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
2.6.6 毒性試験の概要文

アレクシオンファーマ合同会社

目次

頁
略号一覧表 4
2.6.6 毒性試験の概要文 6
2.6.6.1 まとめ 6
2.6.6.2 単回投与毒性試験 8
2.6.6.2.1 2007-0693 試験:ALXN1215（sALP-FcD10）の幼若カニクイザルの急速静注及び点滴静注最大耐用量毒性試験 8
2.6.6.3 反復投与毒性試験 9
2.6.6.3.1 70385 試験：ALXN1215（sALP-FcD10）の Sprague-Dawley 系幼若ラットの静注最大耐用量毒性試験 9
2.6.6.3.2 670314 試験：28 日間回復期間設定 ALXN1215（ENB-0040）の幼若アルビノラットの 4 週間（週 1 回）静脈内投与毒性試験 10
2.6.6.3.3 1007-1503 試験：28 日間回復期間設定 ALXN1215（ENB-0040）の幼若カニクイザルの 4 週間静脈内投与毒性試験 12
2.6.6.3.4 670315 試験：28 日間回復期間設定 ALXN1215（ENB-0040）の幼若アルビノラット 26 週間静脈内投与毒性試験 13
2.6.6.3.5 670338 試験：4 週間回復期間設定 ALXN1215 （ENB-0040）の幼若サルの 6 ヵ月間反復投与毒性骨試験 14
2.6.6.4 遺伝毒性試験 16
2.6.6.5 がん原性試験 16
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 17
2.6.6.6.1 902230 試験：ALXN1215（ENB-0040）の雄ラットのパイロット静脈内投与毒性試験（用量範囲設定） 17
2.6.6.6.2 902233 試験：ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による胚･胎児発生試験のための用量設定試験 17
2.6.6.6.3 902231 試験：ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による受胎能及び初期胚発生に関する試験 18
2.6.6.6.4 902234 試験: ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による胚･胎児発生に関する試験 19
2.6.6.6.5 902236 試験：ALXN1215（ENB-0040）のウサギの静脈内投与による用量範囲設定及び胚･胎児発生に関する試験 20
2.6.6.6.6 902237 試験：ALXN1215（ENB-0040）のウサギの静脈内投与による胚･胎児発生に関する試験 21
2.6.6.6.7 902238 試験：ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験 23
2.6.6.7 局所刺激性試験 24
2.6.6.8 その他の毒性試験（実施している場合） 24
2.6.6.9 考察及び結論 25
2.6.6.10 参考文献 28

表一覧

表 2.6.6.1-1 毒性試験の概要 7
表 2.6.6.2.1-1 2007-0693 試験の試験デザイン 8
表 2.6.6.3.1-1 70385 試験の試験デザイン 9
表 2.6.6.3.2-1 670314 試験の試験デザイン 10
表 2.6.6.3.3-1 1007-1503 試験の試験デザイン 12
表 2.6.6.3.4-1 670315 試験の試験デザイン 13
表 2.6.6.3.5-1 670338 試験の試験デザイン 14
表 2.6.6.6.1-1 902230 試験の試験デザイン 17
表 2.6.6.6.2-1 902233 試験の試験デザイン 18
表 2.6.6.6.3-1 902231 試験の試験デザイン 18
表 2.6.6.6.4-1 902234 試験の試験デザイン 20
表 2.6.6.6.5-1 902236 試験の試験デザイン 21
表 2.6.6.6.6-1 902237 試験の試験デザイン 22
表 2.6.6.6.7-1 902238 試験の試験デザイン 23

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
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BPB	Blood-placenta-barrier	血液胎盤関門
CD	control deviation	制御偏差
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
CV	cardiovascular	心血管系
DXA	dual-energy x-ray absorptiometry	二重エネルギーX 線吸収
ECG	electrocardiogram	心電図
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
FcRn	neonatal receptor	新生児受容体
FOB	functional observational battery	行動観察
GLP	definitive toxicology	GLP 適応毒性試験
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
L1	first lumbar vertebra	第 1 腰椎
L4	fourth lumbar vertebra	第 4 腰椎
L5	fifth lumbar vertebra	第 5 腰椎
L6	sixth lumbar vertebra	第 6 腰椎
mg	milligram	ミリグラム
mL	milliliter	ミリリットル
MTD	maximum tolerated dose	最大耐用量
NA	not applicable	適応不可
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	New Zealand White
pc	postcoitum	交尾後

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢定量的 CT
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
Stage C	closure of the hard palate	着床から硬口蓋閉鎖
Stage D	closure of the hard palate to the end of pregnancy	硬口蓋閉鎖から妊娠終了
Stage F	weaning to sexual maturity	離乳から性成熟
TK	toxicokinetic	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

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

ALXN1215（別名：sALP-FcD10、ENB-0040）は、低ホスファターゼ症（HPP）の長期治療薬として開発されているヒト遺伝子組換え組織非特異型アルカリホスファターゼ Fc-デカ-アスパラギン酸塩融合タンパク質である。HPP は、カルシウムやリンが骨や歯に沈着する石灰化過程が阻害されている疾患である。この石灰化は、骨格構造を維持するうえで重要な役割を持っている。HPP の兆候及び症状は多様であるが、重症度は発症時年齢と反比例している。したがって治療が最も必要とされるのは乳幼児患者である。そのため、毒性試験は生殖発生毒性試験を除き、幼若期の動物を用いて開始された。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って生成されるピロリン酸の加水分解を触媒することでその治療的有益性を発揮する。ピロリン酸が加水分解されることで骨の石灰化が促進され、この反応はすべての哺乳類種で同様に認められる。この部分的共通性に基づき、ラット（*Rattus norvegicus*）、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）及びウサギ（*Oryctolagus cuniculus*）が、ALXN1215 の安全性を評価するために適切と考えられた。また、これらの動物種の組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNSALP）アミノ酸配列は、ヒトの配列との高い相同性を有している（それぞれ 91%、86%及び 97%）。

試験の目的は、皮下（SC）投与により ALXN1215 を投与することである。6 ヵ月の SC 試験は、カニクイザルを用いて実施された。ラットにおいても 6 ヵ月間の SC 投与が検討されたが、ラットにおける静脈内（IV）または皮下（SC）投与後の曝露量を比較する反復投与試験は、皮下投与された動物において ALXN1215 曝露が投与期間を通じて持続可能ではなかったことを実証した（試験 70552）。皮下投与されたラットの抗薬物抗体（ADA）の発生は高く、これは、おそらく、曝露量を低くする必要性を示唆している。結果的に、ラットにおける 6 ヵ月投与毒性試験は、静脈内（IV）投与によって実施された。

ALXN1215 の一般毒性試験計画では、GLP 非適合の最大耐用量を求める試験（MTD 試験）、GLP 適合の投与期間の異なる主要な毒性試験、そしてラットを用いた静脈内（IV）投与と皮下（SC）投与の局所刺激性を比較する GLP 適合試験を実施した。主要な試験の前に 2 つの MTD 試験を実施して MTD を求め、主要な GLP 適合毒性試験実施の参照とした。MTD 試験の 1 つはサルでの単回投与毒性試験、もう 1 つはラットでの反復投与毒性試験であった。主要な毒性試験は、ラット及びサルを用いた 4 週間の静脈内投与毒性試験、4 週間の GLP 適応試験で静脈内投与と皮下投与を比較した局所刺激性試験、サルを用いた 6 ヵ月間静脈内投与試験及びラットでの 6 ヵ月間皮下投与試験を実施した。さらに、生殖発生毒性試験を実施し、受胎能に対する影響、胚･胎児発生及び出生前／出生後の発生に対する影響を検討した。独立した薬理･安全性試験は、ラットを用いて実施し、中枢神経系（CNS）及び呼吸器系機能に及ぼす影響を検討した。心血管（CV）薬理･安全性試験は独立した試験としてではなく、サルでの 6 ヵ月間反復投与試験の中で実施した。一部の試験ではトキシコキネティクス及び ADA 解析用の試料を採取した（2.6.4 項参照）。ALXN1215 の忍容性は一般に良好だった。ラットでは、ほとんどの試験で静脈内投与後に一貫性のある一過性の反応が唯一認められた。 類似の急性所見が、ラットの安全性･薬理試験で認められた（2.6.2.4 項参照）。ラットでの急性反応は、抗ヒスタミン薬又はステロイドである程度軽減したものの、完全には消失しなかった（2.6.2.4 項参照）。さらに、投与に伴う反応の発現に補体が関与することを示す証拠はなかった。ラットの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、サル及びウサギの静注及び皮下投与後には認められず、ラットの皮下投与後にも認められなかった。したがって、この所見の臨床的な重要性は不明である。ラット及びサルの毒性試験

では ALXN1215 に対する免疫応答が観察された。新生児受容体（FcRn）介在胎盤エンドサイトーシスにより ADA が血液胎盤関門（BPB）を通過する可能性もある。ADA 応答については 2.6.4 項で詳細に考察している。一般毒性試験及び生殖毒性試験において、ADA 依存性の作用機序によると思われる有害反応は認められなかった。さらに、ALXN1215 は、ヒトのタンパク質に由来するためヒト以外の動物では免疫原性を示す可能性があり、毒性試験における ADA の発現は非特異的であると考えられる。毒性試験の概要を表 2.6.6.1-1 に、各試験の詳細を以下に記載する。

表 2.6.6.1-1 毒性試験の概要

Study type and duration (GLP Status)	Study Number	Route	Species	Dose Levels (mg/kg)	NOAEL (mg/kg)
Single dose toxicity					
MTD (non-GLP) Single Dose escalating	2007-0693	IV	Monkey	5, 15, 45, 90, 180	NA
Repeat dose toxicity					
MTD (non-GLP) Weekly	70385	IV	Rat	10, 30, 90, 180	NA
4 week (GLP) Weekly	670314	IV	Rat	0, 2.6, 26, 77	26/week
4 week (GLP) Weekly	1007-1503	IV	Monkey	0, 5, 15, 45	45/week
6 month (GLP) Daily	670315	IV	Rat	0, 1, 3, 13	13/day
6 month (GLP) Daily	670388	SC	Monkey	0, 0.43, 2.14, 10	10/day
Local tolerance					
4 week (GLP) Daily	70552	IV SC	Rat	0, 3, 30, 90 0, 0.84, 8.4, 25.2	30/day 25.2/day
Reproductive and Developmental Toxicity					
Pilot Fertility Study (GLP) Daily	902230	IV	Rat	0, 25, 50	NA
Fertility Study (GLP) Daily	902231	IV	Rat	0, 10, 25, 50	50/day
Pilot Embryofetal Study (GLP) Daily	902233	IV	Rat	0, 13, 25, 50	NA
Embryofetal Study (GLP) Daily	902234	IV	Rat	0, 13, 25, 50	50/day
Pilot Embryofetal Study (GLP) Daily	902236	IV	Rabbit	0, 6, 13, 25, 50	NA
Embryofetal Study (GLP) Daily	902237	IV	Rabbit	0, 10, 25, 50	25/day
Prenatal/Postnatal Study (GLP) Daily	902238	IV	Rat	0, 10, 25, 50	50/day

2.6.6.2 単回投与毒性試験

幼若カニクイザルを用いて GLP 非適応の最大耐用量（MTD）毒性試験を実施した。使用個体数を少なくするため、用量を漸増しながら週 1 回の頻度で静脈内投与を行った。

2.6.6.2.1 2007-0693 試験:ALXN1215（sALP-FcD10）の幼若カニクイザルの急速静注及び点滴静注最大耐用量毒性試験

幼若カニクイザル（約 12 か月齢）に ALXN1215 を急速静脈内投与又は点滴静脈内投与した際の MTD を決定する GLP 非適応試験を実施した。試験デザインを表 2.6.6.2.1-1 に、試験結果を 2.6.7 項に記載する。

表 2.6.6.2.1-1 2007-0693 試験の試験デザイン

Test Article	Study Day	Treatment	Dose Level (mg/kg)	Dose Conc. (mg/mL)	Dose Rate (mL/kg/hr)	Animals[a)]	
						Male	Female
Asfotase alfa	1	IV Injection	5	1.25	N/A	3	3
	8	IV Injection	15	3.75	N/A	3	3
	15	IV Infusion	45	11.25	80	3	3
	22	IV Infusion	90	22.5	40	3	3
	29	IV Infusion	180	45	20	3	3
	46[b)]	IV Injection	45	11.25	N/A	2	2

a) 同じ個体に異なる用量を段階的に投与した。各群 2 匹を主要試験に、1 匹を TK 解析に使用した。
b) 主要試験用の個体のみ 46 日目にも投与を行った。

ALXN1215 を最大 6 回まで急速静脈内又は点滴静脈内投与した。最低 7 日間の投与間隔で用量を漸増しながら投与した。投与後の反応に応じて次の用量を選択した。5 又は 15 mg/kg を急速静注、45、90 又は 180 mg/kg をそれぞれ 3、6 又は 12 分かけて点滴静脈内投与した。主試験用の個体のみ、180 mg/kg の点滴静注から 16 日後に 45 mg/kg の急速静注を行った。投与液量は 4 mL/kg とした。試験期間中の評価項目は死亡率、一般症状観察、体重及び摂餌量測定、トキシコキネティクス、血液学的検査及び血液生化学検査を実施した。最終投与後の動物は試験から解放した。

死亡例、有害な臨床症状及び体重への毒性学的影響は認められなかった。予期されたとおり、試験期間を通じてすべての個体で、循環血中の被験薬による用量に比例したアルカリホスファターゼ活性の著しい上昇が認められた。 試験期間中に 3 匹でアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の一過性上昇が認められたが、いずれも臨床症状や有害所見を伴わず、臨床的又は生物学的関連性はないと考えられた。以上、幼若カニクイザルに ALXN1215 を最高 180 mg/kg まで単回静脈内投与した場合に良好な忍容性が確認された。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

ALXN1215 の反復投与毒性試験として、ラットでの 1 ヵ月間 MTD 試験、主要な試験としてラット及びサルを用いた 1 ヵ月間確定毒性試験、及び 6 ヵ月間慢性毒性試験を実施した。1 ヵ月間 MTD 毒性試験は、幼若ラットに ALXN1215 を週 1 回 4 週間投与した。 1 ヵ月間及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験は幼若ラット及び幼若サルを用いて実施した。初回投与時にラットは、生後 21～24 日齢、サルは約 12 ヵ月齢であった。MTD 試験以外の反復投与毒性試験はすべて GLP に準拠し実施した。

2.6.6.3.1 70385 試験：ALXN1215（sALP-FcD10）の Sprague-Dawley 系幼若ラットの静注最大耐用量毒性試験

幼若ラットにおいて ALXN1215 を週 1 回 4 週間静脈内投与した際の最大耐用量を決定する GLP 非適合試験を実施した。試験デザインを表 2.6.6.3.1-1 に、試験結果を 2.6.7.6 項に記載する。

表 2.6.6.3.1-1 70385 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Animals	
					Male	Female
Asfotase alfa (sALP-FcD10)	Dose 1	IV Injection	10	2.0	3	3
	Dose 2	IV Injection	30	6.0	3	3
	Dose 3	IV Injection	90	18	3	3
	Dose 4	IV Injection	180	36	3	3

ラットに ALXN1215 10、30、90 又は 180 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）を週 1 回静脈内投与した。初回投与時のラットの日齢は 22～24 日齢であった。試験期間中の評価項目は死亡率、一般症状観察、体重測定、血液学的検査及び血液生化学検査を実施した。投与終了後に剖検し、特定臓器について重量の測定及び病理組織学的観察を行った。

死亡例はなく、体重、臓器重量及び試験中の凝固パラメータに有意な影響は見られなかった。90 又は 180 mg/kg の初回投与直後に、投与に伴う急性反応として、運動性低下及び四肢／耳介／鼻口部のわずかな腫脹が認められた。四肢に皮膚変色（赤色化又は青色化）も見られた。高用量投与群では過度のひっかき行動、立毛及び過呼吸が発現した。10 又は 30 mg/kg 群では 1 日目の単回投与後に投与に伴う反応は見られなかったが、高用量群で認められた反応の兆候が、2 回目投与時の 8 日目、15 日目及び 22 日目の投与後にすべての個体で認められた。投与に伴う反応に性差はなかった。これらの反応は一過性だったが、特に 180 mg/kg 投与群では投与回数に伴い重度なものも見られた。

予想されたとおり、試験期間を通じてすべての個体で、循環血中の被験薬による用量に比例したアルカリホスファターゼ活性の上昇が見られた。30、90 及び 180 mg/kg 投与群でわずかな血小板数減少及び網状赤血球数増加が見られたが、いずれも用量依存性は認められなかった。高用量群（90 及び 180 mg/kg）では、肉眼及び病理組織学的観察でごく軽度から軽度の胃粘膜びらん／胃潰瘍が部分的に認められた。

