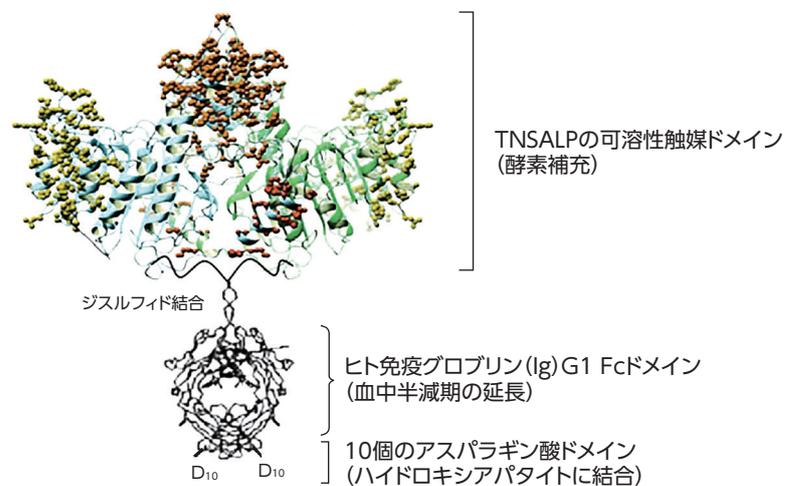


1 作用機序

低ホスファターゼ症は、TNSALPをコードする遺伝子の機能欠損変異による遺伝子疾患である。アスホターゼ アルファは、遺伝的に障害されている骨石灰化過程を正常化し、重篤で生命を脅かす症状や合併症をもたらす石灰化異常を予防又は改善することにより、HPPの根本原因に対処するようデザインされた最初の酵素補充療法剤である。

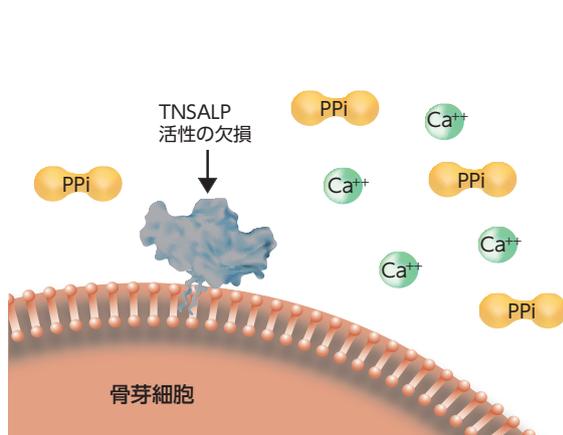
本薬は、ヒトTNSALPの可溶性触媒ドメイン、ヒト免疫グロブリン(Ig)G1のFcドメイン、及び10個のアスパラギン酸残基(D10)からなる融合糖タンパク質のホモ二量体である。アスパラギン酸ドメインが骨基質のヒドロキシアパタイト結晶に直接結合することにより、骨石灰化を阻害するPPiを骨組織において加水分解し、正常な石灰化を回復させることが期待される。

