ALXN1215
ストレンジック皮下注 12mg/0.3mL
ストレンジック皮下注 18mg/0.45mL
ストレンジック皮下注 28mg/0.7mL
ストレンジック皮下注 40mg/1mL
ストレンジック皮下注 80mg/0.8mL

第 2 部 CTD の概要
2.4 非臨床試験の概括評価

アレクシオンファーマ合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 の予防的投与 5
2.4.2.1.2 *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 の治療的投与 6
2.4.2.1.3 ヒドロキシアパタイトとの結合及び In Vitro 石灰化試験 7
2.4.2.1.4 考察及び結論 7
2.4.2.2 安全性薬理 7
2.4.2.3 副次的薬理試験 8
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 8
2.4.3 薬物動態試験 9
2.4.3.1 In Vivo 薬物動態試験 9
2.4.3.2 代謝及び排泄 11
2.4.3.3 薬物動態学的薬物相互作用 11
2.4.4 毒性試験 12
2.4.4.1 一般毒性試験 12
2.4.4.2 局所刺激性試験 13
2.4.4.3 生殖発生毒性試験 13
2.4.4.4 遺伝毒性及びがん原性試験 14
2.4.5 総括及び結論 15
2.4.6 参考文献 16

表一覧

表 2.4.3.1-1 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける単回静脈内投与及び皮下投与時の ALXN1215 の薬物動態学的パラメータ［ALP-PC-09 報告書（マウス）、PK2008010951 報告書（ラット）、902235 報告書（ウサギ）及び 3008-0133 報告書（サル）］（2.6.4.3.1 項参照） 9

図一覧

図 2.4.2.1.1-1 予防的投与 43～52 日目の *Akp2*$^{-/-}$マウス後足の骨石灰化改善に関する ALXN1215 の用量-応答関係 5
図 2.4.2.1.1-2 予防的投与試験における *Akp2*$^{-/-}$マウスの 75%生存期間と ALXN1215 用量の関係 6
図 2.4.2.1.2-1 治療的投与試験における *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存曲線に対する ALXN1215 の影響 7

略号一覧表

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
sALP-FcD10	asfotase alfa	アスホターゼ　アルファ
ALXN1215	asfotase alfa	アスホターゼ　アルファ
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
CNS	central nervous system	中枢神経系
CTX	C-telopeptide crosslinks	C-テロペプチドクロスリンク
DXA	dual-energy x-ray absorptiometry	二重エネルギーX 線吸収
ECG	electrocardiogram	心電図
ENB-0040	asfotase alfa	アスホターゼ　アルファ
F_0	parent group of rats	ラット親グループ
F_1	first generation of rats	ラット 1 次世代
F_2	second generation of rats	ラット 2 次世代
FcD10	Fc domain of immunoglobulin G_1 and a deca-aspartate peptide	免疫グロブリン G_1 及びデカ-アスパラギン酸ペプチドの Fc ドメイン
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
h	hour	時間
HPP	hypophosphatasia	低ホスファターゼ症
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IV	intravenous	静脈内
kg	kilogram	キログラム
L	liter	リットル
mg	milligram	ミリグラム
MTD	maximum tolerated dose	最大耐用量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PLP	pyridoxal-5’ phosphate	ピリドキサール 5'-リン酸
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢定量的 CT
PPi	inorganic pyrophosphate	無機ピロリン酸
r^2	r squared	決定係数
SC	subcutaneous	皮下
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNSALP	tissue non-specific alkaline phosphatase	組織非特異的アルカリホスファターゼ
U	units	単位
WT	wild type	野生型

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

低ホスファターゼ症（HPP）は、生命を脅かす、非常に稀な先天性の骨代謝疾患[1)]であり、組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNSALP）をコードする遺伝子の不活性化変異により、TNSALP 酵素活性の欠乏を来し、骨石灰化障害（すなわち、くる病や骨軟化症）を起こす。成長する骨が適切に石灰化されなければ、関節や骨の外観が損なわれ、成長が障害される。その結果、運動能力及び呼吸機能が影響を受け、死に至る場合もある。ALXN1215 は、突然変異による内因性 TNSALP の欠乏に対処するよう計画された、現在開発中のこのクラスで最初の酵素補充療法剤である。

ALXN1215 は、ヒト TNSALP の触媒領域、ヒト免疫グロブリン G1 の Fc 領域、及び骨標的領域であるデカアスパラギン酸ペプチドから成る可溶性融合タンパク質である。ALXN1215 は *in vitro* にて、デカアスパラギン酸ペプチドを欠く可溶性 TNSALP に比べ 32 倍の親和性でヒドロキシアパタイトに結合する（2.6.2.2.2.1 項に記載）。このことから、ALXN1215 の TNSALP 部分が過剰な局所無機ピロリン酸（PPi）を効率的に分解し、正常な石灰化を回復することができ、ピロリン酸の加水分解により骨石灰化が促進される。また、この作用は非臨床試験で評価したどの動物種でも同様に観察された。薬効評価試験は、HPP のモデルマウス（*Akp2*$^{-/-}$マウス）を使用して実施した。 TNSALP 遺伝子を不活性化して作製された *Akp2*$^{-/-}$モデルマウス[2)]は、骨基質の石灰化障害など、ヒトの HPP と共通する病態を多く持つ。毒性試験は、カニクイザル、ウサギ及びラットを使用して実施した。薬理試験及び毒性試験を裏付けるため、ALXN1215 の血中濃度も測定した。

ALXN1215 の非臨床プログラムの目的は、以下の通りであった。

1) HPP のモデルマウスでの ALXN1215 の有効性と用量との関連性の確認
2) ALXN1215 の中枢神経系、呼吸器系及び循環器系への影響を評価する非臨床安全性薬理試験での確認
3) マウス、ラット、ウサギ及びサルでの ALXN1215 薬物動態の検討
4) 毒性試験における ALXN1215 の免疫原性に関する潜在的影響の評価
5) ALXN1215 をラット、サル及びウサギに投与した際の毒性学的影響の評価

以下に要約する試験結果は、ALXN1215 が有効な HPP 治療薬として使用しうることを支持するものであった。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

