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
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

アレクシオンファーマ合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 緒言 4
2.6.1.1.1 低ホスファターゼ症 4
2.6.1.1.2 ALXN1215 4
2.6.1.2 非臨床開発戦略 5
2.6.1.2.1 HPP モデルマウスでの非臨床有効性試験 5
2.6.1.2.2 薬物動態 6
2.6.1.2.3 安全性薬理試験及び毒性試験 6
2.6.1.2.4 HPP 患者への ALXN1215 の使用 6
2.6.1.3 参考文献 8

図一覧

図 2.6.1.1.2-1 ALXN1215 の構造 4

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
CNS	central nervous system	中枢神経系
CV	cardiovascular	循環器系
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ENB-0040	asfotase alfa	アスホターゼ　アルファ
FcD10	Fc domain of immunoglobulin G1 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
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene	ヒト Ether-à-go-go 関連遺伝子
HPP	hypophosphatasia	低ホスファターゼ症
IV	intravenous	静脈内
kDa	kilodalton	キロダルトン
MTD	maximum tolerated dose	最大耐用量
NHP	nonhuman primate	非人類霊長類
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PLP	pyridoxal-5’ phosphate	ピリドキサール 5'-リン酸
PPi	inorganic pyrophosphate	無機ピロリン酸
SC	subcutaneous	皮下
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNSALP	tissue-nonspecific alkaline phosphatase	組織非特異的アルカリホスファターゼ
TSAC	total sialic acid content	総シアル酸含量

2.6.1 緒言

2.6.1.1 緒言

2.6.1.1.1 低ホスファターゼ症

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であり [1)]、リン酸及びカルシウムの調節障害、骨の進行性変形、奇形、骨折、著明な筋力低下、てんかん発作、腎機能障害及び呼吸不全をきたす可能性のある骨石灰化障害を特徴とする。現時点では、本疾患の患者の治療に対して承認された治療薬はない。

HPP 患者では、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不活性化変異により、TNSALP 酵素活性の欠乏が生じ、無機ピロリン酸（PPi）、ピリドキサール 5'-リン酸（PLP）及びホスホエタノールアミンといった TNSALP 基質の血中濃度が上昇する [8)]。PPi の細胞外濃度が高くなることにより、ハイドロキシアパタイト結晶の形成が妨げられ、骨石灰化が阻害される。その結果、乳幼児及び小児患者ではくる病を、また年齢に関わらず骨軟化症を引き起こす。 血中のビタミン B_6 の最も一般的な形態である PLP の調節不全は、ピリドキシン依存性てんかんを伴う。一部の患者では、高カルシウム血症及び高リン酸血症も認められる。

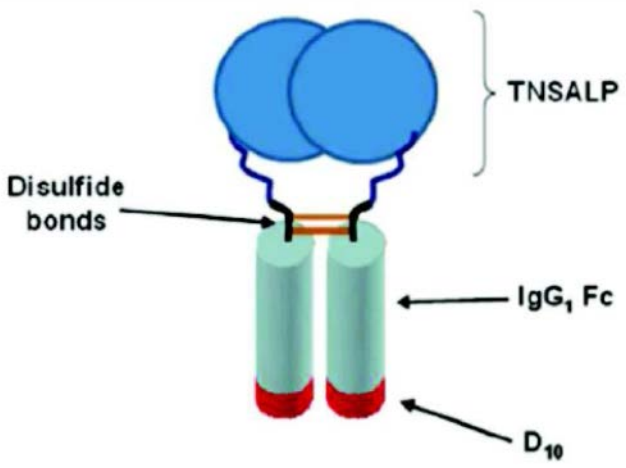
欧州やオーストラリアの患者では、HPP において少なくとも 271 種類の TNSALP 遺伝子異常と 16 種類の遺伝子多型が判明している [5)6)]。これらの遺伝子異常と HPP 病態の関連性が検討されているが、常染色体劣性遺伝又は常染色体優性遺伝であり、遺伝子発現型は多岐にわたっている。

2.6.1.1.2 ALXN1215

ALXN1215（別名 ENB-0040、又は sALPFcD10 ）は、遺伝的に欠陥のある骨石灰化過程を正常化し、重篤で生命を脅かすような HPP 症状を予防又は治癒することにより、HPP の根本原因に対処するようデザインされた、最初の酵素補充療法剤である。

ALXN1215 は、726 個のアミノ酸からなる可溶性免疫グロブリン G1 の Fc 融合糖タンパク質のホモ二量体である。各ポリペプチド鎖は、ヒト TNSALP の可溶性触媒領域、ヒト免疫グロブリン G1 の Fc 領域、及びデカアスパラギン酸ペプチドから成る。非グリコシル化二価融合タンパク質の分子量は 161 kDa である。ALXN1215 の分子の構造のイラストを図 2.6.1.1.2-1 に示す。

図 2.6.1.1.2-1 ALXN1215 の構造



ALXN1215 のアスパラギン酸領域は、骨基質で形成されるヒドロキシアパタイト結晶に直接結合する。このことにより、ALXN1215 が骨の石灰化が起こる適切な組織に選択的に結合し、局所

的に過剰な PPi を効率的に分解し、正常な石灰化を回復させることができる。

2.6.1.2 非臨床開発戦略

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 の有効性と用量反応性の確認
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 の薬物動態の確認
4) 毒性試験における ALXN1215 の免疫原性に対する影響の評価
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

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。PPi、PLP などいくつかの基質に対する酵素活性により定義されるアルカリホスファターゼの生物活性は、受容体を介さず、種特異的でもない [4)]。マウス、ラット、ウサギ、サルなどの哺乳類では、TNSALP のアミノ酸配列のヒトとの相同性が高い（それぞれ、90%、91%、86%及び 97%）。よって、ALXN1215 投与の有効性及び安全性を評価するため、マウス（*Mus musculus*）、ラット（*Rattus norvegicus*）、ウサギ（*Oryctolagus cuniculus*）及びカニクイザル（*Macaca fascicularis*）を選択した。ALXN1215 は、乳幼児に投与されることが予想されるため、技術的に可能な限り幼若なラット及びカニクイザルを使用して一般毒性試験を実施した。

2.6.1.2.1 HPP モデルマウスでの非臨床有効性試験

ALXN1215 の非臨床有効性試験は、TNSALP 遺伝子を不活性化することにより作製したヒト HPP のノックアウトモデルマウス（*Akp2*$^{-/-}$）を使用して実施した。*Akp2*$^{-/-}$マウスは、Dr. José Luis Millán の研究所において、C57B/L6 と 129J の混合背景系統で相同組み換えにより作製された [7)]。*Akp2*$^{-/-}$マウスは、血漿中の TNSALP 基質の蓄積、骨石灰化障害、成長障害及び早期死亡を特徴とする。

Akp2$^{-/-}$マウスにおける ALXN1215 の有効性は、次の 2 通りの投与時期にて評価した。1 つは、出生時から投与を開始する予防的投与、もう 1 つは、骨石灰化異常が確立した生後 12 日目又は 15 日目に投与を開始する治療的投与である。ALXN1215 は、すべてのマウス有効性試験で皮下注射により投与された。*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、主要骨格部位の骨石灰化、腱付着部石灰化障害、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。

ALXN1215 の有効性を検討するために *Akp2*$^{-/-}$マウスモデルが適切であると考えられる理由は、マウスとヒトの TNSALP のアミノ酸配列の相同性が高く（90%）、TNSALP の触媒作用及び安定性に関わる主要なアミノ酸残基配列は、マウスとヒトとで共通していること [3)]、さらに、アルカリホスファターゼの作用機序及び生物活性（PPi、PLP などいくつかの基質に対する酵素活性により定義される）は、受容体を介さず、種特異的でもないこと [4)]の 2 点があげられる。このことから、*Akp2*$^{-/-}$マウスで有効性を評価するにあたり、ALXN1215 の代用となるマウス由来の物質が必要とは判断されなかった。ALXN1215 の初期臨床試験において初回投与量を設定する際には、マウスの薬理データも一部使用した。

2.6.1.2.2 薬物動態

非臨床有効性試験、薬物動態（PK）特性解析及び毒性評価を裏付けるため、マウス、ラット、ウサギ及びサルを使用して ALXN1215 の PK 試験を実施した。PK の特性は、単回静脈内投与又は皮下投与試験で検討された。^{125}I標識ALXN1215をマウスに単回又は反復皮下投与する試験で、ALXN1215 の組織分布を評価した。また、妊娠マウス及び胎児での曝露量を測定することにより、ALXN1215 の胎盤通過を評価した。ALXN1215 のトキシコキネティクス（TK）の特性は、ラット及びサルを使用した反復静脈内投与又は皮下投与毒性試験 5 試験、及び妊娠ラット及びウサギを使用した生殖・発生毒性試験で検討した。抗薬物抗体の評価は、毒性試験で実施した。総シアル酸含量（TSAC）は、ALXN1215 のロットにより異なったため、マウスでの ALXN1215 のクリアランスに対する TSAC の影響を評価するためメタアナリシスを実施した。

2.6.1.2.3 安全性薬理試験及び毒性試験

ALXN1215 の一般毒性試験では、非 GLP 最大耐用量（MTD）試験、異なる期間での確定 GLP 毒性試験、及びラットに静脈内投与又は皮下投与された ALXN1215 の局所刺激性を比較する GLP 試験を実施した。確定試験の前に、ラット及びサルを使用した以下の MTD 2 試験を実施し、MTD を決定し、確定 GLP 毒性試験の用量の目安を得た。MTD 試験の内の一つは、サルでの単回投与毒性試験であり、他方はラットでの反復投与毒性試験であった。その後、ラット及びサルに静脈内投与を行う 4 週間の確定毒性試験を実施した。また、静脈内投与と皮下投与を比較する 4 週間のラット GLP 試験も実施した。その後、サル（皮下投与）及びラット(静脈内投与)の 6 ヵ月間の長期投与毒性試験を実施した。 生殖試験及び発生試験は、受胎能ならびに胚胎児及び産前～周産期所見に対する影響を確認するために実施した。独立した安全性薬理試験を実施し、ラットの中枢神経系及び呼吸機能に対する ALXN1215 の影響を評価した。循環器系安全性薬理試験は、独立試験としてではなく、6 ヵ月の反復投与霊長類毒性試験の一部として実施した。

ALXN1215 は、高分子量タンパク質（分子量 161 kDa）であるため、本分子が細胞膜及び核膜を通過して、ヒト Ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルに到達したり、細胞の DNA 及び他の染色体物質と反応する可能性は低いと考えられる。ALXN1215 による細胞増殖の誘導は報告されていないため、本分子が発癌性であるとは考えられない。ヒドロキシアパタイトとの結合では、シグナル伝達は起こらない。さらに、原薬にも最終製品にも、試験を必要とする不純物は含まれない。これらのことから、*in vitro* での安全性薬理試験、遺伝毒性試験及び癌原性試験は実施していない。

2.6.1.2.4 HPP 患者への ALXN1215 の使用

突然変異の種類に関わりなく、すべての HPP 患者は、TNSALP 欠損 *Akp2*$^{-/-}$マウスと同等の病態生理学的障害である骨基質の石灰化不全（くる病及び骨軟化症）を有する。*Akp2*$^{-/-}$マウス及び HPP 患者で見られるこの障害は、骨の変形をもたらし、成長／生存期間に影響する。*Akp2*$^{-/-}$マウスに ALXN1215 を投与すると、本ノックアウトマウスで通常認められる HPP に関わる障害の多くが消失した。これらの効果は用量と関連しており、ALXN1215 は予防的投与及び（疾患発症後のマウスへの）治療的投与のいずれでも有効であった。臨床試験で使用する用量の数倍の用量をラット及び非ヒト霊長類に投与した毒性試験では、ALXN1215 はおおむね安全であった。幼若動物及び成熟動物を使用した毒性試験により、一般的安全性、薬理学的安全性及び生殖安全性を評価した。これらの試験で一貫して認められた唯一の所見は、ラットの静脈内投与後にのみ認められた急性

反応であった。本反応は、静脈内投与を受けた非ヒト霊長類では観察されず、皮下投与を受けたいずれの動物種でも観察されなかった。これら動物種で実施された一連の非臨床試験から、ALXN1215 は、有効かつ安全であることが示された。

HPP は、治療法がないこと、罹病率及び死亡率が高い疾患であることから、ALXN1215 により、HPP 患者に新しい有効な治療法を提供できることが期待される。

2.6.1.3 参考文献

1) Definition from the UK National Institute for Clinical Effectiveness (NICE). 2004. Citizen
2) 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).
3) Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Millán JL. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. J Biol Chem. 2002 Jun 21;277(25):22992-9.
4) Millan JL. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. Purinergic Signal. 2006 Jun;2(2):335-41.
5) Mornet E, Beck C, Bloch-Zupan A, Girschick H, Le Merrer M. Clinical utility gene card for: hypophosphatasia. Eur J Hum Genet. 2011 Mar;19(3):e1-e5; published online 27 October 2010.
6) Mornet E. The Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Gene Mutations Database. Laboratoire SESEP. Last update: August 27, 2013. http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php Last accessed: August 31, 2013.
7) 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.
8) Whyte MP. Hypophosphatasia. In: Glorieux FH, Pettifor JM, Juppner H, editors. Pediatric Bone: Biology and Diseases. London, UK, Academic Press; 2012: pp. 771-94.

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
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

アレクシオンファーマ合同会社

目次

頁
略号一覧表 6
2.6.2 薬理試験の概要文 8
2.6.2.1 まとめ 8
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.2.1 低ホスファターゼ症 9
2.6.2.2.2 ALXN1215 10
2.6.2.2.2.1 ALXN1215 とヒドロキシアパタイトとの結合 10
2.6.2.2.2.2 ALXN1215 による PPi の加水分解 11
2.6.2.2.2.3 MC3T3-E1 細胞培養液における ALXN1215 による PPi 起因の石灰化阻害の改善 12
2.6.2.2.3 HPP のモデルマウス 13
2.6.2.2.3.1 骨の石灰化異常 13
2.6.2.2.3.2 他の臓器の異常 14
2.6.2.2.3.2.1 頭蓋骨癒合症 14
2.6.2.2.3.2.2 腱付着部の石灰化異常 15
2.6.2.2.3.3 成長 15
2.6.2.2.3.4 生存率 15
2.6.2.2.3.5 要約 15
2.6.2.2.4 前臨床有効性試験 – *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 8.2 mg/kg の予防的投与（9～16 日間投与） 16
2.6.2.2.4.1 試験デザイン 16
2.6.2.2.4.2 TNSALP の基質 – PPi および PLP 17
2.6.2.2.4.2.1 PPi 17
2.6.2.2.4.2.2 PLP 18
2.6.2.2.4.3 足部骨の石灰化異常 19
2.6.2.2.4.4 他の臓器の異常 – 腱付着部の石灰化異常 19
2.6.2.2.4.5 成長 20
2.6.2.2.4.5.1 体重 20
2.6.2.2.4.5.2 骨長 21
2.6.2.2.4.6 要約 22
2.6.2.2.5 前臨床有効性試験 – *Akp2*$^{-/-}$マウスへの ALXN1215 の予防的投与（23～52 日間投与） 22
2.6.2.2.5.1 試験デザイン 22
2.6.2.2.5.2 足部骨の石灰化異常 24
2.6.2.2.5.3 他の臓器の異常 – 腱付着部の石灰化異常 28
2.6.2.2.5.4 成長 29
2.6.2.2.5.4.1 体重 29
2.6.2.2.5.4.2 骨長 30
2.6.2.2.5.5 生存率 30

2.6.2.2.5.6 要約 32
2.6.2.2.6 前臨床有効性試験 – *Akp2*$^{-/-}$マウスの予防的投与の中止による ALXN1215 の作用持続時間の評価 32
2.6.2.2.6.1 試験デザイン 32
2.6.2.2.6.2 後足部骨の石灰化異常 33
2.6.2.2.6.3 成長 33
2.6.2.2.6.3.1 体重 33
2.6.2.2.6.4 生存率 33
2.6.2.2.6.5 要約 34
2.6.2.2.7 前臨床有効性試験 - *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 治療的投与 34
2.6.2.2.7.1 試験デザイン 34
2.6.2.2.7.2 足部骨の石灰化異常 35
2.6.2.2.7.3 成長 36
2.6.2.2.7.3.1 体重 36
2.6.2.2.7.3.2 骨長 37
2.6.2.2.7.4 生存率 37
2.6.2.2.7.5 要約 38
2.6.2.3 副次的薬理試験 39
2.6.2.4 安全性薬理試験 39
2.6.2.4.1 *In Vitro* の安全性薬理試験 39
2.6.2.4.2 *In Vivo* の安全性薬理試験 39
2.6.2.4.2.1 血清カルシウムおよびリン（報告 ALP-PT-10： *Akp2*$^{-/-}$マウスの短期試験における血清カルシウムおよびリンに対する ALXN1215 投与の検討） 39
2.6.2.4.2.2 急性注射反応（報告 PK2008021951：雄の幼若 Sprague-Dawley ラットにおける急性反応の特徴） 40
2.6.2.4.2.3 中枢神経系（CNS）（報告 1007-2491：ENB-0040 - A 機能観察総合評価法（FOB）による単回静脈内投与後の Sprague-Dawley の神経系の評価） 42
2.6.2.4.2.4 呼吸機能（報告 1007-2501：ENB-0040 -単回静脈内投与後の覚醒 Sprague-Dawley の呼吸に関する安全性薬理試験） 43
2.6.2.4.2.5 心血管系（報告 670388 付録 7 および 18）:幼若サルにおける ALXN1215 の 4 週間回復期間を伴った 6 ヶ月反復投与毒性試験） 43
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 44
2.6.2.6 考察及び結論 44
2.6.2.7 参考文献 46

表一覧

表 2.6.2.2.4.1-1 試験デザイン 16
表 2.6.2.2.4.2.1-1 予防的投与 15 日後の 15 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスの血漿サンプル中 PPi 濃度に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の作用 18
表 2.6.2.2.4.2.2-1 10 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスの血漿サンプル中 PLP 濃度に対する ALXN1215 8.2 mg/kg

の 9 日間予防的投与の作用 19
表 2.6.2.2.4.3-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨の石灰化に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用 19
表 2.6.2.2.4.4-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの踵骨-アキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の骨量に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 16 日間予防的投与の作用 20
表 2.6.2.2.4.5.1-1 *Akp2*$^{-/-}$ マウスの平均体重に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用 21
表 2.6.2.2.4.5.2-1 *Akp2*$^{-/-}$マウス左脛骨および左大腿骨の骨長平均値に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用 22
表 2.6.2.2.5.1-1 試験デザイン 23
表 2.6.2.2.5.2-1 *Akp2*$^{-/-}$マウス後足部骨の石灰化に対する ALXN1215 43～52 日間予防的投与の作用 25
表 2.6.2.2.5.2-2 *Akp2*$^{-/-}$マウス後足部骨の石灰化に対する ALXN1215 23～43 日間予防的投与の作用 26
表 2.6.2.2.5.2-3 標準化した 1 日用量および予防的投与試験で正常な後足部骨 X 線像を示した *Akp2*$^{-/-}$マウスの割合 27
表 2.6.2.2.5.3-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスのアキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の骨量に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 43 日間予防的投与の作用 28
表 2.6.2.2.5.4.1-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの平均体重に対する ALXN1215 43 日間予防的投与の作用 29
表 2.6.2.2.5.5-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存期間中央値に対する ALXN1215 予防的投与の作用 31
表 2.6.2.2.6.1-1 試験デザイン 33
表 2.6.2.2.7.1-1 試験デザイン 34
表 2.6.2.2.7.2-1 出生後 15 日目に投与を開始した Akp2$^{-/-}$マウスの後足部骨石灰化に対する ALXN1215 の治療的投与の作用 35
表 2.6.2.2.7.2-2 出生後 12 日目に投与を開始した *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨石灰化に対する ALXN1215 の治療的投与の作用 36
表 2.6.2.2.7.3.1-1 出生後 15 日目から投与を開始する Akp2$^{-/-}$マウスの平均体重 37
表 2.6.2.2.7.4-1 出生後 15 日目から投与を開始した *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存率中央値に対する ALXN1215 治療的投与の作用 38
表 2.6.2.2.7.4-2 出生後 12 日目から投与を開始した Akp2$^{-/-}$マウスの生存率中央値に対する ALXN1215 治療的投与の作用 38
表 2.6.2.4-1 安全性薬理プログラム 39
表 2.6.2.4.2.2-1 試験デザイン – PK2008021951 試験 41