アスホターゼ アルファの構造

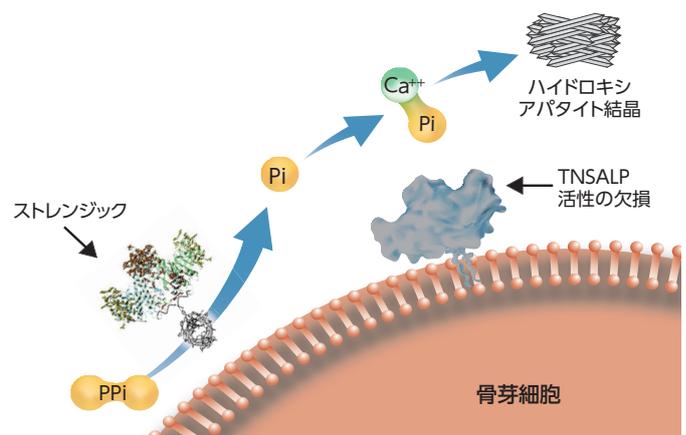


作用機序

HPP



HPP+ストレンジック



開発の経緯

ストレンジック®の
特性

製品情報

臨床成績

薬物動態

薬効薬理

安全性薬理試験及び
毒性試験

有効成分に関する理化学的
知見製剤学的事項取扱い
上の注意包装関連情報

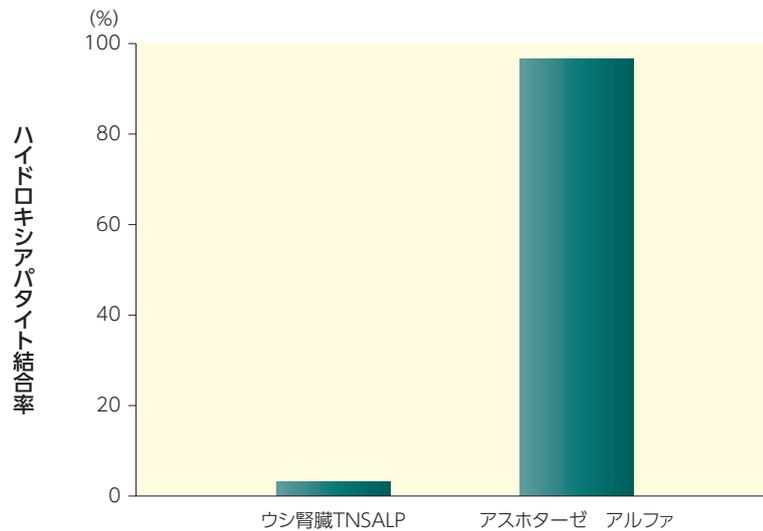
主要文献／製造販売業者の
氏名又は名称及び住所

2 非臨床試験

(1) ハイドロキシアパタイトとの結合試験 (*in vitro*)¹⁹⁾

アスホターゼ アルファのハイドロキシアパタイト結合率は、ウシ腎臓TNSALPの32倍であった。

アスホターゼ アルファ及びウシ腎臓TNSALPとハイドロキシアパタイトとの結合



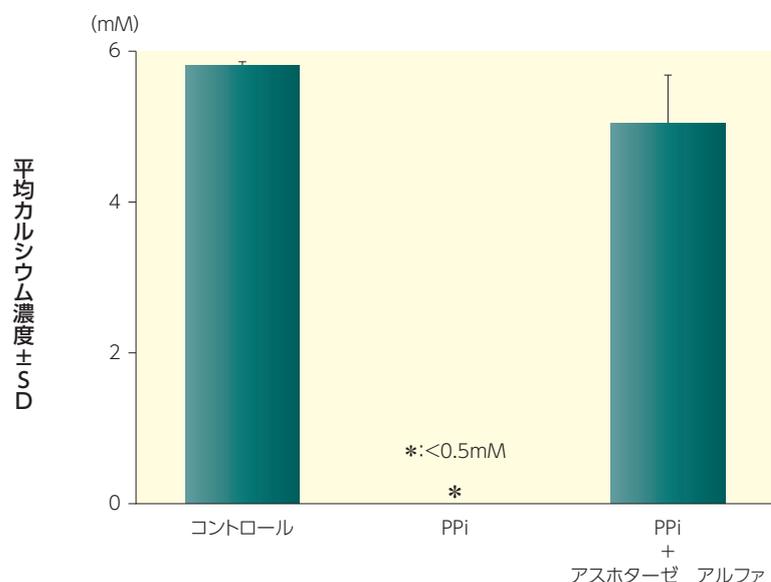
試験方法: *In vitro*で形成したハイドロキシアパタイト結晶とアスホターゼ アルファ又はウシ腎臓TNSALPを混合し、室温で30分インキュベートした後に、ハイドロキシアパタイト結合画分及び非結合画分のALP活性を測定した。