ALXN1215 の非臨床有効性試験は、TNSALP 遺伝子を不活性化して作製したヒト HPP のノックアウトモデルマウス（*Akp2*$^{-/-}$）を使用して実施した [2)]。*Akp2*$^{-/-}$モデルマウスの特性については、2.6.2.2.3 項に記載する。

Akp2$^{-/-}$マウスは、血漿中の ALP 基質である PPi 及びピリドキサール 5'-リン酸（PLP）の内因性蓄積、骨基質の過剰な非石灰化、及び成長障害を特徴とする。また、*Akp2*$^{-/-}$マウスは、アキレス腱付着部の石灰化不全、及び頭蓋の成長／形態の異常もきたす。無呼吸及びてんかん発作も発症し、早期死亡の一因となる。本マウスの生存期間の中央値は 14 日間である。*Akp2*$^{-/-}$マウスは、ヒト HPP の乳児型の臨床特性のほとんどを反映していることから、HPP の治療における ALXN1215 の作用を評価するための適切なモデルである。

Akp2$^{-/-}$マウスにおける ALXN1215 の有効性は、以下の 2 通りの投与方式を使用して評価した。

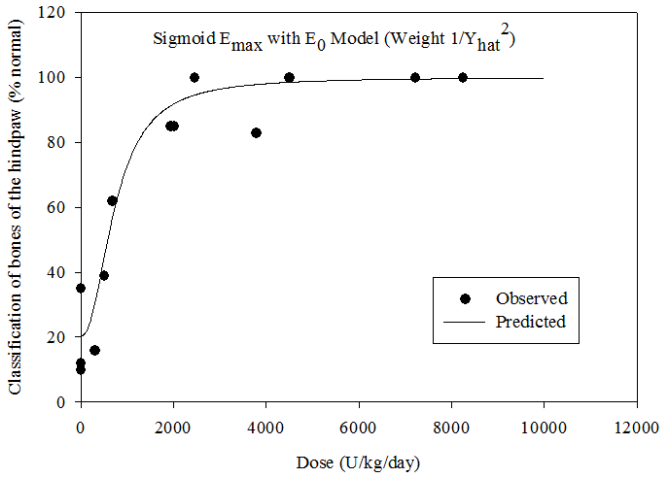
- 出生時から投与を開始する予防的投与
- 骨石灰化障害が発症した生後 12 日目又は 15 日目に投与を開始する治療的投与

すべてのマウス薬効評価試験で、ALXN1215 は皮下投与された。*Akp2*$^{-/-}$マウスを用いた非臨床試験で評価した有効性評価項目は、TNSALP 基質である PPi と PLP、後足の骨石灰化、腱付着部の石灰化、成長（体重及び左大腿骨・脛骨の骨長）及び生存期間であった。

2.4.2.1.1 *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 の予防的投与

Akp2$^{-/-}$マウスに ALXN1215 0.5～8.2 mg/kg/日（アルカリホスファターゼ 303～8241 単位/kg/日に相当）を予防的に皮下投与することにより、後足の石灰化障害が用量依存的に抑制された（結果を 2.6.2.2.5.2 項及び図 2.4.2.1.1-1 に記載、決定係数［r^2］=0.94）。この用量反応関係により、ALXN1215 の薬理活性と処置 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおける石灰化障害の改善との関連性が裏付けられた。マウスでの薬理試験データにより、初期の ALXN1215 臨床試験における初期用量を設定した。

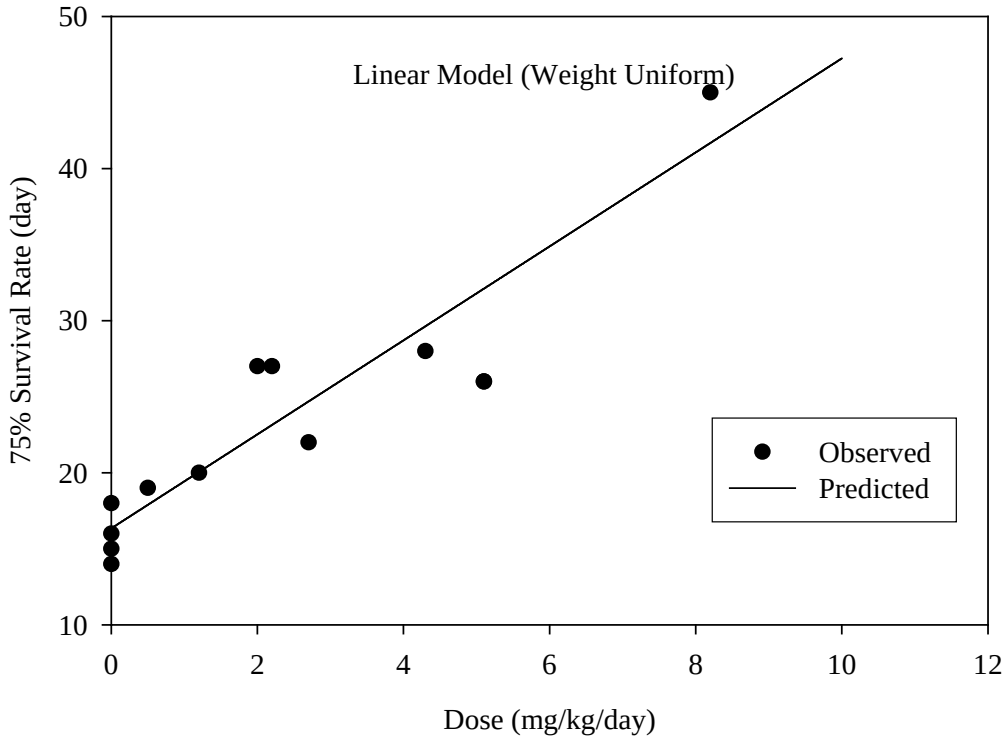
図 2.4.2.1.1-1 予防的投与 43～52 日目の *Akp2*$^{-/-}$マウス後足の骨石灰化改善に関する ALXN1215 の用量-応答関係



Akp2$^{-/-}$マウスは、無呼吸及びてんかん発作（後者はおそらくビタミン B_6 代謝障害による）を発症し、これらが早期死亡の一因となる [2)]。これらの症状は、一部の乳児型 HPP 患者で見られる症