図一覧

図 2.6.2.2.2.1-1 ALXN1215 および腎臓 TNSALP とヒドロキシアパタイトとの結合 11
図 2.6.2.2.2.2-1 基質濃度（PPi）と反応速度との関連性を示す ALXN1215 原薬サンプルの代表的な飽和曲線 12
図 2.6.2.2.2.3-1 14 日間培養後の MC3T3-E1 細胞外マトリックスにおけるカルシウムアッセイを用いた石灰化の定量および PPi および ALXN1215 処置 13
図 2.6.2.2.3.1-1 15 日齢の *Akp2*$^{-/-}$マウス足部骨の X 線画像の分類 14

図 2.6.2.2.4.5.1-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの体重曲線に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用 20
図 2.6.2.2.5.2-1 43～52 日間予防的投与における *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨石灰化の改善に関する ALXN1215 の用量反応性 28
図 2.6.2.2.5.4.1-1 Akp2$^{-/-}$マウスの体重曲線に対する ALXN1215 43 日間予防的投与の作用 30
図 2.6.2.2.5.5-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存曲線に対する ALXN1215 予防的投与の作用 31
図 2.6.2.2.5.5-2 予防的投与試験での *Akp2*$^{-/-}$マウスの 75%生存率における ALXN1215 の用量反応関係性 32
図 2.6.2.2.6.3.1-1 出生後から 35 日間 ALXN1215 を投与し、その後 36 日目から投与を中止した *Akp2*$^{-/-}$マウスの体重曲線 33
図 2.6.2.2.7.3.1-1 出生後 15 日目から ALXN1215 を治療的投与した Akp2$^{-/-}$マウスの体重曲線 .. 37
図 2.6.2.2.7.4-1 治療投与試験における ALXN1215 の *Akp2*$^{-/-}$マウス生存曲線に対する作用 38

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
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
AUC	area under the curve	濃度-時間曲線下面積
β-GP	β-glycerol phosphate	β-グリセロールリン酸
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
BV	bone volume	骨量
C3	complement component 3	補体第 3 成分
C4	complement component 4	補体第 4 成分
C5	complement component 5	補体第 5 成分
C5a	complement component 5a	補体第 5a 成分
Cat #	catalogue number	カタログ番号
CNS	central nervous system	中枢神経系
CV	cardiovascular	心血管
Dexa	dexamethasone	デキサメタゾン
dL	deciliter	デシリットル
DP	diphenhydramine	ジフェンヒドラミン
ECG	electrocardiogram	心電図
ED_{50}	dose that induces 50% of E_{max}	E_{max} の半分の効果を与える投与量
E_{max}	maximal effects	最大効果
ENB-0040	asfotase alfa	アスホターゼ　アルファ
FcD10	Fc domain of immunoglobulin G_1 and a deca-aspartate peptide	免疫グロブリン G_1 の Fc 領域およびデカアスパラギン酸ペプチドドメイン
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
g	gram	グラム
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床実施の基準
h	hour	時間
HCl	hydrochloric acid	塩酸
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene	ヒト Ether-à-go-go 関連遺伝子
HPLC	high pressure liquid chromatography	高圧液体クロマトグラフィー
HPP	hypophosphatasia	低ホスファターゼ症
IND	investigational new drug	治験用新医薬品
IV	intravenous	静脈内
K_3EDTA	tri-potassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸三カリウム塩
k_{cat}	catalytic constant	触媒定数
kDa	kilodalton	キロダルトン

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
kg	kilogram	キログラム
k_m	Michaelis-Menten Constant	ミカエリスメンテン定数
L	liter	リットル
LOQ	limit of quantification	定量下限
MicroCT	microcomputed tomography	マイクロコンピューター断層撮影
µg	microgram	マイクログラム
µM	micromolar	マイクロモル
mg	milligram	ミリグラム
mL	milliliter	ミリリットル
mM	millimolar	ミリモル濃度
mm	millimeter	ミリメートル
mm^3	cubic millimeter	立方ミリメートル
mmol	millimole	ミリモル
n	sample size	試料数
ng	nanogram	ナノグラム
ND	not determined	未測定
NS	no sample	試料なし
PD	pharmacodynamics	薬力学
Pi	inorganic phosphate	無機リン酸
PLP	pyridoxal-5’ phosphate	ピリドキサール 5 リン酸
pNPP	para-nitrophenyl phosphate	p-ニトロフェニルリン酸
PPi	inorganic pyrophosphate	無機ピロリン酸
r^2	r squared	決定定数
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
s	second	秒
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
TNSALP	tissue non-specific alkaline phosphatase	組織非特異的アルカリホスファターゼ
U	unit	単位
WT	wild type	野生型

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

低ホスタファーゼ症（HPP）は、生命を脅かす極めて希な遺伝性の代謝疾患であり [1)]、骨の石灰化不全およびリン酸やカルシウムの調節障害を特徴とする。これらにより、骨破壊や骨の変形、深刻な筋力低下、痙攣発作、腎障害、および呼吸不全などの複数の重要臓器に対する進行性の傷害に至る可能性がある。本疾患患者に対して承認されている治療薬はない。

HPP 患者では、組織非特異型アルカリホスファターゼ（TNSALP）をエンコードしている遺伝子の不活性化変異により TNSALP 酵素活性の欠失を来し、その基質である無機ピロリン酸（PPi）、ピリドキサール-5′-リン酸（PLP）およびホスホエタノールアミンの体循環濃度が上昇する [2)]。PPi の細胞外濃度が上昇すると、ヒドロキシアパタイトの生成が抑制されることにより骨の石灰化が阻害され、乳幼児および小児ではくる病、また年齢に関わらず骨軟化症が発現する。体循環ビタミン B_6 の最も一般的な形態である PLP の調節不全は、ピリドキシン依存性痙攣発作を引き起こす。また、高カルシウム血症および高リン酸血症が発現することもある。

ALXN1215 は、ENB-0040 および sALP-FcD10 とも称するが、遺伝的に欠損している代謝過程を正常化し、生命を脅かす合併症をもたらす石灰化異常を予防または改善することにより、HPP の原因に対処するようデザインされた最初の酵素補充療法治験薬である。ALXN1215 は、726 個のアミノ酸からなる可溶性糖タンパク質であり、ヒト TNSALP の触媒ドメイン、ヒト免疫グロブリン IgG1 Fc ドメインおよびデカアスパラギン酸ペプチドドメインから構成される。アスパラギン酸部分は骨で生成されるヒドロキシアパタイトに直接結合する。これにより ALXN1215 は、適切な組織に選択的に作用し、TNSALP 部分が効率的に過剰な局所 PPi を切断して正常な石灰化を回復させる。JG-60-Exp2 試験により、ALXN1215 の骨基質に対する親和性は、骨を標的としない TNSALPU（すなわち、デカアスパラギン酸ペプチドを欠損している市販の TNSALP）よりも大きいことが示された（2.6.2.2.2.1 項参照）。

TNSALP 遺伝子を不活化して作製したヒト HPP のノックアウトモデルマウス（*Akp2*$^{-/-}$モデルマウス）で ALXN1215 の前臨床有効性試験を実施した。*Akp2*$^{-/-}$マウスは、José Luis Millán 博士の研究室にて C57B/L6 および 129J 系統の混合バックグラウンド上相同組換えにより作製された [3)]。ヒト HPP と同様、*Akp2*$^{-/-}$マウスにおいても、血漿または尿中に ALP の基質である PPi、PLP 及びホスホエタノールアミンの蓄積が認められる。*Akp2*$^{-/-}$マウスでは、誕生時には骨格表現型が正常にみえても、約 8 日齢時点で同腹野生型（WT）よりも骨マトリックスの過剰な非石灰化が認められる。無呼吸およびてんかん発作も発現し（後者はビタミン B_6 代謝における異常が原因と考えられる）、早期死亡の原因となる [3)]。これらマウスは、生後 10-12 日で死亡する [4)]。

Akp2$^{-/-}$マウスにおける ALXN1215 の有効性を以下の 2 種の投与パラダイム下で検討した。

- 出生時に投与開始する予防的投与
- 骨の石灰化異常が認められる出生後 12 または 15 日に投与開始する治療的投与

ALXN1215 は、マウスのすべての有効性試験において皮下（SC）投与した。 *Akp2*$^{-/-}$マウスの前臨床試験で検討された有効性の評価項目は、TNSALP の基質である PPi および PLP、骨の石灰化異常、成長（体重および、左大腿骨ならびに左脛骨の骨長）および生存率であった。

Akp2$^{-/-}$モデルマウスの予防投与試験および治療投与試験の両方の前臨床試験で ALXN1215 の有効性が示された。予防投与試験では、ALXN1215 は PPi および PLP 体循環濃度の上昇防止、骨石灰化増大を示し、また、骨長および体重の増加量減少に有効性を示した。生存期間も改善された。成長および生存率に対する ALXN1215 の効果は投与中止により消失したことから、効果維持には

ALXN1215 の継続投与を必要することが示唆された。ALXN1215 を治療投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスでは、骨石灰化が促進され、生存率が有意に上昇し、体重の増加抑制が抑えられた。以上、これらのデータから、ALXN1215 は標的へ結合し、関連する一次薬力学的マーカーを減少させ、HPP の動物モデルにおいて予防または治療投与により骨石灰化の複数パラメータ、成長および生存率に対して有効であることが示された。

石灰化異常の個体で正常な石灰化過程が回復した場合、非石灰化骨マトリックスが体循環カルシウムおよびリン酸の生理学的シンクとして機能し、急性の低カルシウム血症または低リン酸血症いわゆる「飢餓骨症候群」に至る可能性がある [5)6)]。体循環カルシウムおよびリン酸レベルに対する ALXN1215 の潜在的作用を評価するため、石灰化異常が認められる出生後 12 日のマウスに投与を開始した。本試験において、ALXN1215 の石灰化回復に対する有効性は示されたものの、投与開始時に著しい石灰化異常が存在したにも関わらず、急性低カルシウム血症または低リン酸血症は発現しなかった。

ラットおよびカニクイザルにおいて実施した GLP 安全性薬理試験では、ALXN1215 が中枢神経系（CNS）（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（IV）投与）、および心血管系（670388 試験、2.6.2.4.2.5 項参照、皮下投与）の生理学的機能に及ぼす影響について検討した。ラットでは、いくつかの中枢神経（活動低下）および呼吸器（呼吸減少）パラメータに対して用量依存的ではあるが一過性の影響が認められた。ただしこれらの影響は、ラットにおける複数の静脈内投与毒性試験で認められた一過性の急性反応と時間的に一致していた（70385 試験、70552 試験、670314 試験、670315 試験、2.6.6 項参照）。これら中枢神経系および呼吸器への影響は、ALXN1215 を皮下投与したラット、またカニクイザルでは投与経路を問わず認められなかった。ALXN1215 は、サルの心血管系に対しては静脈内または皮下のいずれの投与ルートにおいても影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 低ホスファターゼ症

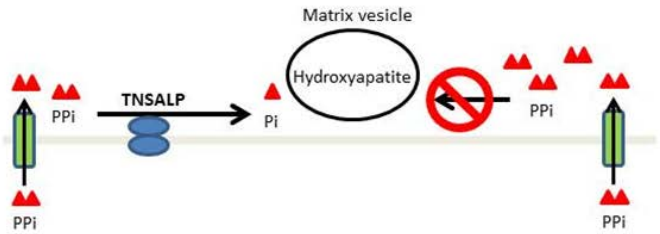
低ホスファタファーゼ症（HPP）は、骨の石灰化不全、ならびにリンおよびカルシウム代謝障害を特徴とし、生命を脅かす極めて希な遺伝性の代謝疾患であり [1)]、骨破壊や骨の変形、深刻な筋力低下、痙攣発作、腎障害、および呼吸不全などの複数の重要臓器に対する進行性の傷害に至るおそれがある。本疾患患者に対して承認されている治療薬はない。

HPP 患者では、組織非特異型アルカリホスファターゼ（TNSALP）をエンコードしている遺伝子の不活性化変異により TNSALP 酵素活性の欠損を来し、その基質である無機ピロリン酸（PPi）、ピリドキサール-5′-リン酸（PLP）およびホスホエタノールアミンの血中濃度が上昇する [2)]。PPi の細胞外濃度が上昇すると、ヒドロキシアパタイトの生成が抑制されることにより骨の石灰化が阻害され、乳幼児および小児ではくる病、また年齢に関わらず骨軟化症が発現する。体循環ビタミン B_6 の最も一般的な形態である PLP の調節不全は、ピリドキシン依存性痙攣発作を引き起こす。また、高カルシウム血症および高リン酸血症が発現することもある。

現在までに、欧州、北米およびオーストラリアの人々において、TNSALP 遺伝子の少なくとも 271 の異なる変異と 16 の遺伝多型について、HPP との関連が認められている [7)8)]。遺伝形式は常染色体劣性遺伝または優性遺伝であり、変異によって完全に TNSALP の活性が消失する場合もあるが、TNSALP レベルが低下するのみの場合もあり、その臨床症状は様々である。

2.6.2.2.2 ALXN1215

ALXN1215 は、遺伝的に障害されている代謝過程を正常化し、生命を脅かす合併症をもたらす石灰化異常を予防または改善することにより、HPP の根本原因に対処するようデザインされた最初の酵素補充療法治験薬である。ALXN1215 は、それぞれ 726 個のアミノ酸からなる 2 本の異なるポリペプチド鎖から構成される可溶性免疫グロブリン G1 Fc を含む糖タンパク質である。それぞれのポリペプチド鎖は、ヒト TNSALP の可溶性触媒ドメイン、ヒト免疫グロブリン G1 Fc ドメインおよびデカアスパラギン酸ペプチドドメインからなる。脱グリコシル化した二価の融合タンパク質の分子量は 161 kDa である。アスパラギン酸部分は骨で生成されるヒドロキシアパタイトに直接結合する。これにより ALXN1215 は適切な組織に選択的に作用し、TNSALP 部分が効率的に過剰な局所 PPi を切断して正常な石灰化を回復させる。（下図参照）



マウスおよびヒト TNSALP（90%）の配列の相同性は高いことから ALXN1215 そのものを *Akp2*$^{-/-}$ モデルマウスに使用した。重要な点は、TNSALP の触媒作用および安定性に寄与する主要アミノ酸残基がマウスとヒトとの間で保持されている点である [9]。その上、アルカリホスファターゼの作用機序と生物学的活性（PPi および PLP など複数の基質に対する酵素活性として定義される）は、受容体活性非依存性で、基質特異的種依存性ではなかった。このように、酵素としての可溶性ヒトアスホターゼアルファは、マウスモデルでマウスのものと同一に機能し、マウスアナログの構築なしにデータ作成に使用することができる [10]。 したがって、マウス由来の ALXN1215 代用薬は、*Akp2*$^{-/-}$ マウスにおける有効性評価には不要であると考えられた。試験報告書では、ALXN1215 は ENB-0040 または sALP-FcD10 と称される。

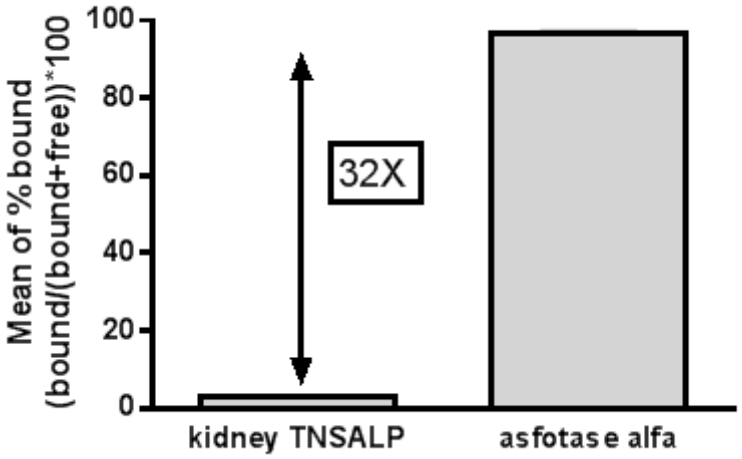
2.6.2.2.2.1 ALXN1215 とヒドロキシアパタイトとの結合

骨の無機質成分は骨組織重量の 75%（骨量の 50%）に相当し、アパタイトとして総称される一群のリン酸無機質（もっとも一般的な骨成分はヒドロキシアパタイト）から構成される [11]。ALXN1215 には、ヒドロキシアパタイトに結合するようデザインされたデカアスパラギン酸ペプチドの一部が含まれるため [12]、ALXN1215 は選択的に骨を標的とする。

ALXN1215 とヒドロキシアパタイトとの結合の程度を測定するため（報告 JG-60-Exp2）、酸可溶性のヒドロキシアパタイト（[redacted]社、カタログ番号[redacted]）を、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むロズウェルパーク記念研究所（RPMI）培地（[redacted]社、カタログ番号[redacted]）にて固形に再構成後、精製 ALXN1215（5 µg）またはウシ腎臓 TNSALP（5 µg）と混合した。アスパラギン酸部分を有しないウシ腎臓 TNSALP（[redacted] cat. [redacted]）は、ヒドロキシアパタイト標品への ALXN1215 の非特異的結合に対する対照として使用した。室温で 30 分インキュベーション後、ALXN1215 の結合型と遊離型を遠心分離し、両画分の ALXN1215 酵素活性をパラニトロフェニルリン酸（pNPP）を基質とするアルカリホスファターゼ比色分析法で測定した。

図 2.6.2.2.2.1-1 に示したように、精製ヒドロキシアパタイトに対して、ALXN1215 は、デカアスパラギン酸ペプチドを欠損する腎臓 TNSALP の 32 倍の親和性を示した。

図 2.6.2.2.2.1-1 ALXN1215 および腎臓 TNSALP とヒドロキシアパタイトとの結合



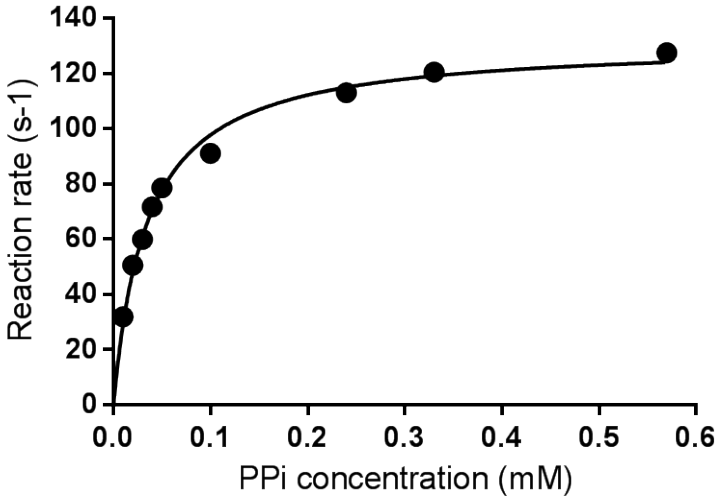
2.6.2.2.2.2 ALXN1215 による PPi の加水分解

ルーチンのアルカリホスファターゼ酵素活性測定には上述の pNPP アッセイを用いたが、Alexion 社はまた、バリデートされた ALXN1215 活性測定法も確立した（TMV-0065FR）[13)]。この測定法では、生理条件下（37°C、pH 7.4）における速度定数、ミカエリスメンテン定数（K_m）および触媒定数（k_{cat}）の測定にアルカリホスファターゼの天然基質である PPi を用いる。本分析法は以下の酵素反応に基づいている。