投与直後に認められた急性所見を除けば、ALXN1215 の忍容性は一般に良好だった。180 mg/kg 投与群の 2 匹で見られた一般症状は非常に重度であったことから、主要な試験では 180 mg/kg の用量を検討しないこととした。

2.6.6.3.2 670314 試験：28 日間回復期間設定 ALXN1215（ENB-0040）の幼若アルビノラットの 4 週間（週 1 回）静脈内投与毒性試験

幼若ラット（21～24 日齢）に ALXN1215 を週 1 回 4 週間（1、8、15 及び 22 日目に）連続して静脈内投与した際の影響を検討する GLP 適合試験を実施した。最終投与後に 28 日間の回復期間を設け、遅発性又は持続的な影響の有無を評価した。試験デザインを表 2.6.6.3.2-1 に、試験結果を 2.6.7.7A 項に記載する。

表 2.6.6.3.2-1 670314 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Actual Dose (mg/kg)	Actual Dose Concentration (mg/mL)	Main Study		Recovery Study	
					Male	Female	Male	Female
Asfotase Alfa	Vehicle	IV Injection	0	0	10	10	5	5
	Dose 1	IV Injection	2.6	0.5	10	10	5	5
	Dose 2	IV Injection	26	5.1	10	10	5	5
	Dose 3	IV Injection	77	15.3	10	10	5	5

ラットに ALXN1215 0、3、30 又は 90 mg/kg を週 1 回投与する計画であったが、実際の 1 回投与量はそれぞれ 0、2.6、26 又は 77 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）であった。主試験群及び回復試験群ともに生後 21 日目から投与を開始した。4 週間（計 4 回）の投与期間終了後の 29 日目に 1 群当たり雌雄 10 匹ずつを安楽死させ、残りの 1 群当たり雌雄 5 匹ずつは 28 日間の回復期間を経た 57 日目に安楽死させた。試験期間中の評価項目は、死亡率、一般症状観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、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、オステオカルシン（骨形成マーカー）及び C-テロペプチド（骨吸収マーカー）、二重エネルギーX 線吸収（DXA）法及び末梢定量的 CT（pQCT）法による骨密度測定、X 線検査、剖検時の頭-臀長及び肉眼所見、臓器重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

高用量群（77 mg/kg）で 25 日目に雄 1 匹が死亡したが、剖検及び病理組織学的検査では死因を特定できなかった。最終投与の 22 日目には毒性徴候が認められないことから、23 日目にトキシコキネティクス用の血液試料を採取したことが死亡に寄与した可能性が推測される。

2.6、26 及び 77 mg/kg 投与群で投与に伴う急性反応が発現した。認められた変化は、投与後 5、15、30 及び 60 分の一般症状観察で、半眼、筋緊張低下、側臥、円背位、低体温、非協調運動、運動性低下、歩行異常、後肢／前肢足蹠の変色（赤色化又は青色化）／硬い腫脹が認められた。いずれの変化も一過性であり、溶媒対照群では見られず、投与期間中においても投与日以外及び回復期には発現しなかった。

体重減少／体重増加率の低下（7.4～12.1%）が回復期間中、雄のみに用量依存的にわずかに認められた。雄に見られた体重減少は一般に摂餌量の低下を伴った。回復期間終了時の骨面積や骨

塩量（DXA 法）が対照群と比べて実薬投与群の雄で一般に低く（4～16%の減少）、骨量が少ないことを示していた。雄の骨量に対する影響は、DXA 法又は pQCT 法を用いて 2 本の四肢骨（大腿骨が 1～23%の減少、脛骨が 3～14%の減少）で測定した。ただし、軸骨格に対して一定の影響は見られず、頭-臀長にも影響はなかった。骨塩密度は一般に対照動物と同等だったことから、観察された所見は主に骨の大きさに対する影響に関係するものと思われる。回復期の評価動物数は少なく、雌雄のデータはばらつきが大きく一貫性もないことから結果の解釈は難しい。よって偶発的な影響を否定できない。

眼科的所見、尿検査、血液生化学的検査、頭-臀長、臓器重量、剖検所見、X 線及び病理組織学的所見には、ALXN1215 に関連した影響は見られなかった。異所性石灰化も認められなかった。血液学的検査値に生物学的に意味のある変動はなかった。77 mg/kg 投与群では一般に好中球数、単球数及び好酸球数が対照群と比べてやや減少していた（それぞれ最大 26%、11%及び 23%の減少）。また、リンパ球数、血小板数及び網状赤血球数も対照群と比べてやや増加していた（それぞれ最大 12%、14%及び 23%の増加）。77 mg/kg 群では、回復期終了時の検査結果でもこれら変化がわずかに残っていた。回復期後に遅発毒性作用は見られなかった。

ALXN1215 投与群では、溶媒対照群と比べて用量依存性にアルカリホスファターゼ活性が増加していた。その他の肝酵素に変動はなく、関連した病理組織学的所見も認められなかったことからアルカリホスファターゼ活性の上昇は循環血中の ALXN1215 に起因すると考えられる。77 mg/kg 群の雄で 4 週目にわずかだが統計的に有意な血清リンの増加（15.4%）が認められた。この変化は、有意差は示さないが血清総カルシウムの増加を伴っていた。回復期終了時の検査値はすべて投与前のレベルに戻っていた。

ALXN1215 投与群の C-テロペプチド平均値が雌 77 mg/kg 群で対照群と比べてやや減少した（統計的有意差あり）。この減少は骨密度データとの関連性はなく、雄では C-テロペプチド値に変動がみられなかったことから、偶発的な所見と思われる。ALXN1215 投与群でオステオカルシン値に変化はみられなかった。

以上、幼若ラットに ALXN1215 0、2.6、26 又は 77 mg/kg を週 1 回 4 週にわたり静脈内投与したところ、限定的な影響が認められた。一貫して認められたのは、投与 60 分後までの一過性の反応であった。ラットで実施したすべての静脈内投与毒性試験で認められた投与に伴う急性反応の原因の検討と考察は 2.6.2 項に記載する。ラットの静脈内投与試験で見られた投与後反応の典型的な一般症状は、サル及びウサギの静注及び皮下投与後には認められず、ラットの皮下投与後にも認められなかった。したがって、この所見の臨床的意義は不明である。77 mg/kg 群の雄でわずかだが統計的に有意な血清リンの増加が認められた。投与期間中に雄の骨密度に生物学的に意味のある影響はみられなかった。しかし、投与期間中に雄の体重、骨密度、骨面積、骨塩量及び骨形状はやや減少しており、この傾向は回復期終了時にも認められた。雌では C-テロペプチド平均値が対照と比べてやや減少したが、投与期間中も回復期間中も骨密度や骨形状に有意な又は一貫した影響は認められなかった。投与期間終了時及び回復期間終了時に異所性石灰化の所見は認められなかった。いずれの用量群でも ALXN1215 投与と関連する X 線所見、剖検所見及び病理組織学的所見はなかった。2.6 及び 26 mg/kg 群では、投与に伴う反応は一過性で毒性評価項目に影響を及ぼさなかったことから、有害作用ではないと判断した。77 mg/kg 群では投与に伴う反応が重度で、雄に体重増加率の低下、摂餌量の減少及び骨成長の抑制傾向が認められた。以上の結果に基づき、幼若ラットに 4 週間投与した場合の無毒性量（NOAEL）は 26 mg/kg/週と推察された。

2.6.6.3.3 1007-1503 試験：28 日間回復期間設定 ALXN1215（ENB-0040）の幼若カニクイザルの 4 週間静脈内投与毒性試験

幼若カニクイザル（～1 歳）に ALXN1215 を週 1 回 4 週間連続して（1、8、15 及び 22 日目に）緩徐静脈内投与した際の影響を検討する GLP 適合試験を実施した。最終投与後に 28 日間の回復期間を設け、遅発性又は持続的な影響の有無を評価した。試験デザインを表 2.6.6.3.3-1 に、試験結果を 2.6.7.7B 項に記載する。

表 2.6.6.3.3-1 1007-1503 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	Main Study		Recovery Study	
					Male	Female	Male	Female
Asfotase Alfa	Vehicle	IV Injection	0	0	3	3	2	2
	Dose 1	IV Injection	5	1.25	3	3	2	2
	Dose 2	IV Injection	15	3.75	3	3	2	2
	Dose 3	IV Injection	45	11.25	3	3	2	2

カニクイザルに ALXN1215 0、5、15 又は 45 mg/kg（投与液量 4 mL/kg）を週 1 回静脈内投与した。4 週間の投与期間終了後の 29 日目に 1 群当たり雌雄 3 匹ずつを安楽死させ、残りの 1 群当たり雌雄 2 匹ずつは 28 日間の回復期間を経た 57 日目に安楽死させた。試験期間中及び終了時の評価項目は、死亡率、一般症状観察、体重及び摂餌量測定、身体測定値、骨の発達の X 線検査、眼科学的検査、心電図、トキシコキネティクス（2.6.4.3.4.4 項参照）、免疫原性検査（2.6.4.3.4.4 項参照）、血液学的検査、凝固パラメータ測定、血液生化学検査、尿検査、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査を実施した。また、X 線検査、骨塩密度（DXA 法及び pQCT 法）、身体的検査及びバイオマーカー（オステオカルシン及び C-テロペプチド値）測定を実施し石灰化に関係する変化を評価した。

試験期間中に死亡例はなく、一般症状、体重増加率又は摂餌量ともに ALXN1215 と関連する影響は認められなかった。また、いずれの用量群においても眼科学的所見、心電図所見、血液学的検査、凝固パラメータ及び尿検査に ALXN1215 の投与に関連する変動はみられなかった。

投与期間及び回復期終了時の身体測定値では、頭囲、上腕長、前腕長、大腿長及び下腿長に特記すべき群間差は認められなかった。

投与期間中又は回復期間中の血液生化学的検査値に毒性学的に有意な変化はなかった。投与期間中は ALXN1215 を投与したすべての個体でアルカリホスファターゼ活性が用量依存性に上昇した。アルカリホスファターゼ活性は回復期終了時では概ね対照と同等の値を示した。ALXN1215 は遺伝子組換えアルカリホスファターゼであり、投与後に血中に存在している ALXN1215 のアルカリホスファターゼ活性が測定されたと考えられ、よって有害作用にはあたらないと推察した。

投与期間及び回復期間終了時の絶対及び相対臓器重量、剖検所見及び病理組織学的所見に ALXN1215 投与の影響は認められず、特記すべき群間差は認められなかった。また、異所性石灰化の所見もみられなかった。溶媒対照群を含むすべての治療群において生殖器官は一般に未成熟

であったが、これは被験動物の年齢と発達段階を考えれば正常の所見であった。

X 線検査、骨密度（pQCT 及び DXA 法）及び血中骨代謝マーカーは対照群と ALXN1215 投与群とで差異は認められなかった。以上の結果から、幼若カニクイザルに ALXN1215 を最高 45 mg/kg まで 4 週間にわたり反復静脈内投与しても骨の発達に有害作用は認められないことが示された。

雌雄のカニクイザルに ALXN1215 0、5、15 又は 45 mg/kg を週 1 回 4 週間にわたり静脈内投与し、その後 4 週間の回復期間を設定した本試験では、いずれの用量群においても毒性を示す変動は認められなかった。したがって、検討した最高用量である 45 mg/kg/週が NOAEL と推察した。

2.6.6.3.4 670315 試験：28 日間回復期間設定 ALXN1215（ENB-0040）の幼若アルビノラット 26 週間静脈内投与毒性試験

幼若ラットに ALXN1215 を毎日 1 回 26 週間にわたり緩徐静脈内投与した際の影響を検討する GLP 適合試験を実施した。最終投与後には 28 日間の回復期間を設け、遅発性又は持続的な影響の有無を評価した。試験デザインを表 2.6.6.3.4-1 に、試験結果を 2.6.7.7C 項に記載する。

表 2.6.6.3.4-1 670315 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Dose (mg/kg)	Dose Conc. (mg/mL)	Main Study		Recovery Study		TK Study	
				Male	Female	Male	Female	Male	Female
Asfotase Alfa	Vehicle	0	0	12	12	6	6	3	3
	Dose 1	1	0.2	12	12	6	6	9	9
	Dose 2	3	0.6	12	12	6	6	9	9
	Dose 3	13	2.6	12	12	6	6	9	9

ラットに ALXN1215 0、1、3 又は 13 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）を毎日 1 回静脈内投与した（週間総用量 91 mg/kg まで）。高用量は、それが有害であると考えられる影響を引き起こした 4 週間投与試験で使用される高用量（77 mg/kg/week）と同様であったという観察に基づいて選択された。また、高用量は、mg/kg/week ベースにおいて予想される臨床用量よりも 10 倍以上高かった。

用量は、実質 77 mg/kg/回の高用量を週 1 回投与で実施した 4 週間毒性試験の結果を参考に設定した。生後 21 日目より投与を開始した。　毒性評価項目は、一般症状観察、眼科学的検査、体重及び摂餌量測定、血液学的検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。骨代謝マーカーであるオステオカルシン（骨形成マーカー）及び C-テロペプチド（骨吸収マーカー）の血中濃度、骨密度（DXA 法）、骨形状（pQCT 法）及び骨の蛍光骨標識法の骨関連検査を実施した。主試験終了時には剖検、身体測定（頭-臀長）及び特定骨組織の X 線検査を実施した。一部の組織（頭蓋冠、第 5、6 腰椎、下顎骨、左大腿脛骨関節／脛骨足根骨関節）について骨異常及び異所性石灰化の有無を検討した。ALXN1215 のトキシコキネティクス及び抗薬物抗体（ADA）の測定も実施した（2.6.4 項参照）。

発育に関する評価項目は、 機能観察バッテリー（FOB）、運動能、聴覚性驚愕馴化、Cincinnati 水迷路、身体発育（膣口又は包皮腺開裂）、性周期及び雄の生殖能の測定を実施した。

試験中に 9 匹が死亡したが、いずれも ALXN1215 の投与に関連しない死亡と考えられた。投与期間中に 4 匹（各群 1 匹）は注射部位の損傷による瀕死例であり、病理組織学的検査で血管周囲

／血管の炎症や壊死が認められた。4 匹（対照群の雌 2 匹、低用量群の雌 2 匹）の死因は特定できなかった。また、回復期間中に死亡した中用量群の雌 1 匹は、血液採取（頸静脈穿刺）に起因するとみられる腋窩骨格筋の出血が死因と推察された。

体重、摂餌量、眼科学的所見、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、骨代謝マーカー、骨密度及び骨形状（DXA 法及び pQCT 法）、蛍光骨標識、行動観察、身体発育、性周期、雄の生殖能、臓器重量、X 線検査、異所性石灰化、剖検所見及び病理組織学的所見に生物学的に意義のある変化は認められなかった。

1、3 及び 13 mg/kg 投与群で、ALXN1215 に関連した急性の一般症状として前後足及び鼻口部に時に腫脹を伴う発赤が見られた。これらの変化は投与期間を通して各投与後に認められ、13 mg/kg 投与群ではこうした所見が常に発現した。二次行動として、過度の毛づくろいと、時にひっかいたり舐めたりする行動が 21 週目まで持続した。早い場合は投与初日、投与 15 分後にこうした反応が認められた。一般に、急性症状の重症度は溶媒対照群や低用量群と比べて 3 及び 13 mg/kg 投与群で強く、投与 6 時間後まで観察したうちの特に 15 分後及び 1 時間後で顕著だった。症状は翌日の投与前には消失しており、回復期間中は発現しなかった。

投与期間を通じ、ALXN1215 投与群では対照群と比べて血中アルカリホスファターゼ活性が用量依存的に上昇していた。このアルカリホスファターゼ活性の上昇は循環血中の ALXN1215 によると考えられた。回復期終了時には正常値範囲内に戻っていた。

以上、幼若ラットに ALXN1215 1、3 又は 13 mg/kg を毎日 1 回 26 週間にわたり静脈内投与した結果、一過性の一般症状として投与 1 時間以内に前後足及び鼻口部に時に腫脹を伴う発赤が認められた。こうした所見は投与期間を通じて発現し、特に 13 mg/kg 投与群では常に認められた。試験期間中、体重、摂餌量、眼科学的所見、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、骨代謝マーカー、骨密度及び骨形状（DXA 法及び pQCT 法）、蛍光骨標識、行動遂行、身体発育、発情周期、臓器重量、体重、頭臀長、X 線検査、肉眼所見、顕微鏡所見、異所性石灰化及び雄の生殖能に生物学的に意味のある変化は認められなかった。循環血中の ALXN1215 投与に起因すると思われるアルカリホスファターゼ活性の上昇が見られた。投与期間を通じて一過性の一般症状に変化が認められたが、1、3 及び 13 mg/kg 投与群ともに完全に可逆性を示し、毒性評価項目に影響はなかったことから、NOAEL は 13 mg/kg/日とした。

