される。BH_4-OH のように、この過程で形成された代謝物の一部は、PCD と DHPR により BH_4 を再生するためにリサイクルされる可能性がある（Werner 2011）。BH_2、キサントプテリン、イソキサントプテリン、XH2、ルマジン、その他のプテリジン誘導体などのさらなる代謝物も報告されている（Nichol 1985, Sawabe 2008, Rasmussen 2022）。余剰の BH_4 は主に尿中に排泄される。

Figure 2. Sepiapterin の推定主要代謝経路



略語：CAR＝カルボニル還元酵素、DHFR＝ジヒドロ葉酸還元酵素、SPR＝sepiapterin 還元酵素、XOR＝キサンチン酸化還元酵素
出典：（Rasmussen 2022）より改変して引用、図 3

Sepiapterin をヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分とインキュベーションしたときも同様の代謝経路が認められ（PTC923-2023-081 試験）、BH_4、BH_2、D-/L-ビオプテリン、XH_2、M269/1、M269/2、M235/2 が検出された（5.2.1 項）。

酵素 SR、DHFR 及び PCD は、様々な組織に広く分布している（proteinatlas.org）。ラットでは、DHPR mRNA は、脳幹、小脳、肝臓、腎臓、副腎及び腸管に最も多く分布し、これらの臓器の組織中には DHPR の酵素活性も認められている（Hoshiga 1993）。したがって、様々な組織で sepiapterin の代謝が起こる可能性があるが、酵素の分布及び活性が特に高い臓器は、肝臓、腎臓、腸管、副腎及び脳である。

5.2 Sepiapterin 代謝の補足的検討

補足的情報源として、sepiapterin の代謝を組織 S9 画分及びヒト腸内細菌叢を用いて in vitro で、並びにラット及びサルに[^{14}C]-sepiapterin を単回経口投与して検討した。

5.2.1 組織 S9 画分における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性

PTC923-2023-081 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.10A 及び 2.6.5.11C）

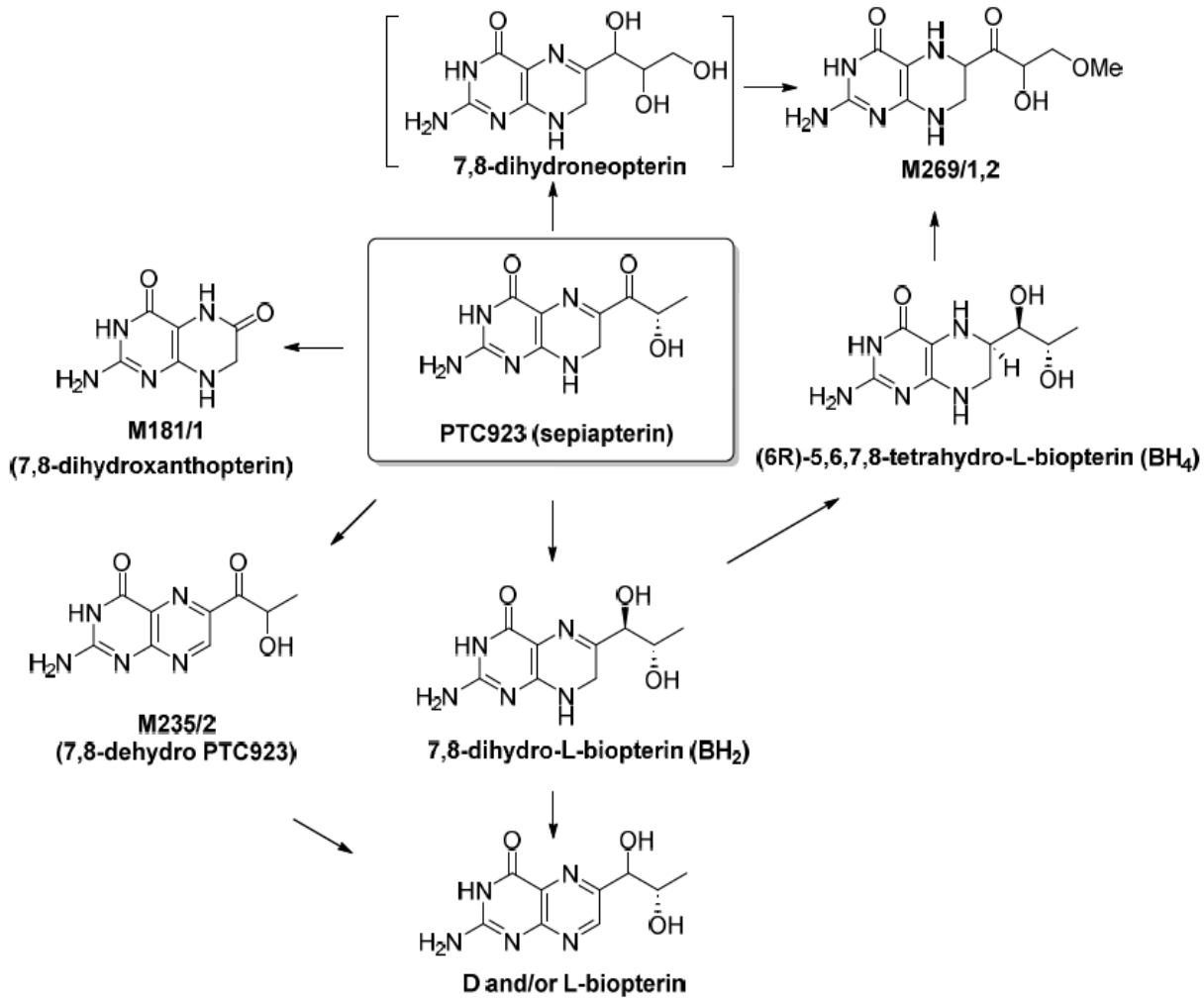
[^{14}C]-sepiapterin を 50 µM で雄ラット、雄ミニブタ、雄サル及び男女ヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分（約 2 mg protein/mL）、並びに男女ヒト腸及び肺 S9 画分（約 2 mg protein/mL）とインキュベートし、揮発性代謝物の生成を検討した。また、雄ラット、雄ミニブタ、雄サル及び男女ヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分との反応液から一定量を分取し、[^{14}C]-sepiapterin の代謝物プロファイルを明らかにし、また、[^{14}C]-sepiapterin の主要な代謝物の特性解析及び/又は同定を行った。

ラット、ミニブタ、サル及びヒトの肝臓 S9 画分、ラット、ミニブタ、サル及びヒトの腎臓 S9 画分、ヒト腸管 S9 画分並びにヒトの肺 S9 画分では、sepiapterin の揮発性代謝物の生成はほとんど認められなかった。詳細については、モジュール 2.7.2、2.1.5.1 項を参照のこと。

ラット、サル及びヒトの肝臓及び腎臓 S9 画分では、sepiapterin は広範に代謝されたが、ミニブタの肝臓及び腎臓 S9 画分では代謝の程度がはるかに小さかった。ヒトに特有の代謝物は認められず、代謝物プロファイルは評価した動物種間で概ね同様であった。

主な代謝経路は、水素化／還元、脱水素化、酸化、メチル化及び側鎖切断で、単独又は複合的に関与していた（Figure 3）。

Figure 3. ラット、ミニブタ、サル及びヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分における sepiapterin の推定主要代謝経路



略語：PTC923＝sepiapterin
注：7, 8-ジヒドロキサントプテリン（7,8-dihydroxanthopterin、M181/1）は代謝物 XH_2 である。
出典：PTC923-2023-081、図 S-1

5.2.2 ヒト腸内細菌叢における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性

PTC923-2023-082 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.10B）

100 µM 及び 3,000 µM の[^{14}C]-sepiapterin を嫌気条件下で、生きている又は死んだヒト腸内細菌叢と 48 時間までインキュベートし、蒸発させた後の放射能回収率を評価した。100 µM の[^{14}C]-sepiapterin を生きている腸内細菌叢と 48 時間インキュベーションした後にのみ放射能の減少が認められたことから、この嫌気条件下で揮発性代謝物が生成されることが示された。3,000 µM の[^{14}C]-sepiapterin とインキュベートしたところ、蒸発による減少は認められず、このような高濃度では、酵素活性が飽和したか又は阻害された可能性が高かった。詳細については、モジュール 2.7.2、2.1.5.2 項を参照のこと。

カニクイザル及びヒトに[^{14}C]-sepiapterin を経口投与したときにマスバランスの回収率が低かったのは、腸内で揮発性代謝物が生成されることで説明できると考えられる。

5.2.3 ラットに[^{14}C]-Sepiapterin を単回経口投与したときの代謝

PTC923-2022-035 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.9A 及び 2.6.5.11A）

PTC923-2022-031 試験（6.1 項）において、無処置及び BDC 雄 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]-sepiapterin 100 mg/kg（250 µCi/kg）を単回経口投与し、血漿、胆汁、尿及び糞を採取して代謝物のプロファイル決定及び同定を行った。

ラットに 100 mg/kg を単回経口投与したところ、未変化体に加え、様々なマトリックスで 17 種類の代謝物が確認され、対応する放射能ピークが認められた。

未変体は循環血中微量成分の 1 つで、血漿中 TRA の $AUC_{0\text{-last}}$ の 0.91%を占めた。循環血漿中に最も多く存在する代謝物は、M269/1 及び M269/2（おそらく BH_4 付加体/アーチファクト）で、血漿中 TRA $AUC_{0\text{-last}}$ の 39.4%を占めた。

プールした胆汁中には未変化体が検出され、投与量の 0.06%未満を占めた。最も量が多かった代謝物は M221/1（2'-デオキシ体）で、投与量の 0.13%を占めた。その他の代謝物としては、共溶出する M181/1（7, 8-ジヒドロキサントプテリン）、イソキサントプテリン及び M257/1 で、合わせると投与量の 0.07%を占めた。

蓄尿中では未変化体は主要成分ではなく、無処置及び BDC ラットでともに投与量の 0.3%未満しか占めなかった。一方、BH_4 は無処置ラットでは投与量の 2.93%を占めた。BDC ラットで最も多い代謝物は、共溶出した M181/1（7,8-ジヒドロキサントプテリン）、イソキサントプテリン及び M257/1 で、投与量の 3.15%を占めた。

無処置ラット及び BDC ラットのプールした糞中では、未変化体がそれぞれ投与量の 20.7%及び 16.2%を占めた。一方、M221/1（2'-デオキシ体）は最も量が多かった代謝物で、無処置ラット及び BDC ラットでは、それぞれ投与量の 25.1%及び 30.0%を占めた。無処置ラット及び BDC ラットの糞中では、放射能として BH_4 は検出されなかった。

ラットに 100 mg/kg を単回経口投与したところ、sepiapterin は広範に代謝され、代謝物は主に糞中に排泄された。主な代謝経路は、水素化/還元、脱水素化、酸化、メチル化、酸化的脱アミノ化及び側鎖切断で、単独又は複合的に関与していた。内因性物質としての sepiapterin 及びその代謝物は他の生体分子の生合成にも関与している可能性がある。

5.2.4 カニクイザルに[^{14}C]-Sepiapterin を単回経口投与したときの代謝

PTC923-2022-036 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.9B 及び 2.6.5.11B）

PTC923-2022-033 試験（6.2 項）において、3 匹の雄カニクイザルに[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg（200 µCi/kg）を単回経口投与し、血漿、尿及び糞を採取して代謝物のプロファイル決定及び同定を行った。

カニクイザルに 50 mg/kg を単回経口投与したところ、未変化体に加えて 24 種類の代謝物が検出され、血漿、尿及び糞中に対応する放射能ピークが認められた。循環血中の放射能に占める未変化体の割合は小さく、投与後 0 時間から 48 時間までの血漿中 TRA 濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-48h}}$）

の 0.27%を占めた。尿中の放射能に占める未変化体の割合は小さく、一方、糞中では主要な放射性成分の 1 つであった。循環血漿中の主要代謝物は M381/1 で、血漿中 TRA $AUC_{0\text{-}48h}$ の 16.1%を占めた。尿中の主要代謝物は M282/1 及び M181/1（7, 8-ジヒドキサントプテリン）の 2 種類であり、それぞれ投与量の 1.50%及び 1.01%を占めた。糞中で最も量が多かった代謝物は、共溶出する代謝物 M222/1 及び M221/1（2'-デオキシ体）で、投与量の 9.33%を占めた。

サルに 50 mg/kg を単回経口投与後、sepiapterin は広範に代謝された。主な代謝経路は、酸化/脱水素化、還元/水素化、酸化的脱アミノ化、脱水、側鎖切断、メチル化、及びおそらくグルタミン酸抱合で、単独又は複合的に関与していた。サルに[^{14}C]-sepiapterin を経口投与した後 7 日間のウォッシュアウト期間を設けた試験（PTC923-2022-033 試験、6.2 項）では、屍体中の[^{14}C]-Sepiapterin 由来放射能のマスバランスの回収率及び残存率が低かったことから、ピリミジン環の開環により揮発性代謝物が生成され、その後グアニジン部分が消失したことが示された。内因性物質としての sepiapterin 及びその代謝物は他の生体分子の生合成にも関与している可能性がある。

6. 排泄

雄 Sprague Dawley ラット及び雄カニクイザルで実施した[^{14}C-]sepiapterin の単回投与試験では（それぞれ 6.1 項及び 6.2 項）、PK、マスバランス及び排泄経路を検討した。また、C57BL/6 マウスにおける sepiapterin の単回投与試験の一部として、尿中排泄を評価した（4.3.1 項）。

6.1 雄 Sprague Dawley ラットにおける[^{14}C]-Sepiapterin の単回強制経口投与による薬物動態、マスバランス及び胆汁中排泄の検討

PTC923-2022-031 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.13A 及び表 2.6.5.14A）

本非 GLP 試験の目的は、雄 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]-sepiapterin を単回投与したときの[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の PK、マスバランス及び胆汁中排泄を検討することであった。

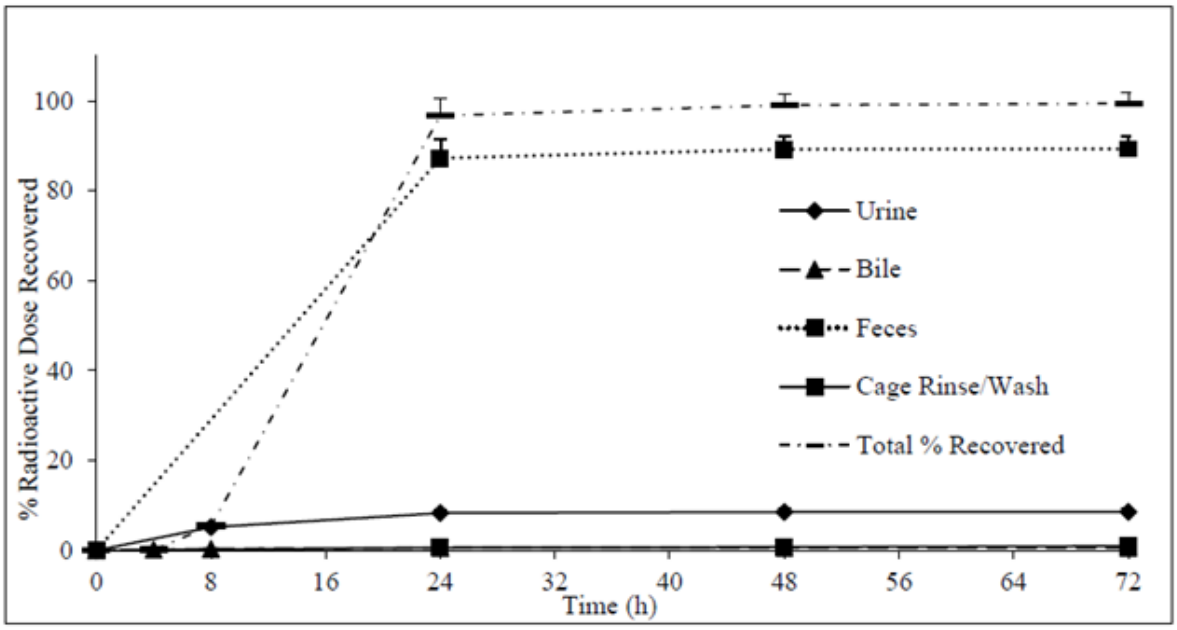
雄 Sprague Dawley ラット計 36 匹に[^{14}C]-sepiapterin 100 mg/kg（約 250 μCi/kg）を単回強制経口投与した。代謝及び排泄は、無処置の雄動物 3 匹（第 1 群）及び BDC 動物 3 匹（第 2 群）を用いて評価した。無処置の雄動物 30 匹（第 3 群）では、PK 及び代謝を評価した。雄 1 匹には投与せず、対照（第 4 群）とした。

排泄物は、無処置ラットでは 168 時間まで、BDC ラットでは 72 時間まで採取した。採取した排泄物サンプル中の投与放射能の回収率を LSC を用いて測定した。第 3 群の動物は、規定の時点でイソフルラン吸入により麻酔し、心臓穿刺により血液サンプルを採取した後、安楽死させた。各血液及び血漿サンプルの一定量を分取し、放射能を測定した。血中及び血漿中の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の PK パラメータを求めた。

雄無処置ラットでは、[^{14}C]-sepiapterin 由来総放射能の 94.27%が投与後 168 時間までに排泄された。主要排泄経路は糞を介する経路で、84.70%が排泄され、尿中排泄率は 9.21%であった。

雄 BDC ラットでは、[^{14}C]-sepiapterin 由来総放射能の 99.43%が投与後 72 時間までに排泄された。主要排泄経路は糞を介する経路で、89.31%が排泄され、尿中排泄率は 8.56%、胆汁中排泄率は 0.57%であった。BDC ラットにおける投与された放射能の尿中（8.56%）及び胆汁中（0.57%）からの回収率の合計は 9.13%で、雄動物では、少なくともこの割合の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能が吸収されたことを示している。BDC ラットでは、投与後 24 時間までに、投与した[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の大部分が回収された（Figure 4）（胆汁：0.55%、尿：8.29%、糞：87.25%、ケージ洗浄液：0.60%、合計：96.69%）。

Figure 4. 胆管カニューレを挿入した雄 Sprague Dawley ラット（第 2 群）に[^{14}C]-Sepiapterin 100 mg/kg（約 250 µCi/kg）を単回強制経口投与したときの排泄物中の放射能の累積回収率



出典：PTC923-2022-03 試験報告書 1、図 2

単回強制経口投与後、最高 TRA 濃度（C_{max}）の平均値は、血漿中で 2.08 µg equivalent/g、血中では 1.76 µg equivalent/g であり、T_{max} は 2 時間であった。T_{max} 後は、血漿中及び血中 TRA はいずれも減少した。血漿中総放射能は投与後 168 時間で検出可能（0.0647 µg equivalent/g 超）であったが、血中放射能は投与後 48 時間までに定量限界未満（0.187 µg equivalent/g 未満）となった。投与後 1～24 時間の血中濃度／血漿中濃度の比の平均値は、0.70～1.08 であった。

6.2 雄カニクイザルにおける[^{14}C]-sepiapterin の単回強制経口投与による薬物動態及びマスバランスの検討

PTC923-2022-033 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.13B）

本非 GLP 試験の目的は、雄カニクイザルに[^{14}C]-sepiapterin を単回投与したときの血漿中及び血中の放射能の経時変化、排泄経路、及び排泄率を明らかにすることであった。

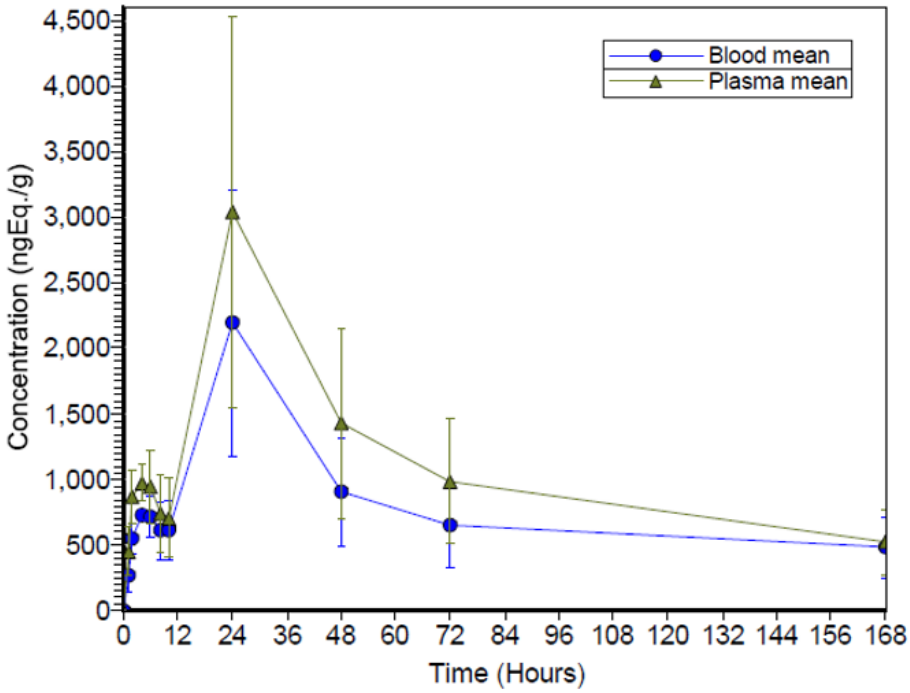
雄カニクイザル計 3 匹に[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg（200 µCi/kg）［実際は 54.2 mg/kg（193 µCi/kg)］単回強制経口投与した。血液は投与 0（投与前）、投与後 1、2、4、6、8、10、24、48、72 及び 168 時間に採取し、尿及び糞は投与後 168 時間まで採取した。全血、血漿、尿、糞、ケージ残渣、ケージ拭取りワイプ及び残屍体について放射能分析を行った。TRA の全血及び血漿中 PK パラメータを算出した。

全動物で、血漿中の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は投与後 1～168 時間まで測定可能であった。C_{max} の平均値は 3,040 ng equivalent/g（ng eq/g）で、投与後 24.0 時間（T_{max}）で到達した。投与後 0 時間から 168 時間の最終検体採取時点までの AUC（$AUC_{0\text{-last}}$）は、184,000 h•ng eq/g であった。

全動物で、血漿中の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は投与後 1～168 時間まで測定可能であった。血中 C_{max} の平均値は 2,190 ng eq/g で、投与後 24 時間（T_{max}）で到達した。$AUC_{0\text{-}last}$ は、132,000 h•ng eq/g であった。

血漿中及び血中のいずれにおいても、TRA は投与後約 4 時間で最初の最高濃度に達し、その後低下し始め、投与後約 10 時間で最低濃度に達した（Figure 5）。最低濃度に達した後、血漿中及び血中 TRA は上昇し、投与後約 24 時間に真の C_{max} に到達し、その後低下した。一般的な有機溶媒を用いた血漿からの抽出可能な放射能は、投与後 24 時間以降のサンプルでは顕著に少なかったことから、[^{14}C]-sepiapterin 又はその代謝物は他のタンパク質複合体の生合成に取り込まれたことが示唆された。

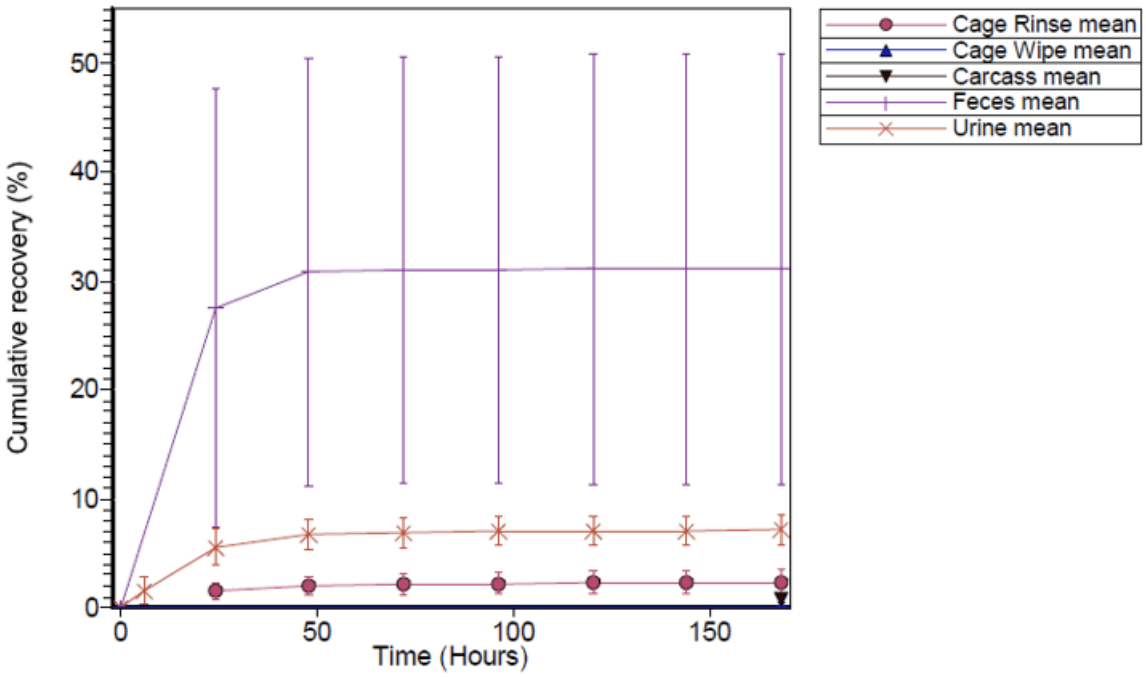
Figure 5. 雄カニクイザル 3 匹に[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg（200 µCi/kg）を単回強制経口投与したときの[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の血中及び血漿中濃度-時間曲線下面積の平均値（±標準偏差）



出典：PTC923-2022-033 試験報告書、図 1

投与後 7 日（168 時間）の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の平均総回収率は 42.75%で、内訳は、糞から 31.12%、糞拭取りワイプから 0.02%、尿から 7.12%、尿拭取りワイプから 0.41%、ケージ洗浄液から 2.34%、ケージ拭取りワイプからは 0.08%、屍体からは 0.83%が回収された。排泄物から回収可能な放射能の大部分は、投与後最初の 48 時間以内に回収された（Figure 6）。

Figure 6. 雄カニクイザル 3 匹に[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg（200 µCi/kg）を単回強制経口投与したときの[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の平均（±標準偏差）回収率（投与量の%）



出典：PTC923-2022-033 試験報告書、図 2

7 日間のウォッシュアウト期間後のマスバランス回収率が低く（42.75%）、屍体中の[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の残存率も低かった（0.83%）。このことは、[^{14}C]-sepiapterin をヒト腸内微生物叢と in vitro でインキュベートしたときに認められたように、揮発性代謝物の生成を示唆していると考えられる（PTC923-2023-082 試験、5.2.2 項）。

7. 薬物動態学的薬物相互作用

Sepiapterin は速やかかつ広範に SR によって（おそらく CR によって補助されて）代謝される。また、DHFR によって 2 段階還元で BH_2 を介して BH_4 が生成される。BH_4 は、芳香族アミノ酸の触媒的水酸化の際に酸化されて、BH_4-OH が生成される。これらの事象では、BH_4 は PAH、TH、TPH 及び NOS などの様々な酵素の補因子として働き、酸化された BH_4 は、PCD 及び DHPR による脱水と還元を受けて BH_4 に再生される。（Werner 2011）BH_4 の代謝には、NOS、キサンチン酸化還元酵素（XOR）などその他の酵素、並びに複数の酵素的及び非酵素的代謝経路が関与する（Nichol 1985, Sawabe 2008, Rasmussen 2022）。

7.1 CYP を介した薬物相互作用

CYP450 アイソザイム 1A2、2B6 及び 3A4 に対する sepiapterin の誘導能を検討するための試験［CNSA-ADME-001-2017 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.12 A）］、及びヒト CYP450 アイソザイム CYP1A2、 2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 に対する sepiapterin の阻害能を検討するための試験［CNSA-ADME-002-2017 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.12 B）］を実施した。Sepiapterin は、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 を阻害しなかった（モジュール 2.7.2、2.1.1 項）。また、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しなかった（モジュール 2.7.2、2.1.2 項）。

7.2 トランスポーターを介した薬物相互作用

ヒト排出トランスポーター［すなわち、アデノシン三リン酸（ATP）結合カセット（ABC）トランスポーター］の BCRP、BSEP 及び MDR1、並びにヒト取り込みトランスポーターの MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2［PTC923-2020-002 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.15 A）］、並びに ENT1 及び ENT2［PTC923-2021-013 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.15 B）］の阻害剤及び基質としての sepiapterin を評価する in vitro 試験を実施した。Sepiapterin は BCRP の基質である。ENT2 による sepiapterin の取り込みは、検討した最高濃度（3,000 µM）でのみ認められたが、これは臨床での sepiapterin の C_{max}（約 2.82 ng/mL、11.9 nM に相当）と比較すると、臨床的な意義はないと考えられる。Sepiapterin は BCRP（IC_{50}：647.7 µM）、ENT1（IC_{50}：2,377 µM）、ENT2（IC_{50}：1,180 µM）及び OATP1B1（3,000 µM で 25%阻害）の弱い阻害剤であった。詳細はモジュール 2.7.2、2.1.4.1 項に要約する。

ヒト排出トランスポーター（すなわち ABC トランスポーター）の BCRP、BSEP 及び MDR1、並びにヒト取り込みトランスポーターの MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、ENT1 及び ENT2 の阻害剤及び基質としての BH_4 を評価する in vitro 試験を実施した［PTC923-2021-012 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.15 C）］。BH_4 は MDR1（P-gp）、BCRP 及び MATE2-K の基質である。BH_4 が取り込みトランスポーターMATE1、OAT1、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、ENT1 及び ENT2 の基質である可能性は低い。BH_4 は安定剤 0.1%DTT の存在下で OAT3 の基質である可能性は低い。BH_4 は P-gp（IC_{50}：992.9 µM）及び BCRP（IC_{50}：778.4 µM）の阻害剤であり、また、OCT1（1,500 µM で 32%）及び OCT2（150 µM で 23%）に対しては弱い阻害剤である。詳細はモジュール 2.7.2、2.1.4.2 項に要約する。

8. その他の薬物動態試験

8.1 ラットを用いた in vivo 遺伝毒性試験のトキシコキネティクス

8.1.1 雄 Sprague Dawley ラットにおける小核及び DNA 損傷誘発性の評価（GLP）

CNSA-TOX-005-2017 試験（モジュール 2.6.7, 2.6.7.9 項）

小核及び DNA 損傷誘発性を評価する本 GLP 試験では、雄 Sprague Dawley ラットに溶媒対照（Oral Mix）、sepiapterin 100、300、1,000 又は 4,000 mg/kg/日、若しくは陽性対照物質のメタンスルホン酸エチル（EMS）150 mg/kg/日を 3 日間連続投与した。試験デザイン及び毒性データは、モジュール 2.6.6、4.2.1 項に示す。

Sepiapterin 及び BH_4 曝露量を確認するため、最終投与後約 3 時間に、ラット血漿サンプルを得た。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 は、HPLC-MS/MS を用いて測定した（[redacted]-170502 試験、2.2.1 項）。

溶媒、EMS 及び sepiapterin の最低用量 100 mg/kg/回を投与したラットでは、血漿中 sepiapterin 濃度は BQL であった（Table 21）。血漿中の内因性 BH_4 は、溶媒投与群及び EMS 投与群ともに測定可能であった。内因性 BH_4 濃度の平均値は、それぞれの群で 94.5 ng/mL 及び 79.1 ng/mL であった。Sepiapterin 及び BH_4 濃度は、1,000 mg/kg/日まで用量の増加に伴い上昇した。