PPi + ALXN1215 → 触媒定常状態にて 2 Pi

K_m および k_{cat} 値を測定するため、さまざまな PPi 濃度を用いて酵素反応を行い、PPi 濃度に対する触媒反応速度の飽和曲線グラフ（モル Pi/秒/モル ALXN1215）を作成した。飽和曲線の典型的なプロットを図 2.6.2.2.2.2-1 に示す（定例 QC、TMV-0065FR[13)]）。

図 2.6.2.2.2.2-1　基質濃度（PPi）と反応速度との関連性を示す ALXN1215 原薬サンプルの代表的な飽和曲線

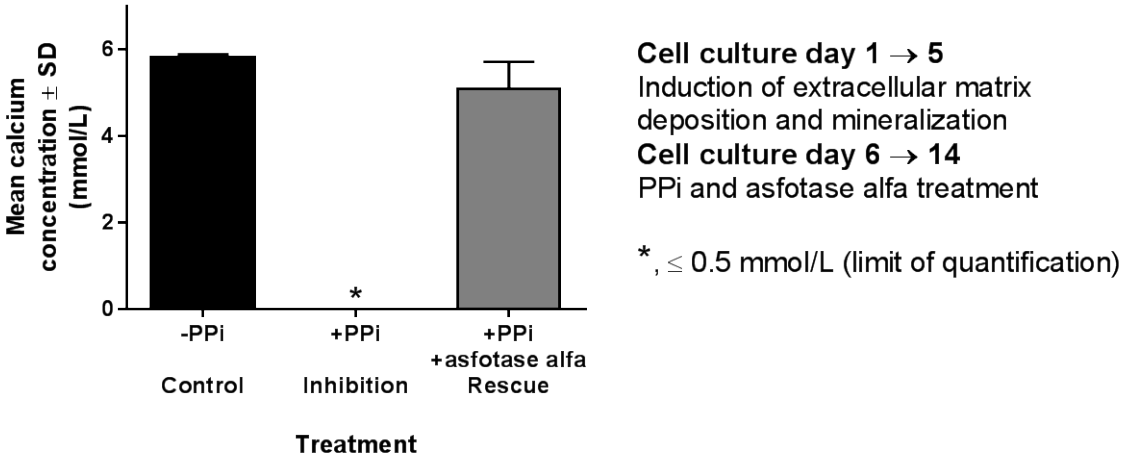


2.6.2.2.2.3　MC3T3-E1 細胞培養液における ALXN1215 による PPi 起因の石灰化阻害の改善

新生マウス頭蓋冠から分離した MC3T3-E1 クローン細胞は、骨形成能を有し、アスコルビン酸および β-グリセロールリン酸（β-GP）の存在下で石灰化に移行するコラーゲンマトリックス合成能が維持されている。培地に PPi を添加することにより MC3T3-E1 培養細胞の石灰化が阻害され、この阻害作用は外因性 TNSALP の添加によって抑制される [14)]。

MC3T3-E1 培養細胞において、PPi による石灰化阻害に対する ALXN1215 の作用について検討した（報告 FB-06-Exp17）。細胞培養培地にアスコルビン酸および β-GP を添加することにより、1 日目に細胞外マトリックスの蓄積および石灰化が誘導された。5 日後に、ALXN1215（132 U/L）存在下または非存在下においてさまざまな処置を開始し（± 5 µM PPi）、さらに 1 週間細胞を培養した。14 日目に、細胞外マトリックスの蓄積および石灰化についてそれぞれコラーゲン染色キット（コラーゲン特異的、[redacted] Inc.、カタログ番号 [redacted]）およびカルシウムアッセイ（[redacted] 社、カタログ番号 [redacted]）を用いて評価した。PPi 存在下では、カルシウム濃度は未処置の対照培養細胞よりも著しく減少した。培養液に ALXN1215 および PPi の両方を加えて培養した場合のカルシウム濃度は、PPi 非存在下の対照細胞培養での濃度と同程度であった。どの処置方法でもコラーゲンマトリックスの蓄積に影響はみられなかった。これらの結果から、MC3T3-E1 細胞における PPi による石灰化阻害は、ALXN1215 によって抑制されうることが示された（図 2.6.2.2.2.3-1　に代表的な試験成績を示す）。

図 2.6.2.2.2.3-1　14 日間培養後の MC3T3-E1 細胞外マトリックスにおけるカルシウムアッセイを用いた石灰化の定量および PPi および ALXN1215 処置



2.6.2.2.3　HPP のモデルマウス

TNSALP 遺伝子を不活化して作製したヒト HPP のノックアウトモデルマウス（以下 *Akp2*$^{-/-}$と記載）において ALXN1215 の前臨床有効性試験を実施した。体循環中に測定可能な TNSALP 活性はないことが証明されている *Akp2*$^{-/-}$マウスは、José Luis Millán 博士の研究室にて C57BL36 系統および 129J 系統の混合バックグラウンド上相同組換えにより作製した[3)]。ヒト HPP と同様、*Akp2*$^{-/-}$マウスにおいても、血漿または尿中に ALP の基質である PPi、PLP およびホスホエタノールアミンの蓄積が認められた。

2.6.2.2.3.1　骨の石灰化異常

HPP は、TNSALP の機能欠損により骨マトリックスの石灰化障害を来す遺伝性疾患である。*Akp2*$^{-/-}$マウスでは、誕生時には骨格は正常にみえるが、約 8 日齢時点で同腹野生型（WT）よりも骨マトリックスの過剰な非石灰化が認められる。*Akp2*$^{-/-}$マウスの骨格表現型は不均一であり、遺伝子型が同一であってもさまざまな石灰化異常を示す。すなわち、重篤な影響を受ける *Akp2*$^{-/-}$マウスがいる一方、10%～50%のマウスは正常な表現型を示す。当初、胸郭、後肢および後足部における骨石灰化異常を比較したが[15)]、その後の検討には、後足部を用いた。後足部は一定パターンの非石灰化を示し、再現性を持って画像化されたため、容易でより定量的な比較が可能となった。後足部骨に関しては、中足骨および指節骨に最も一貫した異常がみられた。石灰化異常は以下の重症度スケールにしたがって分類した。

- 重度：顕著な形態異常が認められ、内側および端部の指骨が完全に欠如し、二次骨化中心が全く認められない場合
- 中等度：指は完全に形成されるが、二次骨化中心が明確でない場合
- 軽度：指は完全に形成されるが、二次骨化中心は一定せずかつ不完全である場合
- 正常：指が完全に形成され、二次骨化中心もすべて認められる場合

各スコアの代表的な後足部 X 線写真を図 2.6.2.2.3.1-1 に示す。

図 2.6.2.2.3.1-1　15 日齢の *Akp2*$^{-/-}$マウス足部骨の X 線画像の分類



2.6.2.2.3.2　他の臓器の異常

2.6.2.2.3.2.1　頭蓋骨癒合症

機能的な頭蓋縫合早期癒合および頭蓋縫合の未成熟な骨癒合がそれぞれ乳幼児および小児の HPP 患者で認められている。

15 日齢時点で *Akp2*$^{-/-}$マウスは異常な頭蓋骨形態を示し、その重症度は後足部骨で認められた石灰化異常の重症度と相関することが示唆された（報告 HPP-PH-06）。頭蓋顔面部の異常を定量化するため、デジタルノギスを用いて *Akp2*$^{-/-}$および WT マウスの頭蓋顔面の直線長を測定した。測定項目は、鼻骨、前頭骨および頭頂骨の骨長、頭蓋骨長、眼窩下および頭蓋骨の幅および頭蓋骨の高さとした。15 日齢時点で、*Akp2*$^{-/-}$マウスの頭蓋骨は同腹 WT マウスより小さかった（長さ～11%および幅～7%）。頭蓋骨の長さで標準化した場合、重度の *Akp2*$^{-/-}$マウスは同腹 WT マウスよりも鼻骨および前頭骨の骨長が著しく短かった（それぞれ 24%および 7%）。頭蓋骨の幅で標準化した場合、眼窩下幅は 9%増加した。

Akp2$^{-/-}$マウスの冠状縫合の癒合は 2 次元マイクロコンピューター断層撮影法（MicroCT）にて評価した。15 日齢の *Akp2*$^{-/-}$マウスでは、縫合周囲の組織質のため、すなわち低石灰化で一定でなかったため、評価を行うことができなかった。したがって、冠状縫合開存性の評価は、癒合は不完全であるがさらに進行し、より一定した癒合が得られる 20～22 日齢において実施した。後足部骨で重度の骨石灰化表現型を示したすべての *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいて、20～22 日齢時点に冠状縫合の癒合が認められた。骨石灰化表現型の重症度が低い（中等度、軽度および正常）*Akp2*$^{-/-}$マウスでは冠状縫合は開存していた。

これらのデータから HPP の前臨床モデルとしての *Akp2*$^{-/-}$マウスの妥当性が支持されたが、本モデルにおいて認められた頭蓋顔面異常に対する ALXN1215 の有効性の評価は継続中であり、本申請には用いない。

2.6.2.2.3.2.2 腱付着部の石灰化異常

Akp2$^{-/-}$マウスでは、踵骨-アキレス腱の繊維軟骨領域において著しい石灰化異常が認められている（ALP-PT-22 試験、2.6.2.2.4.4 項参照）。MicroCT により 17 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスの石灰化異常を定量化したところ、同腹 WT マウスよりも腱付着部の石灰化が 95%減少していた。アキレス腱踵骨の石灰化異常の重症度はすべての *Akp2*$^{-/-}$マウスで同程度であった。後足部骨の異常の重症度との相関関係は認められなかった。

2.6.2.2.3.3 成長

成長障害は、低ホスファターゼ症の特徴であり、幼齢期発症型には発育遅延および低身長が認められる。*Akp2*$^{-/-}$マウスでは体重増加抑制がみられ、成長が障害される。ALP-PT-04 試験（2.6.2.2.4.5 項参照）では、*Akp2*$^{-/-}$マウスの体重はおよそ 6 日齢から野生型（WT）動物と比べて有意に差異を示し始めた。16 日齢時点で、*Akp2*$^{-/-}$マウスの体重は同齢 WT マウスよりも約 20%少なく、長管骨（脛骨および大腿骨）も約 10%短かった。

2.6.2.2.3.4 生存率

Akp2$^{-/-}$マウスでは無呼吸およびてんかん発作も明確に発症しており（後者はビタミン B_6 の代謝異常によるものと考えられる）、早期死亡の一因となっている [3)]。これらの症状は、乳幼児に発現する HPP と類似しており、乳幼児で観察された中枢神経系のビタミン B_6 欠乏に続発する痙攣発作もその一つである [16)]。*Akp2*$^{-/-}$マウスは、生後およそ 10-12 日の概して痙攣性発症の 1 日または 2 日後に死亡した [10)]。食餌にピリドキシン（ビタミン B_6）を補充すると、*Akp2*$^{-/-}$マウスの生存期間中央値の平均は 19.5 日まで延長した（結果を 2.6.2.2.5.5 項に記載した）。

2.6.2.2.3.5 要約

Akp2$^{-/-}$マウスの特徴は、ALP の基質である PPi および PLP の血漿中での蓄積、骨マトリックスの過剰な未石灰化、および成長阻害である。また、アキレス腱付着部の石灰化異常や、頭蓋骨の発達および形態異常も認められる。無呼吸およびてんかん発作も明確であり、早期死亡の一因となっている。*Akp2*$^{-/-}$マウスは乳幼児発現型ヒト HPP のほとんどの臨床的特徴を反映するため、HPP 治療における ALXN1215 を評価するための適切なモデルである。

有効性試験で使用した *Akp2*$^{-/-}$および WT マウスはすべて、カナダの[redacted]の申請者の施設で飼育された。マウスは試験組入れに適した日齢に達した時点で無作為に投与群に割り付けられた。試験開始時および終了時にマウスの遺伝子型を特定し、TNSALP 遺伝子欠損の存在を確認した。ビタミン B_6 代謝異常を補うため、すべての動物に 325 ppm のピリドキシン補充実験用げっ歯類用餌（試験用飼料番号[redacted]または[redacted]）を自由摂取させた。

Akp2$^{-/-}$マウスにおける ALXN1215 の有効性を 2 種の投与パラダイム下で検討した。

- 出生時に投与開始する予防的投与
- 骨の石灰化異常が認められる出生後 12 または 15 日に投与開始する治療的投与

2.6.2.2.4 前臨床有効性試験 – *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 8.2 mg/kg の予防的投与（9～16 日間投与）

9～16 日間投与における予防的投与試験から得られた前臨床データ（報告 ALP-PT-04、ALP-PT-22、ALP-PT-24 および ALP-PT-25.1）を本項に記載する。

2.6.2.2.4.1 試験デザイン

すべての予防的投与試験において、出生時に投与を開始し、試験に応じて 9 日～16 日間継続した。ALXN1215 または溶媒を *Akp2*$^{-/-}$マウスの肩甲骨部に毎日皮下投与した。試験終了時の有効性の評価項目は、TNSALP の基質である PPi および PLP、骨の石灰化異常、腱付着部の石灰化異常、成長（体重および、左脛骨ならびに左大腿骨の骨長）とした。動物における全般健康状態指標として体重も毎日測定した。同齢同腹の未投与 WT マウスを対照群とした。

表 2.6.2.2.4.1-1 試験デザイン

Study Number	Group	Strain	Dose (mg/kg)	Administration Period (Days)	Evaluation Parameters
ALP-PT-04	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	15	▪ Bone mineralization ▪ Survival ▪ Body weight ▪ Bone length ▪ Bone formation o calcein labelling ▪ Histology o von kassa o Alizarin red ▪ Biomarkers o Calcium, PLP, PL, PPi concentrations in plasma or urine ▪ Immune response o ADA
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	15	
	3	WT	-	NA	
ALP-PT-22 Therapeutic	1	*Akp2*$^{-/-}$	-	NA	• Survival • Body Weight • Bone mineralization o Radiography • Calcaneus-Achilles tendon enthesis histology and micro-CT
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	7	
	3	WT	-	NA	
ALP-PT-22 Prophylactic	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	16	
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	16	
	3	WT	-	NA	
AL-PT-24	1	*Akp2*$^{-/-}$	-	14	• Survival • Body weight
	2	*Akp2*$^{-/-}$	-	15	

	3	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	15	• Bone mineralization o Radiography • Biomarker o Plasma PPi
	4	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	15	
	5	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	15	
	6	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	15	
	7	WT	NA	NA	
	8	WT	NA	NA	
	9	WT	NA	NA	
ALP-PT-25.1	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	9	• Survival • Body weight • Bone mineralization o Radiography • Plasma PLP
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	9	
	3	WT	NA	NA	

2.6.2.2.4.2 TNSALP の基質 – PPi および PLP

2.6.2.2.4.2.1 PPi

PPi は、ヒドロキシアパタイト結晶成長の阻害剤であり [17]、HPP では PPi が蓄積することで骨格石灰化が阻害される [17)18)19)]。TNSALP は PPi を局所的に切断し石灰化の阻害物質 PPi を除去することにより石灰化を促進すると考えられる。一方、無機リン酸（Pi）の局所濃度は増加するが、Pi はカルシウムとともに沈殿してリン酸カルシウムを形成し、ヒドロキシアパタイト結晶に変換され、骨に強度と剛性を与える。

ALP-PT-24 試験において、Akp2$^{-/-}$マウスの体循環 PPi 濃度に対する ALXN1215 の作用について検討した。PPi の定量には、出生後 15 日の *Akp2*$^{-/-}$および WT マウスから得た三カリウムエチレンジアミン四酢酸（K_3EDTA）血漿サンプルを用いた。PPi の測定は、放射標識マーカー、すなわちウリジンジホスホ-D-[6-3H]グルコースを用いた酵素カップリング反応に基づいて行った [20)]。PPi は放射標識した 6-ホスホグルコノラクトンに変換される。反応混合液を活性炭で処理して未反応の余分なジホスホ-D-[6-3H]グルコースを吸着させ、上澄み液（遠心分離による活性炭除去後）の放射標識 6-ホスホグルコノラクトンをシンチレーションカウンターで測定した。緩衝液の PPi 標準曲線からマウス血漿サンプル内の PPi 濃度を逆算した。

Akp2$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 14 日間毎日皮下投与した。最終投与後 96 時間までのさまざまなタイムポイントにおける血漿中 PPi 濃度を測定した。ただし、ベースライン PPi 値の対照群として溶媒を投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスの個体数が限られていたため、ALXN1215 投与の有効性評価は、投与後 12 時間の時点でのみ実施した。PPi の定量化を損なう可能性のあるホスファターゼ活性を阻害するために採血管にレバミゾールを添加した。溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいては、同齢同腹の WT マウスよりも血漿中 PPi 濃度の有意な上昇がみられた（$p = 0.0210$）。ALXN1215 の投与により、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいてみられた血漿中 PPi 上昇が完全に抑制された（表 2.6.2.2.4.2.1-1）。

表 2.6.2.2.4.2.1-1　予防的投与 15 日後の 15 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスの血漿サンプル中 PPi 濃度に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の作用

Group No.	**Strain**	**Sample size (n)**	**Daily doses (mg/kg), SC**	**Timepoint**	**PPi concentration (µM)** Mean (SD)
1	*Akp2*$^{-/-}$	14	0	Baseline	3.97 (1.04)
2	*Akp2*$^{-/-}$	15	0	12hr post-dose	4.34 (1.86)
3	*Akp2*$^{-/-}$	15	8.2	12hr post-dose	2.31 (0.41)[a]
4	*Akp2*$^{-/-}$	15	8.2	24hr post-dose	3.06 (1.08)
5	*Akp2*$^{-/-}$	15	8.2	48hr post-dose	3.91 (1.93)
6	*Akp2*$^{-/-}$	15	8.2	96hr post-dose	4.51 (2.58)
7	WT	13	Not injected	Baseline	3.17 (0.82)
8	WT	14	Not injected	12hr post-dose	2.93 (1.11)[b]
9	WT	15	Not injected	96hr post-dose	4.35 (3.80)

a) Akp2$^{-/-}$マウス 0 mg/kg　12hr post-dose と統計学的有意差あり。p = 0.0003
b) Akp2$^{-/-}$マウス 0 mg/kg　12hr post-dose と統計学的有意差あり。p = 0.0210

2.6.2.2.4.2.2　PLP

ビタミン B_6 は、ピリドキシン、ピリドキサールおよびピリドキサミン、およびそれらのリン酸エステルおよび配糖体からなる一群の関連化合物である。ビタミン B_6 の主な補酵素型である PLP は、140 以上の酵素反応の必須補助因子である。ビタミン B_6 は、ほぼすべての代謝機能および細胞恒常性に影響を与える。体循環中の血漿 PLP の組織への取り込みにはあらかじめ 5'-リン酸基が除去される必要がある。このようにビタミン B_6 代謝におけるアルカリホスファターゼ活性の重要性は、本ビタミンの運搬と共に初期段階の吸収においても明らかになっている [21)]。