2.6.6.3.5 670338 試験：4 週間回復期間設定 ALXN1215 （ENB-0040）の幼若サルの 6 ヵ月間反復投与毒性骨試験

幼若カニクイザルに ALXN1215 を毎日 1 回皮下投与した際の影響を検討する GLP 試験を実施した。試験デザインを表 2.6.6.3.5-1 に、試験結果を 2.6.7.7.D 項に記載する。

表 2.6.6.3.5-1 670338 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Dose Conc. (mg/mL)	Main Study		Recovery Study	
					Male	Female	Male	Female
Asfotase alfa	Vehicle	SC Injection	0	0	3	3	2	2
	Dose 1	SC Injection	0.43	1.72	3	3	2	2

	Dose 2	SC Injection	2.14	8.56	3	3	2	2
	Dose 3	SC Injection	10	40	3	3	2	2

約 365 日（1 年）齢の幼若カニクイザルに ALXN1215 0、0.43、2.14 又は 10 mg/kg（投与液量 0.25 mL/kg）を毎日 1 回皮下投与した（週間総用量 70 mg/kg まで）。用量は、45 mg/kg/週の高用量を週 1 回投与で実施した 4 週間毒性試験の結果を参考にし、4 週間試験では有害所見が見られなかったことから、本試験では週間用量をやや高めに設定した。また、高用量は、mg/kg/week ベースにおいて予想される臨床用量よりも少なくとも 10 倍高かった。6 ヵ月間の投与期間終了後に 1 群当たり雌雄 3 匹ずつを安楽死させ、残りの 1 群当たり雌雄 2 匹ずつは 28 日間の回復期間終了後に安楽死させた。毒性評価項目は、一般症状観察、体重及び摂餌量測定、眼科学的検査、心電図（ECG）検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査（骨を含む）を実施した。骨への影響は骨代謝の生化学マーカー（オステオカルシン、I 型プロコラーゲン、N 末端プロペプチド、C-テロペプチド及び N-テロペプチド）並びに骨塩密度（DXA 法及び pQCT 法）と蛍光骨標識法（安楽死 15 日前及び 5 日前に蛍光標識剤を投与）を実施した。TK 及び ADA 解析用の血液試料も採取した（2.6.4.3.4.5 項参照）。

いずれの用量でも臨床的に意味のある有害所見を認められず、試験中に死亡例はなかった。すべての個体の体重、摂餌量、眼科学的所見（眼組織内の異所性石灰化を含む）、心電図、血液学的検査、尿検査、骨代謝の生化学マーカー、骨密度及び骨形状、臓器重量及び肉眼所見に ALXN1215 と関連する変化はみられなかった。

投与期間を通じ、ALXN1215 投与群では対照群と比べて血中アルカリホスファターゼ活性が用量依存的に上昇していた。28 日間の回復期間終了時に、0.43 mg/kg 投与群ではアルカリホスファターゼ活性が依然として高く、2.14 mg/kg 投与群の雄でも程度は軽いがやはり高かった。2.14 mg/kg 投与群の雌及び 10 mg/kg 投与群（雌雄）では投与前のレベルに戻っていた。ALXN1215 はヒト組織非特異的アルカリホスファターゼの可溶性部分を含む組換えタンパク質であることを考えれば、アルカリホスファターゼ活性の上昇は血中に存在している ALXN1215 によると思われた。

骨塩密度（pQCT 法）、骨塩量（BMC）及び骨面積の測定を行った。全動物の第 1～第 4 腰椎、右大腿近位部及び全身の骨密度を測定した。各個体の右脛骨近位部の骨塩量、骨密度及び骨形状を pQCT 法により測定した。脛骨近位部の骨幹端と骨幹でそれぞれ単一スキャンを行った。骨幹端スキャンでは、切片全体、又は骨梁及び皮質/皮質下の骨面積、骨塩量及び骨密度を測定した。骨幹部のスキャンでは、全骨面積、皮質骨塩量、皮質骨塩密度、皮質骨面積、皮質骨厚、骨膜周囲長及び骨内膜周囲長を測定した。骨量（脛骨幹端や腰椎）及び皮質骨厚（脛骨幹）の増加傾向が認められた。しかし、各群の個体数が少なく幼若動物であるために個体差が大きいと考えられ、有益作用に関する評価はできなかった。全般的に、この試験に用いた評価項目では対照と比べてほとんど差が見られないか、影響のパターンに一貫性が認められなかった。頭蓋冠の冠状縫合及びラムダ縫合を含む 2 ヵ所で評価を行った。年齢不相応の異常や早期癒合はみられなかった。この結果から、ALXN1215 を 6 ヵ月間投与した場合にみられる骨の成長及び構造に対する影響は偶発的なもののみであると判断した。

主試験群及び回復群で、対照群を含むすべての用量群の雌雄で骨密度及び骨形状の評価項目の数値が経時的に増加を示すも、正常な骨の成長が認められた。これは使用したサルが試験開始時には非常に若く、試験期間中に急速に成長した結果である。観測された骨の成長は予測されたこ

とであり、データ解釈の妨げにはならなかった。0.43、2.14 及び 10 mg/kg 投与群では注射部位皮膚に痂皮、乾燥、発赤などの臨床症状が認められた。これらの所見は注射部位に限局しており、対照群では認められなかった。回復期間終了時には部分的又は完全に消失していた。病理組織学的検査では、0.43 mg/kg 以上の用量群で ALXN1215 に関連する所見として、注射部位に限局性の石灰化と単球浸潤を伴う限局性の肉芽腫性炎症が認められた。これらの所見は注射部位に限局しており、その他の組織には肉芽腫炎、石灰化（異所性石灰化）及び血管周囲の単球浸潤が認められなかった。2.14 mg/kg 用量群の雄 1 匹（No.302）では、注射部位 4 ヵ所のうち 1 ヵ所で筋肉層の変性／壊死がわずかに認められた。石灰化は、壊死の有無にかかわらず炎症部位ではよく見られる所見である。4 週間の回復期間後に、注射部位の炎症の頻度及び重症度は低下しており、高用量群の一部で局所的な軽い炎症が見られるのみだった。

以上、幼若カニクイザルに ALXN1215 0.43、2.14 又は 10 mg/kg を毎日 1 回 6 ヵ月間皮下投与した結果、注射部位皮膚に痂皮、乾燥、発赤などの症状認められた。試験期間中、体重・摂餌量測定、眼科学的検査（眼組織内の異所性石灰化を含む）、心電図、血液学的検査、血液生化学検査、尿検査、骨代謝の生化学マーカー測定、骨密度及び骨形状（DXA 法及び pQCT 法）、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検査に生物学的に意味のある変化は認められなかった。循環血中の ALXN1215 によると思われるアルカリホスファターゼ活性の上昇が見られた。骨量（脛骨幹端や腰椎）及び皮質骨厚（脛骨幹）の増加傾向が認められたが、ALXN1215 と関連する明確な影響ではなかった。ALXN1215 の投与によって骨の成長が遅延や、何らかの悪影響を受けたことを示す所見はなく、どの組織でも異所性石灰化を示す証拠はなかった。頭蓋冠の冠状縫合及びラムダ縫合を含む 2 ヵ所を測定したが、年齢不相応の異常（早期癒合など）は認められなかった。ALXN1215 投与群のすべてで注射部位に石灰化（異所性石灰化）と単球浸潤を伴う限局性の肉芽腫炎が見られたが、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、高用量群の一部で局所的な軽い炎症が残るのみだった。試験中に発現した異所性石灰化あるいは石灰化として特徴づけられる注射部位の一般症状は部分的又は完全な回復性を示す、忍容性は良好だったことから、NOAEL は 10 mg/kg/日とした。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

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。

2.6.6.5 がん原性試験

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。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

以下にまとめた試験デザインは、ICH S5（R2）の「医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドライン」に準拠している。ALXN1215 は、全身曝露を最適化するために、IV 経路により毎日投与された。

2.6.6.6.1 902230 試験：ALXN1215（ENB-0040）の雄ラットのパイロット静脈内投与毒性試験（用量範囲設定）

ラットにおける生殖試験での用量範囲を確認するための用量設定試験として GLP 適合試験を実施した。試験デザインを表 2.6.6.6.1-1 に、試験結果を 2.6.7.11 項に記載する。

表 2.6.6.6.1-1 902230 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL)	Animal Number (Male)
Asfotase Alfa	Vehicle	IV Injection	0	0	10
	Dose 1	IV Injection	25	5	10
	Dose 2	IV Injection	50	10	10

雄ラットに ALXN1215 0、25 又は 50 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）を 1 日 1 回 15 日間にわたり緩徐静脈内投与した。評価項目は、一般症状観察、体重及び摂餌量測定、臓器重量測定及び剖検を実施した。

ラットで ALXN1215 静脈内投与後に見られる典型的な一過性一般症状として鼻口部及び四肢の皮下発赤及び腫脹が認められた。これらの一般症状は一般に 1～4 時間で消失し、鼻口部及び前後足の皮膚発赤と腫脹などを伴っていた。主に 25 又は 50 mg/kg 投与群の最初の数回の投与後に、一部の個体で歩行異常、運動性低下、側臥及び協調性不全が見られた。25 及び 50 mg/kg 投与群では体重増加率が減少し、50 mg/kg 投与群では摂餌量のわずかな減少を示した。臓器重量及び剖検所見に影響は認められなかった。

一般症状に認められた変化は一過性であり体重増加率への影響も小さかったことから主たる試験における用量は 25 及び 50 mg/kg が妥当と推察された。

2.6.6.6.2 902233 試験：ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による胚･胎児発生試験のための用量設定試験

後に実施するラットにおける実胚･胎児発生試験の用量を設定のための情報を得るとともに､妊娠及び胚･胎児発生に対する ALXN1215 静脈内投与の影響を予備的に検討する GLP 適合試験を実施した。三極調和の ICH ガイドラインに基づく生殖毒性評価の C～D 段階に準拠して実施した。試験デザインを表 2.6.6.6.2-1 に、試験結果を 2.6.7.11 項に記載する。

表 2.6.6.6.2-1　902233 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL)	Animal Number (Female)
Asfotase Alfa	Vehicle	IV Injection	0	0	7
	Dose 1	IV Injection	13	2.6	7
	Dose 2	IV Injection	25	5	7
	Dose 3	IV Injection	50	10	7

雌ラットに ALXN1215 0、13、25 又は 50 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）を妊娠 6 日目～19 日目の 14 日間連続 1 日 1 回 1 分間の緩徐静脈内投与した。試験期間を通じて 1 日 2 回の一般症状を観察した。詳細な観察を妊娠 6～9 日目の投与前、投与 15 分後、1 時間後及び 4 時間後及び、定期的な体重測定日の投与 1 時間後に実施した。体重測定は妊娠 0、3、6、9、12、15、18 及び 21 日目に実施した。摂餌量は妊娠 3～6、6～9、9～12、12～15、15～18 及び 18～21 日目に測定し記録した。妊娠 21 日目に全例について剖検し、卵巣を含む生殖器官を摘出して黄体数を記録した。妊娠子宮の重量を計測し、胎盤を含む子宮内容を観察し、生存胎児及び死亡胎児の数と位置、早期及び後期吸収胚数、着床部位を記録した。各胎児の重量を計測し、外観検査を行い、性別を記録した。

いずれの投与群においても、投与直後に発現し、4 時間以内に消失した一過性の一般状態の変化が発現した。これらの変化はラットに ALXN1215 を静脈内投与後に見られる典型的な症状であった。具体的には、前後肢、足蹠及び鼻口部に皮膚の発赤を伴う腫脹が認められた。50 mg/kg 投与群の 2 匹に半眼が見られたが投与 1 時間後までに消失した。摂餌量が投与開始から 3 日間は 50 mg/kg 投与群でわずかに減少した。卵巣及び子宮の評価項目に特記すべき所見はなかった。また、胎児の成長、生存率及び形態にも影響はみられなかった。主たる胚･胎児発生試験の用量は 13、25 及び 50 mg/kg/日が妥当と判断した。

2.6.6.6.3　902231 試験：ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による受胎能及び初期胚発生に関する試験

ラットに ALXN1215 を静脈内投与し、親（F_0）世代の生殖･受胎能及び一次（F_1）世代の子宮内初期胚発生に及ぼす影響を検討する GLP 適合試験を実施した。試験デザインを表 2.6.6.6.3-1 に、試験結果を 2.6.7.12 項に記載する。

表 2.6.6.6.3-1　902231 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	No. of Animals	
					Male	Female
Asfotase Alfa	Dose 1	IV Injection	0	0	25	25
	Dose 2	IV Injection	10	2	25	25
	Dose 3	IV Injection	25	5	25	25
	Dose 4	IV Injection	50	10	25	25

ラットに ALXN1215 0、10、25 又は 50 mg/kg を 1 日 1 回静脈内投与、雄では 9 週間／63～67

日間以上静脈内投与し、最終投与日に剖検を行った。交配前の投与期間は雄が 28 日間、雌が 14 日間であった。交配期間中も ALXN1215 の投与を継続し、雌には交配後 7 日目まで投与を継続した。投与液量は 5 mL/kg とし、1 回用量を 1 分間かけて外側尾静脈に緩徐に静注した。

試験期間を通じて、一般状態の観察及び死亡・瀕死状態の確認を 1 日 2 回行った。毒性及び生殖機能の評価項目は、一般症状観察、体重及び摂餌量測定、性周期、交尾行動、剖検、卵巣と子宮の検査及び雄の生殖能（精子の数、運動性及び形状観察）検査を実施した。妊娠雌は妊娠 13 日目に、雄は交配期間終了後 3 週間以上経過してから安楽死させた。

ラットにおける ALXN1215 静脈内投与後に見られる典型的な一過性の一般症状は、50 mg/kg 投与群で投与第 1 週目に前後足蹠及び鼻口部の皮膚青色化、50 mg/kg 投与群の特に雌で投与初日における活動性低下、25 及び 50 mg/kg 投与群の雄のみで投与第第 1 週目に左右眼窩周囲組織の腫脹が見られた。投与期間を通じ、いずれの投与群においても散発的に四肢/足蹠及び下顎／鼻口部又は口部の軟性腫脹が見られた。これらの変化はいずれも投与期間中の一過性の症状であり、一般に翌日の投与前には軽減又は消滅していた。雄では体重の減少が認められたが、雌では 50 mg/kg 投与群においても体重の減少は見られなかった。摂餌量に群間差はなかった。

雌では平均発情期日数、性周期数及び平均性周期長に変動はなかった。交配までの平均日数、交尾率、妊娠率及び受胎率に ALXN1215 投与の影響はみられなかった。生存胚が 1 群～4 群のそれぞれ 22 匹、24 匹、25 匹及び 25 匹の雌で確認され、妊娠率はそれぞれ 88%、96%、100%及び 100%であった。雌生殖器官内の精子の確認による雄の交尾率は 1～4 群いずれも 100%であった。黄体数、着床痕、生存胚数、死亡胚及び吸収胚数、着床前及び着床後の胚損失率に ALXN1215 投与の影響はなかった。

臓器重量及び雄の生殖能（精子の数、運動性及び形状）にも影響は認められなかった。ALXN1215 の投与と関連する剖検で異常は認められなかった。

ラットに ALXN12151 0、25 又は 50 mg/kg を 1 日 1 回静脈内投与した結果、ラットに ALXN1215 を静脈内投与したこれまでの試験で投与後に認められた典型的な急性反応が発現した。50 mg/kg 投与群の雄では体重がわずかに減少した。50 mg/kg/日以下の用量では溶媒対照群と比べて受胎能及び初期胚・胎児発生に違いは見られなかった。この結果、雄での NOAEL は 25 mg/kg/日、雌での NOAEL は 50 mg/kg/日と考えられた。受胎能及び初期胚・胎児発生に関する NOAEL は 50 mg/kg/日と推察された。

2.6.6.6.4 902234 試験: ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による胚・胎児発生に関する試験

妊娠ラットに ALXN1215 を着床から硬口蓋閉鎖までの期間投与した際の母動物及び胚・胎児発生に及ぼす影響を検出する GLP 適合試験を実施した。三極調和 ICH ガイドラインの生殖毒性評価の C～D に準拠して実施した。試験デザインを表 2.6.6.6.4-1 に、試験結果を 2.6.7.13A 項に記載する。

表 2.6.6.6.4-1　902234 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL)	Animal Number (Female)
Asfotase Alfa (ENB-0040)	Vehicle	IV Injection	0	0	25
	Dose 1	IV Injection	13	2.6	25
	Dose 2	IV Injection	25	5	25
	Dose 3	IV Injection	50	10	25