Table 21. ラットに sepiapterin を反復経口投与したときの Day 3 の投与後 3 時間の sepiapterin 及び BH_4 の平均血漿中濃度（CNSA-TOX-005-2017 試験）

群	投与	用量（mg/kg/日）	平均 sepiapterin 濃度（ng/mL）	平均 BH_4 濃度（ng/mL）
1	溶媒[a]	0	BQL	94.5
2	Sepiapterin	100	BQL	3,892
3	Sepiapterin	300	13.4	7,440
4	Sepiapterin	1,000	29.6	23,280
5	Sepiapterin	2,000	23.9	12,072
6	EMS	150	BQL	79.1

略語：BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、BQL＝定量限界未満、EMS＝メタンスルホン酸エチル、陽性対照物質
[a] 第 1 群の動物には、参照物質である溶媒の ORAL MIX™（香料を添加した懸濁溶媒）/Mediska® Syrup を投与した。
出典：CNSA-TOX-005-2017、表 8

8.2 ラットの胚・胎児発生に関する反復投与試験のトキシコキネティクス

妊娠雌 Sprague Dawley CD［Crl:CD(SD)］ラットの胚・胎児発生に関する非 GLP 試験（PTC923-2021-005 試験）及び GLP 試験（PTC923-2021-023 試験）において、妊娠日齢 7 日（GD7）から GD17 まで連日反復投与したときの sepiapterin 及び BH_4 のトキシコキネティクスを検討した。

8.2.1 ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生に関する用量設定試験（非 GLP）

PTC923-2021-005 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.7A）

妊娠雌 Sprague Dawley ラットに、対照溶媒（Oral Mix）又は sepiapterin 100、300 及び 1000 mg/kg/日を GD7～GD17 の 11 日間連日強制経口投与した。試験デザイン及び毒性データは、モジュール 2.6.6、6.2.1 項に示す。

血液サンプルの採取は、対照群では、GD7 及び GD17 の投与前及び投与後 4 時間に、sepiapterin 投与群では、GD7 及び GD17 の投与前、投与後 1、2、4、7、12 及び 24 時間に行った。血漿を回収する前に、血液サンプルを直ちに 10%アスコルビン酸（100：11.1 比、v/v）と混合して、sepiapterin 及び BH_4 を安定化させた。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の測定には、両分析対象物質の LLOQ を 11.1 ng/mL とする HPLC-MS/MS を用いた（PTC923-2021-001 試験、2.2.2 項）。

100、300 及び 1,000 mg/kg で経口投与後、sepiapterin は速やかに BH_4 に変換されるように見え、全身循環血中ではほとんど検出されなかった（血漿中 sepiapterin 濃度は概ね BQL）ために、sepiapterin の TK パラメータは算出できなかった。

内因性 BH_4 濃度は、GD7 及び GD17 の投与前及び投与後 4 時間では 29.2～44.4 ng/mL と、全対照動物で測定可能であった。血漿中 BH_4 濃度は、投与前と投与後 4 時間の比較、及び GD7 と GD17 比較で、変化が認められなかった。Sepiapterin 投与群の動物から GD7 の投与前に採取したサンプルの血漿中 BH_4 濃度は 29.1～34.2 ng/mL で、対照群と同程度であった。GD17 の投与前濃度は、sepiapterin 投与群の方が高値で、42.4～48.2 ng/mL であった。

Sepiapterin を 1 日 1 回投与後、全用量で GD7 及び GD17 の両日とも、平均血漿中 BH_4 濃度は 24 時間のサンプル採取期間を通して測定可能であった。BH_4 の T_{max} は、GD7 及び GD17 の投与後 2 又は 4 時間で認められた（Table 22）。BH_4 曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、300 mg/kg よりも 1,000 mg/kg でわずかな低下が認められた GD7 の C_{max} 以外、GD7 及び GD17 の両日において用量に伴って増加した。両日とも、曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）の増加は用量比を下回った。BH_4 の終末相 $T_{1/2}$ は、3.01～4.77 時間であった。反復投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、GD7 と比較して GD17 で低い傾向が見られ、反復投与後の $AUC_{0\text{-}last}$ を初回投与間隔中の $AUC_{0\text{-}last}$ で除した比（R_{AUC}）は 0.568～0.766 であった。

Table 22. 妊娠 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を強制経口投与したときの BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-005 試験）

用量（mg/kg/日）	GD	中央値	平均値		
		T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
100	7	2.0	1,380	11,300	3.86
300	7	4.0	2,990	19,900	4.77
1,000	7	2.0	2,670	25,100	3.01
100	17	4.0	976	6,450	4.66
300	17	2.0	2,000	14,100	3.19
1,000	17	2.0	2,420	19,200	3.46

略語：AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、GD＝妊娠日齢
出典：PTC923-2021-005 試験報告書、本文中の表 2 及び本文中の表 3

8.2.2 ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生に関する試験（GLP）

PTC923-2021-023 試験（モジュール 2.6.7、表 2.6.7.13A）

本 GLP 試験の目的は、妊娠 Sprague Dawley ラットの器官形成期である GD7～GD17 に、1 日 1 回 sepiapterin を投与したときの母体毒性及び胚・胎児発生に対する潜在的影響を評価すること、及び TK パラメータを解析することであった。試験デザイン及び毒性データは、モジュール 2.6.6、6.2.2 項に示す。

妊娠雌 Sprague Dawley ラットに対照溶媒（Oral Mix）又は sepiapterin を 100、300、1000 mg/kg/日の用量で、GD7 から GD17 まで連日投与した。血液サンプルの採取は、対照群では、GD7 及び GD17 の投与前及び投与後 4 時間に、sepiapterin 投与群では、GD7 及び GD17 の投与前、投与後 1、2、4、7、12 及び 24 時間に、さらに、GD17 では投与後 0.5 時間にも採取した。血漿を回収する前に、血液サンプルを直ちに 10%アスコルビン酸（100：11.1 比、v/v）と混合して、sepiapterin 及び BH_4 を安定化させた。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の測定には、両分析対象物質の LLOQ を 11.1 ng/mL とするバリデートされた HPLC-MS/MS を用いた（PTC923-2021-001 試験、2.2.2 項）。

Sepiapterin の単回投与後（GD7）及び反復投与後（GD17）の血漿中 sepiapterin 濃度は LLOQ 未満であった。したがって、血漿中濃度データのノンコンパートメント TK 解析は BH_4 に限定した。BH_4 のトキシコキネティクスパラメータを Table 23 に要約する。

Table 23. 妊娠 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を強制経口投与したときの BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-023 試験）

用量（mg/kg/日）	GD	中央値	平均値		
		T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
100	7	2.0	1,680	11,000	3.93
300	7	4.0	3,160	23,400	3.23
1,000	7	4.0	3,200	29,500	NC
100	17	2.0	1,360	8,360	NC
300	17	2.0	2,520	17,700	NC
1,000	17	2.0	3,410	26,900	3.07

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、GD＝妊娠日齢、NC＝算出せず
出典：PTC923-2021-023 試験報告書、本文中の表 4.1

内因性 BH_4 濃度が測定可能であったのは、対照群の GD7 及び GD17 の投与前及び投与後 4 時間（範囲：32.0～58.0 ng/mL）、並びに sepiapterin 投与群の GD7 及び GD17 の投与前サンプル（範囲：32.7～64.1 ng/mL、310 ng/mL の外れ値 1 例を除外後）であった。

Sepiapterin を単回投与及び反復投与したときの血漿中 BH_4 濃度は、概ね用量の増加に比例して上昇した。単回投与（GD7）及び反復投与（GD17）後の BH_4 曝露量（$AUC_{0\text{-}last}$ 及び C_{max}）は、100～1,000 mg/kg/日の範囲で概ね用量比を下回って増加した。BH_4 の最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は投与後 2～4 時間であった。100～1,000 mg/kg/日の用量で 11 日間連日投与したところ、BH_4 の蓄積は認められなかった。GD17 の BH_4 曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、GD7 と比較して低用量（100 mg/kg/日）及び中用量（300 mg/kg/日）で約 20%減少した。高用量（1000 mg/kg/日）では減少程度は小さく、$AUC_{0\text{-}24h}$ で約 10%減少したが、C_{max} では低下は認められなかった。

8.3 ウサギ胚・胎児発生に関する反復投与試験のトキシコキネティクス

以下の試験において、ニュージーランド白色ウサギを用いて、sepiapterin 及び BH_4 の TK パラメータを評価した。

- PTC923-2021-006、GD7～GD19 の妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する非 GLP 用量設定試験
- PTC923-2021-024、GD7～GD19 の妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する GLP 適合用量設定試験

8.3.1 ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験

PTC923-2021-006 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.7B）

妊娠ウサギを用いたこの非 GLP 胚・胎児発生に関する用量設定試験の目的は、その後のウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の用量を選択すること、妊娠ウサギ並びに着床から硬口蓋閉鎖までの胚及び胎児の発生に及ぼす sepiapterin の影響を検討すること、及び sepiapterin とその代謝物 BH_4 の TK 特性を明らかにすることであった。試験デザイン及び毒性データはモジュール 2.6.6、6.2.3 項に示す。

7ヵ月齢の交配時期を合わせた妊娠ニュージーランド白色［Hsd:Hra(NZW)SPF］雌ウサギの各群に、対照溶媒（Oral Mix）並びに sepiapterin を 100、300 及び 1,000 mg/kg/日の用量で、GD7～GD19 まで 1 日 1 回胃チューブを用いて経口投与した。

GD7 及び GD19 の投与前、投与後 4 時間に対照群の動物から、並びに、投与前、投与後 0.5、1、2、4、7、12 及び 24 時間に、sepiapterin 投与群の動物から血液サンプルを採取した。血漿を回収する前に、血液を直ちに 10%アスコルビン酸（100：11.1 比、v/v）と混合して、sepiapterin 及び BH_4 を安定化させた。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の測定には、両分析対象物質の LLOQ を 11.1 ng/mL とする HPLC-MS/MS を用いた（2.3 項）。

GD7 及び GD19 に対照群の動物から採取し分析したすべての血漿サンプル、並びに GD7 及び GD19 に sepiapterin 投与群の全動物から採取した投与前のサンプルで、血漿中 sepiapterin 濃度は LLOQ 未満（11.1 ng/mL 未満）（BQL）であった。これらの結果から、sepiapterin 投与開始前の動物には検出可能な濃度の sepiapterin は存在しないこと、及び対照動物は被験物質に曝露されなかったことが確認された。

Sepiapterin を単回経口投与した（GD7）後に、100、300 及び 1000 mg/kg の用量でそれぞれ、投与後 7 時間まで、12 時間まで及び 24 時間（最終採血時）まで平均血漿中 sepiapterin 濃度が測定可能であった。Sepiapterin を 1 日 1 回経口で反復投与した（GD19）後に、100、300 及び 1,000 mg/kg の用量でそれぞれ、投与後 2 時間まで、7 時間まで及び 12 時間まで平均血漿中 sepiapterin 濃度が測定可能であった。

GD7 及び GD19 の高血漿中濃度（C_{max}）到達時間（T_{max}）は、用量にかかわらず投与後 1 時間又は 2 時間であった。推定可能であった場合、$T_{1/2}$ は、GD7 では 100、300 及び 1,000 mg/kg でそれぞれ、1.21、2.53 及び 12.8 時間、GD19 では 1,000 mg/kg で 1.16 時間であった。$AUC_{0\text{-last}}$ で定義される sepiapterin 全身曝露量は、GD7 及び GD19 ともに、ほぼ用量に比例して増加した。反復投与後も、sepiapterin の蓄積は認められなかった。GD19 の全身曝露量は GD7 と比較して低く、100、300 及び 1,000 mg/kg の R_{AUC} は、それぞれ 0.505、0.564 及び 0.573 であった。

内因性 BH_4 は対照群のすべての血漿サンプルで測定可能であり、GD7 では 34.1～45.4 ng/mL、GD19 では 22.5～41.7 ng/mL であった。投与前の血漿中 BH_4 濃度は、用量にかかわらず GD7 と GD19 で同程度であり、GD7 では 35.4～51.8 ng/mL、GD19 では 32.5～71.6 ng/mL であった。BH_4 濃度は、すべての用量で投与後 24 時間の最終血液採取時点まで測定可能であった。

GD7 及び GD19 の BH_4 の C_{max} 到達時間（T_{max}）は、用量にかかわらず投与後 1 時間又は 2 時間であった。推定可能な場合、BH_4 の $T_{1/2}$ は、GD7 の 100 及び 300 mg/kg 群でそれぞれ、7.88 及び 5.42 時間、GD19 では 300 及び 1,000 mg/kg 群でそれぞれ、4.73 及び 4.21 時間であった。$AUC_{0\text{-}24h}$ で定義される GD7 及び GD19 の BH_4 全身曝露量は用量の増加に伴い増加し、100 mg/kg/日と 300 mg/kg/日の間ではほぼ用量比例性を示し、300 mg/kg/日と 1,000 mg/kg/日の間では用量比例性を下回っていた。Sepiapterin を反復投与したところ、GD19 の BH_4 全身曝露量は GD7 と比較して低く、GD19／GD7 の比 R_{AUC} は 100、300 及び 1,000 mg/kg でそれぞれ、0.562、0.504 及び 0.519 であった。

GD7 及び GD19 の両日とも、BH_4 全身曝露量は sepiapterin よりも高かった。

GD7 及び GD19 に採取した血液サンプルのノンコンパートメント TK 解析の結果の概要を Table 24 及び Table 25 に示す。

Table 24. 妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を経口投与したときの sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-006 試験）

群	用量（mg/kg/日）	GD	中央値	平均値		
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
2	100	7	1.0	356	969	1.21
3	300	7	1.0	805	3,350	2.53
4	1,000	7	2.0	1,530	8,460	12.8
2	100	19	1.0	403	636	NC
3	300	19	2.0	558	1,750	NC
4	1,000	19	2.0	1,140	4,890	1.16

略語：AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、GD＝妊娠日齢、NC＝計算せず
出典：PTC923-2021-006 試験報告書、本文中の表 2 及び本文中の表 3

Table 25. 妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を経口投与したときの BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-006 試験）

群	用量（mg/kg/日）	GD	中央値	平均値		
			T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
2	100	7	1.0	1,600	8,510	7.88
3	300	7	2.0	3,720	24,100	5.42
4	1,000	7	2.0	4,380	39,100	NRR
2	100	19	2.0	1,210	4,780	NRR
3	300	19	2.0	2,160	12,200	4.73
4	1,000	19	2.0	2,840	20,300	4.21

略語：AUC＝濃度-時間曲線下面積、AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、GD＝妊娠日齢、NRR＝報告可能な結果なし、R^2＝決定係数
注：R^2 が 0.8 未満及び／又は無限大時間まで外挿した AUC が総面積の 20%超であった場合、NRR と表示した。
出典：PTC923-2021-006 試験報告書、本文中の表 4 及び本文中の表 5

8.3.2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

PTC923-2021-024 試験（モジュール 2.6.7、表 2.6.7.13B）

この雌ウサギを用いた胚・胎児発生に関する GLP 試験の目的は、GD7～GD19 の器官形成期の妊娠ウサギに sepiapterin を投与したときの母体毒性及び胚・胎児発生に対する潜在的影響を検討し、sepiapterin 及びその活性代謝物 BH_4 の TK プロファイルを明らかにすることであった。試験デザイン及び毒性データは、モジュール 2.6.6、6.2.4 項に示す。

6～7 ヵ月齢の交配時期を合わせた妊娠ニュージーランド白色［Hsd:Hra(NZW)SPF］雌ウサギの各群に、対照溶媒（Oral Mix）並びに sepiapterin を 100、300 及び 1,000 mg/kg/日の用量で、GD7～GD19 まで 1 日 1 回胃チューブを用いて経口投与した。

GD7 及び GD19 の投与前、投与後 4 時間に対照群の動物から、並びに、投与前、投与後 0.5、1、2、4、7、12 及び 24 時間に、sepiapterin 投与群の動物から血液サンプルを採取した。血漿を回収する前に、血液サンプルを直ちに 10%アスコルビン酸（100：11.1 比、v/v）と混合して、sepiapterin 及

び BH_4 を安定化させた。血漿中の sepiapterin 及び BH_4 の測定には、両分析対象物質の LLOQ を 11.1 ng/mL とする HPLC-MS/MS を用いた（PTC923-2021-016 試験、2.2.5 項）。

Sepiapterin 及び BH_4 のトキシコキネティクスパラメータをそれぞれ Table 26 及び Table 27 に要約する。

Table 26. 雌妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を 100、300 及び 1000 mg/kg で経口投与したときの血漿中 sepiapterin トキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-024）

用量（mg/kg）	GD	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	C_{max}/用量（kg•ng/mL/mg）	T_{last}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}last}$/用量（h•kg•ng/mL/mg）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$/用量（h•kg•ng/mL/mg）	$AUC_{0\text{-}inf}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
100	7	1	345	3.45	7	1,060	10.6	1,100	11.0[a]	NC	NC
300	7	1	669	2.23	12	2,670	8.91	2,800	9.34[a]	2,740	2.10
1,000	7	2	1,240	1.24	24	7,800	7.80	7,800	7.80	8,400	7.99
100	19	1	266	2.66	4	615	6.15	642	6.42[a]	NC	NC
300	19	2	576	1.92	7	1,640	5.47	1,650	5.51[a]	NC	NC
1,000	19	2	707	0.707	12	3,260	3.26	3,340	3.34[a]	NC	NC

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$＝投与後 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、GD＝妊娠日齢、NC＝算出せず、T_{last}＝最終測定可能濃度時点

[a] T_{last} が 24 時間未満の場合は、AUC_{all} を $AUC_{0\text{-}24h}$ として表示した。

出典：PTC923-2021-024 試験報告書、付録-トキシコキネティクス報告書の表 4-1 及び表 4-3

Table 27. 雌妊娠ニュージーランド白色ウサギに sepiapterin を 100、300 及び 1000 mg/kg で経口投与したときの血漿中 BH_4 トキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2021-024）

用量（mg/kg）	GD	T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	C_{max}/用量（kg•ng/mL/mg）	T_{last}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}last}$/用量（h•kg•ng/mL/mg）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$/用量（h•kg•ng/mL/mg）	$AUC_{0\text{-}inf}$（h•ng/mL）	$T_{1/2}$（時間）
100	7	2	1,410	14.1	24	8,180	81.8	8,180	81.8	9,190	9.56
300	7	4	2,550	8.51	24	17,700	59.0	17,700	59.0	NC	NC
1,000	7	4	4,580	4.58	24	35,700	35.7	35,700	35.7	NC	NC
100	19	2	1,020	10.2	24	5,080	50.8	5,080	50.8	5,460	9.58
300	19	2	1,680	5.60	24	9,400	31.3	9,400	31.3	NC	NC
1,000	19	4	2,310	2.31	24	16,300	16.3	16,300	16.3	16,700	4.55

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$＝0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}last}$＝投与後 0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、GD＝妊娠日齢、NC＝算出せず、T_{last}＝最終測定可能濃度時点

出典：PTC923-2021-024 試験報告書、付録-トキシコキネティクス報告書の表 4-2 及び表 4-4

妊娠ウサギの GD7 及び GD19、並びに sepiapterin 投与群の GD7 及び GD19 の投与前血漿中内因性 sepiapterin 濃度は BQL であった。Sepiapterin は経口投与後に速やかに吸収され、投与後 1～2 時間で血漿中 sepiapterin は C_{max} に到達した。GD7 及び GD19 に 100～1,000 mg/kg の用量で投与したところ、血漿中 sepiapterin の $AUC_{0\text{-}last}$ 及び C_{max} のは用量比を下回って増加した。GD7～GD19 に連続投与したところ、sepiapterin 曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$）が低下した。100～1,000 mg/kg/日の用量での $AUC_{0\text{-}last}$ の GD19／GD7 の比は 0.419～0.614 であった。

妊娠ウサギの GD7 及び GD19 では、内因性 BH_4 は測定可能であった。ベースライン BH_4 濃度の平均値（SD）は、対照群で 25.9（7.52）ng/mL、投与群で 38.1（11.3）ng/mL であった。

Sepiapterin は投与後速やかに吸収され、速やかかつ広範に BH_4 に変換された。Sepiapterin を単回投与及び反復投与したときの BH_4 曝露量は、用量の増加に伴って増加した。BH_4 の最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は投与後 2～4 時間であった。BH_4 の終末相の $T_{1/2}$ は、算出可能な場合、4.6～9.6 時間であった。

BH_4 の $AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} は、100～1,000 mg/kg の範囲で用量比を下回って増加した。用量を 100 mg/kg/日から 300 mg/kg/日に 3 倍増加させると、BH_4 の $AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} は 1.64～2.16 倍増加した。用量を 100 mg/kg/日から 1,000 mg/kg/日に 10 倍増加させると、BH_4 の $AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} は、2.25～4.36 倍増加した。

GD7～GD19 に連続投与したところ、BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はすべての用量で低下した。$AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} の GD19/GD7 比は、0.457～0.724 であった。100～1,000 mg/kg/日の用量で 13 日間連日投与したところ、BH_4 の蓄積は認められなかった。

$AUC_{0\text{-}24h}$ の BH_4／sepiapterin 比は、試験日及び投与した sepiapterin の用量に関係なく 4.50～8.12 であった。C_{max} の BH_4／sepiapterin 比は、試験日及び投与した sepiapterin の用量に関係なく 2.87～4.03 であった。

8.4　幼若ラットの反復投与毒性試験のトキシコキネティクス

新生仔ラットの PND4～PND9 に、非 GLP 試験（PTC923-2020-005）では、対照溶媒（Oral Mix）及び sepiapterin を 100 mg/kg の用量で、GLP 試験（PTC923-2020-006）では対照溶媒（Oral Mix）及び sepiapterin を 10、30 及び 100 mg/kg/日の用量で投与した。

GLP 試験（PTC923-2023-045）では、幼若 Sprague Dawley ラットに PND4～PND70 まで sepiapterin を連日反復投与したときの sepiapterin 及び BH_4 のトキシコキネティクスを検討した。

8.4.1　新生児 Sprague Dawley ラットの 6 日間強制経口投与パイロット忍容性試験（非 GLP）

PTC923-2020-005 試験（モジュール 2.6.5、表 2.6.5.16A）

本非 GLP 試験の目的は、新生児 Sprague Dawley ラットに PND4～PND9 の間 1 日 1 回 6 日間反復強制経口投与したときの忍容性及び TK プロファイルを明らかにし、以降の試験の用量を決定することであった。

Sprague Dawley ラットの雌雄新生児を母動物とともに試験に組み入れた。新生仔には、PND4～PND9 の間、対照溶媒の Oral Mix（第 1 群）又は sepiapterin 100 mg/kg（第 2 群）を連日強制経口投与した。試験デザインを Table 28 に示す。

Table 28. 新生児 Sprague Dawley ラットの非 GLP 6 日間強制経口投与試験の試験デザイン（ PTC923-2020-005 試験）

群	被験物質	用量（mg/kg）	投与濃度（mg/mL）	投与容量（mL/kg）	動物数 PK／投与後予備	
					雄	雌
1	溶媒 [a]	0	0	5	3/2	3/2
2	Sepiapterin	100	20		15/9	15/9

略語：PK＝薬物動態
[a] 溶媒は ORAL MIX™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup であった。
注：血液サンプルは、対照群では投与後 4 時間、sepiapterin 投与群では投与前、投与後 2、4、6 及び 12 時間に各時点につき 3 匹から採取した。
出典：PTC923-2020-005 試験報告書、本文中の表 1

PND9 に投与後 12 時間まで血液サンプルを採取し、血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の TK 評価に使用した。10%アスコルビン酸を 1：10（v/v）の割合で直ちに血液に添加し、サンプル中の sepiapterin 及び BH_4 を安定化させた。Sepiapterin 及び BH_4 の LLOQ を 11.1 ng/mL とするバリデートされた HPLC-MS/MS を用いて、血漿中濃度を測定した（2.2.2 項）。

測定可能な血漿中濃度が得られたサンプルは極めて限られていたため、sepiapterin の TK パラメータは推定しなかった。血漿中濃度データのトキシコキネティクス解析は、BH_4 に限定した。

PND9 の対照群動物のすべての血漿サンプルでは、内因性レベルに相当すると考えられる定量可能な濃度の BH_4 が検出され、その範囲は 59.5～103 ng/mL であった。PND9 の投与前の血漿中 BH_4 濃度は、sepiapterin 100 mg/kg/日群で 292～1,090 ng/mL であり、対照群の内因性濃度より高値であった（対照群の 3～18 倍に相当）。血漿中 BH_4 の C_{max} 到達時間（T_{max}）は、雄で投与後 4 時間、雌で投与後 6 時間であった。投与後 0 時間から 12 時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}12h}$）及び補完した $AUC_{0\text{-}24h}$（24 時間の濃度を投与前濃度で補完）は、雌雄新生児を合わせるとそれぞれ 80,300 及び 113,000 h•ng/mL であった。曝露量に雌雄間で顕著な差は認められなかった。TK パラメータは Table 29 に示す。

Table 29. 新生児 Sprague　Dawley ラットに sepiapterin を生後 4 日目～生後 9 日目まで強制経口投与したときの生後 9 日目における BH_4 のトキシコキネティクスパラメータのまとめ（PTC923-2020-005 試験）

用量（mg/kg/日）	中央値			平均値								
	T_{max}（時間）			C_{max}（ng/mL）			$AUC_{0\text{-}12h}$（h•ng/mL）			$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）[a]		
	M	F	M・F	M	F	M・F	M	F	M・F	M	F	M・F
100	4	6	6	9,420	11,300	10,000	72,800	87,800	80,300	101,000	125,000	113,000

略語：$AUC_{0\text{-}12h}$＝投与後 0 時間から 12 時間までの濃度-時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、F＝雌、M＝雄
[a] 投与前の血漿中濃度値を用いて投与後 24 時間の濃度値を推定した。
注：M・F は雌雄を合わせたものである。
出典：PTC923-2020-005 試験報告書、本文中の表 5

8.4.2 新生児 Sprague Dawley ラット 6 日間強制経口投与トキシコキネティクス試験（GLP）

PTC923-2020-006 試験（モジュール 2.6.7、表 2.6.7.15A）

本 GLP 試験の目的は、新生児 Sprague Dawley ラットに PND4 から PND9 まで 1 日 1 回 6 日間 sepiapterin を反復強制経口投与したときの sepiapterin の TK プロファイルを明らかにすることであった。試験デザイン及び毒性データは、モジュール 2.6.6、6.4.1 項に示す。

雌雄 Sprague Dawley ラットの新生児に、PND4 から PND9 まで 6 日間、0 mg/kg の溶媒（香料を添加した懸濁溶媒 Oral Mix、第 1 群）又は 10 mg/kg（第 2 群）、30 mg/kg（第 3 群）若しくは 100 mg/kg（第 4 群）の sepiapterin を 1 日 1 回強制経口投与した。

PK 評価用の血液サンプルは、PND4 及び PND9 の対照群では投与前及び投与後 2 時間、並びに投与群では、投与前、投与後 0.5、1、2、4、8、12 及び 24 時間に採取した。血漿を回収する前に、血液サンプルを直ちに 10%アスコルビン酸で処理して sepiapterin 及び BH_4 を安定化させた。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の測定には、両分析対象物質の LLOQ を 11.1 ng/mL とするバリデートされた HPLC-MS/MS を用いた（PTC923-2021-001 試験、2.2.2 項）。

Sepiapterin の TK 解析：sepiapterin の TK パラメータを Table 30 に要約する。

PND4 の対照群の全動物及び sepiapterin 投与群の投与前サンプルにおける内因性 sepiapterin 濃度は BQL（LLOQ：11.1 ng/mL）であった。Sepiapterin 全身曝露量は、性別とは無関係であるように見えた。Sepiapterin の T_{max} は、投与後 0.5 時間～1.0 時間であった。

PND4 及び PND9 の sepiapterin の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、用量の増加に伴い増加した。PND4 に sepiapterin の用量を 3 倍に増加したところ（10 mg/kg/日から 30 mg/kg/日）、sepiapterin の C_{max} 値が約 5.3 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}24h}$ 値は約 4.6 倍増加した。一方、sepiapterin の用量を 3.3 倍に増加すると（30 mg/kg/日から 100 mg/kg/日）、sepiapterin の C_{max} 値は約 2.2 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}24h}$ 値は約 4.9 倍増加した。PND9 に sepiapterin の用量を 3 倍に増加したところ（10 mg/kg/日から 30 mg/kg/日）、sepiapterin の C_{max} 値は約 1.5 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}last}$ 値は約 4.7 倍増加した。一方、sepiapterin の用量を 3.3 倍に増加すると（30 mg/kg/日から 100 mg/kg/日）、C_{max} 値は約 8.9 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}last}$ 値は約 5.0 倍増加し、$AUC_{0\text{-}24h}$ 値は約 5.1 倍に増加した。

PND4 における sepiapterin の $T_{1/2}$ は、10、30 及び 100 mg/kg/日でそれぞれ 2.03、6.39 及び 2.89 時間であった。PND9 の血漿中 sepiapterin 濃度-時間のデータ数が不十分であったため、sepiapterin の $T_{1/2}$ 値は決定しなかった。ただし、T_{last} 値は、PND9（10、30 及び 100 mg/kg でそれぞれ 4、8 及び 12 時間）の方が、PND4（それぞれ 8、12 及び 12 時間）に比べて概ね短時間であった。PND9 にはより速く sepiapterin 濃度が LLOQ 未満となり、有効な $T_{1/2}$ データが少なかったのだろうと予想することは、妥当である。

Table 30. 新生児 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を連日強制経口投与したときのベースライン値で補正した sepiapterin のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2020-006 試験）

群	用量（mg/kg/日）	PND	性別	中央値	平均値	
				T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	AUC_{0-24h}（h•ng/mL）
2	10	4	M	0.5	73.3	164
		4	F	0.5	45.3	103
		4	M・F	0.5	59.3	133
3	30	4	M	0.5	274	727
		4	F	0.5	359	480
		4	M・F	0.5	317	606
4	100	4	M	1.0	687	3,330
		4	F	1.0	734	2,610
		4	M・F	1	711	2,990
2	10	9	M	0.5	181	NA
		9	F	0.5	148	NA
		9	M・F	0.5	165	NA[a]
3	30	9	M	0.5	176	NA
		9	F	0.5	328	NA
		9	M・F	0.5	252	607
4	100	9	M	0.5	3,380	2,750
		9	F	0.5	1,120	3,450/3,470[b]
		9	M・F	0.5	2,250	3,100/3,110[b]

略語：$\%AUC_{Extrap}$＝最終測定可能濃度時点から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積（%）、AUC＝濃度-時間曲線下面積、AUC_{0-24h}＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、F＝雌、M＝雄、NA＝該当せず、PND＝出生後日数、R^2＝決定係数
[a] $\%AUC_{Extrap}$ が 25%を超えたため、AUC_{0-24h} は報告しなかった。
[b] 初回の値にはすべての血漿が含まれたが、2 回目の値は、投与後 8 時間の雌 1 匹の血漿を除外した。
注：M・F は雌雄のデータを合わせた値である。
測定値が 3 回の連続した定量可能な濃度未満であった場合に ND と表示した。
出典：PTC923-2020-006 試験報告書、付録 7（トキシコキネティクス報告書）の表 1 及びトキシコキネティクス報告書、付録 1 の表 13