状に類似している[3)]。溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスでの生存期間の中央値は 19.5 日であった。ALXN1215 を予防的投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスは、試験したすべての用量で生存期間が有意に改善した（結果を 2.6.2.2.5.5 項に記載）。ALXN1215 の用量と生存期間との関連性をより詳細に検討するために、用量-応答解析にデータの最大組み入れが可能となる 75%生存期間を有効性指標として選択した。図 2.4.2.1.1-2 に示す通り、ALXN1215 1 日量（0.5～8.2 mg/kg/日）と 75%生存期間との間に、明らかな用量-応答関係が認められた（$r^2 = 0.89$）。

図 2.4.2.1.1-2　予防的投与試験における *Akp2*$^{-/-}$マウスの 75%生存期間と ALXN1215 用量の関係



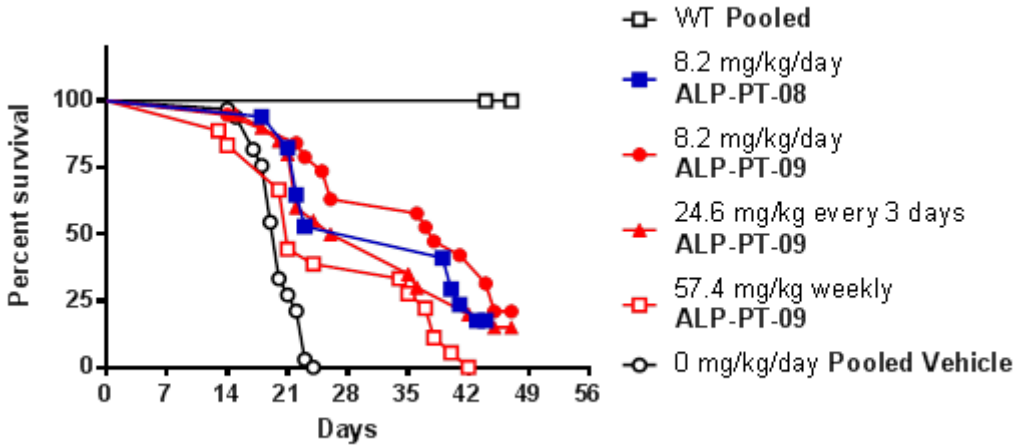
予防的投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスは、ALXN1215 が血漿中の PPi 及び PLP の蓄積を抑制すること（2.6.2.2.4.2 項参照）、腱付着部石灰化障害を改善すること（2.6.2.2.4.4 項及び 2.6.2.2.5.3 項参照）、体重増加と骨成長の抑制を軽減すること（2.6.2.2.4.5 項及び 2.6.2.2.5.4 項参照）も示した。

投与を中断することにより（2.6.2.2.6 項に記載）、ALXN1215 予防的投与による体重増加及び生存期間に対する効果が減少したことから、薬効を維持するには ALXN1215 の継続投与が必要であることが示唆された。

2.4.2.1.2　*Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 の治療的投与

治療的非臨床試験では、*Akp2*$^{-/-}$マウスで有意な石灰化障害が観察される時点に相当する生後 12 又は 15 日目に ALXN1215 投与を開始した。*Akp2*$^{-/-}$に対する ALXN1215 の治療的投与により、骨石灰化が改善し（2.6.2.2.7.2 項参照）、体重増加抑制の軽減が認められた（2.6.2.2.7.3 項参照）。様々な用量の ALXN1215 の治療的皮下投与では、*Akp2*$^{-/-}$マウスの生存期間が有意に延長した（2.6.2.2.7.4 項参照）。一般的に、連日投与が最も有効であった。すべての治療的投与試験での生存曲線を図 2.4.2.1.2-1 に示す。これらの治療効果は、予防的投与試験で認められた治療効果と類似している。

図 2.4.2.1.2-1　治療的投与試験における *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存曲線に対する ALXN1215 の影響



2.4.2.1.3　ヒドロキシアパタイトとの結合及び In Vitro 石灰化試験

ALXN1215 は、in vitro の特性解析において、デカアスパラギン酸ペプチドを欠く腎臓 TNSALP に比べ、精製ヒドロキシアパタイトに対して 32 倍の親和性を示した。3T3-1 細胞培養における in vitro の石灰化試験では、PPi による MC3T3-E1 細胞の石灰化阻害を ALXN1215 が抑制した。これらの結果から、ALXN1215 は、ヒドロキシアパタイトを特異的な標的とし、PPi による MC3T3-E1 細胞の石灰化阻害を抑制することが明らかとなった。

2.4.2.1.4　考察及び結論

ALXN1215 の非臨床試験における有効性が、*Akp2*$^{-/-}$モデルマウスを用いた予防的投与及び治療的投与の両投与方法で示された。予防的投与試験では、ALXN1215 は血中 PPi 及び PLP の蓄積を抑制し、骨石灰化を促進し、骨長と体重の増加抑制に対して効果を示した。投与を受けたマウスでは生存期間も延長した。投与中止により、成長及び生存期間に対する ALXN1215 の効果が消失したことから、薬効を維持するには ALXN1215 の継続的投与が必要であることが示唆された。TNSALP 遺伝子不活性化の有意な影響が発現した後に ALXN1215 の治療的投与を開始した場合、*Akp2*$^{-/-}$マウスにおいて、骨石灰化が促進され、生存期間が有意に延長し、体重増加抑制の軽減が認められた。これらのデータは、ALXN1215 が、標的に結合すること、関係する主要薬力学マーカーを減少させること、及び HPP 動物モデルに対する予防的又は治療的投与により複数のパラメータ（骨石灰化、成長及び生存期間）に対して効果を有することを示している。

2.4.2.2　安全性薬理

石灰化障害を有する患者において正常な石灰化が回復した場合、非石灰化骨基質が血中のカルシウム及びリン酸の生理的シンクとして機能し、急性低カルシウム血症又は低リン酸血症（「hungry bone 症候群」として知られる病態）に陥る可能性がある [4)5)]。カルシウム及びリン酸の血中濃度に対する ALXN1215 の潜在的影響について評価するため、明らかな石灰化障害が見られる生後 12 日目のマウスに投与を開始した（ALP-PT-10 試験、2.6.2.4.2.1 項に記載）。投与開始時には有意な石灰化障害が見られたにもかかわらず、ALXN1215 投与により急性低カルシウム血症及び低リン酸血症は惹起されなかった。