Sprague Dawley 系の交配した雌ラット（各群 25 匹）に、ALXN1215 0、13、25 又は 50 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）を 1 日 1 回尾静脈への静脈内に妊娠 6 日目から 19 日目まで 14 日間投与した。

毒性評価項目は、一般症状観察、体重及び摂餌量測定及び分娩直前（21 日目）の帝王切開による子宮検査を実施した。妊娠 21 日目にすべての個体で卵巣を含む生殖器官を摘出し、黄体数を測定した。妊娠子宮の重量を計測し、胎盤を含む子宮内容を観察し、生存胎児及び死亡胎児の数と位置、早期及び後期吸収胚数、着床部位を観察した。各胎児は体重を測定、外観検査を行い、性別を（外観に基づき）記録した。同腹仔のうち約半数について頭部構造を含む内臓を検査した。残る半数は内臓を取り出し骨格検査を行った。毒性試験の一貫として TK 試験（902480 試験）を実施した（詳細は 2.6.4.3.5.1.1 項参照）。

ラットで ALXN1215 静脈内投与後に見られる典型的な一過性の一般症状として、すべての投与群で投与 15 分後から 4 時間後までに前後肢足蹠及び耳介の発赤、前後肢足蹠及び鼻口部の軟性腫脹が認められた。25 及び 50 mg/kg 投与群では活動性低下、半眼及び不規則性呼吸が投与 1 時間後まで見られた。50 mg/kg 投与群では前後肢足蹠の皮膚青色化及び一過性の協調運動不全が投与 1 時間後まで認められた。体重、体重増加率、補正体重、補正体重増加率及び摂餌量には影響は認められなかった。母動物では ALXN1215 と関連する肉眼的所見は認められなかった。

卵巣及び子宮の評価項目（黄体数、着床数、雄胎児数、雌胎児数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数、着床前及び着床後の胚損失率及び妊娠子宮重量）に影響は見られなかった。異所性石灰化の所見もなかった。胎児重量、重度及び軽度の奇形（外観、内臓及び骨格）及び一般的な骨格変異にも ALXN1215 の影響は認められなかった。

以上、ラットの妊娠 6 日目から 19 日目に ALXN1215 13、25 又は 50 mg/kg を 1 日 1 回静脈内投与した結果、一過性の一般症状に変化が認められた。胎児での異所性石灰化を示す所見はなかった。この結果から、母動物での NOAEL は 13 mg/kg/日とした。ALXN1215 の投与に関連した胎児毒性、胚致死性又は催奇形性を示す所見はなかったことから、胚･胎児発生に関する NOAEL は 50 mg/kg/日とした。

2.6.6.6.5　902236 試験：ALXN1215（ENB-0040）のウサギの静脈内投与による用量範囲設定及び胚･胎児発生に関する試験

ウサギで実施する胚･胎児発生試験における用量設定のための情報を得るとともに、妊娠及び胚･胎児発生に対する ALXN1215 の影響を予備的に検討する GLP 適合試験を実施した。ICH 調和三極ガイドラインの生殖毒性評価の C～D に準拠して評価を行った。試験デザインを表 2.6.6.6.5-1 に、試験結果を 2.6.7.11 項に記載する。

表 2.6.6.6.5-1　902236 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg/day)	Dose Conc. (mg/mL)	Animal Number (Female)
Asfotase Alfa (ENB-0040)	Vehicle	IV Injection	0	0	5
	Dose 1	IV Injection	6	3	5
	Dose 2	IV Injection	13	6.5	5
	Dose 3	IV Injection	25	12.5	5
	Dose 4	IV Injection	50	25	5

ウサギに ALXN1215 0、6、13、25 又は 50 mg/kg（投与液量 2 mL/kg）を 1 日 1 回、妊娠 7 日目から 19 日目まで投与した。交配した雌ウサギを各群 5 匹ずつ割り付けた。毒性評価項目は一般症状観察、体重及び摂餌量を測定した。妊娠 29 日目にすべての個体を剖検、卵巣を含む生殖器官を摘出して黄体数を記録した。妊娠子宮の重量を計測し、胎盤を含む子宮内容を観察し、生存胎児及び死亡胎児の数と位置、早期及び後期吸収胚数、着床痕数を記録した。各胎児の体重を計測し、外観検査を行い、睾丸／卵巣の有無による性別を記録した。TK 解析用の血液試料も採取した（2.6.4.3.5.2.1 項参照）。

死亡及び ALXN1215 に関連する一般症状の変化は見られなかった。25 及び 50 mg/kg 投与群では試験期間を通じて体重増加率がわずかに減少していた。摂餌量に ALXN1215 と関連する影響は見られなかった。

母動物で ALXN1215 に関連する剖検所見は認められなかった。妊娠率は各群とも 80%以上だった。黄体数、着床部位、生存及び死亡胎児数、性比、着床前及び着床後の胚損失率に ALXN1215 の影響は認められなかった。25 及び 50 mg/kg 投与群では早期及び後期吸収胚数がやや高かった。対照群では子宮内胚損失は見られなかったものの、25 及び 50 mg/kg 投与群での平均は試験実施施設の背景値の範囲内であった。いずれの投与群においても胎児重量の雌雄別平均及び総平均がやや低かったが、試験施設の背景値の範囲内であった。これは生存同腹仔数にばらつきがあったことが原因と推測される。胎児の外観に重度奇形及び軽度異常は見られなかった。

以上、ウサギの妊娠 7 日目から 19 日目に ALXN1215 6、13、25 又は 50 mg/kg を 1 日 1 回静脈内投与した結果、母動物への影響として 25 mg/kg 以上で体重増加率の減少が認められた。催奇形性は認められなかった。この結果に基づき、胚･胎児発生試験の用量設定は 10、25 及び 50 mg/kg/日が妥当と判断した。

2.6.6.6.6　902237 試験：ALXN1215（ENB-0040）のウサギの静脈内投与による胚･胎児発生に関する試験

New Zealand White（NZW）系妊娠ウサギにおいて ALXN1215 を着床から硬口蓋閉鎖までの期間投与した場合に母動物及び胚･胎児発生に及ぼす有害作用を検出する GLP 適合試験を実施した。三極調和 ICH ガイドラインの生殖毒性評価の C～D に準拠して実施した。また、妊娠ウサギでの ALXN1215 のトキシコキネティクスも解析した。試験デザインを表 2.6.6.6.6-1 に、試験結果を 2.6.7.13B 項の表に示す

表 2.6.6.6.6-1　902237 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Dose Concentration (mg/mL)	No. of Animals[a)]	
					Main Study	TK
Asfotase Alfa (ENB-0040)	Dose 1	IV Injection	0	0	20	2
	Dose 2	IV Injection	10	5	20	3
	Dose 3	IV Injection	25	12.5	20	3
	Dose 4	IV Injection	50	25	20	3

a)　全て雌

主試験用に各群 20 匹、TK 用の試料採取に各群 2 匹（対照群）又は 3 匹（ALXN1215 投与群）の妊娠雌ウサギを割り付けた。妊娠したウサギに ALXN1215 0、10、25 又は 50 mg/kg（投与液量 2 mL/kg）を 1 日 1 回、妊娠 7 日目から 19 日目まで 13 日間静脈内投与した。

評価項目は一般症状観察、定期的に測定した体重及び摂餌量とした。妊娠 29 日目にすべての個体の剖検、卵巣を含む生殖器官を摘出して黄体数を測定した。妊娠子宮の重量を計測し、胎盤を含む子宮内容を観察し、生存胎児及び死亡胎児の数と位置、早期及び後期吸収胚数、着床痕数を記録した。各胎児の体重を計測し、外観及び内臓検査を行い、性別を（内臓検査に基づき）記録した。各胎児を剖検し、骨格検査を行った。異常を認めた組織については病理組織学的観察を行った。TK 及び ADA 解析用の試料も採取した（2.6.4.3.5.2.2 項参照）。

試験期間中に ALXN1215 の投与に起因する死亡はなかった。一般症状、体重、体重変化率、補正体重、補正体重増加率及び摂餌量に対する ALXN1215 の影響は認められなかった。

50 mg/kg 投与群の母体 2 匹で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。いずれの母体も病理組織学的観察で両腎の主に外皮質に限局し観察された。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っている。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(2.6.6.10 項参照)。このように大量のカルシウムが排泄されることから、ウサギの腎臓では病理組織学的変化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。

卵巣及び子宮の観察（黄体数、着床痕数、生存胎児数、死亡胎児数、吸収胚数、着床前及び着床後の胚損失率）に ALXN1215 と関連する影響は見られなかった。胎児体重、重度の奇形、外観又は内臓の異常、軽度の骨格異常及び一般的な骨格変異にも ALXN1215 の影響は認められなかった。

以上、NZW 系ウサギの妊娠 7 日目から 19 日目に ALXN12151 0、25 又は 50 mg/kg を 1 日 1 回静脈内投与した結果、胎児毒性、催奇形性又は胚致死性を示す所見はなかったことから、胚･胎児発生に関する NOAEL は 50 mg/kg/日とした。50 mg/kg 投与群の 2 匹に腎尿細管の石灰化が見られた。これはおそらくウサギに特有の所見と思われるが、母動物での NOAEL は 25 mg/kg/日と推察した。

2.6.6.6.7 902238 試験：ALXN1215（ENB-0040）のラットの静脈内投与による出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験

Sprague Dawley（Crl;CD[SD]）系ラットに 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 適合試験を実施した。三極調和 ICH ガイドラインの生殖毒性評価の C～F に準拠して評価を行った。試験デザインを表 2.6.6.6.7-1 に、試験結果を 2.6.7.14 項に記載する。

表 2.6.6.6.7-1　902238 試験の試験デザイン

Test Article	Group	Treatment	Dose (mg/kg)	Dose Conc. (mg/mL)	Females (F_0)		Adults (F_1)	
					Main Study	TK	Male	Female
Asfotase Alfa (ENB-0040)	Vehicle	IV Injection	0	0	25	2	24	24
	Dose 1	IV Injection	10	2	25	6	22	22
	Dose 2	IV Injection	25	5	25	6	19	19
	Dose 3	IV Injection	50	10	25	6	23	23

妊娠ラットに ALXN1215 0、10、25 又は 50 mg/kg（投与液量 5 mL/kg）を 1 日 1 回妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで静脈内投与した。

親（F_0）世代の評価項目は、死亡･瀕死率、詳細な身体検査、症状観察、母性行動、体重及び摂餌量測定、分娩観察、トキシコキネティクス及び剖検を実施した。F_1 世代の仔ラットでの評価項目は、一般症状、生存率、体重及び身体発育を観察した。一次（F_1）世代の成獣ラットでの評価項目は、死亡･瀕死率、詳細検査、体重及び摂餌量測定、身体発育、視覚機能、行動機能、交配、分娩観察及び剖検を実施した。二次（F_2）世代の仔ラットでの評価項目は、一般状態、生存率及び体重測定を実施した。

ALXN1215 の投与と関連した死亡はなく、体重及び摂餌量に影響は見られなかった。ラットで ALXN1215 静脈内投与後に見られる典型的な一過性一般症状が認められた。 具体的には、前後足、耳介及び鼻口部の皮膚発赤、前後肢足蹠の皮膚青色化、鼻口部の皮膚青色化、前後足蹠及び後肢の腫脹、鼻口部の腫脹が認められた。

妊娠期間、分娩時間、出産率、生存新生児数、奇形新生児数、性比、着床痕数及び出生率に ALXN1215 と関連する影響はなかった。分娩後 5 時間以内に、母動物 6 匹（10 mg/kg 群の 1 匹、25 mg/kg 群の 3 匹、50 mg/kg 群の 2 匹）が出産した仔ラットの一部を食殺した（出産時、分娩後の処理中又は処理後すぐに死亡していたか、食殺の痕跡があり、安楽死させられていた）。このうち母動物の数匹では、食殺の形跡がある死亡新生児の数が多かった。分娩直後に食殺の行動を示した母動物の割合は、10 mg/kg 投与群及び 50 mg/kg 投与群では試験施設の背景データの範囲内（1 群当たり 0～2 匹）だったが、25 mg/kg 投与群ではやや高かった。ALXN1215 の投与と食殺行動との関連性は明確でないが、投与後の急性注射反応である可能性は否定できない。したがって、ALXN1215 の投与に伴う食殺行動の臨床使用への影響は明らかでない。分娩後 1 日目から 21 日目まで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ALXN1215の影響はなかった。F_0世代でもF_1世代児でも肉眼的所見にALXN1215投与の影響は見られなかった。

F_1世代の発育期に、50 mg/kg投与群の雄の出生児で体重増加率のわずかな低下、低体重及び摂餌量の減少が見られた。いずれの用量群も雌の出生児では体重及び摂餌量に影響は見られなかった。視覚性置き直し反応及び瞳孔反射、膣開口及び包皮分離までの平均日数は、母親へのALXN1215投与による影響は認められなかった。同様に、自発運動量、驚愕馴化及び水迷路を用いた初期行動発達においても影響は認められなかった。F_1世代の交尾率、受精率、受胎率及び交配までの平均日数は群間で差がなく、妊娠期間、分娩時間、出産率、生存新生児数、死亡新生児数、奇形新生児数、性比、着床痕数及び出生率も対照群と差が認められなかった。ALXN1215の投与と関連する剖検所見は認められなかった。F_2世代の仔ラットでは、同腹仔数、生存率及び一般状態に群間差はなかった。

以上、ラットの妊娠6日目から分娩後21日目にALXN12151 0、25又は50 mg/kgを静脈内投与した結果、F0世代（母動物）では投与期間を通じて投与4時間以内にいずれの投与群においても、ALXN1215投与後に見られる典型的な一過性臨床症状が発現した。分娩直後に食殺行動を示した母動物の割合はいずれの投与群でも低かったが、中用量群では3匹と、背景値の範囲（1群当たり 0～2 匹）を上回っていた。ALXN1215 の投与と食殺行動との関連性は明確でないが、投与後の反応である可能性は否定できない。50 mg/kg投与群のF_1世代の成獣ラットでは、離乳後の体重及び摂餌量がやや低かった。F_1世代及びF_2世代出生児の生存率、身体発育、行動機能及び生殖機能には影響がなかった。ALXN1215の投与と関連した異所性石灰化を示す所見はなかった。以上の結果から、NOAELは50 mg/kg/日と推測された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

上述した各GLP適合毒性試験及び70552 GLP試験において、ALXN1215を皮下投与又は静脈内投与した後の注射部位反応を検討した。ほとんどの試験で皮下投与後に軽度の局所刺激性が認められたが、一般に可逆性を示した。70552 皮下投与試験では Sprague-Dawley 系幼若ラットにALXN1215を1日1回4週間にわたり皮下投与し、忍容性は良好であった。ALXN1215と関連する所見として、0.84 mg/kg以上の1回用量では皮下投与部位の血管周囲／皮下にごく軽度～軽度の限局した単核細胞浸潤、8.4 mg/kg以上の1回用量ではわずかなリンパ組織過形成を伴う腋窩リンパ節の腫大が見られた。70552 試験は回復期間を設定しなかった。毒性試験における局所刺激性の評価結果はいずれも、ALXN1215の長期投与を否定するものではない。

2.6.6.8 その他の毒性試験（実施している場合）

上述した以外の毒性試験は実施していない。

2.6.6.9 考察及び結論

ALXN1215 の非臨床安全性試験として、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いた必要十分な一連の一般毒性試験及び生殖毒性試験を実施した。ALXN1215 を最長 6 ヵ月間にわたり、さまざまな用量で皮下又は静脈内投与を行った。ラットにおける静脈内投与による MTD を求める試験（ALXN12151 0、30、90 又は 180 mg/kg を週 1 回 4 週間投与）では、幼若ラット（投与開始時に 23～24 日齢）で投与に伴う急性反応が認められた。その主な症状は運動性低下と、四肢／肢足蹠／耳介／鼻口部にさまざまなパターンの軽度の皮下腫脹、四肢の皮膚変色（赤色化又は青色化）も見られた。最高用量では過度のひっかき行動、立毛及び過呼吸も認められた。これらの投与に伴う反応、特に足や鼻口部の腫脹及び発赤は、実施したラットの静注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。その他には生理学的観察で特に変化は見られなかった（2.6.2.4 項参照）。ラットでの急性反応は抗ヒスタミン薬又はステロイドである程度軽減するも、完全には消失しなかった（2.6.2.4.2.2 項参照）。さらに、注射反応の発現に補体活性化が関与することを示す証拠はなかった。ラットの静脈内投与毒性試験で見られた投与後反応の典型的な一般症状は、サル及びウサギの静注及び皮下投与後には認められず、ラットの皮下投与後にも認められなかった。したがって、この所見の臨床的意義は不明である。