BH_4 の TK 解析：ベースライン値で補正した BH_4 の TK パラメータを Table 31 に要約する。

血漿中内因性 BH_4 濃度は、PND4 の投与群の動物から得られたすべての投与前サンプル並びに PND4 及び PND9 の対照群から得られたすべてのサンプルで検出された。PND4 及び PND9 の対照群における内因性 BH_4 濃度の平均値（SD）は、それぞれ 66.6（16.4）及び 83.2（16.0）ng/mL であり、全体の平均値（SD）は 70.4（17.6）ng/mL であった。Sepiapterin 投与群では、PND4 と比較して PND9 の投与前 BH_4 濃度が高く、また、用量が高いほど高値になったことから、新生児に反復投与したときは、BH_4 が蓄積することが示唆された。

ベースライン値で補正した BH_4 全身曝露量（ベースライン値は、PND4 又は PND9 で各群の対応する投与前濃度の平均値とした）に性差は認められなかった。BH_4 の C_{max} の雌／雄比は、0.834～1.33、及び AUC_{0-24h} の雌／雄比は、0.823～1.21 であった。ベースライン値で補正した BH_4 の終末相 $T_{1/2}$ は、3.85～5.37 時間であった。PND4 及び PND9 では、ベースライン値で補正した BH_4 曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24h}）は、sepiapterin の用量にほぼ比例して増加した。

ベースライン値で補正した BH_4 の平均血漿中濃度の変動を変動係数%（%CV）として評価したところ、用量群間で類似しており、PND4 で 10.9%～265%、PND9 で 12.8%～95.2%であった。PND4

の方が変動が大きかったのは、負のベースライン補正値をパラメータ推定値の 0 に変換した結果であった。これらの値を除外してベースライン値で補正した BH_4 の平均血漿中濃度の変動は、PND4 で 10.9%～83.8%であった。

Table 31. 新生児 Sprague Dawley ラットに sepiapterin を連日強制経口投与したときのベースライン値で補正した BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2020-006 試験）

群	用量（mg/kg）	PND	性別	中央値	平均値	
				T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）
2	10	4	M	4.0	813	7,190
		4	F	4.0	757	6,440
		4	M・F	4.0	788	6,820
3	30	4	M	4.0	2,220	21,700
		4	F	4.0	2,140	20,500
		4	M・F	4.0	2,180	21,100
4	100	4	M	4.0	7,280	75,800
		4	F	4.0	6,070	62,400
		4	M・F	4.0	6,740	69,300
2	10	9	M	4.0	786	8,880
		9	F	4.0	760	9,090
		9	M・F	4.0	774	8,990
3	30	9	M	4.0	2,550	25,200
		9	F	4.0	3,390	30,400
		9	M・F	4.0	2,970	27,800
4	100	9	M	4.0	9,410	90,300
		9	F	4.0	8,340	84,700
		9	M・F	4.0	8,870	87,500/89,800[a]

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、F＝雌、M＝雄、PND＝出生後日数
[a] 初回の値にはすべての血漿が含まれたが、2 回目の値は、投与後 8 時間の雌 1 匹の血漿を除外した。
注：M・F は雌雄のデータを合わせた値である。
出典：PTC923-2020-006 試験報告書、付録 7（トキシコキネティクス報告書）の表 6 及びトキシコキネティクス報告書、付録 1 の表 15

8.4.3 Sepiapterin の幼若ラット 10 週間（強制）経口投与試験及び 4 週間回復性試験

PTC923-2023-045 試験（モジュール 2.6.7、表 2.6.7.15B）

本 GLP 試験の目的は、幼若 Sprague Dawley ラットに PND4～PND70 まで sepiapterin を 1 日 1 回経口投与し、PND98 ぐらいまで 4 週間の回復期間を設けて、sepiapterin の潜在的毒性を評価することであった。

出生後 4 日目のラット 30 匹/性/群からなる 4 群を第 1 期の主試験割り付け、各群 10 匹/性/群とした。第 2 期の回復性試験には、20 匹/性/群を割り付けた。さらに、TK 期には、ラット 184 匹を割り付け、対照群は 8 匹/性/群及び sepiapterin 投与群は 28 匹/性/群とした（Table 32）。用量選択については、モジュール 2.6.6、6.4.2 項で考察する。

Table 32. GLP 試験の TC923-2023-045 試験の試験デザイン

群	投与	用量（mg/kg/日）	投与濃度（mg/mL）	幼若動物数					
				主試験		回復性		TK	
				M	F	M	F	M	F
1	対照 [a]	0	0	10	10	20	20	8	8
2	Sepiapterin	5/30[b]	0.5/3.0[b]	10	10	20	20	28	28
3	Sepiapterin	10/100[b]	1.0/10[b]	10	10	20	20	28	28
4	Sepiapterin	30/300[b]	3.0/30[b]	10	10	20	20	28	28

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積、F＝雌、M＝雄、PK＝薬物動態、PND＝出生後日数、TK＝トキシコキネティクス
[a] 溶媒 ORAL MIX™（香料を添加した懸濁溶媒）/Medisca® Syrup 及び／又は Ora Plus を投与。
[b] 用量は、PND4～PND28 は 5、10 及び 30 mg/kg/日、 PND29～PND70 は 30、100 及び 300 mg/kg/日であった。これは、新生仔ラットを用いた PK 試験（PTC923-2020-006 試験）において、新生仔ラットにおける曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）が同用量（30 mg/kg/日及び 100 mg/kg/日）を投与したときの成熟ラットの曝露量の 10 倍であったことに基づいている。
出典：PTC923-2023-045 試験報告書、本文中の表 1

TK 評価用の血漿サンプルは、PND4 及び PND70 の投与後約 2、4、6、12 及び 24 時間、並びに PND29 の投与後 0（投与前）、2、4、12 及び 24 時間に、TK 試験に割り付けた雌雄仔ラットから採取した。血漿中 sepiapterin 及び BH_4 の測定には、両分析対象物質の LLOQ を 11.1 ng/mL とするバリデートされた HPLC-MS/MS を用いた（PTC923-2021-001 試験、2.2.2 項）。

PND4 の高用量群を除き、sepiapterin 濃度は LLOQ 付近又は未満（LLOQ：11.1 ng/mL 未満）であった（Table 33）。

Table 33. 幼若ラットに sepiapterin を連日経口投与したときのトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2023-045 試験）

群	容量（mg/kg）	PND	性別	中央値	平均値		
				T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	T_{last}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）
4	30	4	F	2.0	681	12	1,530
			M	6.0	105	12	451

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝0 時点から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、F＝雌、M＝雄、PND＝出生後日数、T_{last}＝最終測定可能濃度時点
出典：PTC923-2023-045 試験報告書、本文中の表 13

すべてのラットで BH_4 全身曝露の証拠が認められ、対照動物では内因性 BH_4 濃度が測定可能であった。全体として、BH_4 の平均 T_{max} 値に用量依存性は認められなかった（Table 34）。

ベースライン値で補正した BH_4 の AUC は、評価した全用量範囲（5～30 mg/kg）において、雄ラットでは用量に比例して増加し、雌ラットでは用量比を上回って増加した。PND4 に雌雄幼若ラットにおいて用量を 6 倍増加（5 mg/kg から 30 mg/kg）したところ、雌雄併合ベースライン値で補正した BH_4 の C_{max} 値は、雌で 16 倍及び雄では 4.1 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}last}$（又は $AUC_{0\text{-}24h}$）値は、それぞれ 14 倍及びは 5.5 倍増加した。

雌ラットでは、PND4 の AUC 値は、5 mg/kg と 10 mg/kg の間では用量に比例して増加したが、10 mg/kg と 30 mg/kg の間では用量比を上回って増加した。ただし、30 mg/kg 投与群の個体間変動は他の用量群に比べて大きかった（第 4 群の雌ラットにおける投与後 2 及び 6 時間の各 1 つの濃度が、同群の他の測定値よりそれぞれ、約 12 倍及び約 6.5 倍高かった）ため、データ解釈には注意が必要である。

雌雄ラットにおいて、PND29 のベースライン値で補正した BH_4 曝露量は、概ね用量に比例して増加し、PND70 には、ベースライン値で補正した BH_4 曝露量は、概ね用量比を下回って増加した。

- PND29 に雌雄幼若ラットにおいて用量を 3 倍増加（100 mg/kg から 300 mg/kg）したところ、雌雄併合ベースライン値で補正した BH_4 の C_{max} 値は、雌では 2.3 倍、及び雄では 2.2 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}last}$（又は $AUC_{0\text{-}24h}$）値は、それぞれ 2.2 倍及び 2.1 倍増加した。これらのデータは、曝露量がほぼ用量に比例して増加したことを示す。
- PND70 に雌雄幼若ラットにおいて用量を 10 倍増加（30 mg/kg から 300 mg/kg）したところ、雌雄併合ベースライン値で補正した BH_4 の C_{max} 値は、雌では 3.9 倍及び雄では 2.5 倍上昇し、$AUC_{0\text{-}last}$（又は $AUC_{0\text{-}24h}$）値は、それぞれ 5.4 倍及び 3.6 倍増加した。これらのデータは、曝露量は用量比を下回って増加したことを示す。

一般に、PND70 の AUC 値は PND29 の AUC 値よりも低く、幼若ラットの雌雄の AUC 値の差は 2 倍以内であったことから、曝露量に一定の性差はないことが示唆された。

Table 34. 幼若ラットに Sepiapterin を連日経口投与したときのベースライン値で補正した BH_4 のトキシコキネティクスパラメータ（PTC923-2023-045 試験）

群	容量（mg/kg）	PND	性別	中央値	平均値		
				T_{max}（時間）	C_{max}（ng/mL）	T_{last}（時間）	$AUC_{0\text{-}last}$（h•ng/mL）
2	5	4	F	4.0	244	24	2,710
			M	6.0	351	24	3,770
3	10	4	F	4.0	598	24	6,710
			M	6.0	695	24	6,640
4	30	4	F	6.0	3,960	24	38,800
			M	6.0	1,430	24	20,900
3	100	29	F	4.0	1,890	24	13,400
			M	4.0	1,750	24	12,800
4	300	29	F	4.0	4,400	24	29,800
			M	4.0	3,790	24	26,600
2	30	70	F	2.0	434	24	1,710
			M	2.0	670	24	2,830
3	100	70	F	2.0	1,360	6.0	4,580
			M	2.0	1,320	24	7,300
4	300	70	F	2.0	1,700	24	9,220
			M	2.0	1,680	12	10,200

略語：$AUC_{0\text{-}last}$＝0 時点から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、F＝雌、M＝雄、PND＝出生後日数、TK＝トキシコキネティクス、T_{last}＝最終測定可能濃度時点
注：対照動物における BH_4 の存在を補正するために、各試験日のベースライン値は、すべての TK 解析から除外した。
出典：PTC923-2023-045 試験報告書、本文中の表 15

9. 考察及び結論

広範かつ頑健な代謝、PK 及び TK 試験を in vitro 及び複数の動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ、マーモセット、カニクイザル）を用いて実施した。血漿中だけでなく、肝臓、腎臓、脳及び尿中の sepiapterin 及び BH_4 を測定する HPLC-MS/MS 及び HPLC-蛍光・電気化学検出法を開発した。マウス、ラット、ウサギ及びマーモセットを用いた GLP 適合毒性試験には、血漿中 sepiapterin 及び BH_4 測定するために開発し完全にバリデートした HPLC-MS/MS を用いた。LLOQ は、マウス、ラット、ウサギ及びマーモセットの血漿中における sepiapterin 及び BH_4 の PK 及び TK を評価するのに十分な値であった。試験動物から K_2EDTA 入の試験管に血液サンプルを採取した。分析対象物質を安定化させるため、適量の 10%アスコルビン酸水溶液を直接血液又は血液から回収した直後の血漿であれば血漿に添加した。

吸収及び一般特性

内因性 sepiapterin は、試験したすべての非臨床動物種で測定不能であったが、内因性 BH_4 はほとんどの動物種で（sepiapterin 投与後の BH_4 濃度と比較すると無視できるレベルではあるものの）概ね測定可能であった。マウス、ラット（妊娠雌ラットを含む）、ウサギ、イヌ、マーモセット及びカニクイザルに経口投与したところ、sepiapterin は速やかに吸収された（T_{max} は概ね投与後 2 時間以内であった）。マウス、ラット及びカニクイザルでは、sepiapterin 投与後の血漿中 sepiapterin 濃度は BQL 又は LLOQ 付近であった。血漿中 sepiapterin は測定可能であったものの、一般に BQL まで速やかに減少し、イヌ及び妊娠雌ウサギを除き、消失 $T_{1/2}$ は信頼できる推定ができなかった（マウス、ラット及びマーモセット）。吸収された sepiapterin は、検討したすべての動物種で速やかに BH_4 に変換された。マウス、ラット、マーモセット及びカニクイザルでは、C_{max} 及び AUC の sepiapterin／BH_4 の比は、概ね 5%未満であった。イヌ及びウサギでは変換速度が遅く、血漿中の sepiapterin は測定可能であった。Sepiapterin／BH_4 の比は、イヌでは C_{max} で最大 112%、$AUC_{0\text{-}24h}$ で最大 40%であった。また、妊娠雌ニュージーランド白色ウサギでは C_{max} で最大 40%、$AUC_{0\text{-}24h}$ で最大 24%であった。

血漿中 BH_4 の T_{max} は、すべての動物種で経口投与後概ね 1～4 時間であった。BH_4 の見かけの血漿中 $T_{1/2}$ は、概ね 6 時間未満であった。BH_4 の曝露量に明らかな性差は認められなかった。マウス、ラット及びサルを用いた複数の試験で、BH_4 の C_{max} 及び AUC の増加は用量比を下回った。

マウスでは内因性 sepiapterin は検出されなかった（LLOQ 10 ng/mL）。内因性 BH_4 は 34～73 ng/mL の範囲であり、雌でわずかに高濃度であった。野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウスに sepiapterin を反復投与したところ、投与 1～3 時間後に sepiapterin の C_{max} が認められ、血漿中濃度は概ね 24 時間前に BQL まで低下した。経口投与後、sepiapterin は速やかに吸収され、BH_4 に変換された。Sepiapterin の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は BH_4 の 6%であった。BH_4 の C_{max} は概ね投与 3 時間後に認められた。Sepiapterin への曝露は雄よりも雌で高い傾向があったが、BH_4 の曝露量に性差はなかった。30 mg/kg/日以上の用量では、BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量比例性を下回る増加を示し、300 mg/kg 以上の用量では BH4 の曝露量の増加は本質的にほとんどなかった。Sepiapterin の反復経口投与後、4,000 mg/kg まではマウスにおいて BH_4 の蓄積はほとんどみられなかった。

ラットでは内因性 BH_4 濃度は、34～41 ng/mL の範囲であった。ラットに連日反復投与したところ、14 日間及び 26 週間試験では BH_4 の明らかな蓄積は認められなかったが、13 週間試験では軽度の蓄積が認められた。BH_4 曝露量は、30～100 mg/kg では、ほぼ用量に比例して増加し、100 mg/kg を超える用量では、曝露量の増加は用量比を下回った。サルでは、内因性 BH_4 濃度は概ね 52.9～73.6 ng/mL の範囲であった。Sepiapterin 反復投与後の BH_4 曝露量は、30～100 mg/kg では、ほぼ用量に比例して増加し、100 mg/kg を超える用量では、曝露量の増加は用量比を下回った。

新生児ラットでは、成熟ラットと比較して、PND4 及び PND9 で内因性 BH_4（59.5～103 ng/mL）が高かった。成熟ラットと同様に、sepiapterin から BH_4 への変換は広範であり、$AUC_{0\text{-}24h}$ の BH_4／sepiapterin の比は約 23.7～63.7 であった。6 日間反復投与では、10 mg/kg 及び 100 mg/kg の用量では、sepiapterin の C_{max} は約 3 倍増加したが、30 mg/kg の用量ではほぼ同じであった。投与前の BH_4 濃度は PND4～PND9 まで上昇し、新生児における BH_4 の蓄積性が示唆された。ただし、sepiapterin を反復投与したところ、ベースライン値で補正した BH_4 の全身曝露量（C_{max} 値と $AUC_{0\text{-}24h}$ 値）に明らかな変化が認められなかったことから、BH_4 のクリアランスの上昇が確認された。PND9 における BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、成熟ラットに体重換算で同じ用量の 30 mg/kg 及び 100 mg/kg を 91 日間反復投与したときのそれぞれ約 5 倍及び約 9 倍であった。

妊娠雌 Sprague Dawley ラット及び New Zealand 白色ウサギでは、他の非臨床試験で使用した動物種と同様に、sepiapterin は速やかに吸収され、広範囲で BH_4 に変換された。Sepiapterin は反復投与後の BH_4 曝露量は、GD7 と比較して GD17 又は GD19 で低かった。他の非臨床 PK 試験と同様に、BH_4 の曝露量の増加は用量比を下回った。

妊娠ウサギでは、GD7 及び GD19 の血漿中内因性 sepiapter 濃度は BQL であった。Sepiapterin は経口投与後速やかに吸収され、広範に BH_4 に変換された。$AUC_{0\text{-}24h}$ の BH_4／sepiapterin 比は、試験日及び投与した sepiapterin の用量に関係なく 4.50～8.12 であった。妊娠ウサギの GD7 及び GD19 では、内因性 BH_4 は測定可能であった。BH_4 の最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は投与後 2～4 時間であった。BH_4 の終末相の $T_{1/2}$ は、算出可能な場合、4.6～9.6 時間であった。BH_4 の $AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} は、100～1000 mg/kg の範囲で用量比を下回って増加した。GD7～GD19 に連続投与したところ、BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はすべての用量で低下し、$AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} の GD19／GD7 比は、0.457～0.724 であった。100～1,000 mg/kg/日の用量で 13 日間連日投与したところ、BH_4 の蓄積は認められなかった。

分布

0.1% DTT の存在下 pH 7.31～7.71（インキュベート後）では、0.1～10 μM の濃度で sepiapterin のヒト血漿タンパクへの結合率は低かった（平均 15.4%）。0.5% β-メルカプトエタノールの存在下、pH 7.2 で BH_4 を安定化させたときの BH_4 のヒト血漿タンパク結合率は、2、5、及び 15μM の sepiapterin で中程度～低度（平均血漿タンパク結合率は、それぞれ 41.3%、33.0%、及び 24.1%）であった。

マウスに sepiapterin を経口投与したところ、血漿、肝臓、腎臓、脳中の BH_4 濃度が有意に上昇し、同程度の用量で BH_4 を投与したときよりも、sepiapterin を投与したときの方が BH_4 濃度が高かった。

LE ラットに[^{14}C]-sepiapterin を単回経口投与したところ、[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は全身に広く分布し、ほとんどの組織で投与後 4～8 時間に最高濃度に達した。投与後 168 時間では、大部分の組織で放射能濃度は BQL（0.0703 µg eq/g 未満）であった。組織の約 63%で組織／血漿比が 1.00 を超えた。内分泌系及び代謝/排泄系の組織、及び消化管の組織に[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能が最も多く分布していた。特定の時点で CNS 組織に測定可能な分布が認められたが、これら組織中の放射能濃度は低く、組織／血漿比は 1 以下であった。投与後 48 時間までにすべての CNS 組織の総放射能は BQL となった。

代謝

マウス、ラット、マーモセット及びカニクイザルでは、sepiapterin は速やかかつ広範に BH_4 に代謝された。血漿中 sepiapterin 濃度は LLOQ 未満か、又は BQL まで速やかに低下し、sepiapterin の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ は、概ね代謝物 BH_4 の値の 5%未満であった。Sepiapterinha の代謝は、プテリンサルベージ経路内で一方向の 2 段階還元で、主として SR（補助的に CR が関与する可能性が高い）及び DHFR によって行われ BH_4 が生成される（Smith 2019）。イヌ及びウサギでは sepiapterin から BH_4 への変換が遅く、AUC の sepiapterin／BH_4 比率（%）は 24%以上であった。

外因性の Sepiapterin により生成された BH_4 は、内因性 BH_4 と同様に、芳香族アミノ酸の触媒的水酸化の際に酸化される。PAH、TH、TPH、AGMO 及び NOS の補酵素として働きながら、この過程で BH_4 は酸化される。BH_4-OH のように、この過程で生成された代謝物の一部は、PCD と DHPR を介することで BH_4 を再生するためにリサイクルされる可能性がある（Figure 2）（Werner 2011）。BH_2、キサントプテリン、イソキサントプテリン、XH_2、ルマジン類、及びその他のプテリジン誘導体などのさらなる代謝物が報告されている（Nichol 1985, Sawabe 2008, Rasmussen 2022）。PTC が実施したラット、ミニブタ、サル及びヒトの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた[^{14}C]sepiapterin 代謝の in vitro 試験では、文献で報告されているものと同様の代謝経路が認められ、BH_4、BH_2、D-/L-ビオプテリン、XH_2、M269/1、M269/2 及び M235/2 が生成された。

酵素 SR、DHFR、PCD 及び DHPR の mRNA は広く分布しているため、sepiapterin の代謝は様々な組織で起こるが、酵素の分布及び活性が特に高い臓器は、肝臓、腎臓、腸、副腎及び脳である。

ラット及びサルの in vivo では、sepiapterin は広範に代謝された。主要な代謝経路には、酸化／脱水素化、還元／水素化、酸化的脱アミノ化、脱水、側鎖切断、メチル化などが単独又は複合的に関与していた。ラット、サル及びヒトにおける主要代謝経路はほぼ同様であった。

ラットに[^{14}C]-sepiapterin 100 mg/kg を単回経口投与したところ、循環血中の放射能に占める未変化体の割合は小さく、TRA の血漿中 $AUC_{0\text{-}last}$ の 0.91%を占めた。循環血漿中に最も多く存在する代謝物は、M269/1 及び M269/2（おそらく BH_4 付加体/アーチファクト）で、血漿中 TRA $AUC_{0\text{-}last}$ の 39.4%を占めた。カニクイザルに[^{14}C]-sepiapterin 50 mg/kg を単回経口投与したところ、循環血中の

放射能に占める未変化体の割合は小さく、循環血漿中の主要代謝物は M381/1 で、TRA の血漿中 $AUC_{0\text{-}48h}$ の 16.1%を占めた。

サル及びヒトに[^{14}C]-sepiapterin を経口投与したところ、血漿中放射能の抽出率が低かったことで示されたように、内因性物質としての sepiapterin 及びその代謝物は、他の生体分子の生合成にも関与していると考えられる。

排泄

ラット及びカニクイザルに[^{14}C]-sepiapterin を経口投与したところ、尿中から回収されたのは TRA のうちのわずかな部分で（ラットで 9.21%、サルで 7.1%）、投与量の大部分は投与後 168 時間までに糞中に回収された（ラットで 84.7%、サルで 31.1%）。BDC Sprague Dawley ラットでは、胆汁を介して排泄されたのは極めて少量（投与量の 0.57%）であった。カニクイサル及びヒトでは[^{14}C]-sepiapterin 経口投与後のマスバランス回収率が低く、ヒト腸内細菌叢における in vitro 試験でも示されたように、揮発性代謝物の生成が示唆された。

薬物相互作用

In vitro で、sepiapterin は 50.0 μM までの濃度で、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 を阻害しない。また、sepiapterin は 10 μM までの濃度で、ヒト CYP450 1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しない。

トランスポーター試験では、sepiapterin は BCRP（IC_{50}：647.7 μM）を阻害し、OATP1B1（3000 μM で 25%阻害）、ENT1（IC_{50}：2377 mM）及び ENT2（IC_{50}：1180 mM）をわずかに阻害する。In vitro では、sepiapterin は MDR1（P-gp）の基質ではないが、高濃度（3000 mM）では ENT2 の基質となる可能性がある。

In vitro で、BH_4 は、BCRP の基質かつ阻害剤であり（IC_{50}：778.4 μM）、MDR1 の基質かつ阻害剤であった（IC_{50}：992.9 μM）。

総括

まとめると、sepiapterin 及びその代謝物 BH_4 の吸収、PK、分布、代謝、排泄及び PK 薬物相互作用の特性を検討するために、広範な in vitro 及び in vivo 試験を実施した。これらの結果から、これまでに得られている非臨床での有効性及び安全性の知見の解釈を強化する情報が得られた。これらのデータは一貫しており矛盾がないことから、非臨床試験の動物種からヒトへの PK 及び薬物代謝の推定が可能である。実験動物において、小児及び成人 PKU 患者の治療薬としての sepiapterin の臨床使用を妨げるような sepiapterin 及び BH_4 の PK、TK 及び代謝動態特性は認められないと結論する。

10. 参考文献

Hoshiga, M, Hatakeyama, K, Watanabe, M, Shimada, M and Kagamiyama, H. Autoradiographic Distribution of [^{14}C]tetrahydrobiopterin and Its Developmental Change in Mice. J Pharmacol Exp Ther 1993;267(2):971-978.

Nichol, C, Smith, G and Duch, D. Biosynthesis and Metabolism of Tetrahydrobiopterin and Molybdopterin. Ann. Rev. Biochem. 1985;54:729-764.

Ohashi, A, Sugawara, Y, Mamada, K, Harada, Y, Sumi, T, Anzai, N, et al. Membrane Transport of Sepiapterin and Dihydrobiopterin by Equilibrative Nucleoside Transporters: A Plausible Gateway for the Salvage Pathway of Tetrahydrobiopterin Biosynthesis. Mol Genetics Metab 2011;102(1):18-28.

proteinatlas.org. "The Human Protein Atlas." 2024, from http://www.proteinatlas.org.

Rasmussen, L, Foulks, Z, Burton, C and Shi, H. Establishing Pteridine Metabolism in a Progressive Isogenic Breast Cancer Cell Model. Metabolomics 2022;18(2). https://doi.org/10.1007/s11306-021-01861-9.

Sawabe, K, Wakasugi, KO and Hasegawa, H. Tetrahydrobiopterin Uptake in Supplemental Administration: Elevation of Tissue Tetrahydrobiopterin in Mice Following Uptake of the Exogenously Oxidized Product 7,8-Dihydrobiopterin and Subsequent Reduction by an Anti-Folate-Sensitive Process. J Pharmacol Sci 2004;96(2):124-133.

Sawabe, K, Yamamoto, K, Harada, Y, Ohashi, A, Sugawara, Y, Matsuoka, H and Hasegawa, H. Cellular Uptake of Sepiapterin and Push-Pull Accumulation of Tetrahydrobiopterin. Mol Genetics Metab 2008;94(4):410-416.

Sawabe, K, Yamamoto, K, Kamata, T, Wakasugi, KO and Hasegawa, H (2002). Sepiapterin Administration Raises Tissue BH4 Levels More Efficiently Than BH4 Supplementation in Normal Mice. In Chemistry and Biology of Pteridines and Folates. S. Milstein, G. Kapatos, R. A. Levine and B. Shane; Boston, Springer**:**199-204.

Smith, N, Longo, N, Levert, K, Hyland, K and Blau, N. Phase I Clinical Evaluation of CNSA-001 (Sepiapterin), a Novel Pharmacological Treatment for Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin Deficiencies, in Healthy Volunteers. Mol Genetics Metab 2019;126(4):406-412.

Werner, ER, Blau, N and Thony, B. Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and Pathophysiology. Biochem J 2011;438(3):397-414.

目次

目次 1
略語一覧及び用語の定義 3
2.6.5.1 薬物動態 6
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション 12
2.6.5.3 薬物動態: 単回投与後の吸収 14
2.6.5.3A マウス単回投与後の吸収 14
2.6.5.3B マウス単回投与後の吸収 15
2.6.5.3C マウス単回投与後の吸収 – 血漿、肝、腎、脳組織分布 16
2.6.5.3D ラット単回投与後の吸収 17
2.6.5.3E イヌ単回投与後の吸収 18
2.6.5.3F カニクイサル単回投与後の吸収 19
2.6.5.4 薬物動態: 反復投与後の吸収 20
2.6.5.5 薬物動態: 組織分布 21
2.6.5.5A Organ Distribution After a Single Dose in Mice 21
2.6.5.5B マウス単回投与後の組織分布 23
2.6.5.5C ラット単回投与後の組織分布 24
2.6.5.6 薬物動態: 血漿タンパク結合 27
2.6.5.6A Sepiapterin の血漿タンパク結合 27
2.6.5.6B BH_4 の血漿タンパク結合 27
2.6.5.7 薬物動態: 妊娠中または授乳中の動物試験 28
2.6.5.7A ラットにおける胚胎児発生に関する用量設定試験 28
2.6.5.7B ウサギにおける胚胎児発生に関する用量設定試験 29
2.6.5.8 薬物動態: その他分布試験 30
2.6.5.8A Sepiapterin の双方向透過性 30
2.6.5.8B BH_4 双方向透過性 33
2.6.5.9 薬物動態: In Vivo 代謝 36
2.6.5.9A ラット [^{14}C]-Sepiapterin 単回投与後の代謝 36
2.6.5.9B サル[^{14}C]-Sepiapterin 単回投与後の代謝 38
2.6.5.10 薬物動態: In Vitro 代謝 41
2.6.5.10A 組織 S9 画分における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性 41
2.6.5.10B ヒト腸内細菌叢における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性 43
2.6.5.11 薬物動態: 推定代謝経路 45
2.6.5.11A ラットにおける推定代謝経路 45
2.6.5.11B サルにおける推定代謝経路 46
2.6.5.11C ラット、ミニブタ、サルおよびヒト肝・腎 S9 画分推定代謝経路 47
2.6.5.12 薬物動態: 薬物代謝酵素誘導/阻害 48

2.6.5.12A In Vitro Sepiapterin の Cytochrome P450 酵素誘導 48
2.6.5.12B In Vitro Sepiapterin の Cytochrome P450 酵素阻害 50
2.6.5.13 薬物動態: 排泄 52
2.6.5.13A ラットにおける[^{14}C]-Sepiapterin の単回経口投与による薬物動態、マスバランス及び胆汁中排泄 52
2.6.5.13B カニクイサルにおける[^{14}C]-sepiapterin の単回経口投与による薬物動態及びマスバランス 55
2.6.5.14 薬物動態: 胆汁中排泄 58
2.6.5.14A 胆管カニューレを挿入したラットにおける[^{14}C]-Sepiapterin の単回経口投与による薬物動態、マスバランス及び胆汁中排泄 58
2.6.5.15 薬物動態: 薬物—薬物間相互作用 60
2.6.5.15A トランスフェクト細胞株を使用した、排出トランスポーターおよび取り込みトランスポーターの阻害剤および基質としての Sepiapterin の評価 60
2.6.5.15B トランスフェクト細胞株を使用したヒト SLC トランスポーター ENT1 および ENT2 の阻害剤および基質としての Sepiapterin の評価 64
2.6.5.15C トランスフェクト細胞株を使用した排出トランスポーターおよび取り込みトランスポーターの阻害剤および基質としての BH_4 の評価 66
2.6.5.16 薬物動態: その他 71
2.6.5.16A 新生仔ラットの 6 日間強制経口投与パイロット忍容性試験での吸収 71

略語一覧及び用語の定義

略語又は特殊な用語	用語	説明
%CV	percent coefficient of variation	変動係数%
A-B	apical to basolateral direction	頂端膜側から側底膜側への方向
ABC	adenosine triphosphate-binding cassette	ATP 結合カセット
AIDA	Advanced Image Data Analysis	高度な画像データ解析
AMP	adenosine monophosphate	アデノシン 一リン酸
AOI	areas of interest	関心領域
API	Active Pharmaceutical Ingredient	有効成分
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}8h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 8 hours postdose	投与後 0 時間から 8 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}12h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 12 hours postdose	投与後 0 時間から 12 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose	投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}168h}$	area under the concentration-time curve from time zero to 168 hours postdose	投与後 0 時間から 168 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{–}inf}$	area under the concentration-time curve from time zero extrapolated to infinity	0 時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	area under the concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time	0 時間から定量可能な最終測定時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積
B-A	basolateral to apical direction	側底膜側から頂端膜側への方向
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BDC	bile duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BH_2	7,8 dihydrobiopterin	7, 8-ジヒドロビオプテリン
BH_4	tetrahydrobiopterin	テトラヒドロビオプテリン
BQL	below quantifiable limits	定量限界未満
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CC-02	[redacted]	[redacted]
CC-14	[redacted]	[redacted]
CCK-8	cholecystokinin octapeptide	コレシストキニン オクタペプチド
CNS	central nervous system	中枢神経系
CTD	Common Technical Document	コモンテクニカルドキュメント
CYP	cytochrome P450	チトクロム P450
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DP	drug product	製剤
DTT	dithiothreitol	ジチオスレイトール
$E_2$17βG	estradiol-17-β-glucuronide	エストラジオール-17-β-グルクロン酸抱合体
E3S	estrone-3-sulfate	エストロン-3-硫酸抱合体
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ENT	equilibrative nucleoside transporter	平衡型ヌクレオシドトランスポーター
ER	efflux ratio	排出比

略語又は特殊な用語	用語	説明
ER_{Ctrl}	efflux ratio in mock transfected MDCKII cell monolayers	モックトランスフェクトされた MDCKII 細胞単層における排出比
ER_{Trp}	efflux ratio in transporter expressing MDCKII cell monolayers	トランスポーターを発現させた MDCKII 細胞単層における排出比
GC	gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
GD	gestation day	妊娠日齢
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-MS/MS	high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
K_2EDTA	dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
LC-HR-MS	liquid chromatography with high resolution mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー／高分解能質量分析法
LC-MS	liquid chromatography with mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／質量分析法
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計測法
LY	Lucifer Yellow	ルシファーイエロー
MATE	multidrug and toxin extrusion	多剤排出輸送体
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎臓
MDR1	multidrug resistance protein 1	多剤耐性タンパク質 1
MS	mass spectrometry	質量分析法
NA	not applicable	該当せず
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NC	not calculated	算出せず
ND	not determined/not detected	未確定/検出不能
NMQ	N-methyl quinidine	N-メチル キニジン
NR	not reported	報告なし
NRR	no reportable result	報告可能な結果なし
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting 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
P_{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PND	postnatal day	出生後日数
Preinc	preincubation	プレインキュベーション
qPCR	quantitative (or real-time) polymerase chain reaction	定量的（またはリアルタイム）ポリメラーゼ連鎖反応
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
R^2	coefficient of determination	決定係数
RED	rapid equilibrium dialysis	迅速平衡透析
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SD	standard deviation	標準偏差
SE	standard error	相対誤差

略語又は特殊な用語	用語	説明
SIEM	standard ileal efflux medium	標準回腸排出培地
SLC	solute carrier	溶質輸送体
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{last}	time of last measurable concentration	最終測定可能濃度時点
TRA	total radioactivity	総放射能
UPLC	ultra-performance liquid chromatography	超高パフォーマンス液体クロマトグラフィー
XH_2	7,8-dihydroxanthopterin	7, 8-ジヒドロキサントプテリン

2.6.5.1 薬物動態

The study drug, sepiapterin, previously known as PTC923 and CNSA-001, is a synthetic form of the natural substrate of sepiapterin reductase, a ubiquitous mammalian enzyme, and a natural precursor of tetrahydrobiopterin (BH_4).