ラット及びカニクイザルを使用して GLP 安全性薬理試験を実施し、ALXN1215 の中枢神経系

（1007-2491 試験、2.6.2.4.2.3 項参照、静脈内投与）、呼吸器系（1007-2501 試験、2.6.2.4.2.4 項参照、静脈内投与）、及び循環器系（670388 試験、2.6.2.4.2.5 項参照、皮下投与）生理機能への影響を評価した。ラットでは、用量依存的ではあるが一過性の影響が、特定の中枢神経系パラメータ（活動性低下）及び呼吸器系パラメータ（呼吸数低下）に認められた。しかし、これらの影響は、いくつかのラット静脈内投与毒性試験（70385、70552、670314、670315 試験、2.6.6 項参照）で観察された一過性の急性反応とタイミングが一致していた。これらの中枢神経系及び呼吸器系への影響は、ALXN1215 を皮下投与されたラットでは認められず、カニクイザルでは投与経路にかかわりなく認められなかった。サルの循環器系に対しては、ALXN1215 の静脈内投与及び皮下投与のいずれでも影響は認められなかった。これらの安全性薬理試験では臨床使用に対する重大なリスクは認められず、これまでに蓄積された臨床データもこの結論と整合している。

2.4.2.3 副次的薬理試験

本試験は実施していない。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

本試験は実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 In Vivo 薬物動態試験

マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルに ALXN1215 2～180 mg/kg を単回静脈内投与又は皮下投与し、ALXN1215 の薬物動態（PK）の特性を検討した。一般毒性試験及び生殖毒性試験を補うため、ラット、ウサギ及びサルに ALXN1215 0.43～90 mg/kg を反復静脈内投与又は皮下投与し、ALXN1215 のトキシコキネティクス（TK）を評価した。最も代表的な試験における、これら動物種の ALXN1215 の PK を表 2.4.3.1-1 に示す。

表 2.4.3.1-1 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける単回静脈内投与及び皮下投与時の ALXN1215 の薬物動態学的パラメータ［ALP-PC-09 報告書（マウス）、PK2008010951 報告書（ラット）、902235 報告書（ウサギ）及び 3008-0133 報告書（サル）］（2.6.4.3.1 項参照）

Species	RoA	Dose (mg/kg)	CL or CL/F (L/h/kg)	Vss or Vz/F (L/kg)	$t_{½}$ (h)	C_{max} (mg/L) [a]	C_{max} /Dose [b]	AUC_{last} (mg*h/L) [c]	AUC_{last} /Dose [b] [c]	t_{max} (h) [a]
Mouse	IV	2	0.007	ND	15.6	26.4	13.2	258	129	0.5
	SC	2	ND	ND	31.1	3.07	1.54	100	50.0	12
Male Rat	IV	3	0.0312	0.766	27.3	22.2	7.40	93.1	31.0	0.25
	SC	3	DNS	DNS	DNS	0.424	0.141	24.5	8.17	32
Female Rat	IV	3	0.0492	1.39	33.8	22.1	7.36	53.7	17.9	0.25
	SC	3	DNS	DNS	DNS	0.342	0.114	17.3	5.77	20
Female Rabbit	IV	5	0.054	0.645	29.7	51.4	10.3	102	20.4	0.37
		50	0.172	0.0693	33.6	1140	22.7	2900	57.9	0.42
	SC	5	0.163	6.78	35.9	0.929	0.186	25.9	5.18	6.03
		50	0.175	6.37	29.4	11.0	0.220	280	5.60	12.0
Female Monkey	IV	3	0.0193	0.432	31.4	68.8	22.9	141	47.0	0.25
	SC	3	DNS	DNS	DNS	1.10	0.367	49.0	16.3	10

略語：RoA：投与経路、CL/F：皮下吸収分についての全身クリアランス、Vz/F：皮下吸収分に関する最終消失相の見かけの分布容積、ND：未測定、DNS：データ非提示。皮下投与試験での特定の PK パラメータは、AUC_{last}+外挿面積により算出された AUC_{∞}から直接的又は間接的に求めた。外挿面積が 25%を超える場合、不確実性が明らかであるため、このような AUC_{∞}から求められた PK パラメータを報告不能と判断した。

a) C_{max} 及び t_{max} は、血清濃度の推移から直接求めた実測値である。

b) C_{max}/Dose 及び AUC_{last}/Dose の単位は、それぞれ(mg/L)/(mg/kg)及び(mg*h/L)/(mg/kg)である。

c) AUC_{last} は、マウスでは AUC_{0-49h}、ラットとサルでは AUC_{0-72h}、ウサギでは AUC_{0-96h} である。

用量 2～180 mg/kg をマウス、ラット、ウサギ又はサルに単回静脈内投与後、ALXN1215 の全身クリアランス（CL）は、0.00504～0.0540 L/h/kg、見かけの終末相半減期は 14～40 時間であった。マウス、ラット、ウサギ及びサルでは、定常状態分布容積（Vss）は、体内の総水分量より大きいか、細胞内液量にほぼ等しい値であったことから、ALXN1215 が末梢組織まで分布していることが示唆された。8.2 mg/kg の単回皮下投与時の PK については、*Akp2*$^{-/-}$マウスと野生型マウスとの間に明らかな差はなかった（2.6.4.3.1 項参照）。妊娠マウスに 0.5～8.2 mg/kg を反復皮下投与した場合、試験したすべての用量で、胎児中の ALXN1215 濃度が定量可能であったことから（2.6.4.3.1

項参照)、ALXN1215 は胎盤通過性を有すると考えられた。マウス、ラット、ウサギ及びサルでの皮下投与試験では、t_{max} が投与後 4～32 時間であることから、皮下注射部位からの吸収は緩やかであると考えられた。マウス、ラット、ウサギ及びサルでの皮下投与時の推定バイオアベイラビリティは、25～56%であった。