ラットの 1 ヵ月間毒性試験では、ALXN1215 を実質的に 2.6、26 又は 77 mg/kg（計画用量は 3、30 又は 90 mg/kg）用量を週 1 回 4 週間静脈内投与した。ラットにおける MTD を求める試験と同様、一過性かつ用量及び時間依存性の運動性低下と、立毛、皮膚発赤及び前後肢足蹠の軽度の腫脹が認められた。これらの症状はすべて 24 時間以内に自然に回復した。77 mg/kg 投与群の 1 匹が最終投与の数日後に死亡したが、剖検で特に所見はなく、数日前の血液採取が関係していた可能性が示唆された。77 mg/kg 投与群の雄で摂餌量及び体重の減少が認められた。摂餌量及び体重の減少は、DXA 法及び pQCT 法による骨塩量及び骨面積の低下と関連していた。ただし、骨塩密度やその他の骨形状データは正常であり、骨は小さめだが正常であると考えられた。雄では血液生化学検査で有意なリンの増加が、雌では架橋 C-テロペプチド（骨吸収マーカー）の減少も見られた。この他には行動、血液生化学的検査及び病理組織学的所見に変化は見られなかった。28 日間の休薬期間終了後には、高用量群の雄で体重減少及び骨の縮小を除きすべての所見が消失していた。特に異所性石灰化を示す所見は認められなかった。以上の結果に基づき、ラットに静脈内投与した場合の NOAEL は 26 mg/kg/week と推察した。

ラットにおける 6 ヵ月間毒性試験でも同様の所見が得られた。幼若ラットに ALXN1215 1、3 又は 13 mg/kg を 1 日 1 回 26 週間静脈内投与した結果、一過性の一般症状として足蹠及び鼻口部に赤色化又は腫脹、又は両方が認められた。この症状は、投与期間を通じて毎日、投与 1 時間以内に発現した。急性反応は 13 mg/kg 投与群でもっとも顕著だった。試験期間中、体重、摂餌量、眼所見、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、身体発育、臓器重量、頭臀長、X 線検査、肉眼所見、顕微鏡所見、発情周期及び雄の生殖能に意味のある変化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の上昇は、ALXN1215 の血中循環によると推察された。投与期間を通じて一過性の臨床症状が認められたが、1、3 及び 13 mg/kg 投与群ともに完全に可逆性であり毒性評価項目に影響はなかったことから、NOAEL は 13 mg/kg/日と推察した。

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 ALXN1215 の影響を検討した。幼若カニクイザルに ALXN1215 を最高 180 mg/kg まで単回静脈内投与した結果、良好な忍容性が確認された。この試験の結果を踏まえて、週 1 回 5、15 及び 45 mg/kg の用量を幼若カニクイ

ザルに 28 日間静脈内投与試験を実施した。その結果、骨代謝及び心電図を含めたすべての評価項目で毒性を示唆する所見は認められず、いずれの組織にも異所性石灰化は認められなかった。したがって、カニクイザルに ALXN1215 を週 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/week と推察した。幼若カニクイザルに ALXN1215 0.43、2.14 又は 10 mg/kg を 1 日 1 回 6 ヵ月間皮下投与した試験において、注射部位の発赤又は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又は完全に消失していた。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を含む）、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、剖検及び病理組織学的検査に影響は認められなかった。循環血中の ALXN1215 によると思われるアルカリホスファターゼ活性の上昇が認められた。脛骨幹端や腰椎の骨量増加及び脛骨骨幹の皮質骨肥厚傾向が認められたが、ALXN1215 との明確な関連は認められなかった。ALXN1215 は、骨の成長に対して有害な影響を及ぼさなかった。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。頭蓋冠の冠状縫合及びラムダ縫合を含む 2 ヵ所で評価を行った。早期癒合など年齢不相応の異常はみられなかった。病理組織学的観察では、いずれの ALXN1215 投与群においても注射部位に石灰化（異所性石灰化）と単球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、高用量群の一部で局所的な軽い炎症／浸潤が残るのみであって。石灰化は、壊死の有無にかかわらず炎症部位ではよく見られる所見である。試験中に発現した異所性石灰化または石灰化と見られる注射部位の所見は部分的又は完全に回復し、忍容性は良好だったことから、NOAEL は 10 mg/kg/day と推察した。

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。剖検時に数匹でリンパ節の腫大が見られた。病理組織学的観察では、ALXN1215 を投与した個体の多くで注射部位にごく軽度～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、腋窩リンパ節にわずかなリンパ組織過形成が見られた。

生殖発生毒性に対する ALXN1215 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認められなかった。50 mg/kg を投与した雌ウサギ 2 匹で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。いずれも個体でも病理組織学的観察で両腎の主に外皮質に限局し石灰化が認められた。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(2.6.6.10 項参照)。このようにウサギは大量のカルシウムを排泄することから、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。

ラットでの出生前後の試験では、分娩後 5 時間以内に、母動物 6 匹（10 mg/kg 群の 1 匹、25 mg/kg 群の 3 匹、50 mg/kg 群の 2 匹）が出産した仔ラットの一部を食殺した。分娩直後に食殺の行動を示した母動物の割合は、10 mg/kg 投与群及び 50 mg/kg 投与群では試験施設の背景データの範囲内（1 群当たり 0～2 匹）だったが、25 mg/kg 投与群ではやや高かった。食殺行動が、投与後の急性注射反応である可能性は否定できない。したがって、ALXN1215 の投与に伴う食殺行動の臨床使

用への影響は明らかでない。分娩後 1 日目から 21 日目まで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 ALXN1215 の影響はなかった。F_0 世代でも F_1 世代児でも肉眼的所見に ALXN1215 投与の影響は見られなかった。F_1 及び F_2 世代のラットでは、身体発育、行動機能及び生殖機能には影響がなかった。剖検では、ALXN1215 の投与と関連した石灰化を示す所見はなかった。NOAEL は試験した最高用量である 50 mg/kg/日と推測された。

ラット、ウサギ及びカニクイザルで実施した安全性薬理試験及び毒性試験の結果に基づき、一貫して見られた有意な全身性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 ALXN1215 の臨床使用の妥当性が支持された。

2.6.6.10 参考文献

1) 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.
2) Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE. The Biology of the Laboratory Rabbit. 2 ed. Academic Press; 1994.
3) 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.
4) Vennen KM, Mitchekk MA. Rabbits. In: Saunders Elsevier, editor. Manual of Exotic Pet Practice. 2009. p. 375-405.

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
2.6.7 毒性試験概要表

アレクシオンファーマ合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.7 毒性試験概要表 5
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 5
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 9
2.6.7.4 毒性試験：使用ロット 13
2.6.7.5 単回投与毒性試験 16
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 17
2.6.7.7 A. 反復投与毒性試験：重要な試験 18
2.6.7.7 B. 反復投与毒性試験：重要な試験 24
2.6.7.7 C. 反復投与毒性試験：重要な試験 27
2.6.7.7 D. 反復投与毒性試験：重要な試験 32
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 36
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 36
2.6.7.10 がん原性試験 36
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 37
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（重要な試験） 42
2.6.7.13 A. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（重要な試験） 46
2.6.7.13 B. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 49
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（重要な試験） 53
2.6.7.15 新生児を用いた試験 60
2.6.7.16 局所刺激性試験 60
2.6.7.17 その他の毒性試験 60

略号一覧表

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BBB	blood brain barrier	血液脳関門
CD	control deviation	制御偏差
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
CV	cardiovascular	心血管系
DXA	dual-energy x-ray absorptiometry	二重エネルギーX 線吸収
ECG	electrocardiogram	心電図
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
FcRn	neonatal receptor	新生児受容体
FOB	functional observational battery	行動観察
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
HPP	hypophosphatasia	低フォスファターゼ症
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
L1	first lumbar vertebra	第 1 腰椎
L4	fourth lumbar vertebra	第 4 腰椎
L5	fifth lumbar vertebra	第 5 腰椎
L6	sixth lumbar vertebra	第 6 腰椎
mg	milligram	ミリグラム
mL	milliliter	ミリリットル
MTD	maximum tolerated dose	最大耐用量
NA	not applicable	適応不可
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	New Zealand White
pc	postcoitum	交尾後

略語・用語	内容（英語）	内容（日本語）
pQCT	peripheral quantitative computed tomography	末梢定量的 CT
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
Stage C	closure of the hard palate	着床から硬口蓋閉鎖
Stage D	closure of the hard palate to the end of pregnancy	硬口蓋閉鎖から妊娠終了
Stage F	weaning to sexual maturity	離乳から性成熟
TK	toxicokinetic	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フォスファターゼ

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Overview						**Test Article: Asfotase Alfa**		
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in CTD**
Single-Dose Toxicity								
Single-Dose Toxicity (Maximum Tolerated Dose)	Monkey/ Cynomolgus (juvenile)	IV bolus and IV infusion single dose (weekly dose escalation)	29 days for TK satellite; 46 days for main group	5, 15(bolus), and 45 (3min), 90 (6 min), and 180 (12 min infusion)	No	[redacted]	2007-0693	4.2.3.1.1
Repeat-Dose Toxicity								
4-weeek Toxicity (Maximum Tolerated Dose)	Rat/Sprague-Dawley (juvenile)	IV (weekly)	4 weeks	10, 30, 90, 180	No	[redacted]	70385	4.2.3.2.1
4-week Toxicity Study	Rat/Sprague-Dawley (juvenile)	IV (weekly)	4 weeks	0, 2.6, 26, 77	Yes	[redacted]	670314	4.2.3.2.2
26-week Toxicity Study	Rat/Sprague-Dawley (juvenile)	IV (daily)	6 months	0, 1, 3, 13	Yes	[redacted]	670315	4.2.3.2.3
4-week Toxicity Study	Monkey/ Cynomolgus (juvenile)	IV (weekly)	4 weeks	0, 5, 15, 45	Yes	[redacted]	1007-1503	4.2.3.2.4
26-week Toxicity Study	Monkey/ Cynomolgus (juvenile)	SC (daily)	6 months	0, 0.43, 2.14, 10	Yes	[redacted]	670388	4.2.3.2.5
Genotoxicity	No studies of this type were performed							

Overview						**Test Article: Asfotase Alfa**		
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in CTD**
Carcinogenicity	No studies of this type were performed							
Reproductive and Developmental Toxicity								
Pilot Fertility Males	Rat/Sprague-Dawley	IV (daily)	15 days	0, 25, 50	Yes	[redacted]	902230	4.2.3.5.1.1
Reproductive and Developmental Toxicity (Continued)								
Fertility & early embryonic development	Rat/Sprague-Dawley	IV (daily)	4-5 weeks females, at least 9 weeks males	0, 10, 25, 50	Yes	[redacted]	902231	4.2.3.5.1.2
TK in pregnant rats	Rat/Sprague-Dawley	IV (daily)	GD [a)] 6-19	13, 25, 50	Yes	[redacted]	902480	4.2.2.2.7
Pilot Developmental	Rat/Sprague-Dawley	IV (daily)	GD 6-19	0, 13, 25, 50	Yes	[redacted]	902233	4.2.3.5.2.1
Embryo-fetal Development	Rat/Sprague-Dawley	IV (daily)	GD 6-19	0, 13, 25, 50	Yes	[redacted]	902234	4.2.3.5.2.2
TK in nonpregnant rabbits	Rabbit/New Zealand White	IV and SC (daily)	Single dose	5 and 50 for both routes	Yes	[redacted]	902235	4.2.2.2.6
Pilot Developmental	Rabbit/New Zealand White	IV (daily)	PC [b)] 7-19	0, 6, 13, 25, 50	Yes	[redacted]	902236	4.2.3.5.2.3
Embryo-fetal Development	Rabbit/New Zealand White	IV (daily)	PC 7-19	0, 10, 25, 50	Yes	[redacted]	902237	4.2.3.5.2.4
Perinatal/Postnatal Development	Rat/Sprague-Dawley	IV (daily)	GD 6-LD[c)] 21	0, 10, 25, 50	Yes	[redacted]	902238	4.2.3.5.3.1

Overview						**Test Article: Asfotase Alfa**		
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location in CTD**
Local Tolerance								
IV and SC Bridging Study	Rat/Sprague-Dawley (juvenile)	IV (weekly) and, SC (daily)	4 weeks	IV: 0, 3, 30, 90 (weekly) SC: 0, 0.84, 8.4, 25.2 (daily)	Yes	[redacted]	70552	4.2.3.6.1
Other Toxicity Studies			No studies of this type were performed					

a) GD = Gestation day; may also be designated as postcoitum (pc) in the study reports.
b) PC = Postcoitum.
c) LD = Lactation day.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Overview of Toxicokinetic Studies				**Test Article: Asfotase Alfa**		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**GLP Compliance**	**Study Number**	**Location in CTD**
MTD study with TK [within animal dose escalation with 7 day washout period]	Cynomolgus Monkey	IV Bolus and IV Infusion (weekly dose escalation)	5, 15(bolus) and 45 (3 min), 90 (6 min), and 180 (12 min infusion)	No	2007-0693	4.2.3.1.1
Four-week repeat-dose toxicity study	Sprague-Dawley Rat	IV (weekly)	0.0, 2.6, 26, 77	Yes	670314	4.2.3.2.2
Four-week repeat-dose toxicity study with TK	Cynomolgus Monkey	IV (weekly)	0, 5, 15, 45	Yes	1007-1503	4.2.3.2.4
6-month repeat dose toxicity study with TK	Cynomolgus Monkey	SC (daily)	0, 0.43, 2.14, 10	Yes	670388	4.2.3.2.5
6-month repeat dose toxicity study with TK	Sprague-Dawley Rat	IV (daily)	0, 1, 3, 13	Yes	670315	4.2.3.2.3
Four-week local tolerance study with TK	Sprague-Dawley Rat	IV (weekly) SC (daily)	0, 3, 30, 90 (IV) 0, 0.84, 8.4, 25.2 (SC)	Yes	70552	4.2.3.6.1
Single dose IV and SC Bridging Study	NZW Rabbit	IV (daily) SC (daily)	5, 50 (IV) 5, 50 (SC)	Yes	902235	4.2.2.2.6
Segment II	Sprague-Dawley Pregnant Rat	IV (daily)	0, 13, 25, 50	Yes	902480	4.2.2.2.7
Segment II	NZW Rabbit	IV (daily)	0, 6, 13, 25, 50	Yes	902236	4.2.3.5.2.3
Segment II	NZW Rabbit	IV (daily)	0, 10, 25, 50	Yes	902237	4.2.3.5.2.4
Segment III	Sprague-Dawley Pregnant Rat	IV (daily)	0, 10, 25, 50	Yes	902238	4.2.3.5.3.1

Note: TK results for study 902233 were disqualified due to analytical issues.
The following studies had no TK assessment: 70385, 902230, 902231, and 902234
Study 902480 doses mimic the doses in studies 902233 and 902234; therefore, the TK from this study may be used as a reference of exposure.
NZW = New Zealand White

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Overview of Toxicokinetic Data: AUC (mg*h/L) and C_{max} (mg/L)			**Test Article: Asfotase Alpha**	
Study Number	**ROA, Dose (mg/kg/dose)**	**Rat**	**Rabbit**	**Monkey**
670314	IV, 2.6, 26, 77 (weekly - 4 weeks)	A single timepoint (24h post dose) concentration was obtained Day 16 C_{24} – M/F 0.683/0.596, 4.46/3.83, 7.65/6.71 Day 23 C_{24} – M/F 0.723/0.564, 4.13/3.45, 8.56/6.49		
2007-0693	IV, 5, 15 (bolus), 45 (3min), 90 (6min),180 (12 min infusion) Within animal weekly ascending single dose			$AUC_{(0-24)}$ – (gender combined)763 / 2860 / 8950 / 47000 / 335000[a)] C_{max} – (gender combined) 64.9 / 396 / 1230 / 7720 / 3830[a)]
1007-1503	IV, 5, 15, 90 (weekly - 4 weeks)			$AUC_{(0-168)}$ – (gender combined) Day1: 142 / 606 / 3190 Day22: 105 / 524 / 2670 C_{max} – (gender combined) Day1: 68.1 / 245 / 726 Day22: 53.7 / 236 / 691