Overview: The objectives of the PK studies using sepiapterin were to determine the exposure and tolerability of oral administration of sepiapterin after single doses prior to initiation of nonclinical toxicology studies. Limited and transient exposure to sepiapterin following oral administration, and its rapid conversion to BH_4, a known endogenous substance, does not warrant further investigation of nonclinical distribution and metabolism.					**Test Article:** Sepiapterin and BH_4	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**GLP**	**Study Number**	**eCTD Location**
Absorption – Single Dose						
Absorption – single-dose (sepiapterin and BH_4) study evaluating PK, metabolism, distribution, and excretion	Mouse/ C57BL/6 Male	Oral	[redacted] USA/ [redacted], Canada	Non-GLP	16H0208S-X01/ 6016-2880	4.2.2.3
Absorption – single-dose study evaluating PK of sepiapterin	Mouse/ CD-1, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	CNSA-PK-001-2017	4.2.2.2
Absorption – single-dose study evaluating PK in plasma, liver, kidney, and brain tissues	Mouse/ CD-1, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2023-046	4.2.2.3
Absorption – single-dose bioavailability study evaluating PK of sepiapterin	Rat/ Sprague Dawley, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2020-001	4.2.2.2
Absorption – single-dose bioavailability study evaluating PK of different sepiapterin formulations	Dog/ Beagle, Young adult/ Adult Non-Naïve Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2020-007	4.2.2.2
Absorption – single-dose bioavailability study evaluating PK of different sepiapterin formulations	Monkey/ Cynomolgus, Young adult/ Adult Non-Naïve Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2020-008	4.2.2.2

2.6.5 薬物動態試験概要表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	GLP	Study Number	eCTD Location
Repeat-Dose Studies						
Toxicology repeat-dose Toxicity study – 5-day and 28-day dosing	Mouse/ wild-type CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic, Male and female	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2023-053	4.2.3.2
Repeat-dose 26-week carcinogenicity study	Mouse/CByB6F1 **Carcinogenicity**: CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic **TK**: CByB6F1/J wild type, hybrid non transgenic	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2023-070	4.2.3.4
Toxicology repeat-dose Toxicity study – 14-day dosing with 14-day recovery	Rat/ Sprague Dawley, Male and female	Oral	[redacted] Canada	GLP	CNSA-TOX-001-2017	4.2.3.2
Toxicology repeat-dose toxicity study – 13-week with 28-day recovery	Rat/ Sprague Dawley, Male and female	Oral	[redacted] Canada	GLP	CNSA-TOX-001-2018	4.2.3.2
Toxicology repeat-dose toxicity study – 26-week with 4-week recovery	Rat/ Sprague Dawley, Male and female	Oral	[redacted] Canada	GLP	PTC923-2020-003	4.2.3.2
Toxicology repeat-dose toxicity study – 14-day with 14-day recovery	Monkey/ Marmoset, Male and female	Oral	[redacted] USA	GLP	CNSA-TOX-002-2017	4.2.3.2
Toxicology repeat-dose toxicity study – 13-week with 28-day recovery	Monkey/ Marmoset, Male and female	Oral	[redacted] USA	GLP	CNSA-TOX-002-2018	4.2.3.2
Toxicology repeat-dose toxicity study – 9-month with 4-week recovery	Monkey/ Marmoset, Male and female	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2020-004	4.2.3.2
Organ Distribution						
PK evaluation of samples collected from Study 16H0208S-X01 (sepiapterin and BH_4)	Mouse/ C57BL/6, Male	Oral	[redacted] USA/ [redacted] Canada	Non-GLP	16H0208S-X01/ 6016-2880	4.2.2.3
Single-dose study evaluating PK in plasma, liver, kidney, and brain tissues	Mouse/ CD-1, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2023-046	4.2.2.3

2.6.5 薬物動態試験概要表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	GLP	Study Number	eCTD Location
Tissue distribution following a single dose of [^{14}C]-sepiapterin using QWBA	Rat/ Long Evans, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2022-032	4.2.2.3
Plasma Protein Binding						
Plasma protein binding of sepiapterin using RED	Human plasma	In vitro	[redacted] Hungary	Non-GLP	PTC923-2021-013	5.3.2.3
Plasma protein binding of BH_4 using ultrafiltration	Human plasma	In vitro	PTC Therapeutics, Inc., NJ Center of Excellence Campus, Bridgewater, New Jersey, USA	Non-GLP	PTC923-2022-030	5.3.2.1
Studies in Pregnant or Nursing Animals						
Dose range-finding embryofetal development	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2021-005	4.2.3.5.2
Embryofetal development study	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2021-023	4.2.3.5.2
Dose range-finding embryofetal development	Rabbit/ New Zealand White (Hsd:Hra[NZW] SPF)	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2021-006	4.2.3.5.2
Embryofetal development study	Rabbit/ New Zealand White (Hsd:Hra[NZW] SPF)	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2021-024	4.2.3.5.2
Other Distribution Study						
Bidirectional permeability of sepiapterin	MDCKII-BCRP and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 monolayers	In vitro	[redacted] Hungary	Non-GLP	PTC923-2020-002	5.3.2.3
Bidirectional permeability of BH_4	MDCKII-BCRP and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 monolayers	In vitro	[redacted] Hungary	Non-GLP	PTC923-2021-012	5.3.2.3

2.6.5 薬物動態試験概要表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	GLP	Study Number	eCTD Location
Metabolism In Vivo						
Metabolite identification following a single [^{14}C]-sepiapterin dose in rats	Rat/ Sprague Dawley, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2022-035	4.2.2.4
Metabolite identification following a single [^{14}C]-sepiapterin dose in monkeys	Monkey/ Cynomolgus, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2022-036	4.2.2.4
Metabolism In Vitro						
Metabolic stability of [^{14}C]-sepiapterin in tissue S9 fractions	Male rat, male minipig, male monkey, and mixed-sex human liver and kidney S9, and mixed-sex human intestinal and lung S9	In vitro	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2023-081	5.3.2.3
Metabolic stability of [^{14}C]-sepiapterin in human intestinal microbiota	Human intestinal microbiota	In vitro	[redacted] The Netherlands	Non-GLP	PTC923-2023-082	5.3.2.3
Induction/Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes						
CYP enzyme induction by sepiapterin	Cryopreserved human hepatocytes	In vitro	[redacted] USA	Non-GLP	CNSA-ADME-001-2017	5.3.2.2
CYP enzyme inhibition by sepiapterin	Human liver microsomes	In vitro	[redacted] USA	Non-GLP	CNSA-ADME-002-2017	5.3.2.2
Excretion						
Excretion – PK, mass balance	Rat/ Sprague Dawley, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2022-031	4.2.2.5
Excretion – PK, mass balance	Monkey/ Cynomolgus, Male	Oral	[redacted], USA	Non-GLP	PTC923-2022-033	4.2.2.5
Excretion into Bile						
Excretion – PK, mass balance, and biliary excretion	Rat/ Sprague Dawley, Male	Oral	[redacted] USA	Non-GLP	PTC923-2022-031	4.2.2.5

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	GLP	Study Number	eCTD Location
Drug-Drug Interactions						
Sepiapterin as inhibitor and substrate of the human BCRP, BSEP, and MDR1 efflux (ABC) transporters, and human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 uptake transporters	Transfected cells	In vitro	[redacted] Hungary	Non-GLP	PTC923-2020-002	5.3.2.3
Sepiapterin as inhibitor and substrate of the human SLC transporters ENT1 and ENT2	Transfected cells	In vitro	[redacted] Hungary	Non-GLP	PTC923-2021-013	5.3.2.3
BH_4 as inhibitor and substrate of the human BCRP, BSEP, and MDR1 efflux (ABC) transporters, and human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 uptake transporters	Transfected cells	In vitro	[redacted] Hungary	Non-GLP	PTC923-2021-012	5.3.2.3
Other PK Studies						
Six-day pilot tolerability study in neonatal rats	Neonatal Rat/ Sprague Dawley,Male and female	Oral	[redacted] Canada	Non-GLP	PTC923-2020-005	4.2.2.7
PK Repeat-dose – 14-day	Rat/ Sprague Dawley, Male and Female	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2023-097	4.2.2.7
PK Repeat-dose – 14-day	Rabbit/New Zealand White, Pregnant Female	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2023-096	4.2.2.7
PK Repeat-dose – 14-day	Monkey/ Marmoset	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2024-108	4.2.2.7

2.6.5 薬物動態試験概要表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	GLP	Study Number	eCTD Location
Genotoxicity – in vivo - evaluating micronuclei and DNA damage	Rat/ Sprague Dawley, Male	Oral	[redacted] USA	GLP	CNSA-TOX-005-2017	4.2.3.3.2
Six-day PK study in neonatal rats	Neonatal Rat/ Sprague Dawley, Male and female	Oral	[redacted] Canada	GLP	PTC923-2020-006	4.2.3.5.4
Developmental toxicity in juvenile rats – 10-week with 4-week recovery	Rat/ Sprague Dawley, Male and female	Oral	[redacted] USA	GLP	PTC923-2023-045	4.2.3.5.4

Abbreviations: ABC, adenosine triphosphate-binding cassette; BCRP, breast cancer resistance protein; BH_4, tetrahydrobiopterin; BSEP, bile salt export pump; CTD, Common Technical Document; CYP, cytochrome P450; ENT, equilibrative nucleoside transporter; MATE, multidrug and toxin extrusion; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MDR1, multidrug resistance protein 1; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; PK, pharmacokinetic(s); QWBA, quantitative whole body autoradiography; RED, rapid equilibrium dialysis; SLC, solute carrier; TK, toxicokinetic(s)

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション

Overview: Full descriptions of the analytical methods and validations are presented in Module 2.6.4. Pharmacokinetic data are based on an HPLC with fluorescence and electrochemical detection method for sepiapterin and BH_4, qualified for analysis of mouse plasma, mouse urine, and tissue samples collected during non-GLP studies. Additionally, plasma concentrations of sepiapterin and BH_4 in rat, dog, rabbit, and monkey PK studies are based on qualified LC-MS/MS methods. Toxicokinetic data are based on a HPLC-MS/MS detection method for sepiapterin and BH_4 concentrations in mouse, rat, and marmoset monkey plasma samples collected during GLP-compliant nonclinical development studies and analyzed using validated bioanalytical methods.			**Test Article:** Sepiapterin, BH_4, CC-02, and CC-14
Description	**Type of Assay**	**Study Number**	**CTD Location**
Dose Formulation Analysis Methods			
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of sepiapterin (blended formulation) in Oral Mix	Validated assay	[redacted] Study 0016-3250 and [redacted] Study 0018-1460	4.2.2.1
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of sepiapterin (API) in Oral Mix	Validated assay	PTC923-2020-009, PTC923-2021-014, and PTC923-2023-060	4.2.2.1
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of sepiapterin (API) in Ora Plus	Validated assay	PTC923-2023-065	4.2.2.1
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of sepiapterin drug product in deionized water	Validated assay	PTC923-2021-011	4.2.2.1
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of sepiapterin (API) in DMSO	Validated assay	[redacted] Study 0016-3250 and PTC923-2021-015	4.2.2.1
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of sepiapterin in external solution	Validated assay	[redacted] Study 0017-1210	4.2.2.1
Validation of a GC method for the determination of CC-02 in acetone	Validated assay	PTC923-2021-020	4.2.2.1
Validation of an HPLC method with UV detection for the determination of CC-14 in DMSO	Validated assay	PTC923-2021-021	4.2.2.1
Validated Bioanalytical Methods for Measuring Sepiapterin and BH_4 in Biomatrices			
Determination of sepiapterin (11.1 to 5556 ng/mL) and BH_4 (22.2 to 5556 ng/mL) in rat plasma by HPLC-MS/MS	Validated assay	[redacted]-170502	4.2.2.1
Validation of a liquid chromatographic method using tandem mass spectrometry detection for the determination of sepiapterin (11.1 to 5560 ng/mL) and BH_4 (11.1 to 5560 ng/mL) in K_2EDTA Sprague Dawley rat plasma	Validated assay	PTC923-2021-001	4.2.2.1
Determination of sepiapterin (11.11 to 5556 ng/mL) and BH_4 (22.22 to 5556 ng/mL) in monkey plasma by HPLC-MS/MS	Validated assay	[redacted]-170501	4.2.2.1
Validation of a liquid chromatographic method using tandem mass spectrometry detection for the determination of sepiapterin (11.1 to 5560 ng/mL) and BH_4 (11.1 to 5560 ng/mL) in K_2EDTA monkey plasma	Validated assay	PTC923-2021-002	4.2.2.1
Validation of a liquid chromatographic method using tandem mass spectrometry detection for the determination of sepiapterin (11.1 to 5560 ng/mL) and BH_4 (11.1 to 5560 ng/mL) in K_2EDTA New Zealand white rabbit plasma	Validated assay	PTC923-2021-016	4.2.2.1

Description	Type of Assay	Study Number	CTD Location
Validation of an LC-MS/MS bioanalytical method for the determination of sepiapterin (10 to 5000 ng/mL) and BH_4 (10 to 5000 ng/mL) in 1% ascorbic acid-treated K_2EDTA CD-1-mouse plasma	Validated assay	PTC923-2023-064	4.2.2.1
Validation of an LC-MS/MS bioanalytical method for the determination of 7,8-dihydroxanthopterin (XH_2) in 1% ascorbic acid-treated K_2EDTA Sprague Dawley rat plasma	Validated assay	PTC923-2023-093	4.2.2.1
Validation of an LC-MS/MS bioanalytical method for the determination of 7,8-dihydroxanthopterin (XH_2) In 1% ascorbic acid-treated K_2EDTA New Zealand White rabbit plasma	Validated assay	PTC923-2023-094	4.2.2.1
Validation of an LC-MS/MS bioanalytical method for the determination of 7,8-dihydroxanthopterin (XH_2) in 1% ascorbic acid-treated K_2EDTA cynomolgus monkey plasma	Validated assay	PTC923-2024-109	4.2.2.1

Abbreviations: API, active pharmaceutical ingredient; BH_4, tetrahydrobiopterin; CC-02, [redacted]; CC-14, [redacted]; CTD, Common Technical Document; DMSO, dimethyl sulfoxide; GC, gas chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; K_2EDTA, dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid; LC-MS/MS, liquid chromatography with tandem mass spectroscopy; PK, pharmacokinetic(s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.3 薬物動態: 単回投与後の吸収

2.6.5.3A マウス単回投与後の吸収

Report Title: Single Dose Study of L-Sepiapterin and Tetrahydrobiopterin (BH_4) by Oral Administration to C57BL/6 Mice		**Test Article**: Sepiapterin and BH_4 **Study Number**: 16H0208S-X01/6016-2880
Species	C57BL/6 Mice	**CTD Location**: 4.2.2.3
Sex/Number of Animals	Male/96	**GLP Compliance**: Non-GLP
Feeding Condition	Not fasted	
Method of Administration	Oral gavage	
Vehicle/Formulation	Citrate buffer with 0.5% carboxymethyl cellulose	
Dose (mg/kg)	0, 20, 60, and 180	
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma	
Analyte	Sepiapterin[a]	
Assay	HPLC with fluorescence and electrochemical detection	
PK Parameters of Sepiapterin in Plasma Following Administration of Sepiapterin	**(Dose, mg/kg)**	
T_{max} (h)	2.00 (20), 0.50 (60), and 0.50 (180)	
C_{max} (nmol/g)	9.29 (20), 28.8 (60), and 439 (180)	
$AUC_{0\text{-}8h}$ (h•nmol/g)	26.7 (20), 85.9 (60), and 898 (180)	
Additional Information: Data for sepiapterin and BH_4 exposure in kidney, liver, and urine are presented in Table 2.6.5.5A. Mean C_{max} and $AUC_{0\text{-}8h}$ values for sepiapterin in plasma increased with increasing dose levels in a dose-proportional manner between the 20 and 60 mg/kg dose levels, but in a higher than dose-proportional manner between the 60 and 180 mg/kg dose levels.		

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}8h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 8 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; HPLC, high-performance liquid chromatography; PK, pharmacokinetic(s)

[a] Concentrations of BH_4 in plasma were not measured in this study.``1`4314`32

2.6.5.3B　　マウス単回投与後の吸収

Report Title: Assessment of Plasma Pharmacokinetics Following Oral Dose Administration of CNSA-001 to Male CD-1 Mice		**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: CNSA-PK-001-2017
Species	CD-1 Mice	**CTD Location**: 4.2.2.2
Sex/Number of Animals	Male/18	**GLP Compliance**: Non-GLP
Feeding Condition	Not fasted	
Method of Administration	Oral gavage	
Vehicle/Formulation	Sepiapterin (Phase 1 formulation) and sepiapterin API in citrate buffer with 0.5% carboxymethyl cellulose	
Dose (mg/kg)	180	
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma	
Analyte	Sepiapterin[a]	
Assay	HPLC with fluorescence and electrochemical detection	
PK Parameters	**Group 2 and Group 1**	
T_{max} (h)	1	
C_{max} (units specified)	102.3 and 75.7 nM	
AUC_{0-8h} (units specified)	NA	
Additional Information: Due to the limited number of sampling timepoints (3) and the small sample size per timepoint (N=3), PK analyses were limited.		

Abbreviations: API, Active Pharmaceutical Ingredient; AUC_{0-8h}, area under the concentration-time curve from time zero to 8 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; HPLC, high-performance liquid chromatography; NA, not applicable; PK, pharmacokinetic(s)

[a] Concentrations of BH_4 in plasma were not measured in this study.

2.6.5.3C　　マウス単回投与後の吸収 – 血漿、肝、腎、脳組織分布

Report Title: Pharmacokinetics of Sepiapterin and BH_4 in Male CD-1 Mice Following a Single Oral Dose of Sepiapterin			**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2023-046	
Species	CD-1 Mouse		**CTD Location**: 4.2.2.3	
Sex/Number of Animals	Male/3 animals per group/per timepoint		**GLP Compliance**: Non-GLP	
Feeding Condition	Fed			
Vehicle/Formulation	Oral Mix			
Method of Administration	Oral gavage			
Dose (mg/kg)	100 and 300			
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma			
Analyte	Sepiapterin and BH_4			
Assay	HPLC-MS/MS			
PK Parameters (BH_4 only)	**Baseline-Uncorrected BH_4**		**Baseline-Corrected BH_4**	
Dose	100	300	100	300
T_{max} (h)	2	2	2	2
C_{max} (µg/mL)	3.29	5.52	3.19	5.41
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h•µg/mL)	16.5	38.2	14.1	35.8
$T_{1/2}$ (h)	NR	2.24	NR	1.14
Additional Information: After oral administration, sepiapterin was quickly converted to BH_4, with plasma concentration generally below the LLOQ (10 ng/mL), except for 3 animals that received the highest dose of 300 mg/kg. The plasma exposures to BH_4 increased with sepiapterin dose, though less than dose proportionally. The distribution of BH_4 in liver, kidney, and brain following sepiapterin administration is presented in Table 2.6.5.5B.				

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ, lower limit of quantitation; NR, not reported; PK, pharmacokinetic(s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.3D　　ラット単回投与後の吸収

Report Title: Single-Dose Pharmacokinetic Study of Sepiapterin in Rats		**Test Article**: Sepiapterin API Blend (Phase 1/2 DP formulation) and Sepiapterin API
		Study Number: PTC923-2020-001
Species	Sprague Dawley Rat	**CTD Location**: 4.2.2.2
Sex/Number of Animals	Male/6 animals per group	**GLP Compliance**: Non-GLP
Feeding Condition	Fed	
Vehicle/Formulation	Oral Mix	
Method of Administration	Oral Gavage	
Dose (mg/kg)	100	
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma	
Analyte	Sepiapterin and BH_4	
Assay	HPLC-MS/MS	
Test Article	**Sepiapterin Phase 1 Formulation**	**Sepiapterin API**
PK Parameters (BH_4 only)		
T_{max} (h)	2	3
C_{max} (ng/mL)	1049	1104
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	7408	8154
$T_{1/2}$ (h)	3.9	4.2
Additional Information: After oral administration, sepiapterin was quickly converted to BH_4, with plasma concentration only measurable in 1 animal in the sepiapterin Phase 1/2 DP formulation group (52.7 ng/mL at 8 hours postdose) and 1 animal in sepiapterin API group (25.5 and 15.7 ng/mL at 4 and 6 hours postdose). The mean endogenous BH_4 concentration was 26.0 and 26.3 ng/mL in the sepiapterin Phase 1/2 DP group and sepiapterin API group, respectively, at predose. There is no significant difference of exposure for the 2 formulations.		

Abbreviations: API, Active Pharmaceutical Ingredient; $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; DP, drug product; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; PK, pharmacokinetic (s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.3E　　イヌ単回投与後の吸収

Report Title: Determination of the Pharmacokinetics of Different PTC923 Oral Formulations After a Single Oral Dose to Non-Naïve Male Dogs				**Test Article**: Sepiapterin Phase 1/2 formulation, sepiapterin PTC-A formulation, and sepiapterin PTC-E formulation		
				Study Number: PTC923-2020-007		
Species	Beagle dogs			**CTD Location**: 4.2.2.2		
Sex/Number of Animals	Male/4 and 1 extra			**GLP Compliance**: Non-GLP		
Feeding Condition	Fed					
Vehicle/Formulation	Phase 1/2 formulation: Oral Mix PTC-A and PTC-E formulations: deionized water					
Method of Administration	Oral gavage					
Dose (mg/kg)	30					
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma					
Assay	HPLC-MS/MS					
Analyte	**Sepiapterin**			**BH_4**		
Formulations	**Phase 1/2 (Reference)**	**PTC-A**	**PTC-E**	**Phase 1/2 (Reference)**	**PTC-A**	**PTC-E**
PK Parameters (Mean [%CV])						
T_{max} (h)	1.75 (28.6)	0.750 (38.5)	0.875 (28.6)	2.50 (40.0)	2.50 (40.0)	3.50 (28.6)
C_{max} (ng/mL)	808 (8.97)	967 (19.4)	746 (9.99)	1010 (5.25)	867 (13.4)	861 (24.8)
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	2470 (12.5)	2210 (5.65)	2960 (51.0)	6920 (10.1)	5980 (10.5)	7080 (18.3)
$AUC_{0\text{-}inf}$ (h•ng/mL)	2490 (12.8)	2280 (7.17)	2460 (NA)	7210 (9.82)	6310 (9.18)	6870 (12.6)
$T_{1/2}$ (h)	1.50 (23.8)	2.50 (51.6)	1.72 (9.56)	6.34 (24.0)	7.01 (32.4)	6.08 (5.75)
Additional Information: The baseline plasma sepiapterin concentrations (predose) were all BQL (LLOQ 11.1 ng/mL). The BH_4 plasma concentration was measurable at predose in the range from 14.3 to 20.1 ng/mL. After sepiapterin administration, the sepiapterin was quickly converted to BH_4.						

Abbreviations: %CV, percent coefficient of variation; $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; $AUC_{0\text{–}inf}$, area under the concentration-time curve from time zero extrapolated to infinity; BH_4, tetrahydrobiopterin; BQL, below quantifiable limits; CTD, Common Technical Document; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ, lower limit of quantitation; NA, not applicable; PK, pharmacokinetic(s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.3Fカニクイサル単回投与後の吸収

Report Title: Determination of the Pharmacokinetics of Different PTC923 Oral Formulations After a Single Oral Dose to Non-Naïve Male Monkeys			**Test Article**: Sepiapterin Phase 1/2 formulation, sepiapterin PTC-A formulation, and sepiapterin PTC-E formulation
			Study Number: PTC923-2020-008
Species	Cynomolgus monkeys		**CTD Location**: 4.2.2.2
Sex/Number of Animals	Male/4		**GLP Compliance**: Non-GLP
Feeding Condition	Fed		
Vehicle/Formulation	Phase 1/2 formulation: Oral Mix PTC-A and PTC-E formulations: deionized water		
Method of Administration	Oral gavage		
Dose (mg/kg)	50		
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma		
Analyte	Sepiapterin and BH_4		
Assay	HPLC-MS/MS		
Formulations	**Phase 1/2 (Reference)**	**PTC-A**	**PTC-E**
PK Parameters (BH_4 only) (Mean [%CV])			
T_{max} (h)	2.50 (40.0)	2.00 (0.00)	2.00 (0.00)
C_{max} (ng/mL)	715 (16.4)	908 (30.7)	893 (10.7)
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	4300 (20.4)	4560 (38.1)	4320 (17.2)
$T_{1/2}$ (h)	4.10 (20.0)	4.20 (3.72)	3.21 (25.6)
Additional Information: After oral administration, sepiapterin was quickly absorbed and converted to BH_4. The plasma sepiapterin concentration was BQL (LLOQ 11.1 ng/mL) at all timepoints sampled including baseline (predose). The BH_4 plasma concentration at predose was either BQL (LLOQ 11.1 ng/mL) or just slightly above it (when measurable, it was between 12.8 to 26.5 ng/mL).			

Abbreviations: %CV, percent coefficient of variation; $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the plasma concentration curve from time 0 to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; BQL, below quantifiable limits; CTD, Common Technical Document; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ, lower limit of quantitation; PK, pharmacokinetic(s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.4 薬物動態: 反復投与後の吸収

The following GLP toxicology studies included evaluation of toxicokinetic (TK) parameters and are tabulated in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1, 2.6.7.2, 2.6.7.3 2.6.7.7, and 2.6.7.10:

- Five-day and 28-day mouse Study PTC923-2023-053
- Twenty-six-week mouse carcinogenicity Study PTC923-2023-070
- Fourteen-day rat Study CNSA-TOX-001-2017 and 14-day monkey Study CNSA-TOX-002-2017
- Thirteen-week rat Study CNSA-TOX-001-2018 and 13-week monkey Study CNSA-TOX-002-2018
- Twenty six-week rat Study PTC923-2020-003
- Nine-month monkey Study PTC923-2020-004

Dose range-finding embryofetal development studies in pregnant female rats (Study PTC923-2021-005) and pregnant female rabbits (Study PTC923-2021-006) are presented in Section 2.6.5.7 The GLP embryofetal development studies in pregnant female rats (Study PTC923-2021-023) and pregnant female rabbits (Study PTC923-2021-024) are presented in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1, 2.6.7.2, 2.6.7.3, and 2.6.7.13.

The 6-day pilot tolerability study (PTC923-2020-005) is presented in Section 2.6.5.16 The 6-day GLP pharmacokinetics (PK) study (PTC923-2020-006) in neonatal rats and the 10-week GLP study in juvenile rats (PTC923-2023-045) are presented in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1, 2.6.7.2, 2.6.7.3, and 2.6.7.15.

A 3-day genotoxicity study (CNSA-TOX-005-2017) is presented in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1 and 2.6.7.9.

A 26-week GLP carcinogenicity study was conducted in CByB6F1 mice (Study PTC923-2023-070) to determine the potential carcinogenicity of sepiapterin when given via oral gavage for a minimum of 26 weeks. CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic mice were evaluated for carcinogenicity, and CBYB6F1/J wild-type hybrid non-transgenic mice were evaluated for TK parameters. The study is presented in detail in Module 2.6.6 Section 5.1.1 and tabulated data are presented in Module 2.6.7, Table 2.6.7.2, Table 2.6.7.3, and Table 2.6.7.10.