PLP の定量は、10 日齢 *Akp2*$^{-/-}$および WT マウスの血漿サンプルのビタミン B_6 高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）アッセイを用いて行った（ALP-PT-25.1 試験）（[redacted]社、カタログ番号[redacted]）。PLP 測定には、まず沈殿ステップを実施し高分子物質を除去した。遠心分離後の上澄み液と誘導体化試薬を混合して 60℃ で 20 分間インキュベートした。その後、本蛍光プローブを冷却して（2～8°C）遠心分離を行い、HPLC 装置に注入した。HPLC の無勾配分離を 30°C にて 10 分間 実施した。蛍光検出器を用いて分析結果を記録した。0.1N 塩酸（HCl）中の PLP の標準曲線からマウス血漿サンプル中の PLP 濃度を逆算した。

Akp2$^{-/-}$マウスに、食餌にピリドキシンを補充せずに、溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 9 日間毎日皮下投与した。試験 10 日目の最終投与から 24 時間後に PLP 濃度を測定した。PLP の定量化を損なう可能性のあるホスファターゼ活性を阻害するために採血管にレバミゾールを添加した。溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスでは、同齢同腹の WT マウスに比べ血漿 PLP 濃度の有意な上昇がみられた（$p = 0.0001$）。ALXN1215 の投与により溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいてみられた血漿中 PLP 値の上昇は完全に抑制された（表 2.6.2.2.4.2.2-1）。

表 2.6.2.2.4.2.2-1 10 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスの血漿サンプル中 PLP 濃度に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 9 日間予防的投与の作用

Study Number	Strain	Sample Size (n)	Daily Dose (mg/kg), SC	PLP Concentration (ng/mL) Mean (SD)
ALP-PT-25.1	*Akp2*$^{-/-}$	43	0	484 (146)[a)]
ALP-PT-25.1	*Akp2*$^{-/-}$	25	8.2	LOQ, ND[b)]
ALP-PT-25.1	WT	9	Not injected	82.2 (11.2)

a) WT 動物と統計学的有意差あり。$p < 0.0001$
b) LOQ、ND、14/25 サンプルの結果は定量下限（LOQ）（2.5 ng/mL）を下回り、11/25 サンプルの結果は ND（未測定）であった。

2.6.2.2.4.3 足部骨の石灰化異常

Akp2$^{-/-}$および WT マウス（出生後 16 日、ALP-PT-04 試験）の後足部骨について検討した。*Akp2*$^{-/-}$マウスに 15 日毎日連続して溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を皮下投与した。骨の異常については、試験 16 日目の最終投与の 24 時間後に X 線により実施した。後足部骨（中足骨および指節骨）については、以下の 4 つの分類基準に従い獣医放射線医が盲検下で評価を実施した：重度、中等度、軽度、または正常（図 2.6.2.2.3.1-1）。15 日間予防的投与後の *Akp2*$^{-/-}$マウスの足部骨の石灰化に対する ALXN1215 の作用を表 2.6.2.2.4.3-1 に示す。

表 2.6.2.2.4.3-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨の石灰化に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用

Study Number	Sample Size (n)	Daily Doses (mg/kg), SC	Classification of Bones of the Hindpaw at Day 16 Number (%) of Animals			
			Abnormal			Normal
			Severe	Moderate	Slight	
ALP-PT-04	18	0	5 (28)	7 (39)	0 (0)	6 (33)
ALP-PT-04	19	8.2	0 (0)	7 (37)	4 (21)	8 (42)[a)]

a) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.03$

溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいて出生後 16 日に著しい骨の石灰化異常が認められた。同腹 WT マウスはすべて正常であった。ALXN1215（8.2 mg/kg）の 15 日間予防的投与により骨石灰化が有意に改善された。溶媒および ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスについて $\chi 2$ 検定で分布を比較したところ統計学的有意差が認められた（$p = 0.03$）。

2.6.2.2.4.4 他の臓器の異常 – 腱付着部の石灰化異常

出生後 17 日の *Akp2*$^{-/-}$および WT マウスの踵骨-アキレス腱付着部および二次骨化中心近傍に MicroCT スキャンを実施した（ALP-PT-22 試験）。*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 16 日間毎日皮下投与した。骨量（BV）の測定値を表 2.6.2.2.4.4-1 に示す。

表 2.6.2.2.4.4-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの踵骨-アキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の骨量に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 16 日間予防的投与の作用

Study Number	Strain	Sample Size (n)	Daily Doses (mg/kg), SC	Bone Volume (mm^3) Mean (SD)
ALP-PT-22	*Akp2*$^{-/-}$	9	0	0.003922 (0.006222)[a)]
ALP-PT-22	*Akp2*$^{-/-}$	26	8.2	0.01966 (0.01453)[a)b)]
ALP-PT-22	WT	3	Not injected	0.08047 (0.01531)

a) WT 動物と統計学的有意差あり。$p < 0.0001$
b) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0037$

同腹の WT マウスとは対照的に、すべての溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスで踵骨-アキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の石灰化の欠損が認められた。溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスの同部位で測定された骨量は WT マウスのわずか 5%であった。ALXN1215 8.2 mg/kg を投与された *Akp2*$^{-/-}$マウスでは、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスに比べ骨量測定値の 5 倍の上昇がみられた。これは WT マウスにおける値よりも相当低い値（4 倍）ではあるが、ALXN1215 予防投与後に *Akp2*$^{-/-}$マウスの腱付着部の骨量が上昇したことは、本剤が *Akp2*$^{-/-}$マウスの踵骨-アキレス腱付着部の石灰化異常に対して有意な作用を有することを示している。

2.6.2.2.4.5 成長

2.6.2.2.4.5.1 体重

Akp2$^{-/-}$および WT マウスの体重を毎日測定し、試験 16 日目の剖検時にも測定を行った（ALP-PT-04 試験）。*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 15 日間毎日皮下投与した。体重曲線および平均体重をそれぞれ図 2.6.2.2.4.5.1-1 および表 2.6.2.2.4.5.1-1 に示す。

図 2.6.2.2.4.5.1-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの体重曲線に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用

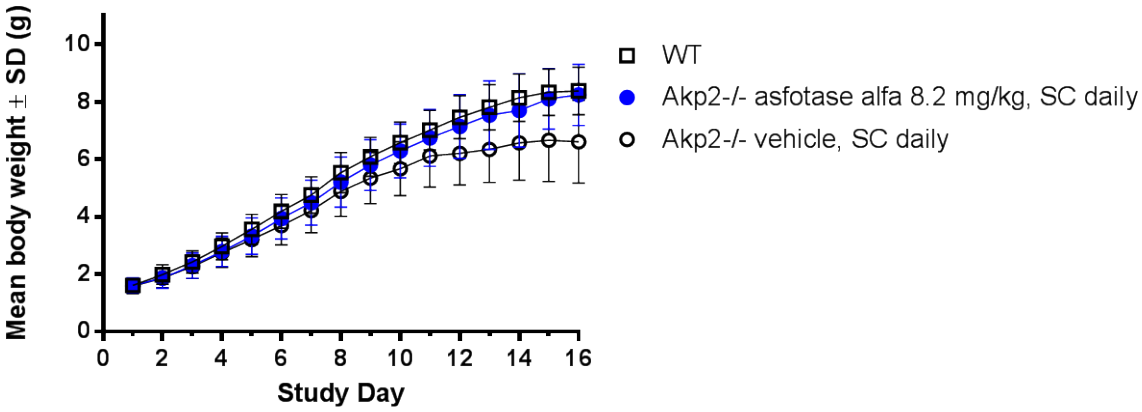


表 2.6.2.2.4.5.1-1 *Akp2*$^{-/-}$ マウスの平均体重に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用

Study Number	Sample Size (n)	Mouse Strain	Daily Doses (mg/kg), SC	Body Weight (g) Mean (SD)			
				day 1	day 6	day 11	day 16
ALP-PT-04	19[a)]	*Akp2*$^{-/-}$	0	1.58 (0.26)	3.69 (0.67)[b)]	5.94 (0.99) [b)]	6.60 (1.44) [b)]
ALP-PT-04	20[c)]	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	1.61 (0.27)	3.94 (0.71)	6.74 (1.00)[d)]	8.23 (1.07)[d)]
ALP-PT-04	18[e)]	WT	Not injected	1.61 (0.21)	4.19 (0.59)	7.01 (0.69)	8.37 (0.83)

a) n = 16（1 日目）、n = 18（11 日目および 16 日目）
b) WT 動物と統計学的有意差あり。6 日目 $p = 0.0217$、11 日目 $p = 0.0028$、16 日目 $p = 0.0006$
c) n = 16（1 日目）、n = 19（16 日目）
d) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。11 日目 $p = 0.0408$、16 日目 $p = 0.0026$
e) n = 16（1 日目）

投与開始時点（1 日目）では、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$群、ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$群および WT 群の体重に著しい差異は認められなかった。6 日目には、WT 群および溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$群の体重に統計学的有意差が認められた（-12%）（$p = 0.0217$）。ALXN1215 8.2 mg/kg は、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスで認められた体重の増加量減少に対して統計学的に有意かつ有益な作用を示した。溶媒投与マウスと ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスとの体重の差は、11 日目に統計学的に有意（$p = 0.0408$）となり、また、16 日目の試験終了時点でも有意差は継続していた（$p = 0.0026$）。ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$群の体重と WT 群の体重との間には、いずれの測定時点においても統計学的有意差は認められなかった。ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与により *Akp2*$^{-/-}$マウス体重の増加抑制が抑えられた。

2.6.2.2.4.5.2 骨長

試験 16 日目の剖検時にデジタルノギスを用いて左脛骨および左大腿骨の骨長を測定した（ALP-PT-04 試験）。*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 15 日間毎日皮下投与した。骨長平均値の結果を表 2.6.2.2.4.5.2-1 に示す。

表 2.6.2.2.4.5.2-1 *Akp2*$^{-/-}$マウス左脛骨および左大腿骨の骨長平均値に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 15 日間予防的投与の作用

Study Number	Sample Size (n)	Mouse Strain	Daily Doses (mg/kg), SC	Bone Length (mm) Mean (SD)	
				Left tibia	Left femur
ALP-PT-04	18[a)]	*Akp2*$^{-/-}$	0	11.71 (1.06)	8.58 (0.77)
ALP-PT-04	19	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	12.59 (0.75)[b)]	9.18 (0.42)[b)]
ALP-PT-04	18[a)]	WT	Not injected	13.06 (0.59)[a)]	9.43 (0.39)[c)]

a) n = 17（左大腿骨）
b) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0135$、左脛骨 $p = 0.0267$、左大腿骨
c) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0006$、左脛骨 $p = 0.0009$、左大腿骨

16 日目には、WT 群および ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$群の左脛骨および左大腿骨の骨長は溶媒投与群よりも統計学的に長いことが示された（WT、それぞれ $p = 0.0006$ および $p = 0.0009$; ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスでそれぞれ $p = 0.0135$ および $p = 0.0267$）。ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$群と WT 群の脛骨または大腿骨の骨長の間には、統計学的有意差は認められなかった。したがって、15 日間の予防投与により、ALXN1215 8.2 mg/kg を投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスでは溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスに比べ有意な骨の成長がみられた。

2.6.2.2.4.6 要約

これらの *Akp2*$^{-/-}$マウスの予防的投与試験から、ALXN1215 は、適切な薬力学マーカーを減少させること、および薬効を有することが示された。以上要約すると、*Akp2*$^{-/-}$マウスに ALXN1215 8.2 mg/kg を 9～16 日間予防的投与することにより、

1) PPi および PLP の血漿内の蓄積が抑制された。
2) 後足部骨の石灰化が促進された。
3) 踵骨-アキレス腱付着部の石灰化異常が部分的に抑制された。
4) 体重増加抑制および骨成長の抑制を抑えた。

2.6.2.2.5 前臨床有効性試験 – *Akp2*$^{-/-}$マウスへの ALXN1215 の予防的投与（23～52 日間投与）

予防的投与による有効性試験から得られた前臨床データ（報告 ALP-PT-03、ALP-PT-05、ALP-PT-06、ALP-PT-08、ALP-PT-09、ALP-PT-11、ALP-PT-12 および ALP-PT-23.2）を本項に記載する。

2.6.2.2.5.1 試験デザイン

Akp2$^{-/-}$マウスの出生時から投与を開始し、試験に応じて 23～52 日間継続投与した。ALXN1215 または溶媒を *Akp2*$^{-/-}$マウスの肩甲骨部に、毎日、3 日ごと、または週に 1 回皮下投与した。試験終了時の有効性の評価項目は、骨の石灰化異常、腱付着部の石灰化異常、成長（体重および、左脛骨ならびに左大腿骨の骨長）、および生存率とした。同齢同腹の未投与 WT マウスを対照群とした。

表 2.6.2.2.5.1-1 試験デザイン

Study Number	**Group**	**Strain**	**Dose (mg/kg)**	**Administration Period (Days)**	**Evaluation Parameters**
ALP-PT-03*	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	52	• Survival • Body weight • Bone length • Bone mineralization o Radiography • Bone formation o calcein labelling • Histology o von Kossa staining o Alizarin Red staining • Biomarkers o PLP, PL, and PPi concentrations in plasma or urine • Immune response o ADA
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	52	
	3	WT	-	NA	
ALP-PT-05	1	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	50 or 52	• Survival • Body weight • Bone mineralization o Radiography
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	50 or 52	
	3	WT	-	NA	
ALP-PT-06	1	*Akp2*$^{-/-}$	4.3	43	• Survival • Bone mineralization o Radiography • Body weight • Biomarkers o Plasma PL o Plasma PLP
	2	*Akp2*$^{-/-}$	15.2	43	
	3	*Akp2*$^{-/-}$	15.2	43	
	4	WT	-	NA	
ALP-PT-08	1	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	43 to 45	• Survival • Bone mineralization o Radiography • Body weight • Bone length • Biomarkers o Plasma PL o Plasma PLP
	2	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	29 to 31	
	3	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	29 to 31	
	4	WT	-	NA	
ALP-PT-09	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	36	• Survival • Bone mineralization
	2	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	36	

	3	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	36	o Radiography • Bone length • Body weight
	4	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	36	
	5	WT	-	NA	
ALP-PT-11	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	44	• Bone mineralization o Radiography • Survival • Bone length • Body weight
	2	*Akp2*$^{-/-}$	0.5	44	
	3	*Akp2*$^{-/-}$	2.0	44	
	4	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	44	
	5	WT	-	NA	
ALP-PT-23.2	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	43	• Survival • Body weight • Bone mineralization o Radiography • Calcaneus-Achilles tendon enthesis histology and micro-CT – right hindlimb
	3	*Akp2*$^{-/-}$	4	43	
	6	*Akp2*$^{-/-}$	4	43	
	7	WT	-	NA	

* ALP-PT-03 試験は、2 段階のクラス分類法（「正常」または「異常」）を使用して評価した。

2.6.2.2.5.2 足部骨の石灰化異常

後足部骨について、ALXN1215 のさまざまな投与量およびさまざまな予防的投与計画を用いた前臨床試験にて検討した（ALP-PT-03 試験、ALP-PT-05 試験、ALP-PT-06 試験、ALP-PT-08 試験、ALP-PT-09 試験および ALP-PT-11 試験）。後足部骨の石灰化異常については、（生存動物に関しては）最終投与 24～48 時間後、または死亡時点において X 線検査にて評価を実施した。後足部骨（中足骨および指節骨）については、以下の 4 つの分類基準に従い獣医放射線医が盲検下で評価を実施した：重度、中等度、軽度、または正常（図 2.6.2.2.3.1-1）。

Akp2$^{-/-}$マウスの ALXN1215 予防的投与後の後足部骨の石灰化に関する盲検下でのすべての評価結果を表 2.6.2.2.5.2-1 に示す。

表 2.6.2.2.5.2-1 *Akp2*$^{-/-}$マウス後足部骨の石灰化に対する ALXN1215 43～52 日間予防的投与の作用

Study Number ALP-PT	Sample Size (n)	Doses (mg/kg) SC	Interval	Duration of Treatment (Days)	Classification of Bones of the Hindpaw at Necropsy[a] Number (%) of Animals			
					Abnormal			Normal
					Severe	Moderate	Slight	
03	0	0	daily	52	NS[b]	NS[b]	NS[b]	NS[b]
08	16	0	Daily[c]	43	8 (50)	6 (37.5)	0 (0.0)	2 (12.5)
09	17	0	Daily[d]	47	10 (58.8)	1 (5.9)	0 (0.0)	6 (35.3)
11	20	0	daily	43	14 (70.0)	1 (5.0)	3 (15.0)	2 (10.0)
11	18	0.5	daily	43	3 (16.7)	4 (22.2)	4 (22.2)	7 (38.9)
11	20	2.0	daily	43	0 (0.0)	3 (15.0)	0 (0.0)	17 (85.0)
06	18	4.3	daily	43	0 (0.0)	2 (11.1)	1 (5.6)	15 (83.3)
03	13	8.2	daily	52	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (100.0)
08	21	8.2	daily	43	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (100.0)
11	19	8.2	daily	43	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (100.0)
05	21	8.2	every 3 days	52	2 (9.5)	4 (19.0)	2 (9.5)	13 (61.9)
06	19	15.2	every 3 days	43	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (100.0)
05	19	8.2	weekly	52	5 (26.3)	7 (36.8)	4 (21.1)	3 (15.8)
06	20	15.2	weekly	43	0 (0.0)	2 (10)	1 (5.0)	17 (85.0)

a) 骨異常については、投与終了 24 又は 48 時間後または死亡時点で評価を行った。
b) NS: 試料なし、ALP-PT-03 試験、溶媒群の X 線画像を得られなかった。
c) マウスに、15 日目より溶媒を毎日投与した。
d) マウスに、12 日目より溶媒を 7 日間投与し、その後溶媒を 7 日間間隔で投与した。

これらの試験において、ALXN1215 はすべての投与量（0.5～15.2 mg/kg）および 43～52 日間のすべての投与期間において、試験条件に応じて様々な程度で *Akp2*$^{-/-}$マウス後足部骨の石灰化を改善した。ALP-PT-06 試験では、表 2.6.2.2.5.2-2 に記載したように、23 日目（試験中間）および 45 日目（投与終了時の 48 時間後）の間に骨石灰化の改善もみられた。本試験では、23 日目に後足部が異常と判定された動物の 50%以上で改善がみられ、試験終了時（45 日目）には正常と分類された。

表 2.6.2.2.5.2-2 *Akp2*$^{-/-}$マウス後足部骨の石灰化に対する ALXN1215 23～43 日間予防的投与の作用

Study Number ALP-PT	**Sample Size (n)**	**Doses (mg/kg) SC**	**Interval**	**Duration of Treatment (days)**	**Classification of Bones of the Hindpaw at Necropsy[a)] Number (%) of Animals**			
					Abnormal			**Normal**
					Severe	**Moderate**	**Slight**	
06	18	4.3	daily	23	0 (0.0)	5 (27.8)	1 (5.6)	12 (66.7)
				43	0 (0.0)	2 (11.1)	1 (5.6)	15 (83.3)
06	19	15.2	every 3 days	23	0 (0.0)	3 (15.8)	1 (5.3)	15 (78.9)
				43	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (100.0)
06	20	15.2	weekly	23	1 (5.0)	7 (35.0)	2 (10.0)	10 (50.0)
				43	0 (0.0)	2 (10)	1 (5.0)	17 (85.0)

a) 骨異常については、投与終了 24 又は 48 時間後または死亡時点で評価を行った。

アルカリホスファターゼ活性／mg ALXN1215（または U/mg）の単位で表される ALXN1215 の酵素比活性は、ロット番号により異なる。このことから、ロット毎の ALXN1215 の投与量（mg/kg）をアルカリホスファターゼ活性単位に標準化することにより、より正確な活性酵素用量を表すことができる。表 2.6.2.2.5.2-3 に示した用量は、各試験で使用したロットの酵素比活性を用いて、アルカリホスファターゼ活性/kg/日（U/kg/day）として標準化したものである。用量を U/kg/day で表することにより、投与量と有効性の関係がよりフィットすることが示された。ALP-PT-12 試験で記載したように、用量反応データのフィッティングには従来の用量反応モデル（E_{max} または S 字状 E_{max}）を用いた。