Overview of Toxicokinetic Data: AUC (mg*h/L) and C_{max} (mg/L)			**Test Article: Asfotase Alpha**	
Study Number	**ROA, Dose (mg/kg/dose)**	**Rat**	**Rabbit**	**Monkey**
670388	SC, 0.43, 2.14, 10 (daily - 6 months)			$AUC_{(0-24)}$ – (gender combined) Day1: 1.38 / 8.50 / 50 Week4: 5.22 / 5.91 / 132 Week26: 7.32 / 14.7 / 124 C_{max} – (gender combined) Day1: 0.0718 / 0.446 / 2.66 Week4: 0.265 / 0.388 / 6.62 Week26: 0.361 / 0.796 / 6.68
670315	IV, 1, 3, 13 (daily – 6 months)	$AUC_{(0-24)}$ (gender combined on Day 1, Weeks 4 and 17) Day 1: 26 /58.4 / 364 Week4: 30.7 / 88.6 / 401 Week17: 75.8 / 284 / 1370 Week26 M: 14.8 / 53.8 / 422 Week26 F: 9.78 / 31.7 / 239 C_{max} – (gender combined on Day 1, weeks 4 and 17) Day 1: 6.07 / 19.3 / 115 Week4: 8.01 / 25.5 / 147 Week17: 8.83 / 42.7 / 302 Week26 M: 12.5 / 55.7 / 357 Week26 F: 8.85 / 35.0 / 305		

Overview of Toxicokinetic Data: AUC (mg*h/L) and C_{max} (mg/L)			**Test Article: Asfotase Alpha**	
Study Number	**ROA, Dose (mg/kg/dose)**	**Rat**	**Rabbit**	**Monkey**
70552	IV, 3, 30, 90 (weekly – 4 weeks)	$AUC_{(0-24)}$ – (gender combined) Day1: 104 / 886 / 1960 Day22: 76.8 / 591 / 2054 C_{max} – (gender combined) Day1: 16.2 / 298 / 567 Day22: 16.2 / 147 / 678		
	SC, 0.84, 8.4,25.2 (daily – 4 weeks) Males only	AUC - Day1 M: 6.17 / 55.7 / 149 Day28 M: 2.09 / 3.00 / 7.29 C_{max} - Day1 M: 0.326 / 2.94 / 8.00 Day28 M: 0.182 / 0.215 / 0.532		
902235	IV, 5, 50 (single dose)		$AUC_{(0-96)}$ - F: 102 / 2896 C_{max} - F: 51.4 / 1137	
	SC, 5, 50 (single dose)		$AUC_{(0-96)}$ - F: 25.9 / 280 C_{max} - F: 0.929 / 11.0	
902480	IV, 13, 25, 50 (daily – 14 days; GD 6 – 19)	$AUC_{(0-24)}$ - F: GD Day6: 167 / 422 / 1096 F: GD Day19:104 / 128[a)] / 1146 C_{max} - F: GD Day6: 54.3 / 183 / 546 F: GD Day19: 55.7 / 20.4 / 673		

Overview of Toxicokinetic Data: AUC (mg*h/L) and C_{max} (mg/L)			**Test Article: Asfotase Alpha**	
Study Number	**ROA, Dose (mg/kg/dose)**	**Rat**	**Rabbit**	**Monkey**
902238	IV, 10, 25, 50 (daily – 14 days; GD 6 – 19)	$AUC_{(0-24)}$ - F: GD Day6: 243 / 703 / 1502 F: GD Day19: 85.8[a)] / 340 / 1368 C_{max} - F: GD Day6: 65.9 / 247 / 612 F: GD Day19: 36.9 / 134 / 672		
902236	IV, 6, 13, 25, 50 (daily – 13 days; PC 7 – 19)		$AUC_{(0-24)}$ - F: PC Day19: 64.6 /245 /727 / 2037 C_{max} - F: PC Day19: 36.2 /128 /370 / 785	
902237	IV, 13, 25, 50 (daily – 13 days; PC 7 – 19)		$AUC_{(0-24)}$ - F: PC Day7: 446 / 1978 / 4188 F: PC Day19: 322 / 1573 / 3435 C_{max} - F: PC Day7: 121 / 584 / 1135 F: PC Day19: 125 / 504 / 1021	

a) Value was corrected for bioanalytical error (see TK report no 2: Impact of bioanalytical issues on ENB-0040 TK results from studies 902236, 902480, and 902238).

Abbreviations: ROA = route of administration; GD = gestation day; PC = postcoitum; LD = lactation day; C_{max} = Peak (maximum) plasma concentration of the drug; AUC = Area under the concentration-time curve; SC = subcutaneous.
GD and PC are used interchangeably in the study reports.

2.6.7.4 毒性試験：使用ロット

Drug Substance			**Test Article: Asfotase Alfa**				
Batch No.	**Purity (%)**		**Specified Impurities**			**Study Number**	**Type of Study**
Tests	**Reverse Phase HPLC**	**Size Exclusion HPLC**	**CHO DNA**	**Residual Protein A**	**Host Cell Protein**		
[redacted]							
						2007-0693 70385 ALP-PT-10	Single-dose toxicity Repeat-dose toxicity Safety pharmacology
						PK2008021951	Safety pharmacology
						670314 1007-1503	Repeat-dose toxicity
						70552	Local tolerance SC

Drug Substance				**Test Article: Asfotase Alfa**			
Batch No.	**Purity (%)**		**Specified Impurities**			**Study Number**	**Type of Study**
Tests	**Reverse Phase HPLC**	**Size Exclusion HPLC**	**CHO DNA**	**Residual Protein A**	**Host Cell Protein**		
[redacted]							
						670388	Repeat-dose toxicity
						70552	Toxicokinetic IV
						1007-2491	Safety pharmacology
						1007-2501	Safety pharmacology
						670315	Repeat-dose toxicity
						670315	Repeat-dose toxicity

Drug Substance				**Test Article: Asfotase Alfa**			
Batch No.	**Purity (%)**		**Specified Impurities**			**Study Number**	**Type of Study**
Tests	**Reverse Phase HPLC**	**Size Exclusion HPLC**	**CHO DNA**	**Residual Protein A**	**Host Cell Protein**		
[redacted]							
						902230	Reproductive toxicity
						902233	Reproductive toxicity
						902234	Reproductive toxicity
						902480	Toxicokinetic IV
						902235	Toxicokinetic IV and SC
						902236	Reproductive toxicity
						902231	Reproductive toxicity
						902237	Reproductive toxicity
						902238	Reproductive toxicity

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Single-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies					**Test Article: Asfotase Alfa**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)**	**Approximate Lethal Dose (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Monkey/ Cynomolgus	IV (aqueous solution) bolus and infusion	5, 15, 45, 90, 180	2M, 2F	180	NA	Well tolerated at all dose levels. Transient increase in ALT and AST t not clearly biologically significant	2007-0693[a)]

a) non-GLP Study

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies					**Test Article: Asfotase Alfa**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Sprague-Dawley	IV weekly (aqueous solution)	4 weeks	10, 30, 90, 180	3M, 3F	30	All Groups - Acute transient reactions - reduced motor activity, slight swelling of limbs, pinna and muzzle with skin discoloration (red or blue in appearance) at the extremities; onset was dose related, no deaths. Both high dose groups – mild erosion of the glandular stomach with submucosal edema.	70385[a)]

a) non-GLP Study

2.6.7.7 A. 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: A 4-week (once weekly) intravenous injection toxicity study of ENB-0040 in the juvenile albino rat followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 4 weeks (weekly injection)**				**Study No.670314**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.2**		
Date of First Dose: October 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 26 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2.6**		**26**		**77**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**
Toxicokinetics: **C_{24} (Day 16) Mean ± SD (mg/L)**	N/A	N/A	0.596 (0.146)	4.46 (0.486)	3.83 (0.869)	7.65 (0.851)	6.71 (2.04)	0.596 (0.146)
C_{24} (Day 23) Mean ± SD (mg/L)	N/A	N/A	0.564 (0.137)	4.13 (0.517)	3.45 (0.414)	8.56 (0.981)	6.49 (1.34)	0.564 (0.137)
Noteworthy Findings: **(-) No noteworthy findings** **(+) Present**								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1[a)]	0
Body Weight (%) (Day 29) (+)[b)]	232.5 g	159.9 g	99.8	100.3	97.5	102.1	95.3	101.3
Body Weight (%) (Day 56) (+)[b)]	493.2 g	273.4 g	94.6	96.0	92.2	104.5	88.8	98.9

Report Title: A 4-week (once weekly) intravenous injection toxicity study of ENB-0040 in the juvenile albino rat followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 4 weeks (weekly injection)**				**Study No.670314**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.2**		
Date of First Dose: October 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 26 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2.6**		**26**		**77**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**
Food Consumption (%) (Day29) (+)[b)]	29.2 g	21.3 g	97.9	97.2	95.5	100.9	89.4*	99.1
Food Consumption (%) (Day 56) (+)[b)]	40.4 g	26.0 g	99.0	96.9	90.6	103.8	89.9	102.3
Liver Weight (%) (+)[c)]	14.38	-	90.4	-	86.3*	-	83.7*	-
Clinical Observations (+)[d)]	-	-	+	+	+	+	+	+
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphorous (mg/dL) (+)	9.941	-	10.38	-	10.86	-	11.47	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 4-week (once weekly) intravenous injection toxicity study of ENB-0040 in the juvenile albino rat followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 4 weeks (weekly injection)**				**Study No.670314**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.2**		
Date of First Dose: October 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 26 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2.6**		**26**		**77**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (including ectopic calcification)	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunogenicity (ADA) [f)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Additional Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Radiological findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone formation marker: Osteocalcin	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone resorption marker: C-telopeptide (+)	-	**45.21**	-	**39.15**	-	**41.45**	-	**35.64****
In vivo DXA whole body	-	-	-	-	-	-	-	-
In vivo DXA lumbar spine (L1-L4)	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 4-week (once weekly) intravenous injection toxicity study of ENB-0040 in the juvenile albino rat followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 4 weeks (weekly injection)**				**Study No.670314**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.2**		
Date of First Dose: October 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 26 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2.6**		**26**		**77**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**
In vivo DXA femur	-	-	-	-	-	-	-	-
Ex vivo pQCT tibia metaphysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Ex vivo pQCT tibia diaphysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluations: Number Evaluated	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**

Report Title: A 4-week (once weekly) intravenous injection toxicity study of ENB-0040 in the juvenile albino rat followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 4 weeks (weekly injection)**				**Study No.670314**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.2**		
Date of First Dose: October 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 26 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2.6**		**26**		**77**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**
In vivo DXA femur (area) (+)[g)]	**399.1**	-	**315.1***	-	**323.4***	-	**306.0***	-
Ex vivo pQCT tibia diaphysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Cortical area (mm^2) (+)	**5.53**	-	**5.42**	-	**5.15**	-	**4.89***	-
Cortical BMC (mg/mm) (+)	**6.24**	-	**6.23**	-	**5.95**	-	**5.61***	-

Report Title: A 4-week (once weekly) intravenous injection toxicity study of ENB-0040 in the juvenile albino rat followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 4 weeks (weekly injection)**				**Study No.670314**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.2**		
Date of First Dose: October 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 26 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**2.6**		**26**		**77**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**	**M: 10/5**	**F: 10/5**
CSMI (mm^4) (+)	**3.60**	**-**	**3.19**	**-**	**3.28**	**-**	**2.28***	**-**
Periosteal circumference (mm) (+)	**9.90**	**-**	**9.64**	**-**	**9.44**	**-**	**9.07***	**-**

a) Death determined to be unrelated to toxicity
b) At end of dosing period (Day 29) or recovery (56); for controls, mean weight or food consumption is shown; for treated groups, percent of control mean weight is shown; statistical significance is based on actual data (not calculated from percentages).
c) Liver weight both absolute and relative to brain weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent of controls for the absolute organ weights
d) Transient acute infusion reaction clinical signs observed in all drug-treated animals: partly closed eyes, decreased muscle tone, lying on the side, hunched posture, cold to touch, uncoordinated movements, decreased activity, abnormal gait and/or blue, red and/or firm swollen hindpaws and/or forepaws at all doses except control.
e) 90 mg/kg/dose was generally associated with slight decreases in absolute neutrophils (up to -26%), monocytes(up to -11%), and/or eosinophils (up to -23%) compared to the control group.
f) No consistent pattern to the antibody responses and titers were low even in the few animals with measurable antibodies.
g) Ex vivo radiographs were performed on the following tissues: aorta, calvarium, heart, femoro-tibial and tibio-tarsal joints, lumbar spine L3-L5 and mandible.

2.6.7.7 B. 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: ENB-0040: A 4-week intravenous injection toxicity study in juvenile Cynomolgus monkeys followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing: 4 weeks (Weekly dose)**				**Study No. 1007-1503**		
Initial Age: Approximately one year		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.4**		
Date of First Dose: November 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 45 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Number of Animals	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**
Toxicokinetics: **AUC(0-72h) (mg*h/L)** Day 1/Day 22, (±CV%)[a)]	NA	NA	142(31.2) / 105(33.2)		606(12.7) / 524(24.6)		3190(20.4) / 2670(20.6)	
C_{max} (mg/L) Day 1/Day 22, (±CV%) [a)]	NA	NA	68.1(16.1) / 53.7(17.5)		245(16.1) / 236(27.1)		726(21.5) / 691(12.2)	
Noteworthy Findings: **(-) No noteworthy findings** **(+) Present**								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%) (Day29)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: ENB-0040: A 4-week intravenous injection toxicity study in juvenile Cynomolgus monkeys followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing: 4 weeks (Weekly dose)**				**Study No. 1007-1503**		
Initial Age: Approximately one year		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.4**		
Date of First Dose: November 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 45 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Number of Animals	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (including ectopic calcification)	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunogenicity (+)[b)]	-	-	+	-	+	+	+	-
Additional Examinations								

Report Title: ENB-0040: A 4-week intravenous injection toxicity study in juvenile Cynomolgus monkeys followed by a 28-day recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing: 4 weeks (Weekly dose)**				**Study No. 1007-1503**		
Initial Age: Approximately one year		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.4**		
Date of First Dose: November 2007		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover and bone densitometry								
No Observed Adverse Effect Level: 45 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**5**		**15**		**45**	
Number of Animals	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**	**M: 3/2**	**F: 3/2**
Radiographic assessment of bone development [c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Body measurementsc	-	-	-	-	-	-	-	-
Biochemical markers of bone turnover (osteocalcin & C-telopeptide) [c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone densitometry (pQCT & DXA) [c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation: Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Postdose Observations	-	-	-	-	-	-	-	-

a) For TK parameters, male=5, female=5, parameter for AUC(0-72h) and C_{max} on study day1/day22, gender combined, repeated doses study.
b) Seven animals had anti-drug antibodies after exposure to asfotase alfa and most positive results were observed at the end of the recovery period. Overall, the levels of anti-drug antibodies present in positive samples were low, except for two animals with titers of 335 and 68.
c) Main and recovery animals.