2.6.5.5 薬物動態: 組織分布

2.6.5.5A Organ Distribution After a Single Dose in Mice

Report Title: Sepiapterin and BH_4: Pharmacokinetics Evaluation								**Test Article**: Sepiapterin		
Species/Strain: Mouse/C57BL/6		**Duration of Dosing**: Single Oral Dose						**Study No.**: 16H0208S-X01/ 6016-2880		
Date of First Dose: 14 November 2016		**Vehicle/Formulation**: Citrate buffer with 0.5% carboxymethyl cellulose						**CTD Location**: 4.2.2.3		
Method of Administration: Oral (gavage)		**Dose Volume (mL/kg)**: 15						**GLP Compliance**: Non-GLP		
PK Parameter Summary										
Group/Daily Dose (mg/kg/day)	**20**			**60**			**180**			**0**
Group/Treatment	**1/BH_4**	**4/Sepiapterin**		**2/BH_4**	**5/Sepiapterin**		**3/BH_4**	**6/Sepiapterin**		**7/Control**
Number of Animals, Male	**15**	**15**		**15**	**15**		**15**	**15**		**6**
Kidney	**BH_4**	**BH_4**	**Sepiapterin**	**BH_4**	**BH_4**	**Sepiapterin**	**BH_4**	**BH_4**	**Sepiapterin**	
$AUC_{0\text{-last}}$ (h•nmol/g)	8.83	20.5	NA	23.6	35.6	NA	47.2	75.1	NA	-
C_{max} (nmol/g)	3.42	4.62	0.294	8.55	9.72	0.281	14.8	31.5	4.44	-
T_{max} (h)	1.00	2.00	NA	1.00	0.50	NA	2.00	1.00	NA	-
$T_{1/2}$ (h)	NA	NA	NA	2.50	2.47	NA	NA	NA	NA	-
Liver										
$AUC_{0\text{-last}}$ (h•nmol/g)	14.9	32.9	-	23.3	63.1	NA	38.6	112	NA	-
C_{max} (nmol/g)	2.36	9.46	-	4.89	13.8	0.813	11.8	26.6	19.3	-
T_{max} (h)	1.00	0.50	-	1.00	2.00	NA	2.00	2.00	NA	-
$T_{1/2}$ (h)	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
Urine										
$AUC_{0\text{-last}}$ (h•nmol/g)	2100	3400	1020	6060	3530	706	5980	8110	1400	-
C_{max} (nmol/g)	385	592	171	1040	830	312	1400	1540	1120	-
T_{max} (h)	4.00	4.00	8.00	4.00	2.00	0.50	8.00	2.00	0.50	-
$T_{1/2}$ (h)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
Plasma										
$AUC_{0\text{-last}}$ (h•nmol/g)	-	-	26.7	-	-	85.9	-	-	898	-
C_{max} (nmol/g)	-	-	9.29	-	-	28.8	-	-	439	-
T_{max} (h)	-	-	2.00	-	-	0.50	-	-	0.50	-
$T_{1/2}$ (h)	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-

Report Title: Sepiapterin and BH_4: Pharmacokinetics Evaluation		**Test Article**: Sepiapterin
Species/Strain: Mouse/C57BL/6	**Duration of Dosing**: Single Oral Dose	**Study No.**: 16H0208S-X01/ 6016-2880
Additional Information: Exposure to BH_4 and sepiapterin in liver, kidney, and urine increased with the dose. Sepiapterin exposure was the highest in urine amongst the analyzed matrices and increased in a less than dose proportional manner over the entire dose range in urine, liver, and kidney. Circulating sepiapterin exposure through plasma showed nonlinear kinetics being much greater than dose proportional over the entire dose range, suggesting possible saturation kinetics in the plasma with increased dose levels, low distribution of sepiapterin in the tissues, and high level of excretion through urine. Exposure of BH_4 was higher in tissues (liver and kidney) following administration of sepiapterin than following administration of a similar dose of BH_4, consistent with greater uptake into tissues and conversion in tissues to BH_4. High inter-individual variability and sparse sampling in urine prevented a clear conclusion on urine exposure to BH_4. Following sepiapterin or BH_4 treatment, kidney, liver, and urine exposure to BH_4 increased as the dose level increased.		

Abbreviations: $AUC_{0\text{-last}}$, area under the concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; NA, not applicable or not calculated due to insufficient measurable concentrations; PK, pharmacokinetic(s)
Note: “-“ indicates no data or information.

2.6.5.5B　　マウス単回投与後の組織分布

Report Title: Pharmacokinetics of Sepiapterin and BH_4 in Male CD-1 Mice Following a Single Oral Dose of Sepiapterin					**Test Article**: Sepiapterin	
					Study No.: PTC923-2023-046	
					CTD Location: 4.2.2.3	
Species	CD-1 Mouse				**GLP Compliance**: Non-GLP	
Sex/Number of Animals	Male/3 animals per group/per timepoint					
Feeding Condition	Fed					
Test Article	Sepiapterin					
Vehicle/Formulation	Oral Mix					
Method of Administration	Oral gavage					
Dose (mg/kg)	100 and 300					
Sample (eg, Whole Blood, Plasma, or Serum)	Plasma, liver, kidney, and brain					
Analyte	Sepiapterin and BH_4					
Assay	HPLC-MS/MS					
PK Parameters at 300 mg/kg (BH_4 Only)	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-24h} (h•µg/mL)	$T_{1/2}$ (h)	Ratio to plasma (C_{max})	Ratio to plasma (AUC_{0-24h})
Baseline-Uncorrected BH_4						
Liver	2	48	292	2.35	8.70	7.64
Kidney	4	23.4	175	3.34	4.24	4.58
Brain	4	0.221	3.92	22.8	0.040	0.103
Plasma	2	5.52	38.2	2.24	NA	NA
Baseline-Corrected BH_4						
Liver	2	47	268	2.62	8.69	7.49
Kidney	4	23.1	168	1.91	4.27	4.69
Brain	4	0.113	1.32	4.28	0.021	0.037
Plasma	2	5.41	35.8	1.14	NA	NA
Additional Information: After oral administration, sepiapterin was quickly converted to BH_4, with plasma concentration generally BLQ and there was no consistent trend for the few samples with measurable concentration. The mean (SD) endogenous BH_4 concentrations in brain, kidney, liver, and plasma in control mice (n=6) were 108 (14.5), 291 (47.7), 992 (91.3), and 102 (11.9) mg/mL or ng/g. Plasma values are presented for both doses in Table 2.6.5.3C.						

Abbreviations: AUC_{0-24h}, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; BQL, below quantifiable limits; CTD, Common Technical Document; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NA, not applicable; PK, pharmacokinetic(s); SD, standard deviation
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.5C　　ラット単回投与後の組織分布

Report Title: Tissue Distribution Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)							**Test Article**: Sepiapterin	
Species/Strain: Rat/Long-Evans, Male			**Duration of Dosing**: Single Oral Dose				**Study No.**: PTC923-2022-032	
Date of First Dose: 22 March 2022		**Vehicle/Formulation**: Oral Mix (Flavored Suspending Vehicle)					**CTD Location**: 4.2.2.3	
Method of Administration: Oral (Gavage)			**Dose Volume (mL/kg)**:15				**GLP Compliance**: Non-GLP	
Dose Level Targeted: 30 mg/kg and 200 µCi/kg, administered at a nominal dose volume of 15 mL/kg					**Mean Dose Administered**: 30.7 mg/kg and 259 µCi/kg			
Daily Dose (mg/kg/day), Number of Animals, and Collection Timepoints								
[^{14}C]-Sepiapterin				**Number of Animals**			**Collection Time Points for QWBA and Blood/Plasma**	
Dose Level	mg/kg	µCi/kg	Dose Volume mL/kg	11 animals; 8 animals were scheduled for QWBA to 168 hours. Only 1 additional provisional timepoint/animal, 504 hours, was subject to QWBA procedures. The remaining 2 provisional animals were not processed.			1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, and 168 hours and 1 additional time at 504 hours	
Targeted	30	200	15					
Actual	30.7	259						

PK Parameters of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity in Plasma and Tissues

Tissue Group	Tissue	C_{max} (µg equivalent/g)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	$AUC_{0\text{-last}}$ (h•µg equivalent/g)	$AUC_{0\text{-inf}}$ (h•µg equivalent/g)	Tissue:Plasma[a]	R^2
Vascular	Plasma (LSC)	0.620	2.0	16.0	16.0	16.7	1.00	0.9773
	Blood (LSC)[b]	0.588	4.0	899.6	33.9	95.7	2.12	0.0893
	Aorta	0.552	8.0	NC	9.17	NC	0.57	NC
	Blood (cardiac)	0.803	4.0	NC	10.6	NC	0.67	NC
CNS	Brain (whole)	0.121	8.0	NC	1.79	NC	0.11	NC
	Meninges	0.549	8.0	NC	7.70	NC	0.48	NC
	Spinal cord	0.143	8.0	NC	0.286	NC	0.02	NC
Ocular	Eye	0.205	8.0	NC	0.958	NC	0.06	NC
	Lens	0.0732	8.0	NC	0.146	NC	0.01	NC
	Uveal tract	0.485	8.0	NC	9.7	NC	0.60	NC
Dermal	Nonpigmented skin	0.504	4.0	40.4	14.8	27.2	0.93	0.9921
	Pigmented skin[b]	0.524	4.0	23.2	11.9	16.5	0.74	0.7883
Endocrine	Adrenal cortex[b]	2.29	2.0	108.0	54.9	88.4	3.43	0.2853
	Adrenal gland[b]	1.88	2.0	319.9	49.9	127	3.12	0.2299
	Adrenal medulla	1.76	2.0	192.1	45.6	81.4	2.86	0.8744
	Pituitary gland	1.04	8.0	NC	13.2	NC	0.83	NC
	Thyroid gland[b]	0.678	8.0	69.4	27.4	37.0	1.72	0.7695
Fatty	Brown fat	0.508	4.0	17.6	21.8	23.6	1.36	0.9972
	White fat	0.220	8.0	NC	11.4	NC	0.72	NC

Report Title: Tissue Distribution Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)							**Test Article**: Sepiapterin	
Species/Strain: Rat/Long-Evans, male		**Duration of Dosing**: Single oral dose					**Study No.**: PTC923-2022-032	
Tissue Group	**Tissue**	**C_{max} (µg equivalent/g)**	**T_{max} (h)**	**$T_{1/2}$ (h)**	**$AUC_{0\text{-last}}$ (µg equivalent h/g)**	**$AUC_{0\text{-inf}}$ (µg equivalent h/g)**	**Tissue:Plasma[a]**	**R^2**
Gastrointestinal	Cecum mucosa	50.2	8.0	12.9	475	478	29.73	0.8320
	Esophagus wall[b]	6.39	8.0	16.0	84	86	5.25	0.7710
	Large intestine wall	28.5	8.0	9.4	348	349	21.77	0.9660
	Oral mucosa	1.44	8.0	NC	23.9	NC	1.50	NC
	Small intestine wall	136	1.0	11.1	234	241	14.61	0.9285
	Stomach wall (glandular)	18.3	1.0	17.5	47.1	48.9	2.94	0.8406
	Stomach wall (nonglandular)[b]	5.66	2.0	11.3	46.7	49.7	2.92	0.7725
Lymphatic	Bone marrow (femur)	1.02	24.0	NC	43.9	NC	2.75	NC
	Lymph node (cervical)	0.590	4.0	30.9	16.5	25.0	1.03	0.9661
	Spleen	0.901	8.0	16.2	34.1	35.9	2.13	0.8839
	Thymus	0.689	8.0	NC	17.4	NC	1.09	NC
Metabolic/Excretory	Bile (in duct)	4.61	2.0	9.1	37.5	38.9	2.35	0.8078
	Kidney	3.48	4.0	27.8	65.1	71.3	4.07	0.8576
	Kidney cortex	3.54	4.0	52.2	79.4	85.3	4.96	0.8361
	Kidney medulla	3.58	8.0	26.1	62.1	66.9	3.89	0.8947
	Liver	13.5	2.0	44.0	154	159	9.60	0.8427
	Urinary bladder wall	637	8.0	NC	4262	NC	266.63	NC
Muscular	Heart	0.479	8.0	NC	8.53	NC	0.53	NC
	Muscle (femoral)[b]	0.370	8.0	35.9	14.6	19.0	0.92	0.7892
Reproductive	Epididymis	0.397	8.0	NC	13.5	NC	0.84	NC
	Prostate	0.645	8.0	NC	16.4	NC	1.02	NC
	Seminal vesicle	0.609	4.0	31.9	23.8	30.9	1.49	0.9992
	Testis[b]	0.254	8.0	45.0	10.9	15.5	0.68	0.6185
Respiratory	Lung	0.757	4.0	23.0	21.4	23.9	1.34	0.8918
	Nasal turbinates	0.472	8.0	NC	5.43	NC	0.34	NC
	Trachea	0.699	8.0	NC	3.21	NC	0.20	NC
Secretory	Ex-orbital lachrymal gland	0.924	8.0	17.0	37.7	40.2	2.36	0.8774
	Harderian gland	1.12	24.0	NC	50.8	NC	3.18	NC
	Intra-orbital lachrymal gland	0.910	8.0	NC	26.4	NC	1.65	NC
	Pancreas	3.53	8.0	43.5	46.2	57.2	2.89	0.9998
	Salivary gland	1.01	8.0	NC	19.3	NC	1.21	NC
Skeletal	Bone (femur)	0.723	24.0	NC	36.4	NC	2.28	NC

Report Title: Tissue Distribution Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)	**Test Article**: Sepiapterin
Additional Information: Selected tissues, tissue concentrations of TRA, and areas of interest were analyzed using QWBA techniques. The tissues and AOI were analyzed within AIDA software using a region sampling tool. Each tissue and AOI per carcass were analyzed once and a single value for the concentration of the derived radioactivity was reported. In tissues with a heterogeneous distribution of radioactivity, the areas with the highest concentrations were sampled.	

Abbreviations: AIDA, Advanced Image Data Analysis; AOI, areas of interest; AUC_{0-inf}, area under the concentration-time curve from time zero extrapolated to infinity; AUC_{0-last}, area under the concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time; CNS, central nervous system; CTD, Common Technical Document; LSC, liquid scintillation; NC, not calculated due to insufficient data; PK, pharmacokinetic(s); QWBA, Quantitative Whole Body Autoradiography; R^2, coefficient of determination; TRA, total radioactivity

[a] Tissue:plasma ratio based on AUC_{0-last}

[b] $T_{1/2}$ and AUC_{0-inf} are approximated values since R^2 is <0.8

Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.6 薬物動態: 血漿タンパク結合

2.6.5.6A Sepiapterin の血漿タンパク結合

Report Title: In Vitro Interaction Studies of PTC923 With Human ENT1 and ENT2 Uptake Transporters		**Test Article**: Sepiapterin	
		Study Number: PTC923-2021-013	
Study System	Human plasma	**CTD Location**: 5.3.2.3	
Experimental Conditions	Protein binding determined in human plasma containing 0.1% DTT by RED for 240 minutes at 37°C		
Analyte	Sepiapterin		
Assay	HPLC-MS/MS		
Mean (SD) Results After 240 Minutes Incubation			
Sepiapterin Test Concentration (µM)	**Fraction Bound (%)**	**Fraction Unbound (%)**	**Recovery (%)**
0.1	0	100	116.4 (30.1)
1	31.4 (24.1)	68.6	120.2 (18.4)
10	11.6 (8.1)	88.4	110.4 (8.0)
Additional Information: The geometric mean unbound fraction is 84.6% and the bound fraction of sepiapterin is 15.4% in human plasma with 0.1% DTT.			

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; DTT, dithiothreitol, ENT, equilibrative nucleoside transporter; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; RED, rapid equilibrium dialysis; SD, standard deviation

2.6.5.6B BH_4 の血漿タンパク結合

Report Title: In Vitro Determination of Tetrahydrobiopterin (BH_4) Binding to Human Plasma Proteins		**Test Article**: Sepiapterin
		Study Number: PTC923-2022-030
Study System	Human plasma	**CTD Location**: 5.3.2.1
Experimental Conditions	Protein binding determined in human plasma containing 0.5% β-mercaptoethanol after 1 hour incubation at 37°C by ultrafiltration	
Analyte	BH_4	
Assay	HPLC-MS/MS	
Mean (SD) Results After 1 Hour Incubation		
BH_4 Test Concentration (µM)	**Fraction Bound (%)**	
2	41.3 (6.89)	
5	33.0 (8.35)	
15	24.1 (5.18)	
Additional Information: BH_4 exhibited low protein binding in human plasma. The percentage binding for controls, warfarin (91.3%) and ketamine (36.5%) were within the acceptable range. Recoveries of BH_4 from all experiments were within acceptable range of ≥65%.		

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; BH_4, tetrahydrobiopterin; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; SD, standard deviation

2.6.5.7 薬物動態: 妊娠中または授乳中の動物試験

The GLP embryofetal development studies in pregnant female rats (Study PTC923-2021-023) and pregnant female rabbits (Study PTC923-2021-024) are presented in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1, 2.6.7.2, 2.6.7.3, and 2.6.7.13.

2.6.5.7A ラットにおける胚胎児発生に関する用量設定試験

Report Title: A Dose Range-Finding Embryofetal Development Study of PTC923 by Oral (Gavage) in Rats				**Test Article**: Sepiapterin
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley Crl:CD(SD)	**Duration of Dosing**: GD7 through GD17			**Study No.**: PTC923-2021-005
Date of First Dose: 23 March 2021	**Vehicle/Formulation**: Oral Mix			**CTD Location**: 4.2.3.5.2
Method of Administration: Oral gavage	**Dose Volume (mL/kg)**: 10			**GLP Compliance**: Non-GLP
Daily Dose (mg/kg/day)	**0/Control**	**100**	**300**	**1000**
Number of Animals: 45, female – main study/TK TK animals were used for TK evaluations only.	6/3	6/6	6/6	6/6
Analytes: Sepiapterin and BH_4				
Assay: HPLC-MS/MS				
TK Evaluations (BH_4 only)				
BH_4 GD7 $AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	NA	11300	19900	25100
BH_4 GD7 C_{max} (ng/mL)	NA	1380	2990	2670
BH_4 GD7 $T_{1/2}$ (h)	NA	3.86	4.77	3.01
BH_4 GD7 T_{max} (h)	NA	2	4	2
BH_4 GD17 $AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	NA	6450	14100	19200
BH_4 GD17 C_{max} (ng/mL)	NA	976	2000	2420
BH_4 GD17 $T_{1/2}$ (h)	NA	4.66	3.19	3.46
BH_4 GD17 T_{max} (h)	NA	4	2	2
Additional Information: Plasma concentrations of sepiapterin were below the LLOQ (11.1 ng/mL) for all samples from the control group. Following once daily oral administration, individual sepiapterin plasma concentrations were generally below the LLOQ, except for a few samples where concentrations close to the LLOQ were observed. Mean BH_4 plasma concentrations were quantifiable through the 24 hours sampling on both GD7 and GD17, including at predose on GD17. At all dose levels, predose mean plasma concentrations were higher on GD17. TK results calculated from the mean plasma BH_4 concentration data showed that exposures (C_{max} and $AUC_{0\text{-}24h}$) of BH_4 increased with dose levels on both GD7 and GD17 with the exception of the C_{max} on GD7, where there was a slight decrease. On both GD7 and GD17, the increase in exposure ($AUC_{0\text{-}24h}$) was less than dose proportional across dose levels.				

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; GD, gestation day; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ, lower limit of quantitation; NA, not applicable; TK, toxicokinetic(s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.7B　　ウサギにおける胚胎児発生に関する用量設定試験

Report Title: A Dose Range-Finding Embryo-fetal Development Study of PTC923 by Oral (Stomach Tube) in Rabbits			**Test Article**: Sepiapterin	
Species/Strain: Rabbit/New Zealand White	**Duration of Dosing**: GD7 through GD19		**Study No.**: PTC923-2021-006	
Date of First Dose: 01 April 2021	**Vehicle/Formulation**: Oral Mix		**CTD Location**: 4.2.3.5.2	
Method of Administration: Oral (stomach tube)	**Dose Volume (mL/kg)**: 10		**GLP Compliance**: Non-GLP	
Analytes: Sepiapterin and BH_4				
Assay: HPLC-MS/MS				
Daily Dose (mg/kg/day)	**0/Control**	**100**	**300**	**1000**
Number of Animals/Sex: 24/female	6	6	6	6
TK Evaluations: 3 animals/group evaluated per timepoint				
Sepiapterin GD7 $AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	NA	969	3350	8460
Sepiapterin GD7 C_{max} (ng/mL)	NA	356	805	1530
Sepiapterin GD7 $T_{1/2}$ (h)	NA	1.21	2.53	12.8
Sepiapterin GD7 T_{max} (h)	NA	1	1	2
Sepiapterin GD19 $AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	NA	636	1750	4890
Sepiapterin GD19 C_{max} (ng/mL)	NA	403	558	1140
Sepiapterin GD19 $T_{1/2}$ (h)	NA	NC	NC	1.16
Sepiapterin GD19 T_{max} (h)	NA	1	2	2
BH_4 GD7 $AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	NA	8510	24100	39100
BH_4 GD7 C_{max} (ng/mL)	NA	1600	3720	4380
BH_4 GD7 $T_{1/2}$ (h)	NA	7.88	5.42	NRR
BH_4 GD7 T_{max} (h)	NA	1	2	2
BH_4 GD19 $AUC_{0\text{-}24h}$ (h•ng/mL)	NA	4780	12200	20300
BH_4 GD19 C_{max} (ng/mL)	NA	1210	2160	2840
BH_4 GD19 $T_{1/2}$ (h)	NA	NRR	4.73	4.21
BH_4 GD19 T_{max} (h)	NA	2	2	2
Additional Information: Systemic exposure to sepiapterin increased with increasing dose levels for both GD7 and GD19. The increase in exposure to sepiapterin between 100 and 300 mg/kg and between 300 and 1000 mg/kg was approximately dose proportional on GD7 and GD19. Systemic exposure to sepiapterin on GD19 was lower when compared to GD7. Systemic exposure to BH_4 increased with increasing dose levels for both GD7 and GD19. The increase in exposure between 100 and 300 mg/kg was approximately dose proportional and between 300 and 1000 mg/kg was less than dose proportional. On both collection days, systemic exposure to BH_4 was higher than sepiapterin.				

Abbreviations: AUC, area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; GD, gestation day; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ, lower limit of quantitation; NA, not applicable; NC, not calculated (less than 3 observed concentration values after the C_{max}); NRR, no reportable result (R^2 was less than 0.8 and/04 the extrapolation of the AUC to infinity represented more than 20% of the total area); R^2, coefficient of determination; TK, toxicokinetic(s)
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.8 薬物動態: その他分布試験

2.6.5.8A Sepiapterin の双方向透過性

Report Title: In vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters				**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002	
Study System		Control (Mock transfected), MDCKII-BCRP-LV, and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 cell monolayers		**CTD Location**: 5.3.2.3	
Experimental Conditions		Cells were preincubated in the assay buffer for 10 minutes to allow cells to adjust to the medium. Assay buffer containing sepiapterin was then added to the appropriate apical (400 µL) or basolateral chamber (800 µL). Prazosin or digoxin efflux ratio was determined as a positive control for BCRP or MDR1 function. After a 120-minute incubation at 37°C, aliquots (100 µL) were taken from the receiver chambers to determine the amount of translocated sepiapterin and controls. Samples were taken from the donor chambers before and after incubation to determine the initial concentrations (C_0) and recovery (R) of the test compounds and the controls. Bidirectional transport of sepiapterin in control, MDCKII-BCRP-LV and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 cells was determined by HPLC-MS/MS.			
Analyte		Sepiapterin			
Assay		HPLC-MS/MS			
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for Sepiapterin and Controls Across MDCKII-Mock-LV Cell Monolayers					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Ctrl}**	
Sepiapterin	3000 µM	0.38±0.12	2.75±0.11	7.28±2.34	
	300 µM	1.32±0.61	3.98±0.61	3.01±1.47	
	3 µM	1.28±0.09	4.13±1.95	3.23±1.54	
LY	40 µg/mL	1.22±0.40	NA	ND	
Prazosin	1 µM	20.55±1.60	18.57±1.21	0.90±0.09	
Prazosin+Ko143	1 µM+1 µM	26.09±1.49	26.13±0.45	1.00±0.06	
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for Sepiapterin and Controls Across MDCKII-BCRP-LV Cell Monolayers					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
Sepiapterin	3000 µM	0.30±0.10	0.93±0.12	3.06±1.09	-4.21±0.20
	300 µM	0.21±0.03	1.53±0.60	7.32±3.02	4.31±1.55
	3 µM	0.93±0.01	1.35±0.10	1.45±0.10	-1.78±0.22
LY	40 µg/mL	0.39±0.06	NA	ND	ND
Prazosin	1 µM	3.65±1.18	40.35±0.84	11.06±3.59	10.15±4.16
Prazosin+Ko143	1 µM+1 µM	19.47±2.02	21.62±2.16	1.11±0.16	0.11±0.17

Report Title: In vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters				**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002	
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for Sepiapterin and Controls Across Abcb1KO-MDCKII-Mock Cell Monolayers					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Ctrl}**	
Sepiapterin	3000 µM	0.94±0.64	1.91±0.93	2.04±1.71	
	300 µM	0.64±0.23	2.20±0.66	3.41±1.60	
	3 µM	NA	1.21±1.12	NA	
LY	40 µg/mL	0.17±0.01	NA	ND	
LY+sepiapterin (applied apically)	40 µg/mL+ 3000 µM	0.92±0.04	NA	ND	
LY+sepiapterin (applied basolaterally)	40 µg/mL+ 3000 µM	18.31±0.07	NA	ND	
Digoxin	1 µM	1.39±0.10	2.37±0.23	1.71±0.20	
Digoxin+valspodar	1 µM+10 µM	1.71±1.68	2.08±0.17	1.22±1.20	
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for Sepiapterin and Controls Across Abcb1KO-MDCKII-MDR1-LV Cell Monolayers					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
Sepiapterin	3000 µM	0.86±0.11	1.05±0.09	1.22±0.19	-0.82±0.51
	300 µM	0.74±0.13	1.00±0.15	1.35±0.31	-2.05±0.21
	3 µM	NA	0.54±0.94	NA	NA
LY	40 µg/mL	0.31±0.08	NA	ND	ND
LY+sepiapterin (applied apically)	40 µg/mL+ 3000 µM	1.77±0.55	NA	ND	ND
LY+sepiapterin (applied basolaterally)	40 µg/mL+ 3000 µM	18.26±0.05	NA	ND	ND
Digoxin	1 µM	0.41±0.06	15.38±1.05	37.08±6.15	35.37±4.44
Digoxin+valspodar	1 µM+10 µM	2.51±1.08	5.51±0.56	2.19±0.97	0.98±1.94

Report Title: In vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters	**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002
Additional Information: The bidirectional permeability of sepiapterin was tested in MDCKII-BCRP and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 monolayer assays at 3 concentrations of the test compound (3, 300, and 3000 µM) applying a 120-minute incubation period. Sepiapterin is a substrate of the human BCRP transporters. The P_{app} values in the B-A direction were higher than in the A-B direction in both transporter expressing and in control cells. The highest net-efflux ratio was 4.31 at 300 µM. A follow-up assay was conducted at 300 µM sepiapterin concentration in the presence and absence of reference inhibitor, where the observed net-ER was 2.86, which was decreased to 0.03 in the presence of 1 µM Ko143. Experiments revealed that sepiapterin is a low permeability compound in Abcb1KO-MDCKII-MDR1 test system (P_{app} values below 1.05 in MDR1-containing cells and below 2.2 in control cells), with P_{app} values comparable to that of the low permeability control (LY). The efflux ratio of sepiapterin for MDR1 was below 2 at all investigated concentrations, indicating that sepiapterin is not an in vitro substrate of this transporter. Bidirectional permeability in Abcb1KO-MDCKII-MDR1 cells was also tested at two concentrations (10 and 100 µM) of sepiapterin in the presence and absence of reference inhibitor (10 µM Valspodar) in order to determine active transport. The outcome of the follow-up measurement was in line with the first (4 concentrations) assay, showing efflux ratios below 2 at both investigated concentrations. The presence of Valspodar had no effect on the bidirectional transport of the test article, indicating that sepiapterin is not an in vitro substrate of MDR1. The value of permeability and functional controls met the acceptance criteria.	

Abbreviations: A-B: apical to basolateral direction; ABC, ATP-binding cassette; B-A, basolateral to apical direction; BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; CTD, Common Technical Document; ER, Efflux ratio; ER_{Ctrl}, efflux ratio in Mock transfected MDCKII cell monolayers; ER_{Trp}, efflux ratio in transporter expressing MDCKII cell monolayers; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LY, Lucifer Yellow; MATE, multidrug and toxin extrusion; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MDR1, multidrug resistance protein 1; NA, not applicable; ND, not determined; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; P_{app}, apparent permeability coefficient; SD, standard deviation

2.6.5.8B BH4 双方向透過性

Report Title: In vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH_4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters					**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012
Study System		Control and transporter transfected MDCKII cell monolayers. MDCKII-Mock-LV (control cell line for BCRP), MDCKII-BCRP-LV, Abcb1KO-MDCKII-Mock-LV (control cell line for MDR1) and Abcb1KO-MDCKIIMDR1-LV			**CTD Location**: 5.3.2.3
Experimental Conditions		Cells were preincubated in the assay buffer for 10 minutes to allow cells to adjust to the medium. Assay buffer supplemented with 0.1% DTT stabilizing agent, containing BH_4 was then added to the appropriate apical (400 µL) or basolateral chamber (800 µL). Prazosin or digoxin efflux ratio was determined as positive control for BCRP or MDR1 function, respectively. After a 120-minute incubation at 37°C, aliquots (30 µL for BH_4, 100 µL for controls) were taken from the receiver chambers to determine the amount of translocated BH_4 and controls. Samples were taken from the donor chambers before and after incubation to determine the initial concentrations (C_0) and recovery (R) of the test compounds and the controls. Bidirectional transport of BH_4 in control, MDCKII-BCRP-LV and Abcb1KO-MDCKII-MDR1-LV cells was determined by HPLC-MS/MS. Samples containing prazosin or digoxin were analyzed by liquid scintillation counting.			
Analyte		BH_4			
Assay		HPLC-MS/MS			
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for BH_4 and Controls Across MDCKII-Mock-LV cell Monolayers in the Presence of 0.1% DTT					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Ctrl}**	
BH_4	2000 µM	1.04±0.61	2.39±1.10	2.29±1.72	
	200 µM	1.19±0.30	1.86±0.42	1.56±0.53	
	20 µM	2.41±1.29	3.35±1.77	1.39±1.05	
	2 µM	0.00±0.00	1.34±0.21	NA	
LY+BH_4	40 µg/mL+ 2000 µM	1.39±0.15	NA	ND	
Prazosin	1 µM	21.08±2.79	18.68±0.70	0.89±0.12	
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for BH_4 and Controls Across MDCKII-BCRP-LV Cell Monolayers in the Presence of 0.1% DTT					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
BH_4	2000 µM	0.55±0.03	0.90±0.09	1.63±0.19	0.71±0.54
	200 µM	0.40±0.22	0.46±0.18	1.17±0.80	0.75±0.57
	20 µM	0.21±0.21	1.88±0.30	8.82±8.80	6.34±7.92
	2 µM	0.00±0.00	0.33±0.56	NA	NA
LY+BH_4	40 µg/mL+ 2000 µM	0.08±0.02	NA	ND	ND
Prazosin	1 µM	5.53±0.63	43.81±4.80	7.92±1.25	7.04±1.87

Report Title: In vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH_4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters					**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for BH_4 and Controls Across Abcb1KO-MDCKII-Mock-LV Cell Monolayers in the Presence of 0.1% DTT					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Ctrl}**	
BH_4	500 µM	0.78±0.52	6.94±1.80	8.89±6.34	
	200 µM	3.41±2.59	9.08±1.51	2.66±2.07	
	20 µM	6.25±3.84	11.44±3.13	1.83±1.23	
	2 µM	5.71±1.76	4.68±0.51	0.82±0.27	
LY+BH_4	40 µg/mL+ 500 µM	1.92±0.31	NA	ND	
Mean (n=3)±SD Bidirectional Permeability and Efflux Ratio Values for BH_4 and Controls Across Abcb1KO-MDCKII-MDR1-LV Cell Monolayers in the Presence of 0.1% DTT					
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
BH_4	500 µM	1.28±0.67	0.82±0.14	0.64±0.35	0.07±0.06
	200 µM	0.50±0.37	1.26±0.31	2.53±1.95	0.95±1.04
	20 µM	0.08±0.14	2.03±0.41	24.84±43.31	13.57±25.37
	2 µM	0.00±0.00	0.90±0.81	NA	NA
LY+BH_4	40 µg/mL+ 500 µM	0.72±0.04	NA	ND	ND

Report Title: In vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH_4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters	**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012
Additional Information: During the study, it was found that BH_4 was not stable enough throughout the time period of the assay. Thus, stabilizing agent (DTT, up to 0.1% in the incubation mixture) was added to the test system. The potential damaging effect of DTT on the monolayer cells was tested prior to the test article experiment in separate measurements. DTT affected the function of both transporters. Both in MDCKII-BCRP-LV and Abcb1KO-MDCKII-MDR-LV the presence of 0.1% DTT decreased the fold accumulation values in the positive controls below the acceptance criteria. While at normal conditions (without DTT), the value of permeability and functional controls met the acceptance criteria indicating that the MDCKII-Mock-LV control, the MDCKII-BCRP-LV, the Abcb1KO-MDCKII-Mock-LV control and Abcb1KO-MDCKII-MDR1-LV cells functioned properly. In the MDCKII-BCRP monolayer experiment, the bidirectional permeability of BH_4 was tested at four concentration points (2, 20, 200, and 2000 µM, nominal) during a 120-minute incubation period, in presence of 0.1% DTT. The P_{app} values in the B-A direction were higher than in the A-B direction in transporter expressing cells (and at 2000 µM in control cells). Due to the presence of 0.1% DTT in the test system the results should be interpreted with caution. A maximum net-efflux ratio of 6.34 at 20 µM nominal concentration of BH_4 was measured, suggesting that the test article might be a substrate of BCRP. In the Abcb1KO-MDCKII-MDR1 monolayer experiment the bidirectional permeability of BH_4 was tested at four concentration points (2, 20, 200, and 500 µM, nominal) during a 120-minute incubation period, in presence of 0.1% DTT. The P_{app} values in B-A direction were higher than in A-B direction both in transporter expressing cells and control cells. Due to the presence of 0.1% DTT in the test system the results should be interpreted with caution. A maximum net-efflux ratio of 13.57 at 20 µM nominal concentration of BH_4 was measured, suggesting that the test article might be a substrate of MDR1.	