表 2.6.2.2.5.2-3　標準化した 1 日用量および予防的投与試験で正常な後足部骨 X 線像を示した *Akp2*$^{-/-}$マウスの割合

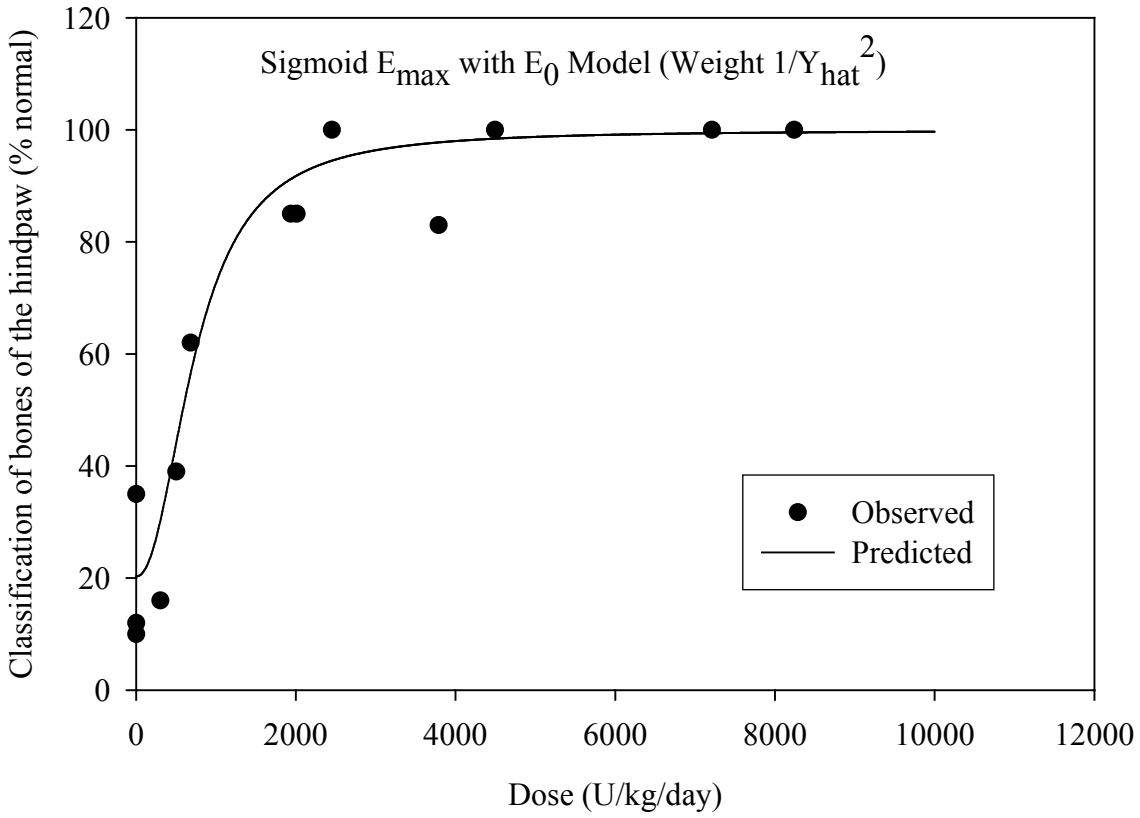
Study No.	Doses (mg/kg) SC & Interval	Normalized Daily Dose (mg/kg/day)	Lot No./Specific Enzymatic Activity (U/mg)	Normalized Daily Dose (U/kg/day)	Bones of the Hindpaw (% of Normal)
ALP-PT-08	0 daily[a)]	0	[redacted] / 879.4	0	12
ALP-PT-09	0 daily[b)]	0	[redacted] / 856.6	0	35
ALP-PT-11	0 daily	0	[redacted] / 1005	0	10
ALP-PT-05	8.2 weekly	1.2	[redacted] / 252.6	303	16
ALP-PT-11	0.5 daily	0.5	[redacted] / 1005	503	39
ALP-PT-05	8.2 every 3 days	2.7	[redacted] / 252.6	682	62
ALP-PT-06	15.2 weekly	2.2	[redacted] / 880.9	1938	85
ALP-PT-11	2.0 daily	2.0	[redacted] / 1005	2010	85
ALP-PT-03	8.2 daily	8.2	[redacted] / 299	2452	100
ALP-PT-06	4.3 daily	4.3	[redacted] / 880.9	3788	83
ALP-PT-06	15.2 every 3 days	5.1	[redacted] / 880.9	4493	100
ALP-PT-08	8.2 daily	8.2	[redacted] / 879.4	7211	100
ALP-PT-11	8.2 daily	8.2	[redacted] / 1005	8241	100

a)　マウスに、15 日目より溶媒を毎日投与した。
b)　マウスに、12 日目より溶媒を 7 日間毎日投与し、その後溶媒を 7 日間間隔で投与した。

図 2.6.2.2.5.2-1　（$r^2 = 0.94$）に示した標準化データによると、ALXN1215 による骨石灰化の改善は 303 U/kg/日～2000 U/kg/日の間で用量依存的であった。

E_{max} の 50%の効果をもたらす投与量（ED_{50}）は 743 U/kg/日であったが、2,000 U/kg/日以上の投与では作用の増加はほとんど認められなかった。この用量反応関係によって、ALXN1215 の薬理活性と処置 *Akp2*$^{-/-}$マウスの石灰化異常改善作用との関係性が支持された。

図 2.6.2.2.5.2-1　43～52 日間予防的投与における *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨石灰化の改善に関する ALXN1215 の用量反応性



2.6.2.2.5.3　他の臓器の異常 – 腱付着部の石灰化異常

出生後 44 日の *Akp2*$^{-/-}$および WT マウスの踵骨-アキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の MicroCT スキャンを実施した（ALP-PT-23.2 試験）。*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 4 mg/kg を 43 日間毎日皮下投与した。骨量（BV）の測定値を表 2.6.2.2.5.3-1 に示す。

表 2.6.2.2.5.3-1　*Akp2*$^{-/-}$マウスのアキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の骨量に対する ALXN1215 8.2 mg/kg の 43 日間予防的投与の作用

Study Number	**Strain**	**Sample Size (n)**	**Daily Doses (mg/kg), SC**	**Bone Volume (mm^3)** Mean (SD)
ALP-PT-23.2	*Akp2*$^{-/-}$	20	0	0.005445 (0.01718)[a)]
ALP-PT-23.2	*Akp2*$^{-/-}$	20	4.0[b)]	0.05059 (0.02622)[a)c)]
ALP-PT-23.2	WT	10	Not injected	0.1778 (0.02914)

a) WT 動物と統計学的有意差あり。$p < 0.0001$
b) ALP-PT-23.2 試験では ALXN1215 の 2 ロットについて検討した。ロット [redacted] の結果を示す。
c) 0 mg/kg と統計的有意差あり。$p < 0.0001$

同腹の WT マウスとは対照的に、すべての溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいて踵骨-アキレス腱付着部および二次骨化中心近傍の石灰化の欠損がみられた。*Akp2*$^{-/-}$マウスの同部位で測定された骨量は WT マウスのわずか 3%であった。ALXN1215 を投与された *Akp2*$^{-/-}$マウスの骨量値は WT マウスの 28%であり、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスに比べ石灰化は約 9 倍増加した。ALXN1215 予防的投与後の *Akp2*$^{-/-}$マウスの骨量増加は、WT マウスよりもかなり低値ではあるものの、踵骨-アキレス腱付着部の石灰化が有意に改善されることを示している。

2.6.2.2.5.4 成長

2.6.2.2.5.4.1 体重

ALP-PT-11 試験において、*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒あるいは 0.5、2.0、8.2 mg/kg の ALXN1215 を 43 日間毎日皮下投与した。*Akp2*$^{-/-}$および WT マウスの体重は毎日測定した。ALP-PT-11 試験の体重曲線および平均体重を表 2.6.2.2.5.4.1-1 および図 2.6.2.2.5.4.1-1 に示す。

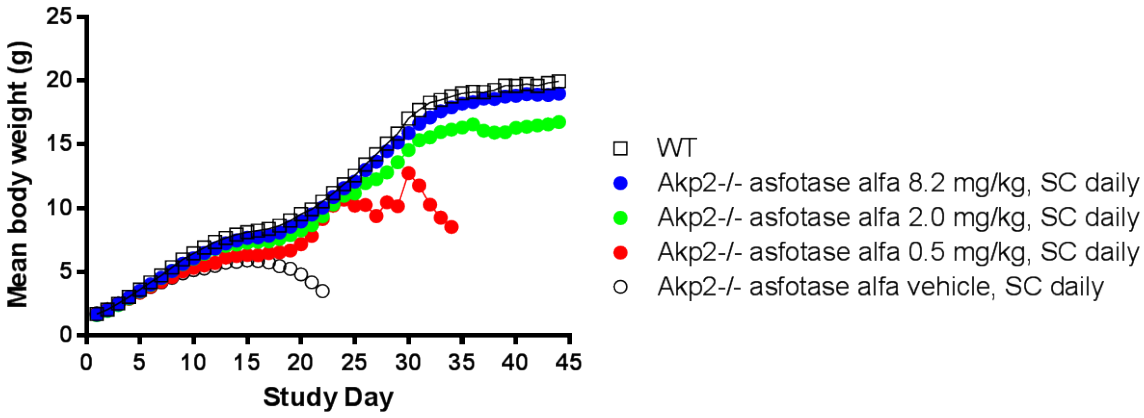
投与開始時（1 日目）は *Akp2*$^{-/-}$と WT マウスの間の体重に差異は認められなかった。7 日目以降溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスの平均体重は WT マウスの平均体重よりも統計学的に有意に低かった。ALXN1215 8.2 mg/kg 投与群の *Akp2*$^{-/-}$マウスの平均体重は、いずれの測定時点でも WT マウスの平均体重と同程度であった。これら 2 群間で体重に関して統計学的有意差は認められなかった。ALXN1215 0.5 および 2.0 mg/kg 投与群においても、それぞれ 8 日目と 18 日目以降で、（投与量 8.2 mg/kg での程度には及ばなかったものの）体重増加量抑制に関して統計学的に有意な作用が認められた（図 2.6.2.2.5.4.1-1）。これらのデータから、体重の正常化と、*Akp2*$^{-/-}$マウスに 43 日間予防投与された投与量 0.5～8.2 mg/kg の ALXN1215 の用量との間の用量反応関係性が示された。

表 2.6.2.2.5.4.1-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの平均体重に対する ALXN1215 43 日間予防的投与の作用

Study Number	**Sample Size (n)**	**Mouse Strain**	**Daily Doses (mg/kg), SC**	**Body Weight (g) Mean (SD)**			
				day 1	day 7	day 8	day 18
ALP-PT-11	21[a)]	*Akp2*$^{-/-}$	0	1.73 (0.29)	4.16 (0.91)[b)]	4.53 (1.09)[b)]	5.46 (1.84)[b)]
ALP-PT-11	18[c)]	*Akp2*$^{-/-}$	0.5	1.67 (0.27)	4.22 (0.63)	4.60 (0.68)	6.53 (2.03)[d)]
ALP-PT-11	20	*Akp2*$^{-/-}$	2.0	1.60 (0.22)	4.52 (0.65)	5.07 (0.69)[e)]	7.59 (1.39)[e)]
ALP-PT-11	19	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	1.65 (0.24)	4.52 (0.68)	5.07 (0.84)[f)]	8.09 (1.36)[f)]
ALP-PT-11	33	WT	Not injected	1.67 (0.26)	4.73 (0.76)	5.34 (0.84)	8.64 (1.58)

a) n = 15（18 日目）
b) WT 動物と統計学的有意差あり。$p = 0.0068$（7 日目）、$p = 0.0008$（8 日目）、$p < 0.0001$（18 日目）
c) n = 16（18 日目）
d) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0375$
e) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0446$（8 日目）$p = 0.0002$（18 日目）
f) 0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0471$（8 日目）$p < 0.0001$（18 日目）

図 2.6.2.2.5.4.1-1　Akp2$^{-/-}$マウスの体重曲線に対する ALXN1215 43 日間予防的投与の作用



2.6.2.2.5.4.2　骨長

出生後から ALXN1215 8.2 mg/kg/日を投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスについて、44 日目の剖検時（ALP-PT-08 試験および ALP-PT-11 試験）、および、55 日目の剖検時（ALP-PT-03 試験）にデジタルノギスを用いて左脛骨および左大腿骨の骨長を測定した。ALP-PT-08 試験では、ALXN1215 処置 *Akp2*$^{-/-}$マウスの脛骨または大腿骨の骨長は、WT マウスに対して統計学的有意差を示さなかった。ALP-PT-03 試験および ALP-PT-11 試験では、ALXN1215 処置 *Akp2*$^{-/-}$マウスの頸骨および大腿骨の平均骨長は、WT マウスよりも 5%～6%短かった。これら骨長の差は統計学的に有意であったが、差異は比較的小さく、後足部骨の X 線異常像との関連性は認められなかった。

これら予防投与試験の終了時点では、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスは成熟前に死亡したため同齢で溶媒投与動物と骨長を比較できなかった。したがって、これらの試験で骨長に対する ALXN1215 投与による絶対効果を十分に検討することはできなかった。ただし、16 日齢の *Akp2*$^{-/-}$群の骨長は同齢の WT 対照群よりも約 10%短かったことから（ALP-PT-04 試験、表 2.6.2.2.4.5.2-1）、*Akp2*$^{-/-}$マウスに ALXN1215 8.2 mg/kg/日（試験した最高用量）を 43～52 日間投与することにより、*Akp2*$^{-/-}$マウスでみられる骨伸長抑制は少なくとも部分的に抑えられることが示唆される。

2.6.2.2.5.5　生存率

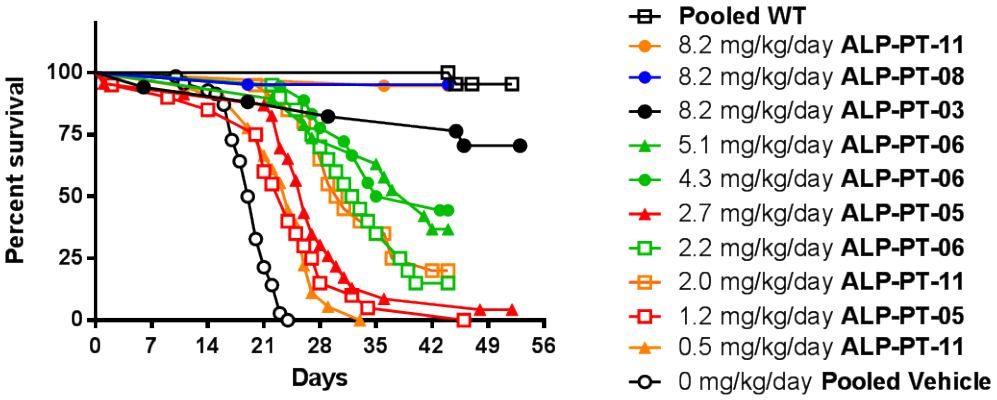
溶媒、または、試験に応じてさまざまな投与量の ALXN1215 を 43～52 日間投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存率について検討した。溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$-マウスの生存率は全試験で一貫しており、ALP-PT-03 試験では生存期間中央値が 18 日、ALP-PT-08 試験では 20 日、ALP-PT-09 試験では 20 日、および ALP-PT-11 試験では 19 日であった（表 2.6.2.2.5.5-1）。それ故、すべての溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$動物の生存率データをすべての予防投与試験でプールして用いた（図 2.6.2.2.5.5-1）。データ統合後の溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存期間中央値は 19.5 日であった。*Akp2*$^{-/-}$マウスに ALXN1215 を投与することにより、すべての投与量において有意な生存率の改善がみられた。

表 2.6.2.2.5.5-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存期間中央値に対する ALXN1215 予防的投与の作用

Study Number	Sample Size (n)	Doses (mg/kg) SC	Interval	Normalized Daily Dose (mg/kg/day)	Median Survival Time (days)[a)]
Pooled vehicle[b)]	70	0[e)]	daily	0	19.5
ALP-PT-11	18	0.5	daily	0.5	24[c)]
ALP-PT-05	20	8.2	weekly	1.2	24[d)]
ALP-PT-11	20	2.0	daily	2.0	30.5[c)]
ALP-PT-06	20	15.2	weekly	2.2	32.5[c)]
ALP-PT-05	23	8.2	every 3 days	2.7	26[c)]
ALP-PT-06	18	4.3	daily	4.3	39[c)]
ALP-PT-06	19	15.2	every 3 days	5.1	41[c)]
ALP-PT-03	17	8.2	daily	8.2	≥ 52[c)]
ALP-PT-08	21	8.2	daily	8.2	≥ 43[c)]
ALP-PT-11	19	8.2	daily	8.2	≥ 43[c)]

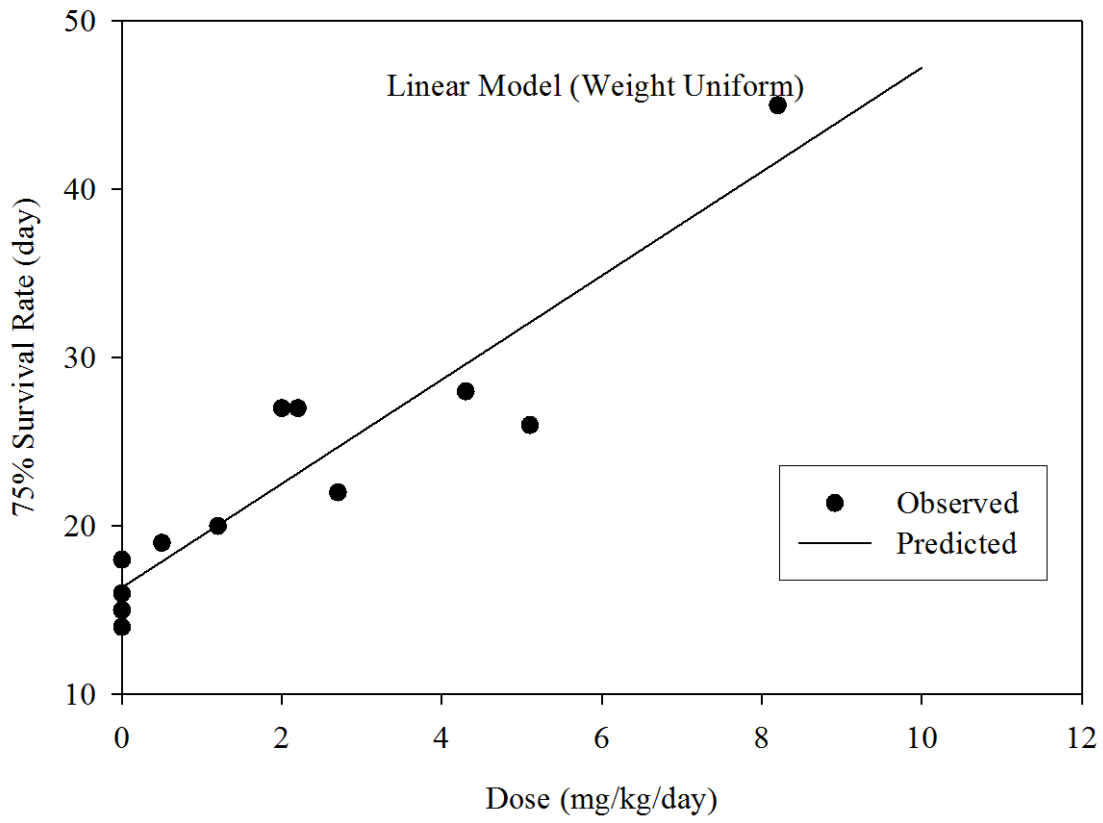
a) 生存期間中央値は動物の 50%が死亡するまであるいは最終投与を迎えるまで評価した
b) ALP-PT-03 試験、ALP-PT-08 試験、ALP-PT-09 試験および ALP-PT-11 試験の溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存率データをプールした
c) プールした溶媒群データに統計学的有意差が認められた $p < 0.0001$
d) プールした溶媒群データに統計学的有意差が認められた $p = 0.0006$
e) ALP-PT-08 試験では、マウスに 15 日目より溶媒を毎日投与した。ALP-PT-09 試験では、マウスに 12 日目より溶媒を 7 日間毎日投与し、その後溶媒を 7 日間間隔で投与した。