2.6.7.7 C. 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: A 26-week Intravenous Injection Toxicity Study of ENB-0040 in the Juvenile Albino Rat Followed by a 28-day Recovery Period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 26 weeks（Daily dose）**				**Study No. 670315**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 28 days**				**Location in CTD: 4.2.3.2.3**		
Date of First Dose: August, 2008		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover, bone densitometry, bone geometry and bone fluorochrome-labeling and behavioral performance (functional observational battery)								
No Observed Adverse Effect Level: 13 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**13**	
Number of Animals Main/Recovery/TK	**M: 12/6/3**	**F: 12/6/3**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**
Toxicokinetics: $AUC_{0\text{-}24h}$ (mg*h/L) Week 1/Week 4/Week 17;Week 26 M/Week 26 F [gender combined on Weeks1, 4 and 17][a)]	-	-	26.0/30.7/75.8/14;8/9.78		58.4/88.6/284;53.8/31.7		364/401/1370;422/239	
C_{max} (mg/L) Week 1/Week 4/Week 17; Week 26 M/Week 26 F [gender combined on Weeks 1, 4 and 17] [a)]	-	-	6.07/8.01/8.83;12.5/8.85		19.3/25.5/42.7;55.7/35.0		115/147/302;357/305	
Noteworthy Findings: **(-) No noteworthy findings** **(+) Present**								

Report Title: A 26-week Intravenous Injection Toxicity Study of ENB-0040 in the Juvenile Albino Rat Followed by a 28-day Recovery Period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 26 weeks（Daily dose）**				**Study No. 670315**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 28 days**				**Location in CTD: 4.2.3.2.3**		
Date of First Dose: August, 2008		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover, bone densitometry, bone geometry and bone fluorochrome-labeling and behavioral performance (functional observational battery)								
No Observed Adverse Effect Level: 13 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**13**	
Number of Animals Main/Recovery/TK	**M: 12/6/3**	**F: 12/6/3**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**
Died or Sacrificed Moribund[b)]	1	2	1	2	0	2	1	0
Body Weight (%) Week 26	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (%) Week 26	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations (+)[c)]	-	-	+	+	+	+	+	+
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Developmental Assessment								
FOB, motor activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Auditory startle	-	-	-	-	-	-	-	-
Water maze	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 26-week Intravenous Injection Toxicity Study of ENB-0040 in the Juvenile Albino Rat Followed by a 28-day Recovery Period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 26 weeks（Daily dose）**				**Study No. 670315**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 28 days**				**Location in CTD: 4.2.3.2.3**		
Date of First Dose: August, 2008		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover, bone densitometry, bone geometry and bone fluorochrome-labeling and behavioral performance (functional observational battery)								
No Observed Adverse Effect Level: 13 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**13**	
Number of Animals Main/Recovery/TK	**M: 12/6/3**	**F: 12/6/3**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**
Vaginal opening/Preputial Separation	-	-	-	-	-	-	-	-
Male Reproductive assessment (sperm)[d)]	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Estrous cycling[d)]	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 26-week Intravenous Injection Toxicity Study of ENB-0040 in the Juvenile Albino Rat Followed by a 28-day Recovery Period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 26 weeks（Daily dose）**				**Study No. 670315**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 28 days**				**Location in CTD: 4.2.3.2.3**		
Date of First Dose: August, 2008		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover, bone densitometry, bone geometry and bone fluorochrome-labeling and behavioral performance (functional observational battery)								
No Observed Adverse Effect Level: 13 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**13**	
Number of Animals Main/Recovery/TK	**M: 12/6/3**	**F: 12/6/3**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**
Histopathology (including ectopic calcification)	-	-	-	-	-	-	-	-
Additional Examinations								
Radiological findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone formation marker: Osteocalcin[d)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone resorption marker: C-telopeptide[d)]	-		-		-		-	
In vivo DXA whole body[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
In vivo DXA lumbar spine (L1-L4) [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
In vivo DXA femur[d)]	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 26-week Intravenous Injection Toxicity Study of ENB-0040 in the Juvenile Albino Rat Followed by a 28-day Recovery Period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley		**Duration of Dosing: 26 weeks（Daily dose）**				**Study No. 670315**		
Initial Age: 21 days		**Duration of Postdose: 28 days**				**Location in CTD: 4.2.3.2.3**		
Date of First Dose: August, 2008		**Method of Administration: IV**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, ectopic calcification, biochemical markers of bone turnover, bone densitometry, bone geometry and bone fluorochrome-labeling and behavioral performance (functional observational battery)								
No Observed Adverse Effect Level: 13 mg/kg/day								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**13**	
Number of Animals Main/Recovery/TK	**M: 12/6/3**	**F: 12/6/3**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**	**M: 12/6/9**	**F: 12/6/9**
Ex vivo pQCT tibia metaphysis[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Ex vivo pQCT tibia diaphysis[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone length[e)]	-	-	-	-	-	-	-	
Postdose Evaluation: Number Evaluated	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
Postdose Observations	-	-	-	-	-	-	-	-

a) TK parameters are based on sparse sampling, n= 3 per timepoint (male=27, female=27); parameters for Weeks 1, 4, and 17 were computed via population compartmental analysis (genders combined). Parameters for Week 26 were obtained by non-compartmental analysis; %CV not calculated for composite data.
b) Although 9 animals died during the study, none of these deaths was considered to be related to asfotase alfa treatment (details provided in written summary).
c) Transient acute infusion reaction clinical signs: partly closed eyes, decreased muscle tone, lying on the side, hunched posture, cold to touch, uncoordinated movements, decreased activity, abnormal gait and/or blue, red and/or firm swollen hindpaws and/or forepaws at all doses except control.
d) NA = non-applicable due to immature development stage of animals.
e) Main and recovery animals.

2.6.7.7 D. 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: A 6-month multiple dose toxicity bone study of ENB-0040 in the juvenile monkey followed by a 4-week recovery period				**Test Article: Asfotase Alfa**				
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus		**Duration of Dosing: 26 weeks (Daily dose)**				**Study No. 670388**		
Initial Age: approximately 12 months		**Duration of Postdose: 4 weeks**				**Location in CTD: 4.2.3.2.5**		
Date of First Dose: February 2008		**Method of Administration: SC**						
		Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride				**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Immunogenicity, local tolerance, electrocardiography, biochemical markers of bone formation and resorption, bone densitometry and geometry, and fluorescent bone labeling								
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.43**		**2.14**		**10**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**
Toxicokinetics[a)]**: AUC_{0-24h} (mg*h/L)** Week 1, Week 4, and Week 26, (±CV%), gender combined	NA		Week 1: 1.38 (44.0) Week 4: 5.22 (53.2) Week 26: 7.32 (31.0)		Week 1: 8.50 (20.8) Week 4: 5.91 (91.5) Week 26: 14.7 (51.5)		Week 1: 50.0 (28.6) Week 4: 132 (77.2) Week 26: 124 (20.1)	
C_{max} (mg/L) Week 1,Week 4, and Week 26, (±CV%), gender combined	NA		Week 1: 0.0718 (49.0) Week 4: 0.265 (48.3) Week 26: 0.361 (34.2)		Week 1: 0.446 (20.4) Week 4: 0.338 (77.3) Week 26: 0.796 (44.6)		Week 1: 2.66 (30.6) Week 4: 6.62 (70.4) Week 26: 6.68 (34.3)	
Noteworthy Findings: **(-) No noteworthy findings** **(+) Present**								
Died or Sacrificed Moribund[b)]	0	1	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)			-	-	-	-	-	-

Report Title: A 6-month multiple dose toxicity bone study of ENB-0040 in the juvenile monkey followed by a 4-week recovery period		**Test Article: Asfotase Alfa**
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing: 26 weeks (Daily dose)**	**Study No. 670388**
Initial Age: approximately 12 months	**Duration of Postdose: 4 weeks**	**Location in CTD: 4.2.3.2.5**
Date of First Dose: February 2008	**Method of Administration: SC**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride	**GLP Compliance: Yes**
Special Features: Immunogenicity, local tolerance, electrocardiography, biochemical markers of bone formation and resorption, bone densitometry and geometry, and fluorescent bone labeling		
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.43**		**2.14**		**10**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**
Clinical Observations[c)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Local Tolerance (injection site) (+)[c)]	-	-	-	-	+	+	+	+
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunogenicity (+)[d)]	-	-	+	+	+	+	-	-
Organ Weights (%) [b)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (including ectopic calcification other than injection site)	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 6-month multiple dose toxicity bone study of ENB-0040 in the juvenile monkey followed by a 4-week recovery period		**Test Article: Asfotase Alfa**
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing: 26 weeks (Daily dose)**	**Study No. 670388**
Initial Age: approximately 12 months	**Duration of Postdose: 4 weeks**	**Location in CTD: 4.2.3.2.5**
Date of First Dose: February 2008	**Method of Administration: SC**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride	**GLP Compliance: Yes**
Special Features: Immunogenicity, local tolerance, electrocardiography, biochemical markers of bone formation and resorption, bone densitometry and geometry, and fluorescent bone labeling		
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.43**		**2.14**		**10**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**
Injection site granulomatous inflammation (+)	-	-	+	+	+	+	+	+
Additional Examinations								
Radiological findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone formation marker: Osteocalcin and Procollagen[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone resorption marker: C- and N-telopeptides[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
In vivo DXA whole body[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
In vivo DXA lumbar spine (L1-L4) [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
In vivo DXA femur[e)]	-	-	-	-	-	-	-	-

Report Title: A 6-month multiple dose toxicity bone study of ENB-0040 in the juvenile monkey followed by a 4-week recovery period		**Test Article: Asfotase Alfa**
Species/Strain: Monkey/Cynomolgus	**Duration of Dosing: 26 weeks (Daily dose)**	**Study No. 670388**
Initial Age: approximately 12 months	**Duration of Postdose: 4 weeks**	**Location in CTD: 4.2.3.2.5**
Date of First Dose: February 2008	**Method of Administration: SC**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride	**GLP Compliance: Yes**
Special Features: Immunogenicity, local tolerance, electrocardiography, biochemical markers of bone formation and resorption, bone densitometry and geometry, and fluorescent bone labeling		
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**0.43**		**2.14**		**10**	
Number of Animals (Main/Recovery)	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**	**M:3/2**	**F:3/2**
Ex vivo pQCT tibia metaphysis [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Ex vivo pQCT tibia diaphysis [e)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation: Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Postdose Observations	-	-	-	-	-	-	-	-

a) No satellite TK groups, main and recovery animals used for TK blood sampling and analysis.
b) Animal was euthanized because it was found with its head caught in the cage.
c) Restricted to the injection site, test article-related focal granulomatous inflammation with focal mineralization and mononuclear cell infiltration observed in animals given ≥ 0.43 mg/kg/dose of asfotase alfa; Following 4-weeks of recovery, both the severity and incidence of the injection site inflammatory changes were reduced.
d) Lack of ADA at the highest dose level could reflects interference of circulating drug levels, though it is noteworthy that there were also no AB at this dose level at the end of recovery when there was no circulating drug.
e) Main and recovery animals.

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

In vitro 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

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、in vitro 遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.7.10 がん原性試験

本剤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、発癌性試験は実施しなかった。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Asfotase Alfa				**Nonpivotal Studies**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses mg/kg**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Sprague-Dawley	IV (in aqueous buffer 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride)	15 days	0, 25, 50 (daily)	10 males	Transient clinical signs typical of those seen after IV injection of asfotase alfa in rats were observed. These clinical signs generally lasted up to 1 to 4 hours in duration and included red skin and soft swelling of the muzzle and fore and hind limbs. Abnormal gait, decreased activity, lying on side, and incoordination for some males, primarily during the first few days of treatment, at 25 and/or 50 mg/kg/day doses was also observed. Decreased body weight gain at doses of ≥ 25 mg/kg/day and slightly decreased food consumption at 50 mg/kg/day dose was also seen. Based on the transient nature of the clinical signs and the minimal difference in body weight gains, 25, 50 mg/kg doses were considered acceptable for the pivotal study.	902230

Test Article: Asfotase Alfa				**Nonpivotal Studies**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses mg/kg**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Sprague-Dawley	IV (in aqueous buffer 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride)	GD 6-19	13, 25, 50 (daily)	6 pregnant females	Main purpose of the study was to provide TK information for the doses and dosing schedule used in the rat reprotoxicology studies. Minimal toxicological observations. clinical signs, body weights, body weight changes, maternal performance, pregnancy status. No significant findings with the exception of the transient clinical signs typical of those seen after IV injection of asfotase alfa in rat. Following a single IV administration, the $AUC_{0\text{-}24h}$ values on gestation day 6 ranged from 167 to 1096 mg•h/L from the low to the high dose level while C_{max} values ranged from 54.3 to 546 mg/L. Following repeated daily doses, $AUC_{0\text{-}24h}$ values on gestation day 19 ranged from 104 to 1146 mg•h/L from the low to the high dose levels while C_{max} values ranged from 55.7 to 673 mg/L.	902480

Test Article: Asfotase Alfa				**Nonpivotal Studies**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses mg/kg**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Sprague-Dawley	IV (in aqueous buffer 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride)	GD 6-19	0, 13, 25, 50	7 pregnant females	Pilot dose range finding study. Minimal toxicological assessment. There was no asfotase alfa related effect on body weight gains, body weights, corrected body weights, corrected body weight gains or gross pathology. No findings were noted for ovarian or uterine parameters. No effect on fetal growth, survival, or morphology. Transient clinical signs (diminishing by 4 hours post dose) noted in all treated groups typical of those seen after IV injection of asfotase alfa in rat. Clinical signs included swelling of the fore/hind limbs/paws and muzzle, and red skin in these same areas. Eyes partly closed (diminishing by 1 hour post dose) in two animals given 50 mg/kg/day. Slightly decreased food consumption at 50 mg/kg/day during the first 3 days of treatment. The recommended doses for the definitive embryo-fetal development study were13, 25, and 50 mg/kg/day.	902233

Test Article: Asfotase Alfa				**Nonpivotal Studies**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses mg/kg**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbit/ NZW	IV SC (in aqueous buffer 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride)	Single dose	IV 5, 50. SC 5, 50.	3 non-pregnant females	Main purpose of this study was to provide TK information for the reprotoxicology studies in rabbit. Minimal toxicological assessment. There were no mortalities or test article related clinical signs in this study. IV - low (5 mg/kg) and high (50 mg/kg) dose, (±CV%). AUC0-96h was 102 (23.1) and 2896 (4.3) mg*h/L, respectively, Cmax was 51.4 (1.8) and 1137 (6.7) mg/L, respectively. SC - low (5 mg/kg) and high (50 mg/kg) dose, (±CV%). AUC0-96h was 25.9 (16.5) and 280 (32.6) mg*h/L, respectively, Cmax was 0.929 (2.9) and 11.0 (43.8) mg/L, respectively. Estimated SC bioavailability 33.7%, and 10.1%, respectively.	902235

Test Article: Asfotase Alfa				**Nonpivotal Studies**		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses mg/kg**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rabbit/ NZW	IV (in aqueous buffer 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride)	GD 7-19	0, 6, 13, 25, 50	5 pregnant females	Pilot dose range finding study. Slight reductions in body weight gain were noted in animals at ≥ 25 mg/kg/day. Slightly higher mean number of early and late resorptions was noted at 25 and 50 mg/kg/day. However, this was in comparison was to a control group in which there was no in utero loss which is not the norm for the facility. The values for the treated groups were within the range of the testing facility historical control range. Decreased mean fetal weights were noted in all treated groups though the values remained within the historical range for the testing facility. There was no evidence of teratogenicity. Following repeated daily doses, $AUC_{0\text{-}24h}$ (±CV%) values on gestation day 19 ranged from 64.6 (44.7) to 2037 (25.0)[#] mg•h/L from the low to the high dose level. C_{max} (±CV%) values ranged from 36.2 (42.8)* to 785 (16.9)* mg/L. [#] Corrected value from amendment report2 The recommended doses for the definitive embryo-fetal development study are 13, 25 and 50 mg/kg/day.	902236

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（重要な試験）

Report Title: An Intravenous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development with ENB-0040 in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to ICH S5(R2) Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to Male Fertility.	**Duration of Dosing: （Daily dose） M: at least 9 weeks (28 days befor mating) F:14 days befor mating, during mating and 7**		**Study No. 902231**	
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Day of Mating: F: 4-5 weeks**		**Location in CTD: 4.2.3.5.1.2**	
Initial Age: 11-12 weeks	**Day of C-Section: 13**			
Date of First Dose: February 2012	**Method of Administration: IV**		**GLP Compliance: Yes**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride			
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: different for adult males and females as shown below				
F_0 Males: 25 mg/kg; F_0 Females: 50 mg/kg; F_1 Litters (M/F): 50 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Males				
Toxicokinetics: No TK	NA	NA	NA	NA
No. Evaluated (M)	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	1	1	0	0
Clinical Observations[a)]	-	++	+++	+++
Necropsy Observations	-	-	-	
Body Weight controls, treated group as (%) of controls [b)]	535.1 g	96.3	97.7	92.9**
Food Consumption (%) total premating [b)]	752.8 g	98.0	99.5	94.8
Mean No. Days Prior to Mating	2.4	3.1	2.6	3.5

Report Title: An Intravenous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development with ENB-0040 in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to ICH S5(R2) Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to Male Fertility.	**Duration of Dosing: （Daily dose） M: at least 9 weeks (28 days befor mating) F:14 days befor mating, during mating and 7**		**Study No. 902231**	
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Day of Mating: F: 4-5 weeks**		**Location in CTD: 4.2.3.5.1.2**	
Initial Age: 11-12 weeks	**Day of C-Section: 13**			
Date of First Dose: February 2012	**Method of Administration: IV**		**GLP Compliance: Yes**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride			
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: different for adult males and females as shown below				
F_0 Males: 25 mg/kg; F_0 Females: 50 mg/kg; F_1 Litters (M/F): 50 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
No. of Males that Mated	25	25	25	25
No. of Fertile Males	22	24	25	25
Females				
Toxicokinetics: No TK	NA	NA	NA	NA
No. Evaluated (F)	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations [a)]	-	++	+++	+++
Necropsy Observations	-	-	-	-
Premating Body Weight controls and treated group as (%) of controls [b)]	285.0	100	101	102

Report Title: An Intravenous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development with ENB-0040 in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to ICH S5(R2) Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to Male Fertility.	**Duration of Dosing: （Daily dose） M: at least 9 weeks (28 days befor mating) F:14 days befor mating, during mating and 7**		**Study No. 902231**	
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Day of Mating: F: 4-5 weeks**		**Location in CTD: 4.2.3.5.1.2**	
Initial Age: 11-12 weeks	**Day of C-Section: 13**			
Date of First Dose: February 2012	**Method of Administration: IV**		**GLP Compliance: Yes**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride			
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: different for adult males and females as shown below				
F_0 Males: 25 mg/kg; F_0 Females: 50 mg/kg; F_1 Litters (M/F): 50 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Gestation Body Weight controls and treated group as (%) of controls [b)]	362.3	99.2	98.6	101
Premating Food Consumption (%) total [b)]	281.0 g	102	101	102
Gestation Food Consumption (%) total [b)]	354.7 g	99.4	96.0	101
Mean No. Estrous Cycles for Mating Period	3.2	3.4	3.2	3.3
Mean No. Days Prior to Mating	2.4	3.1	2.6	3.5
No. of Females Sperm Positive	25	25	25	25
No. of Pregnant Females	22	24	25	25
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean No. Corpora Lutea	17.8	16.7	17.2	18.0

Report Title: An Intravenous Injection Study of Fertility and Early Embryonic Development with ENB-0040 in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to ICH S5(R2) Guideline for Industry: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products and Toxicity to Male Fertility.	**Duration of Dosing: （Daily dose） M: at least 9 weeks (28 days befor mating) F:14 days befor mating, during mating and 7**		**Study No. 902231**	
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Day of Mating: F: 4-5 weeks**		**Location in CTD: 4.2.3.5.1.2**	
Initial Age: 11-12 weeks	**Day of C-Section: 13**			
Date of First Dose: February 2012	**Method of Administration: IV**		**GLP Compliance: Yes**	
	Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride			
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: different for adult males and females as shown below				
F_0 Males: 25 mg/kg; F_0 Females: 50 mg/kg; F_1 Litters (M/F): 50 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Mean No. Implantations	16.0	15.5	15.8	16.3
Mean % Preimplantation Loss	9.43	6.98	7.84	9.27
Mean No. Live Embryos	14.9	14.5	15.0	15.3
Mean No. Resorptions	1.1	1.0	0.8	1.0
No. Dead Embryos	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	7.77	6.22	5.13	6.10

a) (-) No noteworthy findings, (+) Mild, (++) Moderate, (+++) Marked; Clinical signs: Transient acute infusion reaction clinical signs: partly closed eyes, and/or blue, red and/or firm swollen hindpaws and/or forepaws and/or muzzle.

b) At end of dosing period, for controls, group mean weight or food consumption is shown (as indicated). For treated groups, percent of control is shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent change).