Abbreviations: A-B: apical to basolateral direction; ABC, ATP-binding cassette; B-A, basolateral to apical direction; BCRP, breast cancer resistance protein; BH_4, tetrahydrobiopterin; BSEP, bile salt export pump; CTD, Common Technical Document; DTT, dithiothreitol; ENT, equilibrative nucleoside transporter; ER, Efflux ratio; ER_{Ctrl}, Efflux ratio in Mock transfected MDCKII cell monolayers; ER_{Trp}, Efflux ratio in transporter expressing MDCKII cell monolayers; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LY, Lucifer Yellow; MATE, multidrug and toxin extrusion; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MDR1, multidrug resistance protein 1; NA, not applicable; ND, not determined; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; P_{app}, apparent permeability coefficient; SD, standard deviation

2.6.5.9 薬物動態: In Vivo 代謝

2.6.5.9A ラット [^{14}C]-Sepiapterin 単回投与後の代謝

Report Title: Metabolite Radioprofiling and Identification in Male Sprague Dawley Rats Following a Single Oral Administration of [^{14}C]-PTC923						**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male		**Duration of Dosing**: Single oral dose				**Study Number**: PTC923-2022-035			
Date of First Dose: 22 March 2022		**Vehicle/Formulation**: Oral Mix				**CTD Location**: 4.2.2.4			
Method of Administration: Oral (gavage)		**Dose Volume (mL/kg)**: 15				**GLP Compliance**: Non-GLP			
Dose Level Targeted: 100 mg/kg and approximately 250 µCi/kg, administered at a nominal dose volume of 15 mL/kg									
Compound Code	**Modification**	**Intact Rats**				**BDC Rats**			
		Plasma[a] 0-24 h	**Urine 0-24 h (9.01% of Dose)**	**Feces 0-24 h (84.1% of Dose**	**Total: Urine+ Feces[b] (93.1% of Dose)**	**Bile 0-24 h (0.55% of Dose)**	**Urine 0-24 h (8.29% of Dose)**	**Feces 0-24 h (87.3% of Dose)**	**Total: Bile+ Urine+ Feces[c] (95.6% of Dose)**
		%AUC	**%Dose**	**%Dose**	**%Dose**	**%AUC**	**%Dose**	**%Dose**	**%Dose**
Sepiapterin	Parent	0.91	0.27	20.7	21.0	0.06	0.22	16.2	16.5
Pterin	Side chain cleavage	ND		ND				ND	
M219/1 (2'-deoxy-7,8-dehydro sepiapterin)	Dehydration, hydrogenation, and dehydrogenation	ND	ND	0.93	0.93	0.02	ND	1.63	1.65
M221/1 (2'-deoxy-sepiapterin)	Dehydration and hydrogenation	0.76	0.24	25.1	25.3	0.13	0.30	30.0	30.4
M272/1	Oxidative deamination, oxidation, and hydrogenation	ND	ND	1.48	1.48	ND	ND	2.42	2.42
M221/2	Dehydration and hydrogenation/reduction	ND	ND	6.68	6.68	0.02	0.08	6.82	6.92
M223/1	Dehydration and hydrogenation/reduction	ND	0.11	2.60	2.71	ND	0.17	4.35	4.52
M181/1 (7,8-dihydroxanthopterin, XH_2)	Oxidative side chain cleavage	ND[d]	0.22	1.67	1.89	0.07	3.15	3.02	6.24
Isoxanthopterin	Oxidation of pterin	ND	1.93	ND	1.93			ND	
M257/1	Methylation of pyrimidine ring oxidative rearrangement of BH_4	8.67		ND				ND	
D-biopterin	Dehydrogenation and reduction	ND	ND	3.34	3.34	ND	ND	2.72	2.72
L-biopterin	Dehydrogenation and reduction	2.20	0.38	2.97	3.35	0.04	0.70	2.30	3.04

Report Title: Metabolite Radioprofiling and Identification in Male Sprague Dawley Rats Following a Single Oral Administration of [^{14}C]-PTC923						**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male		**Duration of Dosing**: Single oral dose				**Study Number**: PTC923-2022-035			
Compound Code	**Modification**	**Intact Rats**				**BDC Rats**			
		Plasma[a] 0-24 h	**Urine 0-24 h (9.01% of Dose)**	**Feces 0-24 h (84.1% of Dose**	**Total: Urine+ Feces[b] (93.1% of Dose)**	**Bile 0-24 h (0.55% of Dose)**	**Urine 0-24 h (8.29% of Dose)**	**Feces 0-24 h (87.3% of Dose**	**Total: Bile+ Urine+ Feces[c] (95.6% of Dose)**
		%AUC	**%Dose**	**%Dose**	**%Dose**	**%AUC**	**%Dose**	**%Dose**	**%Dose**
M255/1	Hydrogenation and oxidation	2.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M269/1,2 (possibly BH_4 adducts/artifacts)	Hydrogenation, oxidation, and methylation	39.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M239/1 (possibly 7,8-dihydro-D-biopterin)	Hydrogenation/reduction	ND	ND	4.17	4.17	ND	ND	1.39	1.39
7,8-dihydro-L-biopterin (BH_2)	Hydrogenation/reduction	ND	1.05	3.89	4.94	0.02	1.19	1.93	3.14
(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4)	Hydrogenation/reduction	0.85	2.93	ND	2.93	ND	1.24	ND	1.24
Total		54.8	7.13	73.6	80.7	0.36	7.05	72.7	80.2
Additional Information: In addition to parent sepiapterin, 17 metabolites were characterized with corresponding radioactive peaks in various matrices after a 100 mg/kg single oral dose of [^{14}C]-sepiapterin in rats. Sepiapterin was extensively metabolized, and the metabolites were excreted primarily in feces. The major metabolic pathways involved hydrogenation/reduction, dehydrogenation, oxidation, methylation, oxidative deamination, and side chain cleavage, alone or in combination thereof. Possible metabolic pathways are shown in 2.6.5.11A.									

Abbreviations: AUC, area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-last}}$, area under the concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time; BDC, bile duct cannulated; BH_2, 7,8-dihydrobiopterin; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; LC-MS, liquid chromatography with mass spectrometry; ND, not detected; TRA, total radioactivity; XH_2, 7,8-dihydroxanthopterin

[a] $\%AUC_{0\text{-last}}$ of TRA

[b] Percent of dose for combined urine 0 to 24 hours and feces 0 to 24 hours

[c] Percent of dose for combined bile 0 to 24 hours, urine 0 to 24 hours, and feces 0 to 24 hours

[d] Detectable by LC-MS only

Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.9B サル[^{14}C]-Sepiapterin 単回投与後の代謝

Report Title: Metabolite Radioprofiling and Identification in Male Cynomolgus Monkeys Following a Single Oral Administration of [^{14}C]-PTC923				**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin	
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing**: Single oral dose		**Study Number**: PTC923-2022-036	
Date of First Dose: 30 March 2022		**Vehicle/Formulation**: Oral Mix		**CTD Location**: 4.2.2.4	
Method of Administration: Oral (gavage)		**Dose Volume** (mL/kg): 5		**GLP Compliance**: Non-GLP	
Compound Code	**Modification**	**Plasma[a] 0-48 h**	**Urine 0-72 h (6.9% of Dose)**	**Feces 0-48 h (30.8% of Dose**	**Total: Urine+ Feces[b] (37.7% of Dose)**
		%AUC	**%Dose**	**%Dose**	**%Dose**
M220/1	Dehydration of M238/1	ND	ND	1.20	1.20
M222/1	Oxidative deamination, dehydration, and hydrogenation	ND	0.14	9.33	9.47
M221/1 (2'-deoxy-sepiapterin)	Dehydration and hydrogenation	0.25			
M282/1	Oxidation, oxidative deamination, methylation, dehydration, and hydrogenation	ND	1.50	ND	1.50
M381/1	Oxidation, glutamic acid conjugation, and oxidative deamination	16.1	ND	ND	ND
M238/1	Oxidative deamination, hydrogenation, and dehydrogenation	ND	ND	1.41	1.41
M272/1	Oxidative deamination, oxidation, and hydrogenation	0.23	0.08	1.17	1.25
M221/2	Dehydration and hydrogenation/reduction	ND	ND	0.18	0.18
Pterin	Side chain cleavage	ND[c]	0.19	ND	7.61
Sepiapterin	Parent	0.27		7.42	
M238/2	Oxidative deamination	ND	ND		
M224/1	Oxidative deamination, dehydration, and hydrogenation/reduction	ND	ND	0.94	0.94
M223/1	Dehydration and hydrogenation/reduction	ND	0.09	ND	0.09

Report Title: Metabolite Radioprofiling and Identification in Male Cynomolgus Monkeys Following a Single Oral Administration of [^{14}C]-PTC923				**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin	
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing**: Single oral dose		**Study Number**: PTC923-2022-036	
Compound Code	**Modification**	**Plasma[a] 0-48 h**	**Urine 0-72 h (6.9% of Dose)**	**Feces 0-48 h (30.8% of Dose**	**Total: Urine+ Feces[b] (37.7% of Dose)**
		%AUC	**%Dose**	**%Dose**	**%Dose**
M181/1 (7,8-dihydroxanthopterin, XH_2)	Oxidative side chain cleavage	1.38	1.01	0.91	1.92
M182/1	Oxidative deamination and oxidative side chain cleavage	ND	ND		
D-biopterin	Dehydrogenation and reduction	ND	ND	0.23	0.23
L-biopterin	Dehydrogenation and reduction	0.78	0.45	0.38	0.83
M255/1	Hydrogenation and oxidation	0.31	0.07	ND	0.07
M269/1 (possibly BH_4 adduct/artifact)	Hydrogenation, oxidation, and methylation	4.33	0.18	ND	0.18
M269/2 (possibly BH_4 adduct/artifact)			ND		
M240/1	Oxidative deamination and hydrogenation/reduction	ND	ND	2.37	2.37
M239/1 (possibly7,8-dihydro-D-biopterin)	Hydrogenation/reduction	ND	ND		
M240/2	Oxidative deamination and hydrogenation/reduction	ND	ND	0.67	1.62
7,8-dihydro-L-biopterin	Hydrogenation/reduction	ND	0.95		
(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4)	Hydrogenation/reduction	0.28	0.52	ND	0.52
Total		24.0	5.17	26.2	31.4
Additional Information: In addition to parent sepiapterin, 24 metabolites were characterized with corresponding radioactive peaks in various matrices after a 50 mg/kg single oral dose of [^{14}C]-sepiapterin in male cynomolgus monkeys. Sepiapterin was extensively metabolized. The major metabolic pathways involved oxidation/dehydrogenation, reduction/hydrogenation, oxidative deamination, dehydration, side chain cleavage, methylation, and possibly glutamic acid conjugation, alone or in combination thereof. The low mass balance recovery and low retention of [^{14}C]-sepiapterin-derived radioactivity in carcasses following 7-day washout period, indicated volatile metabolite formation through the pyrimidine ring opening followed by the loss of guanidine moiety following oral dose administration of sepiapterin in monkeys. Possible metabolic pathways are shown in 2.6.5.11B.					

Abbreviations: AUC, area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-last}}$, area under the concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time; BH_4, tetrahydrobiopterin; CTD, Common Technical Document; LC-MS, liquid chromatography with mass spectrometry; ND, not detected; TRA, total radioactivity; XH_2, 7,8-dihydroxanthopterin

[a] $\%AUC_{0\text{-last}}$ of TRA

[b] Percent of dose for combined urine 0 to 72 hours and feces 0 to 48 hours

[c] Detectable by LC-MS only
Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.10 薬物動態: In Vitro 代謝

2.6.5.10A 組織 S9 画分における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性

Report Title: In Vitro Metabolism of [^{14}C]-PTC923 in Tissue S9 Fractions		**Test Article**: [^{14}C]-sepiapterin **Study Number**: PTC923-2023-081
Study System	Male rat, male minipig, male monkey, and mixed-sex human liver and kidney S9 Mixed-sex human intestinal and lung S9	**CTD Location**: 4.2.2.4
Experimental Conditions	[^{14}C]-sepiapterin, at 50 µM, was incubated with male rat, male minipig, male monkey, and mixed-sex human liver and kidney S9 (ca. 2 mg protein/mL) and with mixed-sex human intestinal and lung S9 (ca. 2 mg protein/mL) in 50 mM potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA, and NADPH regenerating system for 0, 30, and 60 minutes in a water bath maintained at ca. 37°C under yellow lights. The incubations were terminated by the addition of ice-cold acetonitrile after mixing with 10% (w/v) L-ascorbic acid in water in a 100:11.1 (v/v) ratio. Positive controls were used to evaluate the functionality of the S9 test systems, and [^{14}C]-sepiapterin incubated in the absence of S9 fractions was used as negative control. Volatile metabolite formation was accessed by comparing the radioactivity recovery in each time point sample with the 0 minute samples before and after nitrogen evaporation overnight (evaporation loss).	
Assay	Metabolite radioprofiling: HPLC-radiochromatography Total radioactivity: LSC Metabolite characterization and identification: LC-HR-MS	

Radioactivity Measurements for Evaporation Loss (Volatile Metabolite Formation) Evaluation

Test System	% Recovery (After Evaporation)			% Recovery (After Evaporation and Relative to 0 Minutes)		
	0 Min	30 Min	60 Min	0 Min	30 Min	60 Min
Rat liver S9	96.6	96.6	95.5	100	100	98.9
Minipig liver S9	98.1	104	96.5	100	106	98.4
Monkey liver S9	96.3	96.8	96.6	100	101	100
Human liver S9	98.9	96.2	98.5	100	97.3	99.6
Rat kidney S9	96.1	84.6	88.1	100	88.0	91.7
Minipig kidney S9	90.8	96.7	90.6	100	106	100
Monkey kidney S9	94.1	84.3	94.4	100	89.6	100
Human kidney S9	88.2	96.2	90.1	100	109	102
Human intestinal S9	88.0	96.5	87.1	100	110	99.0
Human lung S9	85.1	86.1	89.4	100	101	105

Relative Percent Distribution of [^{14}C]-Sepiapterin and Its Metabolites After 30- and 60-Minute Incubation of 50 µM [^{14}C]-Sepiapterin With Rat, Minipig, Monkey, and Human Liver S9 Incubations

Metabolite	[M+H]$^+$	Rat Liver S9		Minipig Liver S9		Monkey Liver S9		Human Liver S9	
		30 Min[a]	60 Min[a]	30 Min[a]	60 Min[a]	30 Min[a]	60 Min[a]	30 Min[a]	60 Min[a]
Sepiapterin	238	2.65	ND	73.91	82.10	7.35	0.67	7.65	1.26
M235/2 (7,8-dehydro sepiapterin)	236	0.17	ND	6.11	5.63	0.44	0.04	0.67	0.10
M269/1 and/or 2	270	27.21	39.98	5.74	9.26	3.77	5.06	2.95	4.73
7,8-dihydro-L-biopterin (BH_2)	240	39.60	19.48	4.08	2.74	84.23	74.98	69.25	67.25

Report Title: In Vitro Metabolism of [^{14}C]-PTC923 in Tissue S9 Fractions						**Test Article**: [^{14}C]-sepiapterin **Study Number**: PTC923-2023-081			
M181/1 (XH_2)	182	0.88	ND	1.81	ND	ND	0.64	0.98	ND
D and/or L-biopterin	238	6.43	4.73	2.60	1.60	8.42	6.25	7.94	12.44
(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4)	242	11.80	24.31	4.40	4.53	ND	2.06	0.76	ND
Relative Percent Distribution of [^{14}C]-Sepiapterin and Its Metabolites After 30- and 60-Minute Incubation of 50 µM [^{14}C]-Sepiapterin With Rat, Minipig, Monkey, and Human Kidney S9 Incubations									
Metabolite	**[M+H]$^+$**	**Rat Kidney S9**		**Minipig Kidney S9**		**Monkey Kidney S9**		**Human Kidney S9**	
		30 Min[a]	**60 Min[a]**	**30 Min[a]**	**60 Min[a]**	**30 Min[a]**	**60 Min[a]**	**30 Min[a]**	**60 Min[a]**
Sepiapterin	238	2.36	ND	64.08	62.14	ND	1.04	9.88	0.56
M235/2 (7,8-dehydro sepiapterin)	236	0.18	ND	4.28	4.19	ND	0.08	1.00	0.05
M269/1 and/or 2	270	22.04	40.09	3.60	7.97	1.77	1.79	1.04	2.65
7,8-dihydro-L-biopterin (BH_2)	240	43.12	28.28	5.08	4.56	92.49	66.58	61.82	88.73
M181/1 (7,8-dihydroxanthopterin, XH_2)	182	0.55	0.43	0.90	1.32	ND	0.80	ND	ND
D and/or L-biopterin	238	7.17	8.06	4.49	6.90	10.15	8.47	6.94	8.44
(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4)	242	7.61	20.36	2.30	5.38	ND	0.80	0.68	1.65
Additional Information: Sepiapterin volatile metabolite(s) formation was negligible in rat, minipig, monkey, and human liver S9; rat, minipig, monkey, and human kidney S9; human intestinal S9; and human lung S9 fractions. Sepiapterin was extensively metabolized in liver and kidney S9 fractions from rats, monkeys, and humans, but to a much lesser extent in liver and kidney S9 fractions from minipigs. There were no unique human metabolites observed, and the metabolite profiles were generally comparable across species evaluated. The major metabolic pathways involved hydrogenation/reduction, dehydrogenation, oxidation, methylation, and side chain cleavage, alone or in combination. Proposed metabolic pathways of sepiapterin in rat, minipig, monkey, and human liver and kidney S9 fractions are shown in 2.6.5.11C.									

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; LC-HR-MS, liquid chromatography with high resolution mass spectrometry; LSC, liquid scintillation counting; MS, mass spectrometry; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ND, not detected by radioactivity; XH_2, 7,8-dihydroxanthopterin

[a] Individual contribution for coeluted analytes was estimated by MS response, assuming the same MS response.

2.6.5.10B　　ヒト腸内細菌叢における[^{14}C]-sepiapterin の代謝安定性

Report Title: Metabolic Stability of ^{14}C-PTC923 in Human Intestinal Microbiota		**Test Article**: [^{14}C]-sepiapterin **Study Number**: PTC923-2023-082
Study System	Human intestinal microbiota	**CTD Location**: 5.3.2.3
Experimental Conditions	A pool of human gut microbiota, derived from 7 apparently healthy adult volunteers (Caucasian individuals, subject to European lifestyle and nutrition), was homogenized and grown in a fed-batch fermenter for approximately 40 hours to create a standardized microbiota pool. One day prior to the incubations, the microbiota was diluted 25-fold in the anaerobe SIEM medium and incubated overnight under anaerobic conditions (37°C, 300 rpm) in order to activate the intestinal bacteria. Both live and dead microbiota fractions were diluted in SIEM medium and 1485 µL added to the plate containing 15 µL of the [^{14}C]-sepiapterin dose solution of either 10 or 300 mM (~1 kBq/mL each) to obtain final nominal concentrations of 100 and 3000 µM, respectively, associated with ~0.01 kBq/mL. The content of the wells was immediately mixed after adding the diluted microbiota. The incubations (pH 5.8, 300 rpm) were performed in triplicate at 37°C. At 0, 8, 24, and 48 hours of incubation at 37°C, (whole sample) aliquots of 1 mL were taken from the incubations, and a sub-aliquot of 300 µL was mixed with 4 vol eq. acetonitrile in liquid scintillation vials to inactivate the microbiota. The quenched samples were vortex mixed, evaporated to dryness under nitrogen, dissolved in liquid scintillant, and analyzed by LSC. As negative controls, incubation medium (SIEM) only and microbiota in SIEM only (microbiota without any test compound) were included and analyzed by UPLC and qPCR analysis (0 and 48 hours). As a positive control for anaerobic conditions, the (out)growth of Bifidobacterium in the presence of prebiotic fiber inulin was included and analyzed by qPCR analysis (48 hours). As a positive and negative control for metabolic activity of the used microbiota pool, sulfasalazine was included in the presence or absence of human microbiota, respectively, and was analyzed by UPLC analysis (0 and 48 hours).	
Assay	Radioactivity: LSC Sulfasalazine (metabolic activity marker): UPLC Bifidobacteria biomarker for anaerobic conditions: qPCR	

Concentration of Radioactivity and Recovery in [^{14}C]-Sepiapterin Incubation Samples With Human Intestinal Microbiota

Sample Collection Timepoint (h)	Sepiapterin Concentration (µM)	Target Concentration Radioactivity (kBq/mL)	Measured Concentration Radioactivity (kBq/mL)	Recovery (%)	Mean (SD) Recovery (%)	Mean (SD) Recovery in Control Samples With Dead Microbiota (%)
0	100	0.01	0.0093	102.7	100.0 (2.5)	100.0 (13.1)
			0.0090	99.6		
			0.0088	97.7		
8	100	NA	0.0096	106.4	106.0 (1.3)	108.8 (2.3)
			0.0096	107.0		
			0.0094	104.5		
24	100	NA	0.0086	95.3	97.9 (3.6)	87.2 (4.4)
			0.0087	96.5		
			0.0092	102.1		

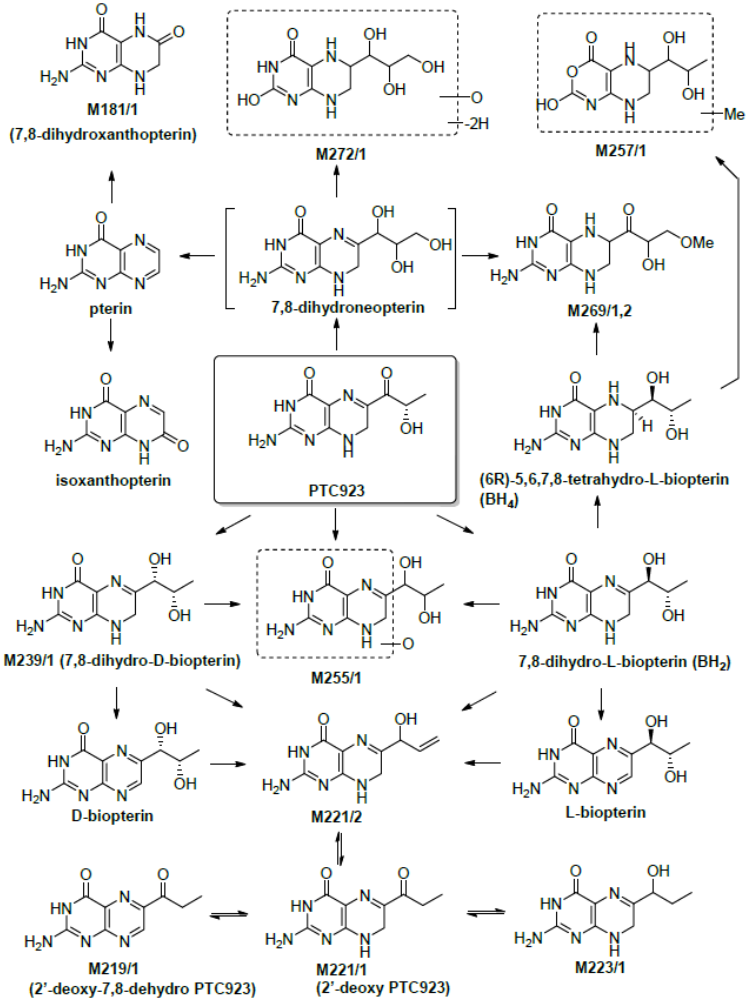
Report Title: Metabolic Stability of ^{14}C-PTC923 in Human Intestinal Microbiota					**Test Article**: [^{14}C]-sepiapterin **Study Number**: PTC923-2023-082	
Sample Collection Timepoint (h)	**Sepiapterin Concentration (μM)**	**Target Concentration Radioactivity (kBq/mL)**	**Measured Concentration Radioactivity (kBq/mL)**	**Recovery (%)**	**Mean (SD) Recovery (%)**	**Mean (SD) Recovery in Control Samples With Dead Microbiota (%)**
48	100	NA	0.0042	46.9	54.5 (6.6)	98.4 (9.3)
			0.0052	58.0		
			0.0053	58.6		
0	3000	0.01	0.0089	99.4	100.0 (2.9)	100.0 (2.2)
			0.0087	97.5		
			0.0092	103.1		
8	3000	NA	0.0091	102.5	104.4 (2.2)	95.4 (3.2)
			0.0095	106.9		
			0.0093	103.7		
24	3000	NA	0.0088	98.8	105.6 (9.3)	86.0 (9.1)
			0.0104	116.2		
			0.0091	101.9		
48	3000	NA	0.0100	112.1	107.8 (4.1)	89.5 (5.9)
			0.0096	107.2		
			0.0093	104.0		

Additional Information: Assay control results confirmed that the assay was conducted under strict anaerobic assay conditions and confirmed the metabolic capacity of the applied gut microbiota.
Incubation of [^{14}C]-sepiapterin at 100 and 3000 μM with living human intestinal microbiota showed that there was ~100% recovery of radioactivity after evaporation for all timepoints, except for the condition where 100 μM sepiapterin was incubated for 48 hours. Mean recovery in this condition was 54.5±6.6%, and this result was reflected in all 3 individual incubations where recovery was 46.9%, 58.0%, and 58.6%, respectively. In contrast, the negative control incubation of 100 μM sepiapterin with dead intestinal microbiota for 48 hours showed negligible radioactivity loss after evaporation where a recovery of 98.4±9.3% was found. These results suggest that intestinal microbiota metabolize sepiapterin at 100 μM and volatile metabolites are being formed during incubation between 24 and 48 hours.
The evaporation loss of volatile metabolite formation was not observed in the incubations with [^{14}C]-sepiapterin at 3000 μM, most likely due to saturation or inhibition of enzyme activity.