図 2.6.2.2.5.5-1 *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存曲線に対する ALXN1215 予防的投与の作用



ALXN1215 の投与量と生存率の関係性についてより十分に検討するため、用量反応分析において最大限のデータが使用可能な 75%生存率を有効性評価項目として選択した（ALP-PT-12 試験）。図 2.6.2.2.5.5-2 示したように（$r^2 = 0.89$）、ALXN1215 の標準化 1 日量（0.5～8.2 mg/kg/日）と生存率の間に明らかな用量反応関係性がみられた。

図 2.6.2.2.5.5-2　予防的投与試験での *Akp2*$^{-/-}$マウスの 75%生存率における ALXN1215 の用量反応関係性



2.6.2.2.5.6　要約

これらの *Akp2*$^{-/-}$マウスの予防的投与試験から、ALXN1215 が薬効を有することが示された。要約すると、*Akp2*$^{-/-}$マウスに対しさまざまな用量の ALXN1215 を 43～52 日間予防投与することにより：

1) 後足部骨の石灰化が促進された。
2) 踵骨-アキレス腱付着部の石灰化異常が部分的に抑制された。
3) 体重増加抑制および骨成長の抑制が抑えられた。
4) 生存率が改善された。

2.6.2.2.6　前臨床有効性試験 – *Akp2*$^{-/-}$マウスの予防的投与の中止による ALXN1215 の作用持続時間の評価

ALP-PT-25.2 有効性試験における前臨床データ（報告 ALP-PT-25.2：*Akp2*$^{-/-}$マウスへの ALXN1215 予防投与、投与中止後の薬理学的活性の期間）について本項に記載する。

2.6.2.2.6.1　試験デザイン

食餌にピリドキシンを補充しない条件下、ALXN1215 8.2 mg/kg を *Akp2*$^{-/-}$マウスの肩甲骨部に毎日皮下投与した。投与は出生時から開始して 35 日間継続した。36 日目に投与中止した後、動物が死亡するまで経過観察を行った。投与開始から死亡時までの有効性の評価項目は成長（体重）および生存率とした。死亡時に骨の石灰化異常について評価を行った。同齢の非処置 WT マウスを対照群とした。

表 2.6.2.2.6.1-1 試験デザイン

Study Number	Group	Strain	Dose (mg/kg)	Administration Period (Days)	Evaluation Parameters
ALP-PT-25.2	4	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	35	• Survival • Body weight • Bone mineralization o Radiography
	3	WT	-	NA	

2.6.2.2.6.2 後足部骨の石灰化異常

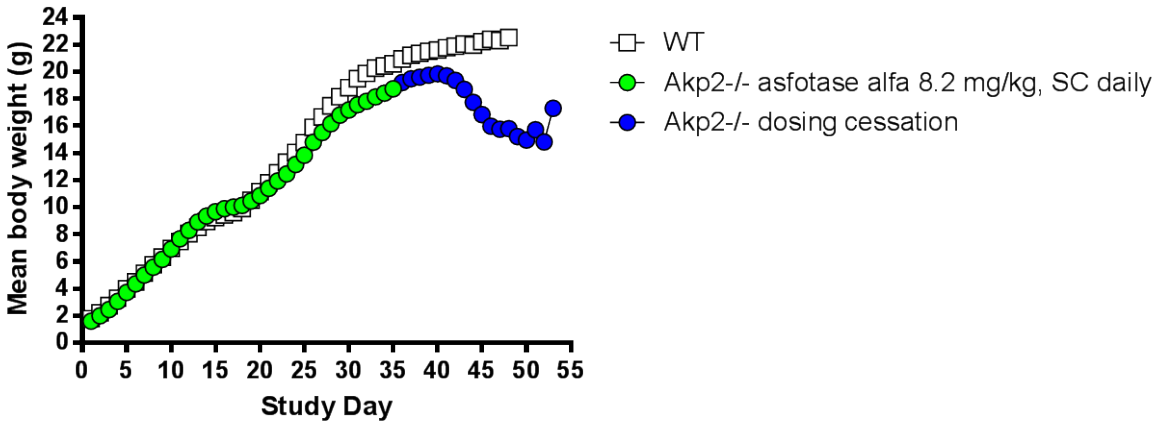
後足部の石灰化異常は、投与中止後の死亡時に X 線写真により評価した。石灰化異常は、2.6.2.2.3.1 項に記述されている重症度スケールにしたがって正常、軽度、中等度および重度に分類された。すべての *Akp2*$^{-/-}$マウスは 53 日目までに死亡した（投与中止から 18 日後）。出生時から 35 日目まで ALXN1215 8.2 mg/kg を投与されたすべての動物について、死亡時点での後足部骨石灰化のスコアは正常であった。

2.6.2.2.6.3 成長

2.6.2.2.6.3.1 体重

Akp2$^{-/-}$および WT マウスの体重を毎日測定した。体重曲線を図 2.6.2.2.6.3.1-1 に示す。投与中止の 7 日後から、すべての *Akp2*$^{-/-}$マウスで平均体重が減少し始め、臨床症状（活動低下、脱水、猫背様姿勢、およびてんかん発作）は悪化した。

図 2.6.2.2.6.3.1-1 出生後から 35 日間 ALXN1215 を投与し、その後 36 日目から投与を中止した *Akp2*$^{-/-}$マウスの体重曲線



2.6.2.2.6.4 生存率

投与中止（36 日目）から 18 日以内にすべての *Akp2*$^{-/-}$マウスが死亡した。投与中止後の生存期間中央値は 14 日であった。

2.6.2.2.6.5 要約

出生時から 35 日間 ALXN1215 8.2 mg/kg を *Akp2*$^{-/-}$に毎日投与した後に投与を中止することにより：

1) 死亡時点における後足部骨の石灰化異常に対しては影響が認められなかった。つまり、35 日間の ALXN1215 投与により改善し正常化した足部骨石灰化の悪化はみられなかった。
2) ALXN1215 の体重増加に対する効果は減少した。
3) ALXN1215 の生存率に対する効果は減少した。

これらのデータから、ALXN1215 投与中止により *Akp2*$^{-/-}$マウスの成長および生存率に有害な影響を与えることが示され、効果維持には ALXN1215 の継続投与を要することが示唆された。

2.6.2.2.7 前臨床有効性試験 - *Akp2*$^{-/-}$マウスに対する ALXN1215 治療的投与

有効性２試験における前臨床データを本項に記載する（報告 ALP-PT-08 および ALP-PT-09）。

2.6.2.2.7.1 試験デザイン

有意な石灰化異常が認められる出生後 12～15 日時点から ALXN1215 の投与を開始した。ALXN1215 または溶媒を *Akp2*$^{-/-}$マウスにさまざまな用量で皮下投与した。ALP-PT-08 試験では、*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 15 日目から 43 日目まで毎日投与した。ALP-PT-09 試験では、*Akp2*$^{-/-}$マウスに溶媒または ALXN1215 8.2 mg/kg を 12 日目から 46 日目まで毎日投与し（それぞれ第 1 群および第 2 群）、第 3 群および第 4 群においては、ALXN1215 8.2 mg/kg を 12 日目から 18 日目まで毎日投与した後、ALXN1215 24.6 mg/kg を 46 日目まで 3 日おきに投与（第 3 群）するか ALXN1215 57.4 mg/kg を 46 日目まで 1 週間おきに投与した（第 4 群）。投与期間中または投与終了時の有効性の評価項目は、骨の石灰化異常、成長（体重）および生存率とした。同齢同腹の未投与 WT マウスを対照群とした。

表 2.6.2.2.7.1-1 試験デザイン

Study Number	**Group**	**Strain**	**Dose (mg/kg)**	**Administration Period (Days)**	**Evaluation Parameters**
ALP-PT-08	1	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	43 to 45	• Survival • Bone mineralization o Radiography • Body weight • Bone length • Biomarkers o Plasma PL o Plasma PLP
	2	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	29 to 31	
	3	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	29 to 31	
	4	WT	-	NA	
ALP-PT-09	1	*Akp2*$^{-/-}$	Vehicle	36	• Survival • Bone mineralization o Radiography • Bone length

					• Body weight

2.6.2.2.7.2 足部骨の石灰化異常

骨異常については、最終投与の 24 時間後または死亡時の X 線画像を用いて評価した。後足部骨（中足骨および指節骨）については、以下の 4 つの分類基準に従い獣医放射線医が盲検下で評価を実施した：重度、中等度、軽度、または正常（図 2.6.2.2.3.1-1）。

ALXN1215 28～36 日間治療的投与後の後足部骨の石灰化異常のスコア結果を表 2.6.2.2.7.2-1 および表 2.6.2.2.7.2-2 に示す。

表 2.6.2.2.7.2-1 出生後 15 日目に投与を開始した Akp2$^{-/-}$マウスの後足部骨石灰化に対する ALXN1215 の治療的投与の作用

Study No	**Sample Size (n)**	**Doses (mg/kg) SC & Interval**	**Classification of Bones of the Hindpaw at Necropsy[a)] Number (%) of Animals**			
			Abnormal			**Normal**
		day 15 to day 43	Severe	Moderate	Slight	
ALP-PT-08	16	0 daily	8 (50.0)	6 (37.5)	0 (0.0)	2 (12.5)
ALP-PT-08	17	8.2 daily	9 (52.9)	0 (0.0)	1 (5.9)	7 (41.2)[b)]

a) 骨異常については投与終了 24 時間後または死亡時点で評価を行った
b) 0 mg/kg とは統計学的有意差はなかった。$p = 0.0645$

出生後 15 日目に ALXN1215 8.2 mg/kg の投与を開始し、29～31 日間毎日投与を受けた *Akp2*$^{-/-}$マウスの 41.2%で、正常な後足部石灰化を示した（ALP-PT-08 試験）。このように改善は認められたものの、溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$群（12.5%）で正常とされた動物の割合と比較すると、統計学的有意差には至らなかった（$\chi 2$；$p = 0.0645$）。

表 2.6.2.2.7.2-2 出生後 12 日目に投与を開始した *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨石灰化に対する ALXN1215 の治療的投与の作用

Study No	Sample Size (n)	Doses (mg/kg) SC & Interval		Classification of Bones of the Hindpaw at Necropsy[a] Number (%) of Animals			
				Abnormal			Normal
		day 12 to day 18	day 19 to day 46/47	Severe	Moderate	Slight	
ALP-PT-09	17	0 daily	0 weekly	10 (58.8)	1 (5.9)	0 (0.0)	6 (35.3)
ALP-PT-09	19	8.2 daily	8.2 daily	6 (31.6)	1 (5.3)	0 (0.0)	12 (63.2)[b]
ALP-PT-09	20	8.2 daily	24.6 every 3 days	9 (45.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	10 (50.0)
ALP-PT-09	18	8.2 daily	57.4 weekly	10 (55.6)	1 (5.6)	0 (0.0)	7 (38.9)

a) 骨異常については、投与終了 24 時間後または死亡時点で評価を行った
b) 0 mg/kg とは統計学的に有意差はなかった。$p = 0.0951$

ALP-PT-09 試験では、ALXN1215 による石灰化の改善は投与計画に依存しているようであり、ALXN1215 8.2 mg/kg を 12 日目から 46 日目まで毎日投与した群において最良の結果が得られた（溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$群で正常と判定された 35.3%と比較すると、63.2%の動物で正常と判定された）。ただし、この改善は統計学的有意差には至らなかった（$\chi 2$；$p = 0.0951$）。

これらの結果から、ALXN1215 の治療投与によって *Akp2*$^{-/-}$マウスの後足部骨の石灰化が促進されることが示唆された。

2.6.2.2.7.3 成長

2.6.2.2.7.3.1 体重

Akp2$^{-/-}$および WT マウスの体重を毎日測定した。ALP-PT-08 試験の平均体重データおよび体重曲線を**表** 2.6.2.2.7.3.1-1 および図 2.6.2.2.7.3.1-1 に示す。

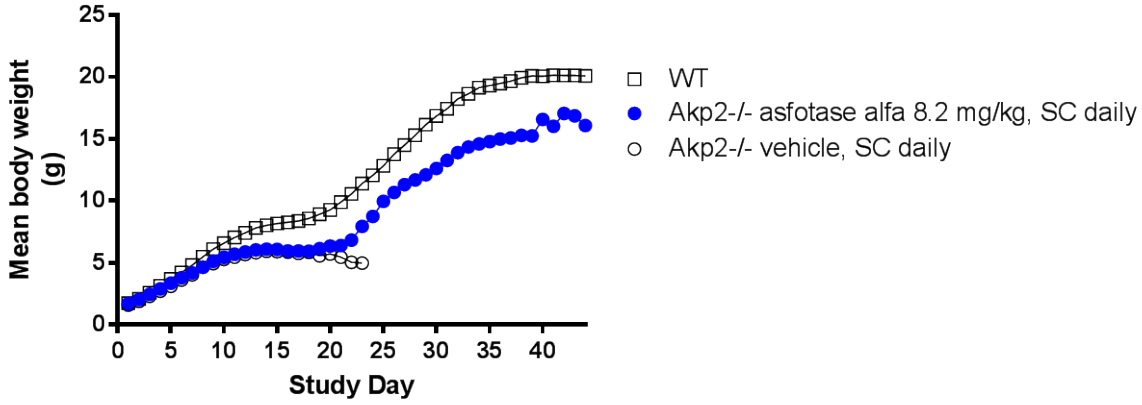
出生時（1 日目）には、WT マウス体重と ALXN1215 または溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスの体重との間に統計学的有意差は認められなかった。15 日目、すなわち投与開始直前には、*Akp2*$^{-/-}$マウスでは既に有意な体重の増加減少が認められた。溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスは死亡時点まで体重は減少を続けた（18～24 日目）。しかしながら、ALXN1215 8.2 mg/kg を毎日投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスでは投与開始 4～5 日後から体重が増加し始め、WT マウスの体重増加と同等の割合で試験終了時まで継続して体重が増加した。このように ALXN1215 により正常な成長速度に回復したが、試験終了時（44 日目）の ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスの体重は WT 群の動物よりも平均して 20%低かった。ALP-PT-09 試験において、出生後 12 日目から ALXN1215 8.2 mg/kg を毎日投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスでも同様の所見が認められた。

表 2.6.2.2.7.3.1-1　出生後 15 日目から投与を開始する Akp2$^{-/-}$マウスの平均体重

Study Number	Sample Size (n)	Mouse Strain	Daily Doses (mg/kg), SC	Body Weight (g) Mean (SD)	
				day 1	day 15
ALP-PT-08	16	*Akp2*$^{-/-}$	0	1.60 (0.15)	5.90 (1.14)[a)]
ALP-PT-08	17	*Akp2*$^{-/-}$	8.2	1.71 (0.31)	6.09 (1.40)[b)]
ALP-PT-08	30	WT	Not injected	1.73 (0.32)	8.18 (1.30)

a) WT 動物と統計学的有意差あり。$p < 0.0001$
b) WT 動物と統計学的有意差あり。$p = 0.0001$

図 2.6.2.2.7.3.1-1　出生後 15 日目から ALXN1215 を治療的投与した Akp2$^{-/-}$マウスの体重曲線



2.6.2.2.7.3.2　骨長

治療的投与試験終了時点（44～48 日目）では、同齢の溶媒投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスは成熟前に死亡したため骨長の比較分析はできなかった。したがって、これらの試験から ALXN1215 投与による骨長への潜在的効果を評価することはできなかった。

2.6.2.2.7.4　生存率

ALXN1215 の治療的投与により *Akp2*$^{-/-}$モデルマウスの生存率が有意に改善された。投与したすべての動物に 1 日当たりの換算で同量の ALXN1215（8.2 mg/kg/日）を投与したが、投与間隔が短くなるにつれて生存率がより向上する傾向が認められた。すべての治療投与試験の生存期間中央値および生存曲線をそれぞれ表 2.6.2.2.7.4-1、表 2.6.2.2.7.4-2 および図 2.6.2.2.7.4-1　に示す。

表 2.6.2.2.7.4-1　出生後 15 日目から投与を開始した *Akp2*$^{-/-}$マウスの生存率中央値に対する ALXN1215 治療的投与の作用

Study No	**Sample Size (n)**	**Doses (mg/kg) SC & Interval** day 15 to day 43	**Median Survival Time (days)**
ALP-PT-08	16	0 daily	20
ALP-PT-08	17	8.2 daily	39[a)]

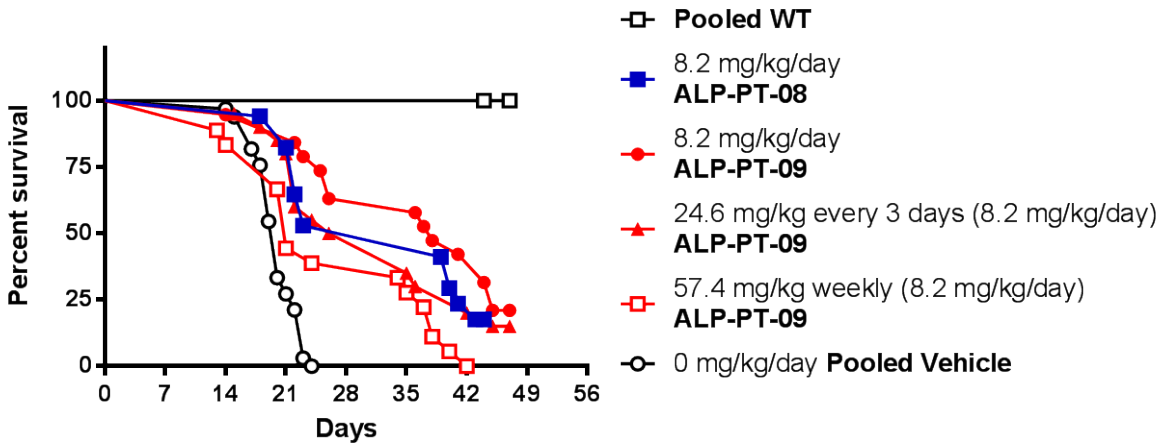
a)　0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0002$

表 2.6.2.2.7.4-2　出生後 12 日目から投与を開始した Akp2$^{-/-}$マウスの生存率中央値に対する ALXN1215 治療的投与の作用

Study No	**Sample Size (n)**	**Doses (mg/kg) SC & Interval**		**Median Survival Time (days)**
		day 12 to day 18	day 19 to day 46/47	
ALP-PT-09	17	0 daily	0 weekly	20
ALP-PT-09	19	8.2 daily	8.2 daily	38[a)]
ALP-PT-09	20	8.2 daily	24.6 every 3 days	30.5[a)]
ALP-PT-09	18	8.2 daily	57.4 weekly	21[b)]

a)　0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p < 0.0001$
b)　0 mg/kg と統計学的有意差あり。$p = 0.0054$