^{125}I 標識 ALXN1215 の組織分布の特性を、幼若マウスへの単回静脈内投与（5 mg/kg）及び新生児マウスへの反復皮下投与（4.3 mg/kg）試験で検討した（2.6.4.4 項参照)。^{125}I 標識 ALXN1215 が、選択的に長骨（頭蓋冠、脛骨及び大腿骨など）に分布しているのが観察された。AUC 及び C_{max} は、頭蓋冠、脛骨及び大腿骨などの骨組織で、腎臓、肝臓、肺及び筋肉などの血液がよく潅流する組織よりも高かった。放射能は、長骨で 64 時間以上維持され、96～168 時間の試験期間中に、減少が認められなかったことから、ALXN1215 は骨を標的とし、骨に滞留すると考えられた。血液／血清中の放射能は、骨組織の放射能よりも急やかに消失した。

ALXN1215 の TK は、幼若ラット及びサルで評価した（2.6.4.3.4 項参照)。4 週間又は 26 週間の 0.43～90 mg/kg の反復静脈内又は皮下投与後、AUC 又は C_{max} が、試験により用量増加に比例して（線形動態を）あるいは比例せず（高濃度や低濃度を示す非線形動態）増加した。試験デザイン、薬剤ロット（総シアル酸含量［TSAC］の異なる)、免疫原性及び動物の日齢など複数の因子が、特に試験間で、用量比例性の評価に影響を及ぼしたと考えられる。半減期の実測値から予測された通り、幼若ラット及びサルにおける薬物蓄積の程度は、投与頻度に依存した。週 1 回の投与計画では、薬物の蓄積は認められなかった。連日投与では、薬物の蓄積が認められた。幼若ラット及び幼若サルにおいて、TK パラメータの性差は認められなかった。

抗薬物抗体の産生は、反復投与毒性／TK 試験 5 試験のうち 4 試験で認められた（2.6.4.3.4 項参照)。しかし、動物での免疫応答からヒトでの免疫応答の可能性を予測することはできないと考えられる [6)]。

妊娠ラット及びウサギに ALXN1215 6～50 mg/kg/日を、13 又は 14 日間、反復静脈内投与したところ（2.6.4.3.5 項参照)、$AUC_{0\text{-}24h}$ 及び C_{max} が、試験 1 日目及び最終日に用量に比例する程度を超えて高値を示したことから、非直線的動態が示唆された。薬物の蓄積は、観察されなかった。これらの試験で薬物の蓄積が起こらなかった理由は不明である。抗薬物抗体によるクリアランスの促進が、本所見の一因として考えられた。

TSAC とクリアランスについてのメタアナリシス（2.6.4.7 項参照）では、TSAC 値と用量補正 AUC_{∞}との間に正の相関関係が示された。TSAC 値と CL（静脈内投与）又は皮下吸収分についてのクリアランス（CL/F、皮下投与）との逆相関も認められた。さらに、TSAC 値は単回皮下投与後のバイオアベイラビリティ及び用量補正 C_{max} と正の相関関係にあるようであった。これらのデータから、シアリル化が少ないほど、ALXN1215 のクリアランスは速く、皮下吸収が少なくなるため、AUC 及びバイオアベイラビリティが低下すると考えられる。

要約すると、マウス、ラット、ウサギ及びサルを使用し、ALXN1215 の PK／TK の特性を検討した。静脈内投与試験の PK の結果から、全動物種での ALXN1215 の CL の範囲は 0.00504～0.0540 L/h/kg であり、見かけの終末相半減期の範囲は 14～40 時間であると考えられた。 Vss データから、骨を含む末梢組織に ALXN1215 が分布することが示唆され、^{125}I 標識 ALXN1215 を用いた組織分布試験の結果により確認された。皮下投与試験での PK データから、被験動物種では、ALXN1215 の吸収が緩やかであり、皮下投与時のバイオアベイラビリティが 25～56%であると考えられた。反復投与毒性／TK 試験では、試験により用量増加に比例して、あるいは比例せず全身曝露量が増加した。PK／TK データにより、ALXN1215 による低ホスファターゼ症治療の非臨

床での安全性評価及び用量／曝露量-応答関係が裏付けられた。

2.4.3.2 代謝及び排泄

ALXN1215 の非臨床代謝・排泄試験は特に実施していない。一般的に、糸球体ろ過のカットオフ分子量（> 60 kDa）を上回る IgG 及び Fc 領域を含む融合タンパク質のような比較的大きなタンパク質医薬品は、（異化などにより）小さなペプチドやアミノ酸へと分解され、血液及び組織液中から消失し、アミノ酸は新たなタンパク質の合成に再利用される。非特異的消失経路として、内皮細胞のほか、単球、マクロファージ、クッパー細胞などの細網内皮系（RES）細胞のリソソームによる分解が考えられる。この経路により消失するタンパク質医薬品は、非特異的エンドサイトーシス又はピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれると考えられる。特定のタンパク質医薬品に対し特異的な受容体を発現する細胞内での異化が、主要な特異的消失経路である。この場合、細胞内への取り込みは、標的受容体（グリコール受容体、Fc 受容体）を含む特異的受容体と結合することにより起こる。Fc 領域を含む融合タンパク質などのタンパク質医薬品は、保護的受容体である内皮細胞及び RES 細胞の新生児 Fc 受容体（FcRn）に結合することにより分解を回避し、長い半減期を達成していると考えられる。

ALXN1215 の消失経路を検討するため、非臨床 PK／TK 試験での薬物動態の非線形性の評価、TSAC が PK に及ぼす影響についてのメタアナリシス、ALXN1215 と他の Fc 融合タンパク質との FcRn 結合能及びヒトでの半減期の比較など、包括的な解析を実施した（2.6.4.6 項参照）。ヒト及び動物の試験で得られた PK/PD データ及び免疫原性データ、*in vitro* 試験の結果及び ALXN1215 の分子構造情報からは、ALXN1215 固有の消失経路を示す証拠は得られなかった。ALXN1215 の排泄は、他の Fc 融合タンパク質の排泄に関与すると考えられる一般的機序により支配されている可能性が高い。