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; LSC, liquid scintillation counting; NA, not applicable; SD, standard deviation; SIEM, standard ileal efflux medium; qPCR, quantitative (or real-time) polymerase chain reaction; UPLC, ultra-performance liquid chromatography

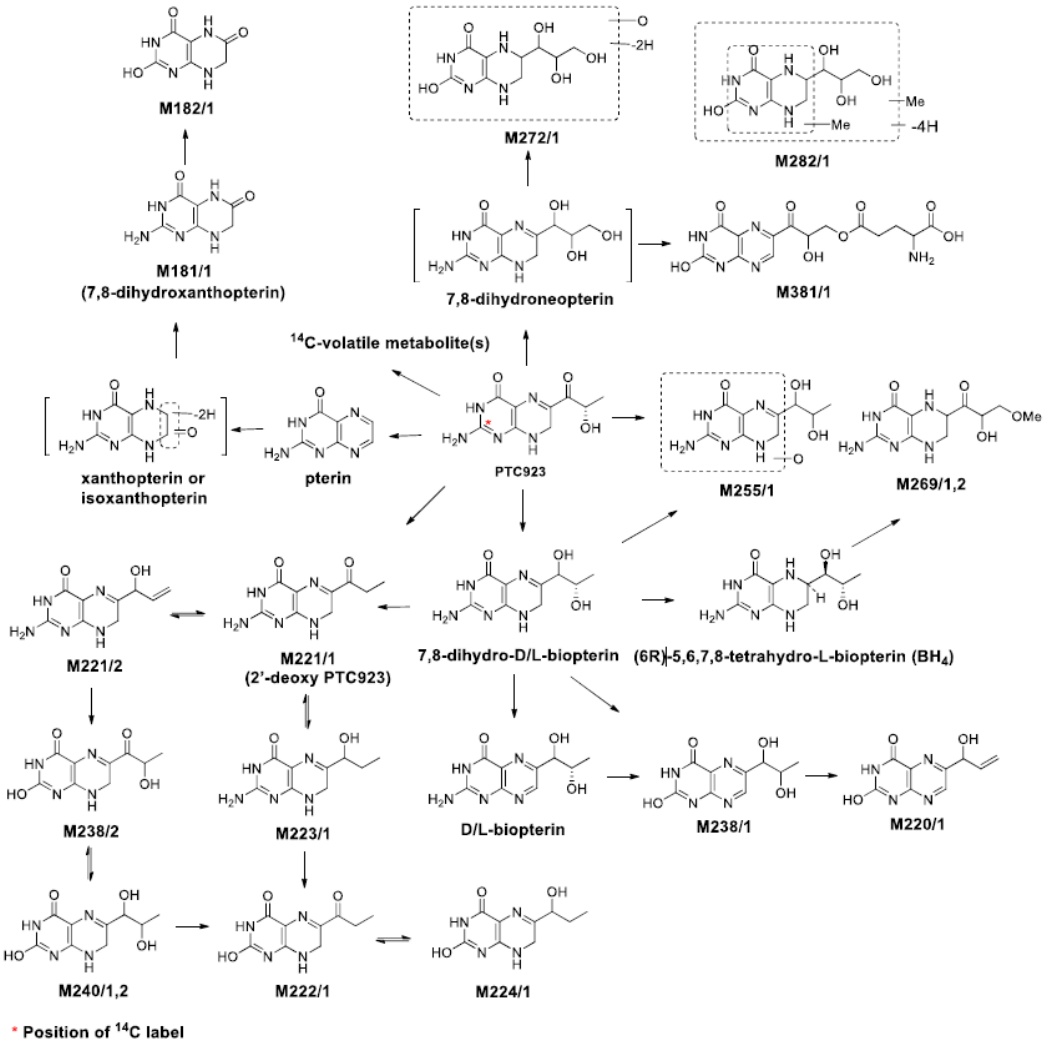
2.6.5.11 薬物動態: 推定代謝経路

2.6.5.11A ラットにおける推定代謝経路



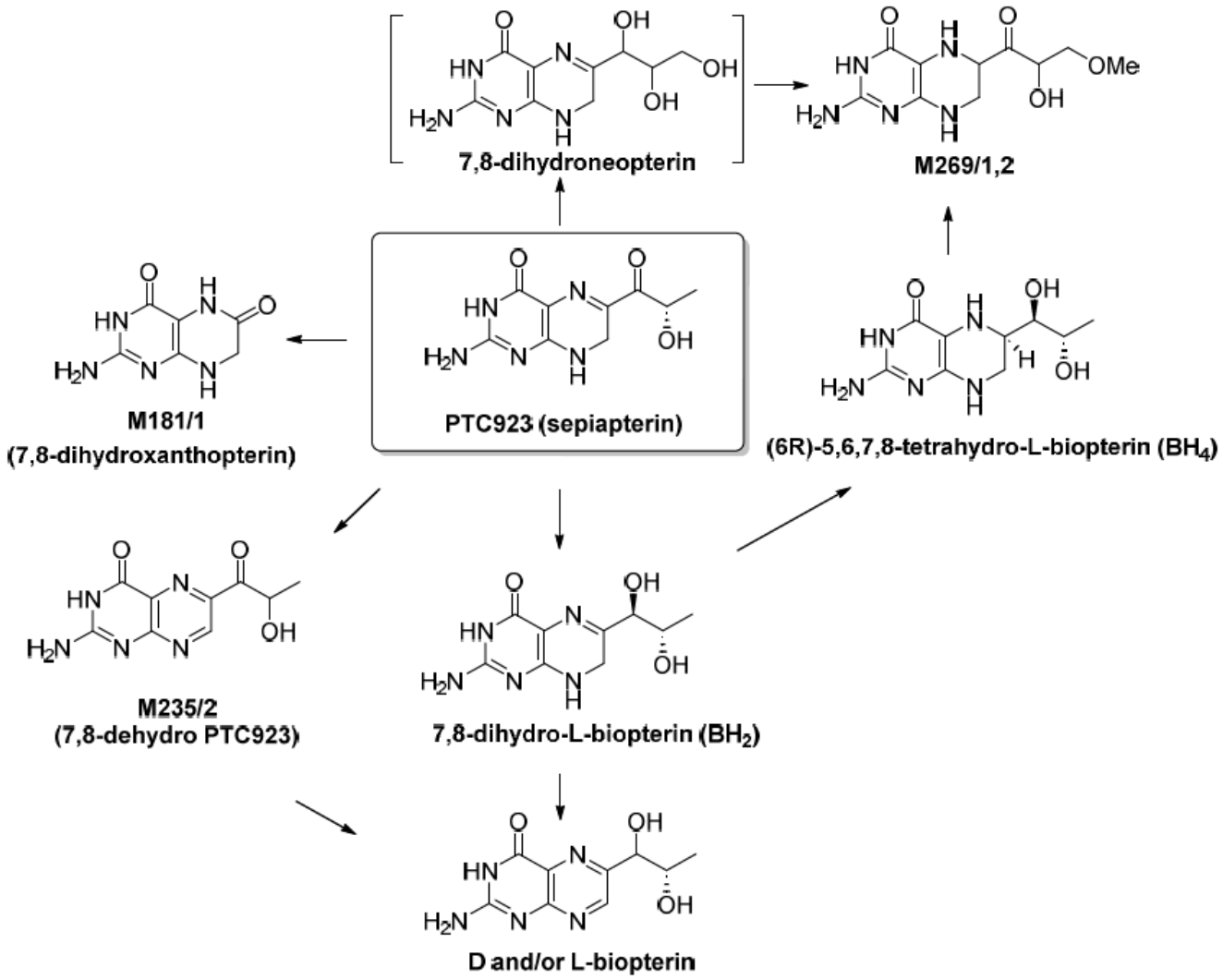
Note: PTC923 is sepiapterin.
Source: PTC923-2022-035

2.6.5.11B　　サルにおける推定代謝経路



Note: PTC923 is sepiapterin.
Source: PTC923-2022-036

2.6.5.11C　　ラット、ミニブタ、サルおよびヒト肝・腎 S9 画分推定代謝経路



Note: 7,8-dihydroxanthopterin (M181/1) is metabolite XH_2.
Source: PTC923-2023-081

2.6.5.12 薬物動態: 薬物代謝酵素誘導/阻害

2.6.5.12A In Vitro Sepiapterin の Cytochrome P450 酵素誘導

Report Title: Sepiapterin Form A: Determination of Human CYP450 Induction					**Test Article**: Sepiapterin		
					Study Number: CNSA-ADME-001-2017		
Study System	Cryopreserved human hepatocytes				**CTD Location**: 5.3.2.2		
Experimental Conditions	Sepiapterin at 0.1, 1.0, and 10 μM, inducer controls (50 μM omeprazole, 1 mM phenobarbital, and 25 μM rifampicin), or vehicle control were added in the cell culture medium (100 μL per well) to 3 lots of pre-plated human hepatocytes (2 plates per lot). The plates were returned to the incubator and incubated for 24 hours. Induction was repeated, and plates were returned to the incubator for an additional 24 hours. The CYP substrates were added to the appropriate wells by replacing the cell culture medium with diluted substrate (100 μL per well) for a nominal final concentration of 100 μM phenacetin, 150 μM bupropion, and 125 μM testosterone. The plates were incubated at 37°C for 2 hours in a cell culture incubator. The reaction was terminated by adding 100 μL RLT lysis reagent to each well. From each well in the assay plate, 50-μL aliquots were removed and added to 200 μL quench solution. The quenched samples were centrifuged at 2000×g (3100 rpm) for 5 minutes in a refrigerated (4°C) centrifuge. An aliquot (50 μL) of the supernatants was removed and diluted with 100 μL Milli-Q water to reduce the % organic content. These samples were used for the enzyme activity assay.						
Analyte	Substrate metabolites						
Assay	Substrate metabolites: HPLC-MS/MS mRNA: RT-PCR						

CYP Induction in 3 Lots of Single-Donor Human Hepatocytes

CYP Isozyme	**Substrate**	**Metabolite Monitored**	**Compound**	**Concentration (μM)**	**Fold Induction (Enzyme Activity)**		
					Lot 1	**Lot 2**	**Lot 3**
1A2	Phenacetin	Acetaminophen	Sepiapterin	0.1	1.2	1.3	1.4
				1	1.2	1.0	1.2
				10	1.4	1.2	1.9
			Omeprazole	50	18.4	4.1	26.4
2B6	Bupropion	Hydroxybupropion	Sepiapterin	0.1	1.3	1.1	1.4
				1	1.2	1.2	1.5
				10	1.1	1.1	1.2
			Phenobarbital	1000	7.0	2.2	4.1
3A4	Testosterone	Hydroxytestosterone	Sepiapterin	0.1	1.2	1.0	1.0
				1	1.3	1.0	1.2
				10	1.1	0.9	1.1
			Rifampicin	25	7.3	5.0	9.1

Report Title: Sepiapterin Form A: Determination of Human CYP450 Induction				**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: CNSA-ADME-001-2017	
Induction in mRNA Expression in 3 Lots of Single-Donor Human Hepatocytes					
CYP Isozyme	**Compound**	**Concentration (μM)**	**Relative Fold Induction**		
			Lot 1	**Lot 2**	**Lot 3**
1A2	Sepiapterin	0.1	0.890	0.860	1.00
		1	0.830	0.930	1.06
		10	1.12	0.970	1.42
	Omeprazole	50	16.6	7.24	16.5
2B6	Sepiapterin	0.1	0.970	0.930	0.960
		1	1.17	0.880	1.02
		10	1.11	0.850	0.840
	Phenobarbital	1000	10.7	10.1	24.4
3A4	Sepiapterin	0.1	0.540	0.900	0.910
		1	0.650	0.670	0.650
		10	0.550	0.650	0.380
	Rifampicin	25	89.1	60.5	301
Additional Information: Relative to the vehicle control, sepiapterin at 0.1, 1.0, and 10 μM demonstrated less than 2.0-fold induction in human CYP isozymes 1A2, 2B6, and 3A4 in the 3 single-donor lots of hepatocytes tested. In every case, the mean fold induction observed for CYPs 1A2, 2B6, and 3A4 was below the 2.0 positive response cut-off demonstrating that sepiapterin did not induce any of the CYPs tested. The positive control inducers (omeprazole, phenobarbital, and rifampicin) demonstrated acceptable induction as measured by enzyme activity in all the lots of hepatocytes with values ranging from 2.2-fold to 26.4-fold. No significant induction in mRNA by sepiapterin compared to DMSO control was observed for human CYPs 1A2, 2B6, and A4 in the 3 single-donor lots of hepatocytes tested. The fold induction in CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA by sepiapterin at 0.1, 1, and 10 μM ranged from 0.9 to 1.9, which is below the 4.0-fold induction considered a positive response. The positive control inducers (omeprazole, phenobarbital, and rifampicin) demonstrated acceptable induction as measured by mRNA activity in all the lots of hepatocytes with values ranging from 7.24-fold to 301-fold.					

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; CYP, cytochrome P450; DMSO, dimethyl sulfoxide; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

2.6.5.12B In Vitro Sepiapterin の Cytochrome P450 酵素阻害

Report Title: Sepiapterin Form A: Human Cytochrome P450 Enzyme Inhibition				**Test Article**: Sepiapterin
				Study Number: CNSA-ADME-002-2017
Study System	Pooled human liver microsomes, mixed sex			**CTD Location**: 5.3.2.2
Experimental Conditions	Sepiapterin and control inhibitors (fluvoxamine, ticlopidine, quercetin, sulfaphenazole, omeprazole, quinidine, and ketoconazole) were tested for inhibition of human CYP isozymes 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4 in a single lot of pooled human liver microsomes, mixed sex, using an IC_{50} method. Sepiapterin and control inhibitors (omeprazole and verapamil) were tested for inhibition of human CYP isozymes 2C19 and 3A4 in a single lot of pooled human liver microsomes, mixed sex, using an IC_{50} shift (time-dependent) method. Sepiapterin was tested at nine concentrations ranging from 0.00545 µM to 50.0 µM. Prior to initiating the assay, the buffer/cofactor/substrate solutions containing the test articles and diluted microsomes were warmed to 37°C. Replicate 75 µL aliquots were added together to initiate the reactions; the final reaction volume was 150 µL. For the T0 control condition, 50-µL aliquots (from the samples containing 0 µM and the highest concentration of the test or control article) were immediately removed and quenched with 200 µL of acetonitrile containing internal standards. The assay plate was sealed and incubated at 37°C with very gentle agitation. After a 30-minute incubation period, 50-µL aliquots were removed and quenched with 200 µL of acetonitrile containing internal standards. Samples were then centrifuged, pooled, diluted, and analyzed by HPLC-MS/MS.			
Analyte	Substrate metabolites			
Assay	Substrate metabolites: HPLC-MS/MS			

Human CYP Enzyme Inhibition

Compound	**CYP Isozyme**	**CYP Substrate**	**IC_{50} (µM) or Mean Inhibition at 50 µM)**
Sepiapterin	1A2	Phenacetin	No inhibition
	2B6	Bupropion	11.4% inhibition
	2C8	Amodiaquine	No inhibition
	2C9	Diclofenac	1.4% inhibition
	2C19	Mephenytoin	14.4% inhibition
	2D6	Dextromethorphan	No inhibition
	3A4	Midazolam	No inhibition
	3A4	Testosterone	3.7% inhibition

Human CYP Enzyme Time-Dependent Inhibition

Compound	**Concentration (µM)**	**CYP Isozyme**	**Substrate**	**IC_{50} (µM)**				**IC_{50} Shift (Fold Difference)**		
				No Preincubation		**Preincubation**				
				+NADPH	-NADPH	+NADPH	-NADPH	**Preinc- NADPH versus Preinc +NADPH**	**No Preinc- NADPH versus Preinc+ NADPH**	**No Preinc+ NADPH versus Preinc+ NADPH**
Sepiapterin	50	2C19	Mephenytoin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	50	3A4	Midazolam	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Additional Information: CYP isozymes 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4 (midazolam and testosterone substrates) were not inhibited by sepiapterin over a test concentration range of 0.00545 to 50.0 µM. The inhibition by sepiapterin was not concentration dependent.
There was no time-dependent inhibition effect by sepiapterin on CYP isozymes 2C19 and 3A4 (midazolam substrate). Little to no inhibition was observed by sepiapterin over a test concentration range of 0.00545 to 50.0 µM.

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; CYP, cytochrome P450; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; IC_{50}, half maximal inhibitory concentration; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ND, not determined; Preinc, preincubation
Note: If data are not able to be curve fit (eg, not full dose-response), then the % inhibition at the highest test concentration (50 μM) is reported.

2.6.5.13 薬物動態: 排泄

2.6.5.13A ラットにおける[^{14}C]-Sepiapterin の単回経口投与による薬物動態、マスバランス及び胆汁中排泄

Report Title: Pharmacokinetics, Mass Balance, and Biliary Excretion Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Sprague Dawley Rats				**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male	**Duration of Dosing**: Single oral dose			**Study Number**: PTC923-2022-031	
Date of First Dose: 22 March 2022	**Vehicle/Formulation**: Oral Mix			**CTD Location**: 4.2.2.5	
Method of Administration: Oral (gavage)	**Dose Volume** (mL/kg): 15			**GLP Compliance**: Non-GLP	
Dose Level Targeted: 100 mg/kg and approximately 250 µCi/kg, administered at a nominal dose volume of 15 mL/kg					
Group, Daily Dose (mg/kg, µCi/kg)	**Group 1 100, 250**	**Group 2 100, 250**		**Group 3 100, 250**	**Group 4 Vehicle Control**
Number of Animals Total/Sex: 37/Male	**3 (Intact)**	**3 (BDC)**		**30 (Intact) (3 animals/timepoint)**	**1**
Collection Matrices	**Excretion/ Balance Urine/Feces**	**Bile Excretion (Duodenal Replacement of Bile Salts)**		**Radio-PK Blood/Plasma**	**Urine, Feces, Carcass, Blood, and Plasma[a]**
		Urine/Feces	**Bile**		
Timepoints/Intervals Postdose (hours)	0 to 8	0 to 8	Predose	1	24
	8 to 24 (0-24 for feces)	8 to 24	0 to 4	2	-
	24 to 48	0 to 24 (feces)	4 to 8	4	-
	48 to 72	24 to 48	8 to 24	6	-
	72 to 96	48 to 72	24 to 48	8	-
	96 to 120	-	48 to 72	10	-
	120 to 144	Daily cage rinse, cage wash at termination, carcass retained at termination[b]		24	-
	144 to 168			48	-
	Daily cage rinse, cage wash at termination, carcass retained at termination[b]			72	-
				168[c]	-

Summary of PK Parameters of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity in Plasma and Blood in Group 3 Intact Rats

Matrix	C_{max} (µg equivalent/ g)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	T_{last} (h)	AUC_{0-24h} (h•µg equivalent/g)	AUC_{0-168h} (h•µg equivalent/g)	AUC_{0-inf} (h•µg equivalent/g)	Blood:Plasma Ratio (based on AUC_{0-24h})
Plasma	2.07	2.0	84.6	168	18.3	42.8	54.3	1.00
Blood	1.76	2.0	8.8	24	17.1	NC	20.2	0.93

Report Title: Pharmacokinetics, Mass Balance, and Biliary Excretion Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Sprague Dawley Rats		**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male	**Duration of Dosing**: Single oral dose	**Study Number**: PTC923-2022-031

Cumulative Recovery of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity Following a Single Oral Dose of 100 mg/kg (~250 µCi/kg) to Group 1 Intact Male Sprague Dawley Rats

Sample/ Timepoint (hours)	Percent Recovery (Percent Dose) – Mean (SD)								Total (% of Dose)
	0-8	0-24	0-48	0-72	0-96	0-120	0-144	0-168	
Urine	4.51 (1.49)	9.01 (0.71)	9.18 (0.75)	9.20 (0.74)	9.20 (0.74)	9.21 (0.75)	9.21 (0.75)	9.21 (0.75)	94.27 (4.15)
Feces	-	84.13 (3.22)	84.67 (3.39)	84.69 (3.40)	84.70 (3.39)	84.70 (3.39)	84.70 (3.39)	84.70 (3.39)	
Cage rinse/wash	-	0.32 (0.10)	0.35 (0.12)	0.35 (0.13)	0.36 (0.13)	0.36 (0.14)	0.36 (0.14)	0.37 (0.14)	

Figure 1: Cumulative Recovery of Radioactivity in Excreta of 3 Group 1 Intact Male Sprague Dawley Rats After a Single Oral Gavage 100 mg/kg (Approximately 250 µCi/kg) Dose of [^{14}C]-Sepiapterin

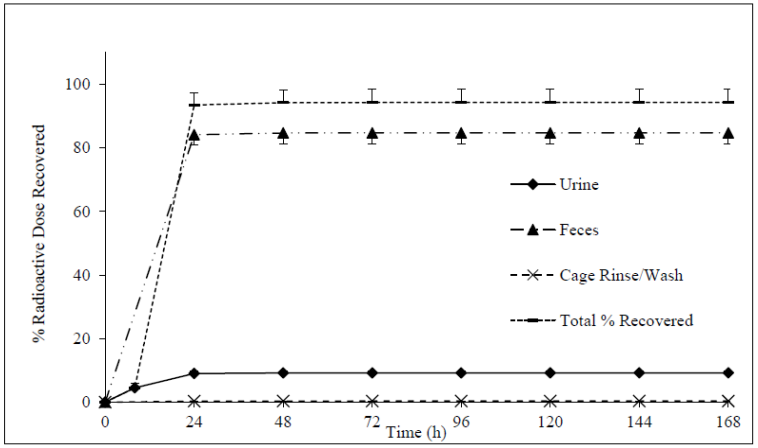
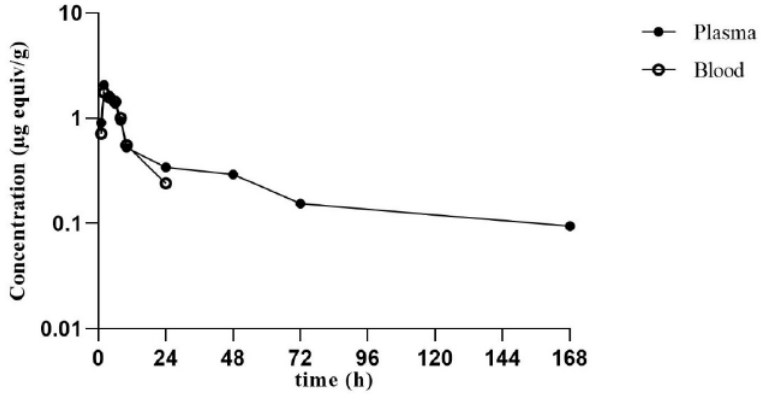


Figure 2: Concentration of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity in Plasma and Blood of Group 3 Intact Male Sprague Dawley Rats After a Single Oral Gavage 100 mg/kg (Approximately 250 µCi/kg) Dose of [^{14}C]-Sepiapterin



Report Title: Pharmacokinetics, Mass Balance, and Biliary Excretion Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Sprague Dawley Rats		**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male	**Duration of Dosing**: Single oral dose	**Study Number**: PTC923-2022-031
Additional Information: Data and mass balance for BDC rats are presented in Table 2.6.5.14A. Following a single PO dose of 100 mg/kg (~250 µCi/kg) [^{14}C]-sepiapterin to intact male rats (Group 3), the C_{max} values of 2.07 µg equiv/g and 1.76 µg equiv/g were reached in plasma and blood, respectively, at 2 hours postdose. Both plasma and blood TRA decreased after their T_{max}. Total plasma radioactivity was detectable (>0.0647 µg equiv/g) at 168 hours postdose but blood radioactivity was below quantifiable limits (<0.187 µg equiv/g) by 48 hours postdose. Mean blood to plasma concentration ratio ranged from 0.70 to 1.08 from 1 hour to 24 hours postdose. Following a single PO dose of 100 mg/kg (~250 µCi/kg) [^{14}C]-sepiapterin to intact male rats (Group 1), 94.27% of the [^{14}C]-sepiapterin-derived radioactivity was excreted by 168 hours, and the main route of excretion was through feces (84.70%), with urine (9.21%) and cage rinse/wash (0.37%) contributing to the total radioactivity recovered.		

Abbreviations: $AUC_{0\text{-inf}}$, area under the concentration-time curve from time zero extrapolated to infinity; $AUC_{0\text{-24h}}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; $AUC_{0\text{-168h}}$, area under the concentration-time curve from time zero to 168 hours postdose; BDC, bile duct cannulated; NC, not calculated; PK, pharmacokinetic(s); T_{last}, time of last measurable concentration

[a] Control urine and feces were collected from one male animal at 24 hours. A terminal blood sample was taken by cardiac puncture under isoflurane-induced anesthesia, blood taken, and plasma was separated by chilled centrifugation.

[b] Carcasses were not processed as mass balance was >90%.

[c] 3 animals per time point, terminal bleeds were by cardiac puncture under isoflurane-induced anesthesia. Plasma was separated by chilled centrifugation.

Note: "-" indicates not applicable.

Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.13B　　カニクイサルにおける[^{14}C]-sepiapterin の単回経口投与による薬物動態及びマスバランス

Report Title: Pharmacokinetic and Mass Balance Study of [^{14}C]-PTC923 Following a Single Oral Gavage Dose to Cynomolgus Monkeys					**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing**: Single oral dose				**Study Number**: PTC923-2022-033
Date of First Dose: 30 March 2022	**Vehicle/Formulation**: Oral Mix				**CTD Location**: 4.2.2.5
Method of Administration: Oral (gavage)	**Dose Volume (mL/kg)**: 5				**GLP Compliance**: Non-GLP
Group 1, Daily Dose (50 mg/kg, 200 µCi/kg) – Targeted			**Number of Animals Total/Sex**: 3/Male		
Samples Collected	**Blood/Plasma**	**Urine**	**Feces**	**Cage Rinses**	**Final Cage Rinse/Wipe**
Timepoints/Intervals Postdose (Hours)	0 Predose	Predose	Predose	Every 24 hours after sample collection	At 168 hours after all sample collections
	1	0 to 6	0 to 24		
	2	6 to 24	24 to 48		
	4	24 to 48	48 to 72		
	6	48 to 72	72 to 96		
	8	72 to 96	96 to 120		
	10	96 to 120	120 to 144		
	24	120 to 144	144 to 168		
	48	144 to 168	-		
	72	-	-		
	168	-	-		

Summary of PK Parameters of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity in Blood and Plasma in Monkeys – Mean (SD)

Matrix	**Mean (SD) PK Parameters**		
	T_{max} (h)	**C_{max} (ng equivalent/g)**	**$AUC_{0\text{-}168h}$ (h•ng equivalent/g)**
Blood	24 (0)	2190 (1020)	132000 (58600)
Plasma	24 (0)	3040 (1490)	184000 (84600)

Blood:Plasma Ratio – Mean (SD)

B:P Ratio	Timepoint (h)									
	1	2	4	6	8	10	24	48	72	168
	0.58 (0.04)	0.64 (0.04)	0.76 (0.09)	0.77 (0.07)	0.83 (0.02)	0.88 (0.05)	0.73 (0.03)	0.65 (0.05)	0.66 (0.03)	0.92 (0.04)

Report Title: Pharmacokinetic and Mass Balance Study of [^{14}C]-PTC923 Following a Single Oral Gavage Dose to Cynomolgus Monkeys										**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus			**Duration of Dosing**: Single oral dose							**Study Number**: PTC923-2022-033
Summary of Percent Recovery (Percent Dose) of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity										
Sample/ Timepoint (hours)	**Percent Recovery (Percent Dose) – Mean (SD)**									
	Predose	**0 to 6**	**6 to 24**	**0 to 24**	**24 to 48**	**48 to 72**	**72 to 96**	**96 to 120**	**120 to 144**	**144 to 168**	**Total (% of Dose)**
Cage rinse	-	-	-	1.54 (0.70)	0.39 (0.23)	0.16 (0.10)	0.07 (0.05)	0.10 (0.08)	0.03 (0.03)	0.05 (0.04)	Total (0 to 168) 2.34 (1.14)
Cage wipe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Total (0 to 168) 0.08 (0.07)
Carcass	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Total (0 to 168) 0.83 (0.30)
Dose site wipe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Total 0 h 1.82 (1.74)
Feces	0.00 (0.00)	-	-	27.54 (20.20)	3.28 (1.19)	0.15 (0.09)	0.02 (0.01)	0.11 (0.16)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	Total (0 to 168) 31.12 (19.75)
Feces wipe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Total (72 h) 0.02 (NA)
Urine	NA	1.55 (1.18)	4.03 (0.91)	-	1.15 (0.33)	0.17 (0.06)	0.10 (0.05)	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.07 (0.08)	7.12 (1.47)
Timepoint (hours)	**2**					**10**					**Total**
Urine wipe	0.05 (NA)					0.39 (0.47)					0.41 (0.44)
All Samples	**-**					**-**					**42.75 (21.93)**

Report Title: Pharmacokinetic and Mass Balance Study of [^{14}C]-PTC923 Following a Single Oral Gavage Dose to Cynomolgus Monkeys		**Test Article**: [^{14}C]-Sepiapterin
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing**: Single oral dose	**Study Number**: PTC923-2022-033

Figure 1: Blood and Plasma Concentration-Time Curves (Mean±SD) of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity After a Single Oral Gavage 50 mg/kg (Approximately 200 µCi/kg) Dose of [^{14}C]-Sepiapterin

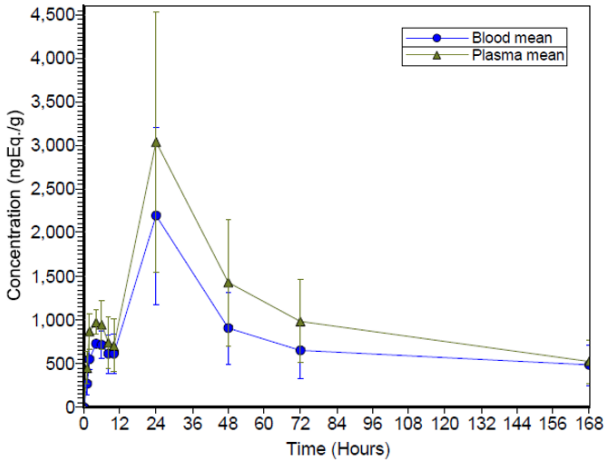
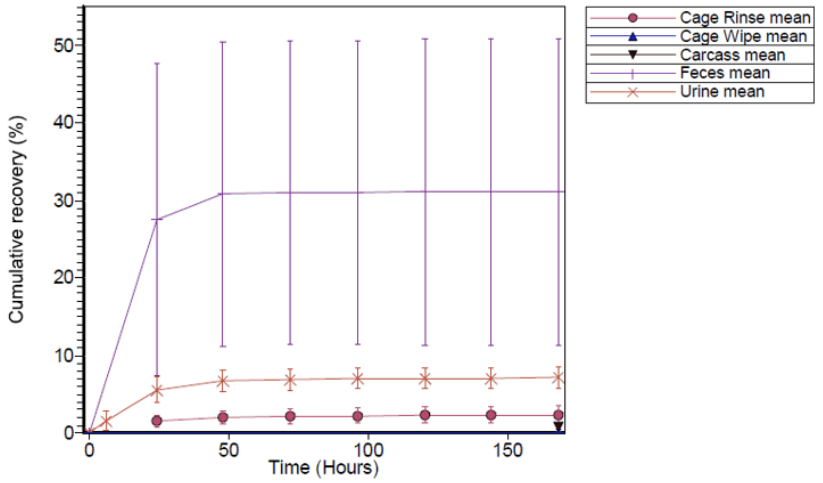


Figure 2: Percent Recovery (%Dose) of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity After a Single Oral Gavage 50 mg/kg (Approximately 200 µCi/kg) Dose of [^{14}C]-Sepiapterin



Abbreviations: AUC, area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}168h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 168 hours postdose; $AUC_{0\text{-}inf}$, area under the concentration-time curve from time zero extrapolated to infinity; B:P, blood:plasma; NA, not applicable; PK, pharmacokinetic(s); SD, standard deviation
Note: "-" indicates not applicable.
Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.14 薬物動態: 胆汁中排泄

2.6.5.14A 胆管カニューレを挿入したラットにおける[^{14}C]-Sepiapterin の単回経口投与による薬物動態、マスバランス及び胆汁中排泄

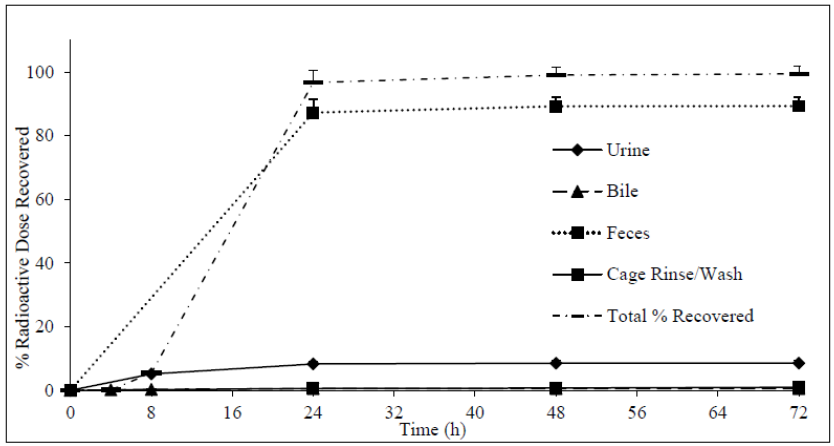
Report Title: Pharmacokinetics, Mass Balance, and Biliary Excretion Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Sprague Dawley Rats				**Test Article**: Sepiapterin	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male	**Duration of Dosing**: Single oral dose			**Study Number**: PTC923-2022-031	
Date of First Dose: 22 March 2022	**Vehicle/Formulation**: Oral Mix			**CTD Location**: 4.2.2.5	
Method of Administration: Oral (gavage)	**Dose Volume** (mL/kg): 15			**GLP Compliance**: Non-GLP	
Dose Level Targeted: 100 mg/kg and approximately 250 µCi/kg, administered at a nominal dose volume of 15 mL/kg					
Group, Daily Dose (mg/kg, µCi/kg)	**Group 1 100, 250**	**Group 2 100, 250**		**Group 3 100, 250**	**Group 4 Vehicle Control**
Number of Animals Total/Sex: 37/Male	3 (Intact)	3 (BDC)		30 (Intact) **(3 Animals/Timepoint)**	1
Collection Matrices	**Excretion/ Balance Urine/Feces**	**Bile Excretion (Duodenal Replacement of Bile Salts)**		**Radio-PK Blood/Plasma**	**Urine, Feces, Carcass, Blood, and Plasma[a]**
		Urine/Feces	**Bile**		
Timepoints/Intervals Postdose (Hours)	0 to 8	0 to 8	Predose	1	24
	8 to 24 (0-24 for feces)	8 to 24	0 to 4	2	-
	24 to 48	0 to 24 (feces)	4 to 8	4	-
	48 to 72	24 to 48	8 to 24	6	-
	72 to 96	48 to 72	24 to 48	8	-
	96 to 120	-	48 to 72	10	-
	120 to 144	Daily cage rinse, cage wash at termination, carcass retained at termination[b]		24	-
	144 to 168			48	-
	Daily cage rinse, cage wash at termination, carcass retained at termination[b]			72	-
				168[c]	-

Cumulative Recovery of [^{14}C]-Sepiapterin-Derived Radioactivity Following a Single Oral Dose of 100 mg/kg (~250 µCi/kg) to Group 2 Male BDC Sprague Dawley Rats – Mean (SD)

Sample/ Timepoint (Hours)	**Percent Recovery (Percent Dose) – Mean (SD)**					**Total (% of Dose)**
	0-4	**0-8**	**0-24**	**0-48**	**0-72**	
Bile	0.15 (0.06)	0.32 (0.11)	0.55 (0.18)	0.57 (0.22)	0.57 (0.22)	99.43 (2.30)
Urine	-	5.16 (0.65)	8.29 (0.85)	8.53 (0.93)	8.56 (0.92)	
Feces	-	-	87.25 (4.36)	89.24 (2.99)	89.31 (2.97)	
Cage rinse/wash	-	-	0.60 (0.22)	0.71 (0.24)	0.99 (0.49)	

Report Title: Pharmacokinetics, Mass Balance, and Biliary Excretion Following a Single Oral Dose of [^{14}C]-PTC923 in Male Sprague Dawley Rats		**Test Article**: Sepiapterin
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley, male	**Duration of Dosing**: Single oral dose	**Study Number**: PTC923-2022-031

Figure 1: Cumulative Recovery of Radioactivity in Excreta of 3 Group 2 Bile Duct Cannulate Male Sprague Dawley Rats After a Single Oral Gavage 100 mg/kg (approximately 250 µCi/kg) Dose of [^{14}C]-Sepiapterin



Additional Information: Data for intact rats are presented in Table 2.6.5.13A.
Following a single PO dose of 100 mg/kg (~250 µCi/kg) [^{14}C]-sepiapterin to male BDC rats (Group 2), 99.43% of the [^{14}C]-sepiapterin-derived radioactivity was excreted by 72 hours and the main route of excretion was through feces (89.31%), with urine (8.56%), bile (0.57%), and cage rinse/wash (0.99%) contributing to the total radioactivity recovered.