図 2.6.2.2.7.4-1　治療投与試験における ALXN1215 の *Akp2*$^{-/-}$マウス生存曲線に対する作用



2.6.2.2.7.5　要約

12 または 15 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスに対し ALXN1215 8.2 mg/kg/日の治療的投与により：

1)　後足部骨の石灰化が促進された。
2)　体重の増加抑制が減少した。
3)　生存率が改善された。

治療投与試験におけるこれらの作用は、予防投与試験で観察された作用と一貫していた。

2.6.2.3 副次的薬理試験

本試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ラットの中枢神経系（CNS）および呼吸機能に対する ALXN1215 の潜在的影響を評価するため安全性薬理試験を実施した。心血管系（CV）の安全性試験は霊長類の 6 ヶ月の反復投与毒性試験（670388 試験、2.6.6 項参照）の一部として実施した。これらの試験報告書では ALXN1215 を ENB-0040 または sALP-FcD10 と記載している。

表 2.6.2.4-1 安全性薬理プログラム

Study Type and Number	**GLP status**	**Route of Administration**	**Species**
Serum calcium and phosphorus ALP-PT-10	No	SC	Mouse
Acute injection reaction PK2008021951	No	IV bolus; IV infusion; SC	Rat
Central nervous system 1007-2491	Yes	IV	Rat
Respiratory function 1007-2501	Yes	IV	Rat
Cardiovascular system[a)] 670388	Yes	SC	Monkey

a) 6 ヶ月毒性試験の一部として実施した。

2.6.2.4.1 *In Vitro* の安全性薬理試験

本試験は実施していない。本タンパク質（分子量 161 キロダルトン[kDa]）はヒト Ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルに入るには大きすぎるため、本試験から有意義なデータは得られないと考えられたため実施しなかった。

2.6.2.4.2 *In Vivo* の安全性薬理試験

2.6.2.4.2.1 血清カルシウムおよびリン（報告 ALP-PT-10： *Akp2*$^{-/-}$マウスの短期試験における血清カルシウムおよびリンに対する ALXN1215 投与の検討）

前臨床試験から、ALXN1215 投与 *Akp2*$^{-/-}$マウスにおいて骨石灰化は改善したが、持続性の痙攣発作が発現したことが示されている。低カルシウム血症は痙攣発作の原因となることがある。HPP 患者で骨が石灰化されることにより一過性の低カルシウム血症および低リン酸血症（「飢餓骨」症状）が誘発される可能性が懸念される [5)6)]。*Akp2*$^{-/-}$動物モデルのカルシウムおよびリンの血漿中濃度に対する ALXN1215 投与の影響をモニターするため、非 GLP 試験（ALP-PT-10 試験）をデザインした。低カルシウム血症（または低リン酸血症）が誘導される可能性を最大化するため、過

剰な非石灰化マトリックスを有する 12 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスを使用した。ALXN1215 8.2 mg/kg を 12 日目から単回または 4 日間、肩甲骨部に皮下投与した。本試験の結果概要を表 2.6.3.4 に示す。

本試験は以下の 4 つの群からなる。

- 第 1 群（対照群）：*Akp2*$^{-/-}$マウス 19 頭
- 第 2 群（Tx1）：*Akp2*$^{-/-}$マウス 19 頭に 8.2 mg/kg の ALXN1215 を単回投与した。
- 第 3 群（Tx4）：*Akp2*$^{-/-}$マウス 20 頭に ALXN1215 8.2 mg/kg を毎日 4 日間投与した。
- 第 4 群（WT）：*Akp2*$^{+/+}$マウス 17 頭

評価項目として、投与後 4 時間時点での血清中総カルシウム濃度およびリン濃度を測定した。

12 日齢時点で、対照群の *Akp2*$^{-/-}$マウスの血清カルシウム濃度（平均 11.33 ± 1.77 mg/dL）は、WT 動物のカルシウム濃度（平均 10.64 ± 0.82 mg/dL）と比較して統計学的有意差は認められなかった。*Akp2*$^{-/-}$マウスに投与量 8.2 mg/kg の ALXN1215 を単回投与（Tx1）または ALXN1215 を 4 日間投与（Tx4）したところ、血清カルシウム濃度（それぞれ 11.32 ± 1.00 mg/dL および 11.33 ± 1.53 mg/dL）は対照群の *Akp2*$^{-/-}$マウスの濃度との間に有意な差異は認められなかった。Tx1 群および Tx4 群の *Akp2*$^{-/-}$マウスの平均カルシウム濃度は WT 動物よりも僅かに高値（6%）を示した。単回投与では統計学的に有意であったが（$p = 0.0498$）、反復投与では有意差異は認められなかった（$p = 0.3540$）。12 日齢時点で、対照群の *Akp2*$^{-/-}$マウスの血清リン濃度（平均 10.61 ± 1.46 mg/dL）は WT 動物の血清リン濃度（平均 11.18 ± 1.15 mg/dL）と比較して統計学的有意差は認められなかった。*Akp2*$^{-/-}$マウスに投与量 8.2 mg/kg の ALXN1215 を単回投与（Tx1）または ALXN1215 を 4 日間投与（Tx4）したところ、血清リン濃度（それぞれ 12.42 ± 3.40 mg/dL および 12.13 ± 3.79 mg/dL）は対照群の *Akp2*$^{-/-}$マウスの濃度との間に有意な差異は認められなかった。ALXN1215 の投与により血清リン濃度は事実上対照群の *Akp2*$^{-/-}$マウスよりも Tx1 群の *Akp2*$^{-/-}$マウスで 17%、Tx4 群では 13%上昇した。単回投与では統計学的に有意であったが（$p = 0.0208$）、反復投与では有意差は認められなかった（$p = 0.1928$）。

結論として、ALXN1215 8.2 mg/kg を 12 日目から開始して 1 日または 4 日間投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスの血清総カルシウム濃度または血清総リン濃度に意味のある影響は認められなかった。同様に、1 日目から ALXN1215 投与を開始した短期（ALP-PT-04）試験および長期（ALP-PT-03）試験の両方で、血清カルシウム値またはリン値の異常は認められなかった。したがって、ALXN1215 投与により *Akp2*$^{-/-}$モデルマウスで低カルシウム血症または低リン酸血症が誘導されないことが示された。

2.6.2.4.2.2 急性注射反応（報告 PK2008021951：雄の幼若 Sprague-Dawley ラットにおける急性反応の特徴）

ラットへの ALXN1215 静脈内投与の際、投与直後にいくつかの急性注射反応が認められた。反応は一過性で、主に、起毛、顔面または肢の腫脹および活動性低下であった。本非 GLP 試験の目的は、ALXN1215 の静脈内投与後に認められた有害事象を減少させるための異なるアプローチについて検討すること、また、急性注射反応における炎症、ヒスタミン、補体またはトリプターゼの関与について同定することである。検討したアプローチとしては、静脈内投与を種々の速度で行うこと、また、前投薬としてジフェンヒドラミンまたはデキサメタゾン（Dexa）を皮下投与することである。本試験の結果概要を表 2.6.3.4 に示す。

本試験は 2 セッション実施し、1 セッション目は 9 群で、2 セッション目では 8 群で実施した。これらの群を表 2.6.2.4.2.2-1 に掲載する。

表 2.6.2.4.2.2-1 試験デザイン – PK2008021951 試験

Session Number	Group Number	Sample Size (n)	Dose (mg/kg)	Regimen	ROA	Pre-treatment
1	1	6	0	bolus	IV	no
	2	6	0	bolus	IV	DP[a)] 10 mg/kg SC
	3	6	90	bolus	IV	no
	4	6	90	bolus	IV	DP 10 mg/kg SC
	5	6	0	15-minute infusion	IV	no
	6	6	90	15-minute infusion	IV	no
	7	6	90	30-minute infusion	IV	no
	8	6	0	bolus	SC	no
	9	6	180	bolus	SC	no
2	10	5	0	bolus	IV	DP 20 mg/kg SC
	11	5	90	bolus	IV	no
	12	5	90	bolus	IV	DP 20 mg/kg SC
	13	5	90	bolus	IV	DP 20 mg/kg IP
	14	5	0	15-minute infusion	IV	DP 20 mg/kg SC
	15	5	90	15-minute infusion	IV	no
	16	5	90	15-minute infusion	IV	DP 20 mg/kg SC
	17	5	90	bolus	IV	Dexa[b)] 5 mg/kg SC

a) DP、ジフェンヒドラミン
b) Dexa、デキサメタゾン

ALXN1215 投与の直後から投与 24 時間後まで臨床徴候（起毛、顔面または肢の腫脹、活動性低下、過剰ひっかき行動、皮膚変色（外見上青色））を記録した。発生頻度および重症度に基づいてスコア化した。臨床徴候は、溶媒または ALXN1215 投与から 0、0.25、1、2、4、6 および 24 時間後にスコア化した。各臨床徴候が認められた場合に値 1 を付与した。各臨床徴候の重症度は 3 点スケールで評価し、スコア化した。1 は軽度、2 は中等度、および 3 は重度である。臨床徴候存在スコアに重症度のスコアを加えることにより、特定のタイムポイントで認められたすべての臨床徴候が関与するクローバルスコアとした。それぞれの処置で経時的に得られた臨床スコアの平均値を用いて曲線下面積（AUC）を算出し、それぞれの処置後の有害事象の程度ならびに持続時間の両方について評価した。急性反応を予測できるバイオマーカーを同定するため、血清中の C3、C5、および総補体の機能を測定し、さらに、血漿中の C3、C4、C5a およびトリプターゼ濃度の測定を行った。

静脈内ボーラス投与または 15～30 分以上の緩徐インフュージョンにて ALXN1215 90 mg/kg を投与されたすべての動物で急性反応が認められたが、溶媒投与ラットでは認められなかった。反応は一過性で、主に、起毛、顔面または肢の腫脹および活動性低下であった。すべての症例で臨床症状は 24 時間以内に正常に戻った。

15 または 30 分間の ALXN1215 90 mg/kg をインフュージョン投与された動物では、同用量で静

脈内ボーラス投与された動物と比較して、投与後 2～6 時間に有害事象が減少した。ただし、緩徐インフュージョンでは急性反応は完全には軽減されなかった。

ジフェンヒドラミンまたはデキサメタゾンの皮下前投与により、ALXN1215 90 mg/kg を静脈内ボーラス投与された 4 動物で投与後最初の 6 時間後に認められた臨床 AUC スコアはそれぞれ 52 および 64%減少した。これらの薬剤の皮下前投与によって、ALXN1215 の静脈内ボーラス投与後の急性反応からの回復が促進された。ただし、ALXN1215 投与前にジフェンヒドラミンまたはデキサメタゾンを前投与することにより臨床徴候が完全に軽減された訳ではなかった。静脈内ボーラス投与後に認められた観察に反して、15 分間インフュージョン後に得られた臨床 AUC スコアはジフェンヒドラミンの皮下前投与によっては減少しなかった。

30 分間インフュージョン投与群以外のすべての投与群において、ALXN1215 の静脈内投与後にトリプターゼ濃度が対照群に比べ上昇した。ジフェンヒドラミンの前投与により臨床徴候スコアは減少したが、トリプターゼ値は対照群の値まで回復しなかった。

ALXN1215 静脈内投与後のラットで観察された急性反応に関与するメカニズムとして、補体活性化の関与を示唆する一貫した所見は認められなかった。

結論として、ALXN1215 の静脈内ボーラス投与はラットに対し明確な急性反応を引き起こした。ALXN1215 の緩徐インフュージョン、あるいは、ジフェンヒドラミンまたはデキサメタゾンの皮下投与により急性反応は減弱したが、完全な消失には至らなかった。注射反応の発現に補体が関与することを示す証拠は得られなかった。

2.6.2.4.2.3 中枢神経系（CNS）（報告 1007-2491：ENB-0040 - A 機能観察総合評価法（FOB）による単回静脈内投与後の Sprague-Dawley の神経系の評価）

本 GLP 試験の目的は、単回静脈内投与後の雄 Sprague-Dawley ラットの一般行動に対する ALXN1215 の潜在的薬理学的作用を評価することである。投与時点で 6～7 週齢のラットを用いた。投与量は 0、3、30、または 88 mg/kg とした。評価は、投与前、投与直後、および投与後 30 分、6 および 24 時間に実施した。機能観察総合評価法（FOB）による定性および定量評価は、オープンフィールド行動、処置に対する反応および生理学的評価とした。体温および神経筋強度の測定も実施した。試験終了後すべての動物を安楽死させた。剖検は実施しなかった。本試験の結果概要を表 2.6.3.4 に示す。

ALXN1215 30 および 88 mg/kg の静脈内投与直後および 30 分後に、運動活性低下および刺激反応性の低下が記録された。更に、これらの投与量で、歩行異常、運動性低下、伸筋突伸反射の減少、着地開脚の変化、および四肢脱力が認められた。神経筋への影響は、足部に見られた ALXN1215 関連の臨床徴候と一致した（腫脹、または、赤色または青色変色）。投与 6 時間後には神経筋への影響は明確には認められず、足部の臨床徴候は投与 24 時間後までに正常に戻った。投与量 3 mg/kg では、投与直後に 2 匹の動物に足部の赤色化が記録されたが、行動への影響は認められなかった。

投与量 30 および 88 mg/kg の ALXN1215 投与 30 分後には、統計学的に有意な体温下降が認められた。これらの投与量では、何匹かの動物で不規則呼吸／努力性呼吸も認められた。

以上、投与量 30 および 88 mg/kg の ALXN1215 の単回静脈内投与により、Sprague-Dawley ラットの一般行動に対して急速な一過性の可逆的影響が認められた。これらの行動変化は足部腫脹および赤色化と同時に発現した。ALXN1215 3 mg/kg の投与では行動に対し測定可能な影響を及ぼすことはなかった。

2.6.2.4.2.4 呼吸機能（報告 1007-2501：ENB-0040 -単回静脈内投与後の覚醒 Sprague-Dawley の呼吸に関する安全性薬理試験）

本 GLP 試験の目的は、覚醒下で単回静脈内投与を受けた Sprague-Dawley 雄ラットの呼吸機能に対する ALXN1215 の潜在的薬理学的作用を評価することである。投与時点で 6～7 週齢のラットに、0、3、30、および 90 mg/kg の ALXN1215 を投与した。投与直後の 2 時間、および投与 6 時間後および 12 時間後に、一回換気量、毎分換気量および呼吸数をモニターした。試験終了時点にすべての動物を安楽死させた。剖検は実施しなかった。本試験の結果概要を表 2.6.3.4 に示す。

呼吸機能モニター中には臨床徴候の評価を実施できなかったが、試験中に死亡例または ALXN1215 関連の臨床徴候は認められなかった。

すべての用量で投与直後に ALXN1215 による有意な呼吸緩徐作用がみられた。本作用は重篤度に関しては、ほぼ用量依存的であったが、発現頻度または発現期間に関しては用量依存性はなく、概して毎分換気量の減少を伴っていた。対照群ではこのような影響は認められなかった。この呼吸機能の抑制は、投与後 6.5～7.5 時間の間にも時折見られ、第 3 群の 24～25 時間のタイムフレームでも一回換気量および毎分換気量に関して統計学的に有意な抑制が認められた。呼吸機能への影響は、第 2 群および第 3 群と比較して第 4 群でより重度であった。高用量（第 4 群）では投与後 0～2 時間に重症度が有意に上昇したが、中用量（第 3 群）および低用量（第 2 群）で重症度の差異はみられなかった。第 3 群の抑制作用の持続時間は第 2 群または第 4 群よりも長かった。

これらの結果から、ALXN1215 はラットの呼吸機能に対して何らかの用量依存的抑制作用を有することが示された。これらの作用は投与直後の 2 時間で最も顕著に認められ、他のラット毒性試験で認められた一過性の臨床徴候の発現時期および持続時間と一致していた。

2.6.2.4.2.5 心血管系（報告 670388 付録 7 および 18）：幼若サルにおける ALXN1215 の 4 週間回復期間を伴った 6 ヶ月反復投与毒性試験）

本 GLP 試験の目的の概要は、幼若カニクイザルに 6 ヶ月間 1 日 1 回 SC 投与した ALXN1215 の潜在的毒性について検討するとともに、28 日間の回復期間における遅延性または持続性の影響について評価することである。

ALXN1215 の投与量は 0、0.43、2.14、および 10 mg/kg/日とした。毒性評価は、試験前および 1 週間目および 25 週目の ECG モニターにより行った。ECG 評価（表 2.6.3.4 にまとめた）は、肢誘導（I、II、III、aVR、aVL、および aVF）を用いて、投与前に 1 回、さらに 6 日目および 26 週目の投与後 15 分、4、12、および 24 時間後（T_{max} が含まれる期間）にすべての動物に対し ECG を実施した。心電図チャートについては循環器認定獣医が定性評価を行った。HR、PR、RR、QRS、QT 及び QTc の測定値を用いて、心室性不整脈に対する潜在的リスクを評価した。異なる心拍数に対する QT 間隔を補正するために、Fridericia の補正式を使用した。安静時心拍数が多い動物は、必然的に QT 間隔が短くなる。被験動物間のわずかに異なる心拍数を補正するために、この計算を行って QT 間隔を標準化した。標準化によって、医薬品の効果をより正確に評価することが可能となる。

循環器認定獣医によるこれらのデータの評価に基づくと、投与量 10 mg/kg まで（試験中最高投与量）皮下投与を 6 ヶ月間受けた幼若カニクイザルの ECG 記録に関して ALXN1215 による生物学的に意味のある影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

本試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

HPP は、TNSALP の産生不全をもたらす遺伝性疾患であり、石灰化されない骨マトリックスの蓄積（すなわちくる病、骨軟化症）に至る。この結果、成長障害、運動能力低下、呼吸不全、および場合により死亡に至るなど、カスケード的な影響が及ぶことがある。

José Luis Millánl 博士の研究室にて作製された *Akp2*$^{-/-}$モデルマウス [3]は、ほとんどの HPP の臨床的特徴（例えば、TNSALP 基質の蓄積、骨の石灰化異常、成長障害や早期死亡など）を反映するため、ALXN1215 の有効性を評価する薬理試験に使用した。

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。

Akp2$^{-/-}$モデルマウスにおいて、予防的投与および治療的投与の両方の投与条件下で ALXN1215 の有効性が示された。予防的投与試験では、ALXN1215 によりアルカリホスファターゼの基質である PPi および PLP の蓄積が妨げられ、骨石灰化が促進され、骨長および体重の増加抑制に有益な影響を及ぼした。生存率も改善した。成長および生存率に対する有益な影響は投与中止後に減少し、効果維持には ALXN1215 の継続投与が必要であることが示唆された。ALXN1215 を治療的投与した *Akp2*$^{-/-}$マウスでは骨石灰化が促進され、生存率が著しく改善され、体重増加抑制が抑えられた。以上、これらのデータから、ALXN1215 は標的に結合し、関連する薬力学（PD）マーカーを減少させるとともに HPP の動物モデルにおいて予防的投与または治療的投与することにより有効性を示すことが示された。

ALXN1215 による骨石灰化の促進により、急性低カルシウム血症または低リン酸血症（すなわち「飢餓骨」症状）[5)6)]に至る状況を再現するため、骨マトリックスの非石灰化が有意な 12 日齢 *Akp2*$^{-/-}$マウスに ALXN1215 を 1 日間または 4 日間毎日皮下投与した。本試験（報告 ALP-PT-10）において、ALXN1215 投与により低カルシウム血症または低リン酸血症は誘導されなかったことから、「飢餓骨」症状も誘導され難いことが示唆された。