2.4.3.3 薬物動態学的薬物相互作用

ALXN1215 の非臨床薬物動態学的薬物相互作用試験は、実施していない。タンパク質医薬品の消失経路は、小分子の消失経路とは異なる。小分子は通常、チトクローム P450 を介する酸化や抱合により代謝される。タンパク質医薬品は、これらの経路では代謝されない。したがって、ALXN1215 が併用小分子医薬品の薬物動態に影響を及ぼす可能性は低い。同様に、併用小分子医薬品が ALXN1215 の PK に影響を及ぼす可能性も低い(2.6.4.7 項参照)。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 一般毒性試験

一連の一般毒性試験及び生殖毒性試験をすべて実施し、ラット、ウサギ及びカニクイザルでのALXN1215 の非臨床安全性を評価した。様々な用量の ALXN1215 を最長 6 ヵ月間、静脈内投与又は皮下投与した。ラットでの静脈内投与最大耐用量試験（週 1 回、10、30、90 又は 180 mg/kg を 4 週間）では、まず注射に伴う急性の一過性反応が幼若ラット（投与開始時生後 23～24 日）で認められた（2.6.6.3.1 項参照）。この反応は、主に運動性を低下させ、四肢、足、耳介、鼻口部に多様なパターンで現れ、四肢の皮膚変色（赤色化又は青色化）を伴う軽微な皮下組織の腫脹を呈した。最高用量では、過度な引っ掻き行動、立毛及び過呼吸も認められた。これらの投与に伴う反応（特に足と鼻口部の腫脹及び発赤）は、実施したラットでの静脈内投与毒性試験のいずれにおいても認められた。類似の急性所見は、安全性薬理試験でも認められた。これらは、生理学的観察で認められた唯一の変化であった（2.6.2.4.2 項参照）。ラットで見られたこれらの急性反応は、抗ヒスタミン剤又はステロイド剤である程度軽減するも、完全には解消されなかった（2.6.2.4.2.2 項参照）。さらに、補体活性化がこれらの注射反応の発現に関与することを示す証拠はなかった（結果を 2.6.2.4.2.2 項に記載する）。ラット静脈内投与毒性試験で認められた投与後反応の典型的な一般症状は、サル及びウサギではいずれの投与経路でも全く認められず、皮下投与後のラットでも認められなかった。従って、これらの所見の臨床的意義は不明である。

ラットを使用した 1 ヵ月間 GLP 適応毒性試験では、ALXN1215 3、26 及び 77 mg/kg 用量を週 1 回 4 週間静脈内投与した（2.6.6.3.2 項参照）。ラットにおける最大耐用量を求める試験と同様に、立毛、皮膚発赤及び前後肢足蹠の軽度の腫脹を伴う、一過性かつ用量及び時間依存性の運動性低下が認められた。すべてのラットは、24 時間以内に自然回復した。77 mg/kg/週投与群のラット 1 匹は、最終投与の数日後に死亡した。死後の剖検で特別な異常はなく、この死亡は 2～3 日前の採血に関連している可能性が示唆された。77 mg/kg/週投与群の雄では、摂餌量及び体重の減少傾向が認められた。この摂餌量及び体重の減少は、骨塩量の減少のほか、二重エネルギーX 線吸収測定法（DXA）と末梢骨定量的 CT 法（pQCT）により測定した骨表面積の減少と関連していた。ただし、骨密度やその他の骨構造の測定値は正常であったことから、骨は縮小していたものの、正常であったと考えられる。また、最高用量では、臨床的に問題とならない血清リン濃度の増加が雄で認められ、また骨吸収のマーカーである架橋 C-テロペプチド（CTX）の減少が雌で認められた。この他には、行動、血液生化学的検査又は組織病理学的所見に変化は認められなかった。高用量群の雄での体重及び骨の大きさへの影響を除き、すべての所見は、28 日間の回復期間終了後に消失した。この雄で見られた影響は、ALXN1215 投与終了の 28 日後以降も持続した。特に、異所性石灰化の所見は認められなかった。これらの所見に基づき、ラットに静脈内投与した場合の無毒性量（NOAEL）は 26 mg/kg/週と推察した。本用量では、$AUC_{0\text{-}168h}$ は 591 mg*h/L、C_{max} が 147 mg/L であった（2.6.4.3.4 項参照）。

6 ヵ月間の GLP 適応ラット毒性試験でも同様の所見が得られた（2.6.6.3.4 項参照）。1、3 又は 13 mg/kg/日を幼若ラットに毎日 26 週間静脈内投与した結果、足及び鼻口部に一過性の一般症状（発赤又は腫脹）が認められた。これらの変化は、投薬期間全体を通じて投与の最長 1 時間後まで観察された。急性反応は、13 mg/kg/日投与群で最も顕著であった。試験期間中、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、異所性石灰化、骨代謝マーカー、骨密度及び骨形状（DXA 法及び pQCT 法）、行動遂行、身体発達、臓器重量、身体測定値、X 線検査、剖検及び顕微鏡的所見、発情周期又は雄の生殖能を含むいずれの毒性評価項目に対しても、意味

のある ALXN1215 の影響は認められなかった。血清中アルカリホスファターゼ活性高値は、ALXN1215 の毎日の静脈内投与に起因するものと推察された。投与期間を通じて一過性の臨床症状が認められたが、用量 1、3 又は 13 mg/kg/日群では完全に可逆的であり、いずれの毒性評価項目にも影響を及ぼさなかったことから、NOAEL を 13 mg/kg/日と推察した。本用量での $AUC_{0\text{-}72h}$ の平均値（雄雌統合）は 331 mg*h/L、C_{max} は 331 mg/L であった（2.6.4.3.4 項参照）。