Statistical significance: * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$

2.6.7.13 A. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（重要な試験）

Report Title: An Embryo-Fetal Development Study of ENB-0040 by Intravenous Injection in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 6-19 (Daily dose)**		**Study No. 902234**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley	**Day of C-Section: GD 21**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.2**	
Initial Age: 77-84 days	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2011	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 13 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**13**	**25**	**50**
Dams/Does: Toxicokinetics: No TK	NA	NA	NA	NA
No. Pregnant	25	25	25	24
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Clinical Observations [a)]	-	+	+++	+++
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%) gain during treatment period [b)]	88.8 g	97.6%	97.9%	104%
Food Consumption (%) during treatment period [c)]	333 g	97.8%	100%	98.4%
Mean No. Corpora Lutea	15.2	14.9	14.9	15.5

Report Title: An Embryo-Fetal Development Study of ENB-0040 by Intravenous Injection in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 6-19 (Daily dose)**		**Study No. 902234**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley	**Day of C-Section: GD 21**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.2**	
Initial Age: 77-84 days	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2011	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females: 13 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg**				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**13**	**25**	**50**
Mean No. Implantations	12.8	13.0	12.6	14.2
Mean % Preimplantation Loss	15.85	12.26	15.72	7.75
Litters:				
No. Litters Evaluated	25	25	25	24
Mean No. Live Fetuses	12.1	12.4	12.0	13.3
Mean No. Resorptions	0.7	0.6	0.6	0.9
No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	5.78	4.14	4.68	6.33
Mean Fetal Body Weight (g)	5.856	5.930	5.818	5.731

Report Title: An Embryo-Fetal Development Study of ENB-0040 by Intravenous Injection in Rats			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 6-19 (Daily dose)**		**Study No. 902234**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley	**Day of C-Section: GD 21**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.2**	
Initial Age: 77-84 days	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2011	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features: None				
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females: 13 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg**				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**13**	**25**	**50**
Fetal Sex Ratios (%M)	48.26	55.12	52.42	53.73
Fetal Anomalies: fetuses (litters)				
Gross External limbs/paws short/fused	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Visceral Anomalies: accessary lobe of lung	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Situs inversus	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Skeletal Anomalies: 14^{th} rudimentary ribs	1(1)	0(0)	0(0)	2(2)
Total Affected Fetuses (Litters) Major Malformations	0(0)	1(1)	2(1)	0(0)

a) (-) No noteworthy findings (+) Mild (++) Moderate (+++) Marked; Clinical signs included transient acute infusion reactions: partly closed eyes, and/or blue, red and/or firm swollen hindpaws and/or forepaws and/or muzzle.
b) For controls, the mean change in weight from PC day 6-18 is shown. For treated groups, percent of control weight change is shown.
c) For controls, the consumption during the sampling periods between PC days 6-18 is shown. For treated groups the percent of control groups is shown.
Statistical significance: * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$

2.6.7.13 B. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Report Title: An Intravenous Injection Study of Embryo-fetal Development with ENB-0040 in Rabbits			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 7-19 （Daily dose）**		**Study No. 902237**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rabbit /New Zealand	**Day of C-Section: GD 29**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.4**	
Initial Age: 5-6 months	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2012	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features:				
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females: 25 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg**				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Dams/Does Toxicokinetics: **$AUC_{0\text{-}24h}$ (mg*h/L) GD 7 and GD 19 (±CV%)**[a)]	-	GD7: 446(13.5) GD19: 322(43.0)	GD7: 1978(46.0) GD19: 1573(20.8)	GD7: 4188(17.6) GD19: 3435(31.4)
C_{max} (mg/L) GD 7 and GD 19 (±CV%)[a)]	-	GD7: 121(34.6) GD19: 125(13.9)	GD7: 584(84.2) GD19: 504(22.4)	GD7: 1135(13.2) GD19: 1021(3.20)
No. Pregnant	20	19	20	18
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Clinical Observations –delivered early GD 29	0	1	0	0

Report Title: An Intravenous Injection Study of Embryo-fetal Development with ENB-0040 in Rabbits			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 7-19 （Daily dose）**		**Study No. 902237**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rabbit /New Zealand	**Day of C-Section: GD 29**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.4**	
Initial Age: 5-6 months	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2012	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features:				
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females: 25 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg**				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%) gain during treatment [b)]	0.29 kg	86.2%	103%	89.7%
Food Consumption (%) GD 7-20 [c)]	2137 g	103%	105%	100%
Mean No. Corpora Lutea	10.3	9.6	9.7	9.1
Mean No. Implantations	8.8	8.8	8.8	8.2
Mean % Preimplantation Loss	15	8	9	10
Litters:				
No. Litters Evaluated	20	18	20	18
Mean No. Live Fetuses	8.5	8.5	8.7	8.1
Mean No. Resorptions	0.3	0.2	0.2	0.2

Report Title: An Intravenous Injection Study of Embryo-fetal Development with ENB-0040 in Rabbits			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 7-19 （Daily dose）**		**Study No. 902237**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rabbit /New Zealand	**Day of C-Section: GD 29**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.4**	
Initial Age: 5-6 months	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2012	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features:				
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females: 25 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg**				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	2.83	2.97	1.50	2.78
Mean Fetal Body Weight (g)	42.69	42.62	42.34	42.54
Fetal Sex Ratios (% M)	48.69	53.77	53.99	43.46
Fetal Anomalies: fetuses(litters)				
AUC_{∞}Gross External: Facial Malformation	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Anopthalmia/micropthalmia	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)
Omphalocele	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Visceral Anomalies: Pharynx	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Skeletal Anomalies: skull	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)

Report Title: An Intravenous Injection Study of Embryo-fetal Development with ENB-0040 in Rabbits			**Test Article: Asfotase Alfa**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to D of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 7-19 （Daily dose）**		**Study No. 902237**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rabbit /New Zealand	**Day of C-Section: GD 29**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2.4**	
Initial Age: 5-6 months	**Method of Administration: IV**			
Date of First Dose: March 2012	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**		**GLP Compliance: Yes**	
Special Features:				
No Observed Adverse Effect Level: **F_0 Females: 25 mg/kg; F_1 Litters: 50 mg/kg**				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Total Affected Fetuses (Litters) Major Malformations	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)

a) TK parameters evaluated in pregnant rabbits (n = 3) on gestation days 7 and 19.
b) For controls, mean weight gain from PC day 7-19 is shown; for treated groups, percent of mean control weight change is shown.
c) For controls the amount of food consumed between GD 7-20 is shown. For treated groups the percent of control food consumption is shown.
Note: Histopathology Finding: Moderate tubular mineralization was seen in the kidneys of two animals given 50 mg/kg/day and might be asfotase alfa related, however, the unique calcium metabolism of the rabbit may also be considered as a factor.

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（重要な試験）

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats			**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process	**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
	Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley	**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks	**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012	**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6				
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
F_0 Females:				
Toxicokinetics: AUC $_{0\text{-}24h}$ (mg*h/L) GD 6/GD 19[a)]		243/85.8*	703/340	1502/1368*
C_{max} (mg/L) GD 6 and GD 19[a)]		65.9/36.9	247/134	612/672
No. Pregnant	24	23	23	25
No. Died or Sacrificed Moribund (cannibalized litter)	0	1	3	2
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	1	0
Clinical Observations [b)]	-	++	+++	+++
Necropsy Observations	-	-	-	-
Gestation Body Weight (%)[d)]	386.7	100	100	99.4
Lactation Body Weight (%)[d)]	322.6	99.3	99.3	98.1
Gestation Food Consumption (%) total[d)]	330.9	97.3	98.1	101

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats				**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process		**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
		Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley		**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks		**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012		**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6					
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
Lactation Food Consumption (%) total [d)]		591.2	105.3	105.8	105.5
Mean Duration of Gestation (days)		21.4	21.4	21.6	21.7
Abnormal Parturition		-	-	-	-
F_1 Litters: (Preweaning)					
	No. Litters Evaluated	24	23	23	25
	Mean No. of Implantations	13.5	14.1	14.4	14.3
	Mean No. Pups/Litter	12.7	13.2	13.6	13.5
	Mean No. Liveborn Pups/Litter	12.7	12.9	13.3	12.9
	No. of Litters with Stillborn Pups	1	2	2	4
	Postnatal Survival to Day 4 %	99.38	92.24	89.88	94.57
	Postnatal Survival to Weaning Day 4-21 %	100	100	100	99.46

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats				**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process		**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
		Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley		**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks		**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012		**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6					
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
	No. of Total Litter Losses	0	1	3	2
	Change in Pup Body Weights (g) Day 4-21	44.22	44.23	45.05	44.53
	Pup Sex Ratios (%M)	56.28	48.32	50.33	49.08
	Pup Clinical Signs: Cannibalized (M/F)	0/0	6/5	12/10	12/8
	Pup Necropsy Observations	-	-	-	-
F_1 Males: (Postweaning)					
	No. Evaluated Postweaning	24	22	19	23
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight Change (day 21-112) (g)	549.0	528.8	535.7	505.7

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats				**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process		**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
		Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley		**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks		**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012		**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6					
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
	Food Consumption (%) total	1341.1	96	100	94
	Preputial Separation mean day	42.0	41.5	41.4	42.9
	Sensory Function	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Learning and Memory	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	4.6	2.6	3.8	2.8
	No. of Males that Mated	23	22	19	22
	No. of Fertile Males	22	21	18	21
F_1 Females: (Postweaning)					
	No. Evaluated Postweaning	24	22	19	23
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats				**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process		**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
		Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley		**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks		**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012		**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6					
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight Change (Day 21-77) (g)	217.3	218.2	220.4	208.6
	Gestation Body Weight Change (g)	153.5	152.4	151.9	154.9
	Premating Food Consumption (%) total [d)]	919.9	98	100	97
	Gestation Food Consumption (%) total [d)]	544.1	100	104	100
	Mean Age of Vaginal Patency (days)	31.6	31.5	32.3	32.1
	Sensory Function	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Learning and Memory	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	4.6	2.6	3.8	2.8

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats				**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process		**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
		Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley		**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks		**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012		**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6					
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
	No. of Females Sperm-Positive	23	22	19	22
	No. of Pregnant Females	22	21	18	21
	Mean Duration of Gestation (days)	21.5	21.6	21.8	21.8
	Abnormal Parturition	-	-	-	-
F_2 Litters:					
	No. Litters Evaluated	22	21	18	21
	Mean No. of Implantations	16.1	16.4	15.6	16.7
	Mean No. Pups/Litter	15.3	15.4	14.7	15.5
	Mean No. Live-born Pups/Litter	15.2	15.2	14.2	15.4
	Mean No. Stillborn Pups/Litter	0.1	0.2	0.5	0.1
	Postnatal Survival to Day 4 (%)	98.89	96.45	96.99	99.06
	Postnatal Survival to Weaning	NA	NA	NA	NA

Report Title: A Pre and Postnatal Study of ENB 0040 by Intravenous Injection in Rats				**Test Article: Asfotase Alpha**	
Design conforms to the ICH Harmonized Tripartite Guideline - stages C to F of the reproductive process		**Duration of Dosing: GD 6-LD 21 (Daily Dose)**		**Study No. 902238**	
		Day of Mating: GD 0			
Species/Strain: Rat /Sprague-Dawley		**Method of Administration: IV**		**Location in CTD: 4.2.3.5.3.1**	
Initial Age: 11-12 weeks		**Vehicle/Formulation: In aqueous buffer; 25 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM sodium chloride**			
Date of First Dose: February 2012		**Litters Culled/Not Culled: Culled**		**GLP Compliance: yes**	
Special Features: F2 sacrificed on LD 4-6					
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg For F_0 Females, F_1 Males, and F_1 Females					
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**25**	**50**
	Change in Pup Body Weights (g) Day 0-4	3.87	4.15	4.26	3.62
	Pup Sex Ratios (% M)	48.69	50.53	53.13	54.09
	Pup Clinical Signs	-	-	-	-
	Pup Necropsy Observations	-	-	-	-

a) TK parameters for pregnant rats on gestation Days 6 and 19; * indicates that the value was corrected for bioanalytical error.
b) (-) No noteworthy findings (+) Mild (++) Moderate (+++) Marked. Clinical signs include transient acute infusion reaction: uncoordinated movements, decreased activity, irregular respiration, and/or blue, red and/or swollen hindpaws and/or forepaws/limb and/or muzzle; effects noted at all doses.
c) For control animals, group mean weight gain during gestation or lactation (as indicated), is shown; for treated groups, percent weight gain compared to appropriate control is shown.
d) For control animals, food consumption during gestation or lactation (as indicated), is shown; for treated groups, food consumption as compared to the appropriate control is shown.

2.6.7.15 新生児を用いた試験

本剤の治療対象集団を踏まえ、生殖毒性試験を除くすべての毒性試験に幼若動物を用いた。幼若動物を用いた試験は成獣動物の各項に記載する。

2.6.7.16 局所刺激性試験

Local Tolerance			**Test Article: Asfotase Alpha**		
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/ Sprague-Dawley	IV Injection	0, 3, 30, 90 (weekly, IV)	3M/F for control, 30M/F for treated groups	Typical transient clinical signs for IV administration which absent for the SC route. SC findings limited to the slight mononuclear cellular infiltration at the injection site and hyperplasia of the draining lymph node - findings are consistent with the subcutaneous injection of a large protein. Following repeated iv weekly doses, $AUC_{(0\text{-}168h)}$ values on day 1/day 22 were 104/76.8, 886/591, and 1960/2054 mg*h/L for 3, 30, and 90 mg/kg dose, respectively, while C_{max} on day1 /day22 were 16.2/16.2, 298/147, 567/678 mg/L for 3, 30 , and 90 mg/kg, respectively. Following repeated SC daily administration, $AUC_{0\text{-}24h}$ values on day 1/day 28 were 6.17/2.09, 55.7/3.00, and 149/7.29 mg*h/L for 0.84, 8.4, and 25.2 mg/kg dose, respectively, while C_{max} on day1 /day28 were 0.326/0.182, 2.94/0.215, 8.00/0.532 mg/L for 0.84, 8.4, and 25.2 mg/kg, respectively.	70552
	SC injection	0, 0.84, 8.4, 25.2 (daily, SC)	3M for control, 6M for treated groups		
	Both formulations in aqueous buffer; 25 mM sodium P04 pH 7.4, 150 mM NaCl				

2.6.7.17 その他の毒性試験

その他の試験は実施しなかった。