静脈内投与による安全性薬理試験（呼吸機能および中枢神経系）では ALXN1215 投与より一過性の影響が認められ、ラットに静脈内投与した一般毒性試験で認められた他の臨床徴候と一致していた。中枢神経系に対する影響としては、高用量を投与したすべての動物で運動活性低下、刺激に対する過反応、歩行異常、運動性低下、伸筋突伸反射の減少、着地開脚の変化、および四肢脱力が認められた。これらの影響は静脈内投与を行ったラットの一般毒性試験における足部の一過性の腫脹および赤色化と一致していたが、皮下投与では発現しなかった。さらに、高用量の ALXN1215 の静脈内投与を受けたラットでは一過性の体温下降が記録された。中枢神経系および臨床所見は ALXN1215 によるラット呼吸機能に対する用量依存的抑制作用とも一致した。この作用は投与後最初の 2 時間で最も顕著に認められ、ラット毒性試験で認められた臨床所見および行動に対する作用の発現時期および持続時間と一致していた。 投与量 10 mg/kg（試験中最高投与量）までの皮下投与を受けた幼若カニクイザルでは ALXN1215 による有意な心血管作用は認められなかった。中枢神経系および呼吸機能に対する影響はすべての個体で一過性であり、静脈内投与の毒性試験で認められた臨床徴候と一貫しており、また一致した。ラット静脈内投与毒性試験で認められた臨床徴候は皮下投与を受けたラットでは認められず、サルでも投与経路を問わず認

められなかった。安全性薬理試験からは臨床使用上のいかなる危険性も確認されず、この結論は現行の臨床データとも一致した。

2.6.2.7 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) Whyte MP.Hypophosphatasia.In: Glorieux FH, Pettifor JM, Juppner H, editors.Pediatric Bone: Biology and Diseases.London, UK, Academic Press; 2012: pp. 771-94.
3) Narisawa S, Frohlander N, Millán JL.Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establhisment of a model of infantile hypophosphatasia.Dev Dyn.1997 208(3):432-46.
4) Millán JL.Mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in medicine and biotechnology.Wiley-VCH; 2006.Chapter 8 pages 131-164.
5) 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.
6) 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.
7) Mornet E, Beck C, Bloch-Zupan A, Girschick H, Le Merrer M. Clinical utility gene card for: hypophosphatasia.Eur J Hum Genet.2011 Mar;19(3):e1-e5; published online 27 October 2010.
8) Mornet E. The Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Gene Mutations Database.Laboratoire SESEP.Last update: August 27, 2013. http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php Last accessed: August 31, 2013.
9) Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Millán JL.Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases.J Biol Chem.2002 Jun 21;277(25):22992-9.
10) Millán JL.Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes.Purinergic Signal.2006 Jun; 2(2):335-41.
11) Shea JE and Miller SC.Skeletal function and structure: Implications for tissue-targeted therapeutics.Adv Drug Deliv Rev. 2005 May 25; 57(7):945-57.
12) Kasugai S, Fujisawa R, Waki Y, Miyamoto KI and Ohya K. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)6 conjugation.J Bone Miner Res.2000 May;15(5):936-43.
13) TMV-0065FR.Final report for TMV-0065, protocol for validation of inorganic pyrophosphate (PPi) hydrolysis assay for asfotase alfa.Alexion.Effective date [redacted].
14) Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD.Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity.J Biol Chem.2007 May 25;282(21):15872-83.
15) Millán JL, Narisawa S, Lemire I, Loisel TP, Boileau G, Leonard P, Gramatikova S, Terkeltaub R, Camacho NP, McKee MD, Crine P, Whyte MP.Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia.J Bone Miner Res.2008 Jun;23(6):777-87.
16) 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.

17) Fleisch H and Russell RG, A review of the physiological and pharmacological effects of pyrophosphate and diphosphonates on bones and teeth.J Dent Res.1972 Mar-Apr; 51(2):324-32.

18) Meyer JL, Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? Archives of biochemistry and Biophysics.1984 May 15; 231(1):1-8.

19) Meyer JL and Fleisch H, Calcification inhibitors in rat and human serum and plasma.Biochim Biophys Acta.1984 Jun 15; 799(2):115-21.

20) Cheung CP and Suhadolnik RJ, Analysis of inorganic pyrophosphate at the picomole level.1977.Analytical Biochemistry, 83 p 61-63.

21) da Silva, V. R., Russell, K. A. and Gregory, J. F. (2012) Vitamin B6, in Present Knowledge in Nutrition, Tenth Edition (eds J. W. Erdman, I. A. Macdonald and S. H. Zeisel), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.Pages 307-320.

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
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3 薬理試験概要表

アレクシオンファーマ合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.3 薬理試験概要表 5
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 5
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 11
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 12

略号一覧表

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
AUC	area under the curve	濃度-時間曲線下面積
β-GP	β-glycerol phosphate	β-グリセロールリン酸
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
BV	bone volume	骨量
C3	complement component 3	補体第 3 成分
C4	complement component 4	補体第 4 成分
C5	complement component 5	補体第 5 成分
C5a	complement component 5a	補体第 5a 成分
Cat #	catalogue number	カタログ番号
CNS	central nervous system	中枢神経系
CV	cardiovascular	心血管
Dexa	dexamethasone	デキサメタゾン
dL	deciliter	デシリットル
DP	diphenhydramine	ジフェンヒドラミン
ECG	electrocardiogram	心電図
ED_{50}	dose that induces 50% of E_{max}	E_{max} の半分の効果を与える投与量
E_{max}	maximal effects	最大効果
ENB-0040	asfotase alfa	ALXN1215
FcD10	Fc domain of immunoglobulin G_1 and a deca-aspartate peptide	免疫グロブリン G_1 の Fc 領域およびデカアスパラギン酸ペプチドドメイン
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
g	gram	グラム
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床実施の基準
h	hour	時間
HCl	hydrochloric acid	塩酸
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene	ヒト Ether-à-go-go 関連遺伝子
HPLC	high pressure liquid chromatography	高圧液体クロマトグラフィー
HPP	hypophosphatasia	低ホスファターゼ症
IND	investigational new drug	治験用新医薬品
IV	intravenous	静脈内
K_3EDTA	tri-potassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸三カリウム塩
k_{cat}	catalytic constant	触媒定数
kDa	kilodalton	キロダルトン

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
kg	kilogram	キログラム
k_m	Michaelis-Menten Constant	ミカエリスメンテン定数
L	liter	リットル
LOQ	limit of quantification	定量下限
MicroCT	microcomputed tomography	マイクロコンピューター断層撮影
µg	microgram	マイクログラム
µM	micromolar	マイクロモル
mg	milligram	ミリグラム
mL	milliliter	ミリリットル
mM	millimolar	ミリモル濃度
mm	millimeter	ミリメートル
mm^3	cubic millimeter	立方ミリメートル
mmol	millimole	ミリモル
n	sample size	試料数
ng	nanogram	ナノグラム
ND	not determined	決定されず
NS	no sample	試料なし
PD	pharmacodynamics	薬力学
Pi	inorganic phosphate	無機リン酸
PLP	pyridoxal-5’ phosphate	ピリドキサール 5 リン酸
pNPP	para-nitrophenyl phosphate	p-ニトロフェニルリン酸
PPi	inorganic pyrophosphate	無機ピロリン酸
r^2	r squared	決定定数
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
s	second	秒
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
TNSALP	tissue non-specific alkaline phosphatase	組織非特異的アルカリホスファターゼ
U	unit	単位
WT	wild type	野生型

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Overview			**Test Article: Asfotase Alfa**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in** CTD
Primary Pharmacodynamics					
Binding to hydroxyapatite	asfotase alfa	in vitro	Enobia Pharma Inc.	JG-60-Exp2	4.2.1.1.9
Rescue of PPi-induced mineralization inhibition in MC3T3-E1 cells	asfotase alfa	in vitro	Enobia Pharma Inc.	FB-06-Exp17	4.2.1.1.10
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (15 days) – effect on bone mineralization defects of the hindpaw and growth	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-04	4.2.1.1.2
Phenotyping study in *Akp2*$^{-/-}$ mice – craniosynostosis	*Akp2*$^{-/-}$ mice	NA[a)]	Enobia Pharma Inc.	HPP-PH-06	4.2.1.1.11
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (16 days) – effect on bone mineralization deficit of the enthesis	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-22	4.2.1.1.12
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (15 days) – effect on plasma PPi	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-24	4.2.1.1.14
Oh AThProphylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (9 days) – effect on plasma PLP	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-25.1	4.2.1.1.15
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (52 days; daily dosing) – effect on bone mineralization defects of the hindpaw and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-03	4.2.1.1.1
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (52 days; 3 and 7 days dosing interval) – effect on bone mineralization defects of the hindpaw and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-05	4.2.1.1.3
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (43 days; 1, 3 and 7 days dosing interval) – effect on bone mineralization defects of the hindpaw and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-06	4.2.1.1.4
Prophylactic (43 days; daily dosing) and therapeutic (initiation of treatment on day 15) treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice – effect on bone mineralization defects of the hindpaw, growth and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-08	4.2.1.1.5
Therapeutic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (initiation of treatment on day 12) – effect on bone mineralization defects of the hindpaw and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-09	4.2.1.1.6
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (43 days; daily dosing) – effect on bone mineralization defects of the hindpaw, growth and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-11	4.2.1.1.7
Dose response modeling in *Akp2*$^{-/-}$ mice – dose response in relation to bone mineralization defects of the hindpaw and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-12	4.2.1.1.8
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (43 days; daily dosing) – effect on bone mineralization deficit of the enthesis	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-23.2	4.2.1.1.13

Overview			**Test Article: Asfotase Alfa**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in** CTD
Primary Pharmacodynamics					
Prophylactic treatment in *Akp2*$^{-/-}$ mice (35 days; daily dosing) – effect of dosing cessation on bone mineralization defects of the hindpaw, growth and survival	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-25.2	4.2.1.1.16
Secondary Pharmacodynamics					
No studies of this type were conducted.					
Safety Pharmacology					
Serum calcium and phosphorus	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	Enobia Pharma Inc.	ALP-PT-10	4.2.1.3.1
Acute injection reaction	Sprague-Dawley rats	IV bolus; IV infusion; SC	[redacted]	PK2008021951	4.2.1.3.4
Central nervous system	Sprague-Dawley rats	IV	[redacted]	1007-2491[b)]	4.2.1.3.2
Respiratory function	Sprague-Dawley rats	IV	[redacted]	1007-2501[b)]	4.2.1.3.3
Cardiovascular system[c)]	Cynomolgus juvenile monkeys	SC	[redacted]	670388[b)]	4.2.3.2.5
Pharmacodynamic Drug Interactions					
No studies of this type were conducted.					

a) NA、該当なし
b) GLP 適合陳述を含む試験報告書
c) 6 ヶ月毒性試験の一部として実施

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Study number	**Tissue or fluid to be evaluated**	**Animal Strain**	**Administration method**	**Dose of Asfotase alfa mg/kg**	**Noteworthy findings**
ALP-PT-03	Plasma and bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	The survival of mice in the Vehicle group was statistically different ($p<0.0001$) from that of mice in the WT group. The median survival for the mice in the Vehicle group was 18.5 days; no mice survived beyond 24 days of age. In Tx-1, 75% survived to the end of the study ie 53 days. The survival of the Tx-1 group was statistically improved compared to the survival of the Vehicle group ($p<0.0001$).
ALP-PT-03	Plasma and bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for 52 days	
ALP-PT-03	Plasma and bone	WT	-	-	
ALP-PT-04	Bone and Plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	The distribution of radiographic images of the feet between severe, moderate, slight and normal approached statistical significance when the Tx-1 group treated with ENB-0040 was compared to the vehicle group ($p=0.0720$). There were no mice with severe mineralization defects in the Tx-1 group treated with ENB-0040 whereas 28% of the mice receiving vehicle had severe mineralization defects.
ALP-PT-04	Bone and Plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for 15 days	
ALP-PT-04	Bone and Plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	
ALP-PT-05	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2	ENB-0040 administered at 8.2mg/kg every 3 days prevented mineralization defects in 62% of
ALP-PT-05	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2	
ALP-PT-05	Bone	WT	-	-	

					mice. This percentage was statistically different (p=0.0029) compared to the 16% prevention obtained after weekly treatment with ENB-0040 also administered at 8.2 mg/kg.
ALP-PT-06	Bone and plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	4.3 daily for 23/43 days	At the end of the study, the difference between the 100% normalization observed in Tx-3 and that obtained in Tx-1 (83%, p=0.0634) or Tx-7 (85%, p=0.0789) approached statistical significance. In all three groups (Tx-1, Tx-3 and Tx-7), there was a further improvement of the mineralization of the feet between days 23 and 43 of treatment.
ALP-PT-06	Bone and plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	15.2 every 3 days for 23/43 days	
ALP-PT-06	Bone and plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	15.2 weekly for 23/43 days	
ALP-PT-06	Bone and plasma	WT	-	Not injected	
ALP-PT-08	Bone and Plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily from day 15 to day 43	The distribution of radiographic images of the feet between normal and abnormal approached statistical significance when the RTx-1 group (41%) is compared to the vehicle group (12%) (p=0.0645).
ALP-PT-08	Bone and Plasma	Akp2$^{-/-}$	SC	0 daily	
ALP-PT-08	Bone and Plasma	Akp2$^{-/-}$	SC	8.2 daily from day 15 to day 43	
ALP-PT-08	Bone and Plasma	WT	-	Not injected	
ALP-PT-09	Bone	Akp2$^{-/-}$	SC	0 daily	At the end of the study, the Chi Square test comparing the distribution of normal and abnormal feet between groups RVehicle, RTx-1, RTx-3 and RTx-7 was not significant (p=0.3248). No inter treatment comparisons were statistically significant or approached
ALP-PT-09	Bone	Akp2$^{-/-}$	SC	8.2 daily from day 12 to day 46/47	
ALP-PT-09	Bone	Akp2$^{-/-}$	SC	8.2 daily from day 12 to day 18, then 24.6 every 3 days from day 19 to	

				day 46/47	significance.
ALP-PT-09	Bone	Akp2$^{-/-}$	SC	8.2 daily from day 12 to day 18, then 57.4 weekly from day 19 to day 46/47	
ALP-PT-09	Bone	Akp2$^{-/-}$	SC	Not injected	
ALP-PT-11	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	There is a clear relationship between administered daily dose and percent of individuals with normal bony structures of the foot, rib cages and pelvic limbs. The 80% effective dose was calculated to be 3.2 mg/kg/day for feet, 2.8 mg/kg/day for rib cages and 2.9 mg/kg/day for pelvic limbs
ALP-PT-11	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0.5 daily for 43 days	
ALP-PT-11	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	2.0 daily for 43 days	
ALP-PT-11	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for 43 days	
ALP-PT-11	Bone	WT	SC	Not injected	
ALP-PT-22	Bone and plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	Prophylactic treatment of *Akp2*$^{-/-}$mice with 8.2 mg/kg/day asfotase alfa for 16 days: Promoted mineralization of bones of the hindpaw and reversed suppression of bone growth Partially prevented mineralization deficit at the calcaneus-Achilles tendon enthesis Reversed osteoid accumulation in bones of the distal hindlimb
ALP-PT-22	Bone and plasma	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for 16 days	
ALP-PT-22	Bone and plasma	WT	SC	Not injected	
ALP-PT-23.2	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	Micro-CT measurements of BV at the calcaneus-Achilles tendon enthesis in vehicle- and asfotase alfa-treated *Akp2*$^{-/-}$ mice showed that prophylactic treatment with 4 mg/kg/day asfotase alfa for 43 days: Partially prevented the
ALP-PT-23.2	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	4.0 daily for 43 days	
ALP-PT-23.2	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	4.0 daily for 43 days	
ALP-PT-23.2	Bone	WT	SC	Not injected	

					mineralization deficit at the calcaneus-Achilles tendon enthesis. There was a 9- to 12-fold increase in enthesis mineralization compared to vehicle-treated *Akp2*$^{-/-}$ mice (as compared to study ALP-PT-22, in which there was a 4-fold increase in enthesis mineralization after 16 days of treatment at 8.2 mg/kg/day) Promoted normal mineralization of bones of the hindpaw Increasing asfotase alfa prophylactic treatment duration from 16 to 43 days significantly improved the reversal of the mineralization deficit at the calcaneus-Achilles tendon enthesis in *Akp2*$^{-/-}$ mice.
ALP-PT-24	Plasma and bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	As occurs in HPP in humans, *Akp2*$^{-/-}$ mice exhibit accumulation of the ALP substrate PPi in plasma. These data support the relevance of the *Akp2*$^{-/-}$ mouse as a preclinical model of HPP. Prophylactic treatment of *Akp2*$^{-/-}$ mice with 8.2 mg/kg/day asfotase alfa for 15 days completely prevented accumulation of PPi in plasma.
ALP-PT-24	Plasma and bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for 14 days	
ALP-PT-24	Plasma and bone	WT	SC	Not injected	
ALP-PT-25.1	Plasma and bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	0	Prophylactic treatment of *Akp2*$^{-/-}$ mice with 8.2 mg/kg/day asfotase alfa for 9 days reversed suppression of bone growth and completely prevented accumulation of PLP in plasma.
ALP-PT-25.1	Plasma and bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for 9 days	
ALP-PT-25.1	Plasma and bone	WT	SC	Not injected	
ALP-PT-25.2	Bone	*Akp2*$^{-/-}$	SC	8.2 daily for35 days then stop	Dosing of *Akp2*$^{-/-}$ with 8.2 mg/kg asfotase alfa daily from birth for

				dosing	35 days followed by cessation of dosing: Had no impact on bone mineralization defects of the hindpaw at time of death. That is, there was no reversal of the improved, normal mineralization of bones of the hindpaw induced by asfotase alfa during the 35 days of dosing Reversed the beneficial effects of asfotase alfa on weight gain Reversed the beneficial effects of asfotase alfa on survival These data demonstrate the detrimental effects of cessation of dosing of asfotase alfa on growth and survival of *Akp2*$^{-/-}$ mice, suggesting that continuous therapy with asfotase alfa is required for sustained benefit.
ALP-PT-25.2	Bone	WT	-	Not injected	

2.6.3.3 副次的薬理試験

本試験は実施していない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Strain / Species	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Serum calcium and phosphorus	*Akp2*$^{-/-}$ mice	SC	0 8.2 (single dose) 8.2 daily for 4 days	10M/9F 12M/7F 10M/10F	None	No	ALP-PT-10
Acute injection reaction	Sprague-Dawley rats	IV bolus; IV infusion; SC	IV 0, 90 SC 0, 180	6M Group No. 1 to 9 5M Group No. 10 to 17	Transient acute infusion reactions at 90 mg/kg after IV administration. Slowing infusion or administering DP[a)] or Dexa[b)] decreased but did not completely alleviate the acute response. No reactions after SC administration at 180 mg/kg	No	PK2008021951
Central nervous system	Sprague -Dawley rats	IV	0, 3, 30, 88	10M	Transient effects at 30 and 88 mg/kg coincident with transient acute infusion reactions observed in rats after IV administration	Yes	1007-2491
Respiratory function	Sprague-Dawley rats	IV	0, 3, 30, 90	8M	Transient depressed respiration at ≥ 3 mg/kg. These effects were consistent in timing and duration with transient clinical signs observed in rats after IV administration.	Yes	1007-2501
Cardiovascular system[c)]	Cyno-molgus juvenile monkeys	SC	0, 0.43, 2.14, 10 daily for 26 weeks	5M/F	None	Yes	670388

a) DP、ジフェンヒドラミン
b) Dexa、デキサメタゾン
c) 6 ヶ月毒性試験の一部として実施。投与前、6 日目、および 26 週間の間に ECG を実施した。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

本試験は実施していない。