カニクイザルを用いた単回投与及び最長 6 ヵ月間の反復投与による本剤の影響を評価した。GLP 非適応最大耐用量試験においては、幼若カニクイザルに本剤を最高 180 mg/kg まで静脈内投与した結果、良好な忍容性が確認された（2.6.6.2.1 項参照）。この最大耐用量試験での結果を踏まえて、その後の 28 日間 GLP 静脈内投与試験では、幼若カニクイザルに 5、15 又は 45 mg/kg 用量を週 1 回投与した（2.6.6.3.3 項参照）。その結果、骨及び心電図への影響を含め、毒性を示唆する所見は認められなかった。評価したいずれの組織にも、異所性石灰化は認められなかった。従って、カニクイザルに週 1 回 4 週間投与した場合の NOAEL は、検討した最高用量である 45 mg/kg/週と推察した。本用量での $AUC_{0\text{-}168h}$ は 2670 mg*h/L であり、C_{max} は 691 mg/L であった。幼若カニクイザルに本剤 0.43、2.14 及び 10 mg/kg/回を毎日 6 ヵ月間皮下投与した試験において、注射部位の発赤及び皮膚乾燥が認められた。これらの症状は 28 日間の回復期間終了時には部分的に又は完全に消失した。体重及び摂餌量測定、眼科学的検査（眼組織内への異所性石灰化の所見なし）、心電図、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、骨代謝の生化学マーカー、骨密度及び骨形状（DXA 法及び pQCT 法）、臓器重量、剖検及び顕微鏡的所見に影響は認められなかった。血清中アルカリホスファターゼ高値は、ALXN1215 の毎日の皮下投与に起因するものと推察された。6 ヵ月後、脛骨骨幹端及び腰椎の骨量増加及び脛骨骨幹の皮質骨肥厚の傾向が認められたが、本剤との明確な関連は認められなかった。本剤の投与による骨成長への有害な影響は認められなかった。いずれの組織でも、異所性石灰化を示す所見は見られなかった。頭蓋冠では冠状縫合及びラムダ形縫合を含む 2 部位で評価を行った。幼若サルでは、頭蓋骨縫合の早期癒合などの異常は認められなかった。顕微鏡的観察では、いずれの本剤投与群においても注射部位に異所性石灰化と単核細胞浸潤を伴う肉芽腫性炎症が見られたが、4 週間の回復期間終了時には部分的又は完全に消失しており、10 mg/kg/日投与群の一部で注射部位での局所的な軽い炎症／浸潤が見られたのみであった。石灰化は、壊死の有無にかかわらず炎症病巣でよくみられる所見である。試験中に発現した異所性石灰化と注射部位の所見は部分的に又は完全に消失し、忍容性が良好だったことから、NOAEL は 10 mg/kg/日と推察した。本用量での $AUC_{0\text{-}24h}$ は 124 mg*h/L であり、C_{max} は 6.68 mg/L であった（2.6.4.3.4 項参照）。

2.4.4.2 局所刺激性試験

ALXN1215 を皮下投与したラットでは、試験期間中の観察で注射部位に Draize の判定基準による局所反応は認められなかった（2.6.6.7 項参照）。剖検時に数匹でリンパ節の腫大が認められた。顕微鏡的観察では、本剤を投与した個体の多くで、注射部位にごく軽度から軽度の単球浸潤が認められた。8.4 mg/kg 投与群の 2 匹及び 25.2 mg/kg 投与群の 2 匹では、腋窩リンパ節にわずかなリンパ組織過形成が認められた。

2.4.4.3 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性に対する本剤の影響を検討するため、ラット及びウサギを用いた一連の試験を実施した。ラット及びウサギでは最高用量 50 mg/kg/日まで子宮毒性を示す所見は認められなかった。

受胎能及び初期胚発生に対しても雌雄ラットに 50 mg/kg/日まで投与しても影響は見られなかった（2.6.6.6.1、2.6.6.6.2、2.6.6.6.3、2.6.6.6.4、2.6.6.6.5 及び 2.6.6.6.6 項参照）。50 mg/kg の比較的高用量を投与した妊娠雌ウサギ 2 匹では、中等度の尿細管石灰化を伴う腎臓の淡色化が肉眼で認められた（2.6.6.6.6 項参照）。顕微鏡的観察では、いずれの個体でも両腎に認められ、主に外皮質に限局していた。ウサギの生理機能及びカルシウム・リン代謝は、他の草食動物と同じだが、げっ歯類（ラット及びマウス）、肉食動物及びヒトとは異なる。ウサギは、食餌からカルシウムを過剰に吸収し、腎臓を介して大量に排泄する [7)8)9)10)]。このようにウサギは、大量のカルシウムを排出することから、ウサギの腎臓では、顕微鏡所見として限局的な石灰化が認められることも多い。カルシウム排泄がわずかに変動しただけでも腎臓のカルシウム恒常性が変化し、転移性の石灰化が生じる可能性がある。したがって、ウサギのカルシウム代謝の特異性を考えると本試験で認められた変化の関連性は明確でない。

雌ラットに ALXN1215 を妊娠、分娩及び授乳期に（妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで）投与し、母動物の機能並びに仔動物の発生、生存率、身体発育、行動及び生殖能に及ぼす影響を観察する GLP 適応試験を実施した（2.6.6.6.7 項参照）。ラットの出生前及び出生後の試験では、分娩後 5 時間以内に、母動物 6 匹（10 mg/kg/日群の 1 匹、25 mg/kg/日群の 3 匹、50 mg/kg/日群の 2 匹）が、分娩後 5 時間以内に出産した仔ラットの一部を食殺した。分娩後 0 日目に認められた食殺行動を示した母動物の割合は、10 及び 50 mg/kg/日投与群では試験施設の背景値の範囲内（1 群当たり 0～2 匹）であったが、25 mg/kg/日投与群ではわずかに上回った値を示した。この所見は、投与後の急性反応である可能性があり、本剤の臨床使用との関連は明らかでない。分娩後 1～21 日目の授乳期における母動物の行動に異常は見られなかった。耳介展開、切歯萌出及び開眼までの平均日数に本剤と関連する影響は認められなかった。F_0 世代でも F_1 でも、肉眼的所見に本剤投与との関連性は見られなかった。F_1 世代及び F_2 世代の生存率、身体発育、行動機能及び生殖機能には影響が見られなかった。肉眼的所見（剖検）で本剤の投与と関連した異所性石灰化は認められなかった。NOAEL は検討した最高用量である 50 mg/kg/日と推察した。本用量での $AUC_{0\text{-}24h}$ は 1400 mg*h/L、C_{max} は 672 mg/L であった（2.6.4.3.5 項参照）。