(2) MC3T3-E1細胞におけるPPiによる石灰化阻害に対する作用 (*in vitro*)²⁰⁾

骨芽細胞クローンであるMC3T3-E1細胞は骨形成能を有し、アスコルビン酸及びβ-グリセロールリン酸(β-GP)の処置によって石灰化が開始される。この時培地にPPiを添加するとMC3T3-E1培養細胞の石灰化が阻害され、この阻害作用は外因性TNSALPの添加によって抑制される²¹⁾。MC3T3-E1細胞における、PPiによる石灰化阻害に対するアスホターゼ アルファの作用について検討した。

PPi存在下では未処置時と比較してカルシウム濃度が低下し、PPiによる石灰化の阻害が認められた。また、PPi及び本剤存在下では、PPi存在下と比較してカルシウム濃度が未処置時と同程度まで回復し、本薬がPPiによる石灰化阻害を抑制することが示唆された。

MC3T3-E1細胞におけるPPiによる石灰化阻害及びそれに対するアスホターゼ アルファの作用



試験方法：MC3T3-E1細胞において、アスコルビン酸及びβ-GP存在下で石灰化を誘導し、培養開始6日後から、未処置、PPi存在下、又はPPi及びアスホターゼ アルファ(132U/L)存在下で培養した。培養開始14日後に細胞外マトリックス中に沈着したカルシウムを可溶化した後に定量した。

(3) 低ホスファターゼ症のモデルマウス(Akp2^{-/-}マウス)に対する予防的投与(15日間投与)²²⁾

アスホターゼ アルファの非臨床有効性試験は、TNSALP遺伝子(Akp2)をノックアウトして作製したHPPのモデルマウス(Akp2^{-/-})²³⁾を使用して実施した。Akp2^{-/-}マウスは、TNSALPの生理的基質である血漿中又は尿中のPPi、PLP及びホスホエタノールアミンの蓄積を呈する。生後約8日で同腹仔の野生型に対し骨マトリックスの非石灰化が認められるが、その程度は多様であり、一部の個体は正常な骨格表現型を呈する。また、体重増加抑制及び骨長短縮等の成長阻害が認められ、生後10～12日に早期死亡に至る。概ね無呼吸及びけいれん発作が認められた1～2日後に死亡することから、これらが早期死亡の主要因と考えられている²³⁾。Akp2^{-/-}マウスは、出生直後には野生型マウスと表現型に差がなく、生後10日までにHPP様の表現型を呈するようになることから、乳児型HPPのモデルとされている²⁴⁾。なお、Akp2^{-/-}マウスを用いた*in vivo*試験においては、ビタミンB₆代謝異常に伴うけいれん発作による早期死亡の防止のため、特記のない限り食餌中にピリドキシンが補充された。

● 足部骨の石灰化異常に対する作用

Akp2^{-/-}及び野生型マウスの後足部骨について検討したところ、溶媒投与Akp2^{-/-}マウスにおいて出生後16日に著しい骨の石灰化異常が認められた。同腹野生型マウスはすべて正常であった。本剤の15日間予防的投与により、溶媒投与群に比べて骨石灰化が有意に改善された。

Akp2^{-/-}マウスの足部骨の石灰化に対するアスホターゼ アルファの15日間予防的投与の作用

試験番号	例数	用量(mg/kg.sc/日)	試験16日目での後足部骨石灰化異常の重症度 動物数及び割合(%)			
			重度	中等度	軽度	正常
ALP-PT-04	18	0	5/18 (28)	7/18 (39)	0/18 (0)	6/18 (33)
	19	8.2	0/19 (0)	7/19 (37)	4/19 (21)	8/19 (42) ^{a)}

a) 0mg/kgと統計学的有意差あり。p=0.03(χ^2 test)