Abbreviations: BDC, bile duct cannulated; NC, not calculated; PK, pharmacokinetic(s); SD, standard deviation
[a] Control urine and feces were collected from one male animal at 24 hours. A terminal blood sample was taken by cardiac puncture under isoflurane-induced anesthesia, blood taken, and plasma was separated by chilled centrifugation.
[b] Carcasses were not processed as mass balance was >90%.
[c] 3 animals per time point, terminal bleeds were by cardiac puncture under isoflurane-induced anesthesia. Plasma was separated by chilled centrifugation.
Note: "-" indicates not applicable.
Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.

2.6.5.15 薬物動態: 薬物—薬物間相互作用

2.6.5.15A トランスフェクト細胞株を使用した、排出トランスポーターおよび取り込みトランスポーターの阻害剤および基質としての Sepiapterin の評価

Report Title: In Vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the Human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters			**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002	
Study System	Transfected MDCKII and HEK293 cells		**CTD Location**: 5.3.2.3	
Experimental Conditions	For vesicular transport inhibition, sepiapterin (2-concentration assay: 300 and 3000 µM for BCRP and MDR1, 20, and 200 µM for BSEP; 7-concentration BCRP IC_{50} assay: 4.11, 12.3, 37.0, 111, 333, 1000, and 3000 µM) was incubated with membrane vesicle preparations (total protein: 50 µg/well for BSEP and MDR1 or 12.5 µg/well for BCRP) and the probe substrate. Reactions (1 minute at 32°C for BCRP and MDR1, 5 minutes at 37°C for BSEP) were initiated by the addition of ATP (or AMP in assay buffer as a background control). Reactions were quenched and filtered. The filters were washed, dried, and the amount of substrate inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation counting. For uptake transporter inhibition, cell cultures were plated onto standard 96-well tissue culture plates and preincubated at 37°C for 30 minutes in assay buffer containing the test article at appropriate concentrations (sepiapterin at 300 and 3000 µM for OATP1B1, OATP1B3, OCT1; 1 and 10 µM for MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, and OCT2). Cells were washed and lysed. Radiolabeled probe substrate transport was determined by measuring an aliquot (35 µL) from each well for LSC. The uptake of sepiapterin was determined using cells overexpressing the respective uptake transporter and control cells, at 2 incubation timepoints (2 and 20 min) at 37°C and at 2 concentrations (1 and 10 µM for MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, and OCT2; 10 µM and 3 mM for OATP1B1 and OATP1B3) of sepiapterin. Uptake experiments were carried out in the absence and presence of a known inhibitor of the respective uptake transporter, to determine whether sepiapterin was actively taken up into the cells. Cells were washed and lysed. Sepiapterin in the lysate was determined by HPLC-MS/MS.		
Analyte	Sepiapterin Radiolabeled probe substrates			
Assay	Sepiapterin: HPLC-MS/MS Radiolabeled probe substrates: LSC			

Effect of Sepiapterin on Transport in Vesicular Transport Inhibition Assays

Transporter	**Probe Substrate**	**Sepiapterin Nominal Concentration (µM)**	**Relative Inhibition (%)**	**IC_{50} (µM)**
BCRP	E3S	3000	88	647.7
		1000	59	
		333.33	38	
		111.11	11	
		37.04	13	
		12.35	0	
		4.12	5	
BSEP	Taurocholate	200	1	NA
		20	-3	
MDR1	NMQ	3000	-13	NA
		300	1	

Report Title: In Vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the Human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters	**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002

Effect of Sepiapterin on Transport of Substrates in Uptake Transporter Inhibition Assays

Transporter	**Probe Substrate**	**Sepiapterin Nominal Concentration (μM)**	**Relative Inhibition (%)**
MATE1	Metformin	10	10
		1	3
MATE2-K	Metformin	10	5
		1	-9
OAT1	Tenofovir	10	9
		1	7
OAT3	E3S	10	0
		1	2
OATP1B1	$E_2$17βG	3000	25
		300	8
OATP1B3	CCK-8	3000	19
		300	-6
OCT1	Sumatriptan	3000	9
		300	-2
OCT2	Metformin	10	-8
		1	-7

Sepiapterin in MDCKII-BCRP-LV Monolayer Substrate Assay

Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**ER_{Ctrl}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
Sepiapterin	300 μM	0.30±0.10	0.93±0.12	3.06±1.09	7.28±2.34	-4.21±0.20
	30 μM	0.21±0.03	1.53±0.60	7.32±3.02	3.01±1.47	4.31±1.55
	3 μM	0.93±0.01	1.35±0.10	1.45±0.10	3.23±1.54	-1.78±0.22

Sepiapterin in Abcb1KO-MDCKII-MDR1 Monolayer Substrate Assay

Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**ER_{Ctrl}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
Sepiapterin	3000 μM	0.86±0.11	1.05±0.09	1.22±0.19	2.04±1.71	-0.82±0.51
	300 μM	0.74±0.13	1.00±0.15	1.35±0.31	3.41±1.60	-2.05±0.21
	3 μM	NA	0.54±0.94	NA	NA	NA

Report Title: In Vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the Human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters			**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002	
Accumulation of Sepiapterin in Uptake Transporter Substrate Assays				
Transporter	**Substrate**	**Concentration (μM)**	**Minutes**	**Fold Accumulation**
MATE1	Sepiapterin	10	2	1.49
			20	1.24
		1	2	1.29
			20	0.93
	Metformin	10	15	10.53
MATE2-K	Sepiapterin	10	2	0.89
			20	1.11
		1	2	1.16
			20	1.31
	Metformin	10	5	10.38
OAT1	Sepiapterin	10	2	0.75
			20	1.19
		1	2	0.91
			20	0.77
	Tenofovir	5	2	30.75
OAT3	Sepiapterin	10	2	1.11
			20	1.21
		1	2	1.02
			20	0.84
	E3S	1	1	62.88
OATP1B1	Sepiapterin	3000	2	1.39
			20	1.22
		10	2	1.15
			20	0.93
	$E_2$17βG	1	3	42.02
OATP1B3	Sepiapterin	3000	2	1.22
			20	1.48
		10	2	1.25
			20	1.32
	CCK-8	1	2	67.87
OCT2	Sepiapterin	10	2	0.67
			20	0.81
		1	2	0.72
			20	0.79
	Metformin	10	1	13.67

Report Title: In Vitro Evaluation of PTC923 as Inhibitor and Substrate of the Human BCRP, BSEP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters	**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2020-002
Additional Information: Sepiapterin inhibited the BCRP-mediated E3S accumulation with a maximum inhibition of 88% at 3000 µM. The calculated IC_{50} was 647.7 µM. Sepiapterin did not inhibit BSEP-mediated taurocholate accumulation up to 200 µM or MDR1-mediated NMQ accumulation up to 3000 µM. Sepiapterin inhibited the OATP1B1-mediated $E_2$17βG accumulation with maximum of 25% at 3000 µM. Sepiapterin did not influence the MATE1-mediated metformin accumulation, MATE2-K-mediated metformin accumulation, OAT1-mediated tenofovir accumulation, OAT3-mediated E3S accumulation, OATP1B3-mediated CCK-8 accumulation, OCT1-mediated sumatriptan accumulation, or OCT2-mediated metformin accumulation at tested conditions. The bidirectional permeability of sepiapterin was tested in MDCKII-BCRP and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 monolayer assays (data presented in Table 2.6.5.8A). Results indicated that sepiapterin is a substrate of the human BCRP transporters and is not an in vitro substrate of MDR1. Transporter-specific fold accumulations were <2 in human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, and OCT2 SLC transporter substrate assays indicating no active accumulation of sepiapterin.	

Abbreviations: A-B: apical to basolateral direction; ABC, ATP-binding cassette; AMP, adenosine monophosphate; B-A, basolateral to apical direction; BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; CCK-8, cholecystokinin octapeptide; CTD, Common Technical Document; $E_2$17βG, estradiol-17-β-glucuronide; E3S, estrone-3-sulfate; ER, Efflux ratio; ER_{Ctrl}, Efflux ratio in Mock transfected MDCKII cell monolayers; ER_{Trp}, Efflux ratio in transporter expressing MDCKII cell monolayers; HEK, human embryonic kidney; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; IC_{50}, half maximal inhibitory concentration; LSC, liquid scintillation counting; MATE, multidrug and toxin extrusion; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MDR1, multidrug resistance protein 1; NA, not applicable; NMQ, N-methyl quinidine; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; P_{app}, apparent permeability coefficient; SLC, solute carrier

2.6.5.15B　　トランスフェクト細胞株を使用したヒト SLC トランスポーター ENT1 および ENT2 の阻害剤および基質としての Sepiapterin の評価

Report Title: In Vitro Interaction Studies of PTC923 With Human ENT1 and ENT2 Uptake Transporters			**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2021-013	
Study System	Transfected MDCKII cells		**CTD Location**: 5.3.2.3	
Experimental Conditions	For SLC transporter inhibition, cell cultures were plated onto standard 96-well tissue culture plates and preincubated at 37°C for 30 minutes in assay buffer containing the test article at appropriate concentrations (sepiapterin at 300 and 3000 µM in the 2-concentration assay and 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, and 3000 µM in the 7-concentration IC_{50} determination assay). Uptake experiments were performed at room temperature (ENT1) or at 37 °C (ENT2) in 50 µL of assay buffer containing the probe substrate and the test article or solvent and controls. Cells were washed and lysed. Radiolabeled probe substrate transport was determined from each well by LSC. The uptake of sepiapterin was determined using cells overexpressing the respective SLC transporter and control cells, at 4 concentrations (1, 10, 100, and 3000 µM, nominal) of sepiapterin, applying a 10-minute incubation period. Uptake experiments were carried out in the absence and presence of a known inhibitor of the respective SLC transporter, to determine whether or not sepiapterin was actively taken up into the cells. Cells were washed and lysed. Sepiapterin in the lysate was determined by HPLC-MS/MS.			
Analyte	Sepiapterin Radiolabeled probe substrates			
Assay	Sepiapterin: HPLC-MS/MS Radiolabeled probe substrates: LSC			

Effect of Sepiapterin on Transport in SLC Transporter Inhibition Assays

Transporter	**Probe Substrate**	**Sepiapterin Nominal Concentration (µM)**	**Relative Inhibition (%)**	**IC_{50} (µM)**
ENT1	Uridine	3000	54	2377
		2000	42	
		1000	23	
		750	20	
		500	7	
		250	-3	
		100	0	
ENT2	Adenosine	3000	73	1180
		2000	61	
		1000	42	
		750	35	
		500	31	
		250	13	
		100	4	

Report Title: In Vitro Interaction Studies of PTC923 With Human ENT1 and ENT2 Uptake Transporters				**Test Article**: Sepiapterin **Study Number**: PTC923-2021-013
Accumulation of Sepiapterin in SLC Transporter Substrate Assays				
Transporter	**Substrate**	**Concentration (µM)**	**Minutes**	**Fold Accumulation**
ENT1	Sepiapterin	1	10	0.86
		10	10	NA[a]
		100	10	0.64
		3000	10	0.92
	Uridine	1	1	5.43
ENT2	Sepiapterin	1	10	0.84
		10	10	1.20
		100	10	0.44
		3000	10	4.55
	Adenosine	0.5	10	40.97
Additional Information: Sepiapterin inhibited the ENT1-mediated uridine accumulation at the investigated concentrations in a dose-dependent manner with a maximum inhibition of 54% observed at 3000 µM nominal concentration of sepiapterin. The calculated IC_{50} is 2377 µM. Sepiapterin inhibited the ENT2-mediated adenosine accumulation at the investigated concentrations in a dose-dependent manner with a maximum inhibition of 73% observed at 3000 µM nominal concentration of sepiapterin. The calculated IC_{50} is 1180 µM. The accumulation of sepiapterin was similar in the ENT1-expressing and the control cells (transporter-specific fold accumulation values were <2), and the reference inhibitor of ENT1 (dilazep) had little effect on the fold accumulation values of the test article, indicating that there was no active accumulation of sepiapterin under the conditions tested. The accumulation of sepiapterin was higher in the ENT2 transporter expressing cells than in their control cells. The maximum fold accumulation values were 4.55 and 1.04 in the absence and presence of the reference inhibitor of ENT2 (dipyridamole), respectively, observed at 3000 µM nominal concentration of the test compound. Based on these findings, sepiapterin is proved to be a transported substrate of ENT2 SLC transporter.				

Abbreviations: CTD, Common Technical Document; ENT, equilibrative nucleoside transporter; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; IC_{50}, half maximal inhibitory concentration; LSC, liquid scintillation counting; MDCK, Madin-Darby canine kidney; NA, not applicable; SD, standard deviation; SLC, solute carrier

[a] The measured values in ENT1 transporter expressing cells were below the limits of quantitation and removed from analysis.

2.6.5.15C　　トランスフェクト細胞株を使用した排出トランスポーターおよび取り込みトランスポーターの阻害剤および基質としての BH_4 の評価

Report Title: In Vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters				**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012
Study System	Transfected MDCKII and HEK293 cells			**CTD Location**: 5.3.2.3
Experimental Conditions	For vesicular transport inhibition, BH_4 (2-concentration assay: 250 and 2500 µM for BCRP and MDR1, 25 and 250 µM for BSEP; 7-concentration IC_{50} assay: 3.43, 10.29, 30.86, 92.59, 277.78, 833.33, and 2500 µM, nominal) was incubated with membrane vesicle preparations (total protein: 50 µg/well for BSEP and MDR1 or 12.5 µg/well for BCRP) and the probe substrate. Reactions (1 minute at 32°C for BCRP and MDR1, 5 minutes at 37°C for BSEP) were initiated by the addition of ATP (or AMP in assay buffer as a background control). Reactions were quenched and filtered. The filters were washed, dried, and the amount of substrate inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation counting. The uptake of BH_4 into membrane vesicles was determined using inside-out membrane vesicles (total protein: 50 µg/well) prepared from cells overexpressing the human BSEP ABC transporter as well as from control cells. One incubation timepoint (10 min) and 4 concentrations (0.25, 2.5, 25, and 250 µM, nominal) of BH_4 were tested in the presence of ATP or AMP to determine whether BH_4 is actively transported into the vesicles. Reactions were quenched and filtered. The filters were washed, dried, and the amount of BH_4 was determined by HPLC-MS/MS. For SLC/uptake transporter inhibition, cell cultures were plated onto standard 96-well tissue culture plates and preincubated at 37°C for 30 minutes in assay buffer containing the test article at appropriate concentrations (BH_4 at 710 and 7100 µM for ENT1 and ENT2; 15 and 150 µM for MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, and OCT2; 100 and 1000 µM for OATP1B1 and OATP1B3; and 150 and 1500 µM for OCT1). Cells were washed and lysed. Radiolabeled probe substrate transport was determined from each well for LSC. The uptake of BH_4 was determined using cells overexpressing the respective uptake transporter and control cells at 1 incubation timepoint (10 minutes) at 37°C and at 4 concentrations (7.1, 71, 710, and 7100 µM for ENT1 and ENT2; 0.15, 1.5, 15, and 150 µM for MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, and OCT2; 1, 10, 100, and 1000 µM for OATP1B1 and OATP1B3; and 1.5, 15, 150, and 1500 µM for OCT1) of BH_4. Uptake experiments were carried out in the absence and presence of a known inhibitor of the respective uptake transporter, to determine whether BH_4 was actively taken up into the cells. Cells were washed and lysed. BH_4 in the lysate was determined by HPLC-MS/MS.			
Analyte	BH_4 Radiolabeled probe substrates			
Assay	BH_4: HPLC-MS/MS Radiolabeled probe substrates: LSC			

Effect of BH_4 on Transport in Vesicular Transport Inhibition Assays

Transporter	**Probe Substrate**	**BH_4 Nominal Concentration (µM)**	**Relative Inhibition (%)**	**IC_{50} (µM)**
BCRP	E3S	2500	97	778.4
		833.33	58	
		277.78	12	
		92.59	6	
		30.86	3	
		10.29	5	
		3.43	5	

Report Title: In Vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters			**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012	
Transporter	**Probe Substrate**	**BH_4 Nominal Concentration (μM)**	**Relative Inhibition (%)**	**IC_{50} (μM)**
BSEP	Taurocholate	250	2	NA
		25	0	
MDR1	NMQ	2500	99	992.9
		833.33	37	
		277.78	14	
		92.59	6	
		30.86	7	
		10.29	-2	
		3.43	-2	
Effect of BH_4 on the Transport of Substrates in Uptake Transporter Inhibition Assays (in Absence and Presence of 0.1% DTT)				
Transporter	**Probe Substrate**	**BH_4 Nominal Concentration (μM)**	**Relative Inhibition in Absence of 0.1% DTT (%)**	**Relative Inhibition in Presence of 0.1% DTT (%)**
ENT1	Uridine	7100	8	8
		710	3	0
ENT2	Adenosine	7100	19.8	8
		710	-0.5	-2
MATE1	Metformin	150	2	6
		15	3	1
MATE2-K	Metformin	150	14	3
		15	7	0
OAT1	Tenofovir	150	15	8[a]
		15	0	0[a]
OAT3	E3S	150	-4	-5
		15	2	-2
OATP1B1	$E_2$17βG	1000	-11.4	-31[a]
		100	0.5	-13[a]
OATP1B3	CCK-8	1000	-13.3	-18
		100	5.5	2
OCT1	Sumatriptan	1500	46	32
		150	2	8
OCT2	Metformin	150	6	23
		15	7	6

Report Title: In Vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters				**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012		
BH_4 in MDCKII-BCRP-LV Monolayer Substrate Assay in Presence of 0.1% DTT						
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**ER_{Ctrl}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
BH_4	2000 µM	0.55±0.03	0.90±0.09	1.63±0.19	2.29±1.72	0.71±0.54
	200 µM	0.40±0.22	0.46±0.18	1.17±0.80	1.56±0.53	0.75±0.57
	20 µM	0.21±0.21	1.88±0.30	8.82±8.80	1.39±1.05	6.34±7.92
	2 µM	0.00±0.00	0.33±0.56	NA	NA	NA
BH_4 in Abcb1KO-MDCKII-MDR1-LV Monolayer Substrate Assay						
Test Compound	**Concentration**	**$P_{app\ A-B}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**$P_{app\ B-A}$ ($\times10^{-6}$ cm/s)**	**ER_{Trp}**	**ER_{Ctrl}**	**Net-ER ER_{Trp}-ER_{Ctrl}**
BH_4	500 µM	1.28±0.67	0.82±0.14	0.64±0.35	8.89±6.34	0.07±0.06
	200 µM	0.50±0.37	1.26±0.31	2.53±1.95	2.66±2.07	0.95±1.04
	20 µM	0.08±0.14	2.03±0.41	24.84±43.31	1.83±1.23	13.57±25.37
	2 µM	0.00±0.00	0.90±0.81	NA	0.82±0.27	NA
Accumulation of BH_4 in Control and Transfected Cells in Uptake Transporter Substrate Assays (in Absence and Presence of 0.1% DTT)						
Transporter	**Substrate**	**Concentration (µM)**	**Minutes**	**Fold Accumulation in Absence of 0.1% DTT**	**Fold Accumulation in Presence of 0.1% DTT**	
ENT1	BH_4	7100	10	1.26	1.14	
		710	10	2.60	1.16	
		71	10	4.13	1.48	
		7.1	10	1.23	1.65	
	Uridine	1	1	7.29	7.78	
ENT2	BH_4	7100	10	5.24	1.88	
		710	10	1.23	1.93	
		71	10	1.03	1.35	
		7.1	10	1.04	0.68	
	Adenosine	0.5	10	29.54	20.73	
MATE1	BH_4	150	10	0.66	0.03	
		15	10	0.54	0.65	
		1.5	10	0.56	0.65	
		0.15	10	0.63	0.56	
	Metformin	10	15	15.31	19.66	
MATE2-K	BH_4	150	10	3.60	4.65	
		15	10	1.43	1.17	
		1.5	10	NA	NA	
		0.15	10	NA	NA	
	Metformin	10	5	12.81	11.28	

Report Title: In Vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters				**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012	
Transporter	**Substrate**	**Concentration (μM)**	**Minutes**	**Fold Accumulation in Absence of 0.1% DTT**	**Fold Accumulation in Presence of 0.1% DTT**
OAT1	BH_4	150	10	1.71	0.52
		15	10	0.99	1.12
		1.5	10	0.82	NA
		0.15	10	0.69	NA
	Tenofovir	5	2	120.27	26.32
OAT3	BH_4	150	10	3.06	1.98
		15	10	1.43	1.29
		1.5	10	1.40	NA
		0.15	10	1.12	NA
	E3S	1	1	34.84	24.47
OATP1B1	BH_4	1000	10	0.97	0.56
		100	10	0.87	1.27
		10	10	0.75	1.17
		1	10	0.77	0.86
	$E_2$17βG	1	3	84.90	28.85
OATP1B3	BH_4	1000	10	0.80	0.58
		100	10	0.72	1.02
		10	10	0.83	0.89
		1	10	0.73	1.62
	CCK-8	1	2	72.48	41.40
OCT1	BH_4	1500	10	0.88	0.83
		150	10	0.52	0.67
		15	10	0.35	0.59
		1.5	10	0.24	0.45
	Sumatriptan	10	3	16.65	11.71
OCT2	BH_4	150	10	0.78	0.96
		15	10	0.77	0.62
		1.5	10	0.73	0.64
		0.15	10	0.62	0.79
	Metformin	10	1	29.94	20.09

Report Title: In Vitro Interaction Studies of Tetrahydrobiopterin (BH4) With Human BCRP, BSEP, and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and With Human ENT1, ENT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 Uptake Transporters	**Test Article**: BH_4 **Study Number**: PTC923-2021-012
Additional Information: The bidirectional permeability of BH_4 was tested in MDCKII-BCRP and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 monolayer assays (data presented in Table 2.6.5.8B). During the study, it was found that BH_4 was not stable enough throughout the time period of the assay. Thus, stabilizing agent (DTT, up to 0.1% in the incubation mixture) was added to the test system. DTT affected the function of both transporters. Results indicated that BH_4 might be a substrate of the human BCRP and MDR1 transporters. BH_4 inhibited the BCRP-mediated E3S transport in the absence of 2-mercaptoethanol at the applied concentrations in a dose-dependent manner with a maximum inhibition of 97% observed at 2500 µM nominal concentration. The calculated IC_{50} was 778.4 µM. BH_4 inhibited the MDR1-mediated NMQ transport in the absence of 2-mercaptoethanol at the applied concentrations in a dose-dependent manner with a maximum inhibition of 99% observed at 2500 µM nominal concentration. The calculated IC_{50} was 992.9 µM. No ATP-dependent accumulation was observed in the BSEP-specific vesicular transport substrate assay. In the uptake transporter inhibition assays, the presence of 0.1% DTT affected the function of OAT1- and OATP1B1-expressing cell lines. In these experiments the fold accumulation values decreased in the positive controls below acceptance criteria. BH_4 inhibited OCT1-mediated sumatriptan accumulation with a maximum inhibition of 32% observed at 1500 µM nominal concentration of the test compound. BH_4 inhibited OCT2-mediated metformin accumulation with a maximum inhibition of 23% observed at 150 µM nominal concentration of the test compound. BH_4 did not influence the ENT1-mediated uridine accumulation, ENT2-mediated adenosine accumulation, MATE1-mediated metformin accumulation, MATE2-K-mediated metformin accumulation, OAT1-mediated tenofovir accumulation at tested conditions, OAT3-mediated E3S accumulation, OATP1B1-mediated $E_2$17βG accumulation, or OATP1B3-mediated CCK-8 accumulation at tested conditions. During the data interpretation process the dataset generated in the presence of 0.1% DTT was taken into account. The results generated in the absence of 0.1% DTT were not used to draw conclusions regarding the substrate nature of BH_4 in the uptake transporter substrate measurements. Conflicting results with the 2 assay designs were obtained in the case of ENT1, ENT2 and OAT3 uptake transporters. For these transporters the results obtained should be treated with caution. In presence of 0.1% DTT, transporter-specific fold accumulations were <2 in the absence of reference inhibitors and the inhibitor had little effect on the transporter-specific accumulation of BH_4 implying that there was no active accumulation of the test compound in ENT1, ENT2, MATE1, OAT1, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, and OCT2 transporter expressing cells. The accumulation of BH_4 was higher in MATE2-K transporter expressing than in control cells. The maximum fold accumulation values were 4.65 and 1.24 in the absence and presence of the reference inhibitor of MATE2-K (pyrimethamine), respectively, observed at 150 µM nominal concentration of the test compound, indicating that there was active accumulation of BH_4 in MATE2-K transporter expressing cells. The accumulation of BH_4 was higher in OAT3 transporter expressing than in control cells. Though the maximum fold accumulation value was observed at 150 µM, nominal concentration of the test article was less than 2 in the absence of the reference inhibitor of OAT3 (probenecid), in the presence of inhibitor it decreased from 1.98 to 0.81, indicating that probably there was active accumulation of BH_4 in OAT3 transporter expressing cells.	

Abbreviations: A-B: apical to basolateral direction; ABC, ATP-binding cassette; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; B-A, basolateral to apical direction; BCRP, breast cancer resistance protein; BH_4, tetrahydrobiopterin; BSEP, bile salt export pump; CCK-8, cholecystokinin octapeptide; CTD, Common Technical Document; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; $E_2$17βG, estradiol-17-β-glucuronide; E3S, estrone-3-sulfate; ENT, equilibrative nucleoside transporter; ER, Efflux ratio; ER_{Ctrl}, Efflux ratio in Mock transfected MDCKII cell monolayers; ER_{Trp}, Efflux ratio in transporter expressing MDCKII cell monolayers; HEK, human embryonic kidney; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; IC_{50}, half maximal inhibitory concentration; LSC, liquid scintillation counting; MATE, multidrug and toxin extrusion; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MDR1, multidrug resistance protein 1; NA, not applicable; NMQ, N-methyl quinidine; OAT, organic anion transporter; OATP, organic anion transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; P_{app}, apparent permeability coefficient; SD, standard deviation; SLC, solute carrier

[a] In the uptake transporter inhibition assays, the presence of 0.1% DTT affected the function of OAT1- and OATP1B1-expressing cell lines. In these experiments the fold accumulation values decreased in the positive controls below acceptance criteria.

2.6.5.16 薬物動態: その他

The 6-day GLP PK study (PTC923-2020-006) in neonatal rats and the 10-week GLP study in juvenile rats (PTC923-2023-045) are presented in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1, 2.6.7.2, 2.6.7.3, and 2.6.7.15.

A 3-day genotoxicity study (CNSA-TOX-005-2017) is presented in Module 2.6.7, Sections 2.6.7.1 and 2.6.7.9.

2.6.5.16A 新生仔ラットの 6 日間強制経口投与パイロット忍容性試験での吸収

Report Title: A 6-Day Oral Gavage Pilot Tolerability Study in Neonatal Sprague Dawley Rats							**Test Article**: Sepiapterin		
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley Crl:CD(SD)			**Dose (mg/kg)**: 100				**Study Number**: PTC923-2020-005		
Date of First Dose: 25 September 2020			**Vehicle/Formulation**: Oral Mix				**CTD Location**: 4.2.2.7		
Method of Administration: Oral gavage			**Dose Volume (mL/kg)**: 5				**GLP Compliance**: Non-GLP		
Method: Male and female Sprague Dawley rat neonates were dosed daily via oral gavage from PND4 to PND9 with either the control vehicle, Oral Mix, or 100 mg/kg sepiapterin.									
Analytes	Sepiapterin and BH_4								
Assay	HPLC-MS/MS								
Mean (SE) PK Parameters (BH_4 Only) at PND9									
Sex	**T_{max} (h)**	**C_{max} (ng/mL**	**C_{max}/Dose (ng/mL/ (mg/kg)**	**T_{last}[a] (h)**	**$AUC_{0\text{-}12h}$ (h•ng/mL)**	**$AUC_{0\text{-}12h}$/ Dose (h•ng/mL/ (mg/kg)**	**$AUC_{0\text{-}24h}$[a] (h•ng/mL)**	**$AUC_{0\text{-}24h}$/ Dose[a] (h•ng/mL/ (mg/kg)**	**$T_{1/2}$[a] (h)**
Male	4	9420 (1030)	94.2	12	72800	728	101000 (9270)	1010	NC
Female	6	11300 (401)	113	12	87800	878	125000 (15800)	1250	NC
Male and Female Combined	6	10000 (1060)	100	12	80300	803	113000 (9120)	1130	NC
Additional Information: Following administration of sepiapterin, mean plasma concentrations of sepiapterin were observed up to 6 hours postdose for males and up to the last blood sampling occasion, at 12 hours postdose for females. In addition, all plasma sepiapterin concentrations were BQL at predose for both sexes. Sepiapterin, when quantified, was generally measured at low individual concentrations in the plasma (with the exception of outlier 2- and 4-hour samples for 2 males) throughout the sampling period ranging from 13.8 to 92.6 ng/mL, which are close to the LLOQ of 10.0 ng/mL. Sepiapterin PK parameters were not estimated.									

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}12h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 12 hours postdose; $AUC_{0\text{-}24h}$, area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose; BH_4, tetrahydrobiopterin; BQL, below quantifiable limits; CTD, Common Technical Document; LLOQ, lower limit of quantitation; NC, not calculated; PK, pharmacokinetic(s); PND, postnatal day; SE, standard error; T_{last}, time of last measurable concentration

[a] Plasma concentration values obtained at the predose timepoint were imputed as the concentration at 24 hours postdose for the purpose of parameter estimation within the dosing interval; however, the last quantifiable plasma concentration was at 12 hours postdose (T_{last}).

Note: Vehicle Oral Mix was ORAL MIX™ (Flavored Suspending Vehicle)/Medisca® Syrup.