2.4.4.4 遺伝毒性及びがん原性試験

遺伝毒性（2.6.6.4 項参照）及びがん原性（2.6.6.5 項参照）試験は実施されなかった。ALXN1215 は大きなタンパク質分子であり、細胞膜及び核膜を通過しないため、細胞内の DNA や染色体成分と結合する可能性は低い。遺伝毒性試験を行う必要のある不純物は製剤及び原薬中に含まれていない。したがって、遺伝毒性試験は実施していない。ALXN1215 ではタンパク質同化作用が報告されておらず、よって発癌性や細胞増殖誘導作用は示さないと考えられる。ヒドロキシアパタイトとの結合がシグナル伝達を惹起することはない。また、がん原性試験を行う必要のある不純物は製剤及び原薬中に含まれていない。したがって、がん原性試験は実施していない。

2.4.5 総括及び結論

ALXN1215（別名 sALPFcD10、及び ENB-0040 ）は、HPP の長期治療用に現在開発中の新規生物学的製剤である。HPP 患者では、機能的 TNSALP が産生されないことにより、正常であれば成長中の骨や歯にカルシウムやリンといったミネラルを沈着させるプロセスである石灰化が損なわれる。石灰化は、骨格の構造的統合にとって極めて重要である。本疾患の徴候及び症状は多様であるが、HPP の重症度は発症年齢に反比例する。したがって、最も治療を必要とする患者は乳幼児及び小児である。ALXN1215 は、ヌクレオチド・ピロホスファターゼ・ホスホジエステラーゼにより産生されるピロリン酸の加水分解を触媒することにより治療効果を発揮する。ピロリン酸の加水分解は、骨石灰化を促進し、その効果は非臨床試験で評価した動物種間で同様であった。有効性試験は、HPP のモデルマウス（*Akp2*$^{-/-}$マウス）を使用して実施し、毒性試験は、カニクイザル、ウサギ及びラットを使用して実施した。薬理試験及び毒性試験を裏付けるため、薬物動態試験を実施した。

ALXN1215 の非臨床試験では、*Akp2*$^{-/-}$モデルマウスへの予防的投与及び治療的投与の両投与方法で有効性が示された。予防的投与試験では、ALXN1215 は血中の PPi と PLP の蓄積を予防し、骨石灰化を促し、骨長と体重の増加抑制に対して効果を示した。生存期間も延長した。成長及び生存期間に対する ALXN1215 の効果は投与中止後に消失したことから、薬効維持のためには ALXN1215 の継続投与を必要とすることが示唆された。ALXN1215 の治療的投与を受けた *Akp2*$^{-/-}$マウスでは、骨石灰化が促進され、生存期間が有意に延長し、体重増加の抑制が軽減された。これらのデータから、ALXN1215 は、標的に結合すること、関係する主要薬力学マーカーを減少させること、及び HPP の動物モデルにおいて複数のパラメータ（骨石灰化、成長及び生存期間）に対し効果を有することが示された。この有効性プロファイルから、ALXN1215 が HPP の治療に有益であると考えられる。

安全性薬理試験及び毒性試験は、ラット、ウサギ及びカニクイザルを使用して実施した。TK 及び補完的抗薬物抗体試験は、いくつかの試験で ALXN1215 の曝露量を測定することにより実施した。一貫して見られた有意な全身的影響はラットにおける静脈内投与後の一過性かつ用量依存性の急性反応のみであった。具体的には呼吸抑制、運動性低下及び四肢の腫脹などであった。こうした反応はサル（静脈内及び皮下投与後）及びウサギ（静脈内投与後）では認められず、ラットに同用量を皮下投与しても認められなかった。サルでは皮下投与による注射部位に反応が認められたが、これは軽度で概ね可逆的であった。結論として、これらの反応は有害ではないと考えられ、それぞれの長期投与試験では検討した最高用量が一般には NOAEL であったことから、毒性試験の総合的な結果により本剤の臨床使用の妥当性が支持された。

2.4.6 参考文献

1) Definition from the UK National Institute for Clinical Effectiveness (NICE). 2004. Citizen Council Report on Ultra-Orphan Drugs. Available at http://tinyurl.com/b3qurp3 (last accessed October 09, 2013) and as defined in the following documents: Wales Medicines Strategy Group (AWMSG); Recommendations for a Belgian Plan for Rare Diseases; the EMINET Report commissioned by the European Commission's Directorate General Enterprise and Industry, the European Union Committee of Experts on Rare Diseases' (EUCERD).
2) Narisawa S, Frohlander N, Millan JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. Dev Dyn. 1997 208(3):432-46.
3) Baumgartner-Sigl S, E. Haberlandt, Mumm S, Scholl-Burgi S, SeRGI-C, Ryan L, et al. Pyridoxine-responsive seizures as the first symptom of infantile hypophosphatasia caused by two novel missense mutations (c.677T>C, p.M226T; c.1112C>T, p.T371I) of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. Bone. 2007;40(6):1655-61.
4) Latus J, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Alscher MD, Kimmel M. Incidence of and risk factors for hungry bone syndrome in 84 patients with secondary hyperparathyroidism. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2013 Jul 8;6:131-7.
5) Witteveen JE, van Thiel S, Romijn JA, Hamdy NA. Hungry bone syndrome: still a challenge in the post-operative management of primary hyperparathyroidism: a systematic review of the literature. Eur J Endocrinol. 2013 Feb 20;168(3):R45-53.
6) ICH S6 Addendum to Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) May 2012.
7) Lidfors L, Edstorm T. The Laboratory Rabbit. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Eighth ed. Wiley Blackwell; 2010. p. 399-417.
8) Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE. The Biology of the Laboratory Rabbit. 2 ed. Academic Press; 1994.
9) Suckow MA, Brammer DW, Rush HG, Chrisp CE. Biology and Disease of Rabbits. In: Academic Press, editor. Laboratory Animal Medicine. 2 ed. 2002. p. 329-64.
10) Vennen KM, Mitchekk MA. Rabbits. In: Saunders Elsevier, editor. Manual of Exotic Pet Practice. 2009. p. 375-405.