重症度分類

重度：顕著な形態異常が認められ、内側及び端側の指骨が完全に欠如し、二次骨化中心が全く認められない場合

中等度：指骨は完全に形成されるが、二次骨化中心が明確でない場合

軽度：指骨は完全に形成されるが、二次骨化中心は一定せずかつ不完全である場合

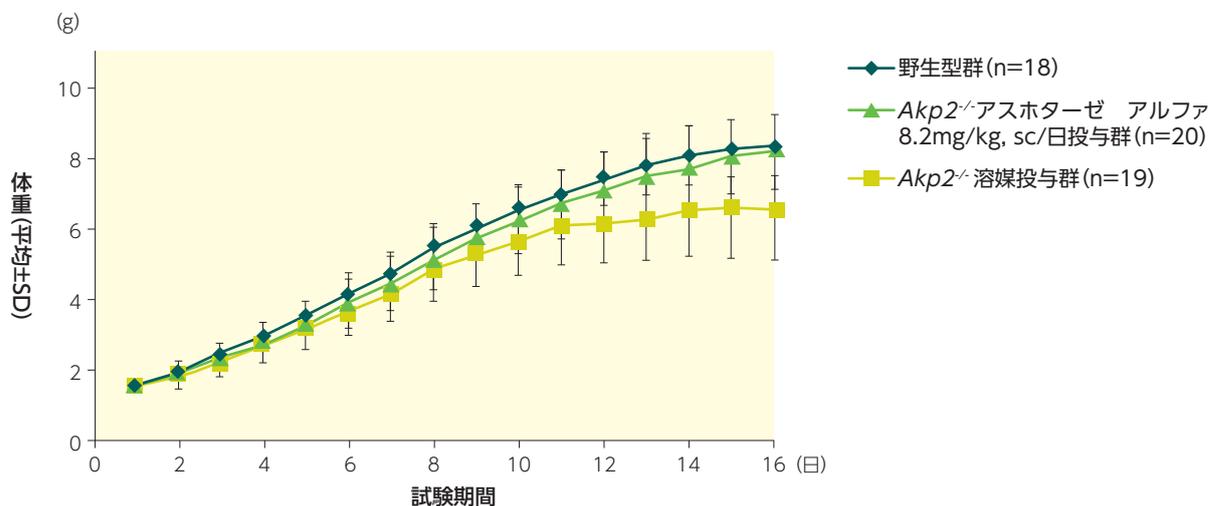
正常：指骨が完全に形成され、二次骨化中心もすべて認められる場合

試験方法：Akp2^{-/-}マウスに溶媒又はアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを15日間毎日連続して皮下投与し、最終投与24時間後の試験16日目にX線検査を実施し、骨の異常について評価した。

●体重に対する作用

アスホターゼ アルファ8.2mg/kgの15日間予防的投与により、*Akp2*^{-/-}マウス体重の増加抑制が抑えられた。

Akp2^{-/-}マウスの体重曲線に対するアスホターゼ アルファの15日間予防的投与の作用



試験方法：*Akp2*^{-/-}マウスに溶媒又はアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを15日間毎日連続して皮下投与し、*Akp2*^{-/-}及び野生型マウスの体重を測定した。

●骨長に対する作用

野生型群及びアスホターゼ アルファ投与*Akp2*^{-/-}群の左脛骨及び左大腿骨の骨長は、溶媒投与*Akp2*^{-/-}群よりも統計学的に有意に長かった。一方、アスホターゼ アルファ投与*Akp2*^{-/-}群と野生型群の脛骨又は大腿骨の骨長の間には、統計学的有意差は認められなかった。

Akp2^{-/-}マウスの左脛骨及び左大腿骨の骨長に対するアスホターゼ アルファの15日間予防的投与の作用

試験番号	例数	マウス	用量 (mg/kg,sc/日)	骨長 (mm) 平均(SD)	
				左脛骨	左大腿骨
ALP-PT-04	18 ^{a)}	<i>Akp2</i> ^{-/-}	0	11.71 (1.06)	8.58 (0.77)
	19	<i>Akp2</i> ^{-/-}	8.2	12.59 (0.75) ^{b)}	9.18 (0.42) ^{b)}
	18 ^{a)}	野生型	投与なし	13.06 (0.59) ^{c)}	9.43 (0.39) ^{c)}

a) n=17 (左大腿骨)

b) 0mg/kgと統計学的有意差あり。p=0.0135、左脛骨 p=0.0267、左大腿骨、Wilcoxon two-sample rank sum test

c) 0mg/kgと統計学的有意差あり。p=0.0006、左脛骨 p=0.0009、左大腿骨、Wilcoxon two-sample rank sum test

試験方法：*Akp2*^{-/-}マウスに溶媒又はアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを15日間毎日連続して皮下投与し、試験16日目の剖検時にデジタルノギスを用いて左脛骨及び左大腿骨の骨長を測定した。

(4) 低ホスファターゼ症のモデルマウス (*Akp2*^{-/-}マウス) に対する予防的投与 (43~52日間投与)²⁵⁻³¹⁾

Akp2^{-/-}マウスを用いて、アスホターゼ アルファのさまざまな投与量及びさまざまな予防的投与計画を行った前臨床試験 (ALP-PT-03試験²⁵⁾、ALP-PT-05試験²⁶⁾、ALP-PT-06試験²⁷⁾、ALP-PT-08試験²⁸⁾、ALP-PT-09試験²⁹⁾及びALP-PT-11試験³⁰⁾で、骨の石灰化異常及び生存期間について検討した。

Akp2^{-/-}マウスの後足部骨石灰化異常及び生存期間中央値に対する種々の用法用量の
アスホターゼ アルファ43~52日間予防的投与の作用

試験番号	用量 (mg/kg)	用法	ALP 酵素活性換算用量 ^{d)} (U/kg/日)	投与期間 (日)	例数	石灰化異常の重症度				生存期間中央値 (日)
						重度	中等度	軽度	正常	
ALP-PT-03 ²⁵⁾	0 ^{a)}	1日1回	0	52	16	NS ^{e)}				18
	8.2	1日1回	2452	52	13	0/13 (0.0)			13/13 (100.0)	≥52
ALP-PT-05 ²⁶⁾	8.2	3日に1回	682	52	21	2/21 (9.5)	4/21 (19.0)	2/21 (9.5)	13/21 (61.9)	26
	8.2	1週間に1回	303	52	19	5/19 (26.3)	7/19 (36.8)	4/19 (21.1)	3/19 (15.8)	24
ALP-PT-06 ²⁷⁾	4.3	1日1回	3788	43	18	0/18 (0.0)	2/18 (11.1)	1/18 (5.6)	15/18 (83.3)	39
	15.2	3日に1回	4493	43	19	0/19 (0.0)	0/19 (0.0)	0/19 (0.0)	19/19 (100.0)	41
	15.2	1週間に1回	1938	43	20	0/20 (0.0)	2/20 (10.0)	1/20 (5.0)	17/20 (85.0)	32.5
ALP-PT-08 ²⁸⁾	0 ^{b)}	1日1回	0	43 ^{c)}	16	8/16 (50.0)	6/16 (37.5)	0/16 (0.0)	2/16 (12.5)	20
	8.2	1日1回	7211	43	21	0/21 (0.0)	0/21 (0.0)	0/21 (0.0)	21/21 (100.0)	≥43
ALP-PT-11 ³⁰⁾	0 ^{b)}	1日1回	0	43	20	14/20 (70.0)	1/20 (5.0)	3/20 (15.0)	2/20 (10.0)	19
	0.5	1日1回	503	43	18	3/18 (16.7)	4/18 (22.2)	4/18 (22.2)	7/18 (38.9)	24
	2.0	1日1回	2010	43	20	0/20 (0.0)	3/20 (15.0)	0/20 (0.0)	17/20 (85.0)	30.5
	8.2	1日1回	8241	43	19	0/19 (0.0)	0/19 (0.0)	0/19 (0.0)	19/19 (100.0)	≥43

石灰化異常の重症度：例数/解析対象例数 (割合%)、生存期間：中央値 (日)

a) 150mM塩化ナトリウム、0.1mM塩化マグネシウム、20μM塩化亜鉛含有25mMリン酸ナトリウム溶液 (pH7.4)

b) 150mM塩化ナトリウム含有25mMリン酸ナトリウム (pH7.4)

c) 生後15日から溶媒が1日1回29~31日間投与された。

d) アスホターゼ アルファの各使用ロットのALP酵素比活性に基づき標準化された1日あたりのALP酵素活性換算用量

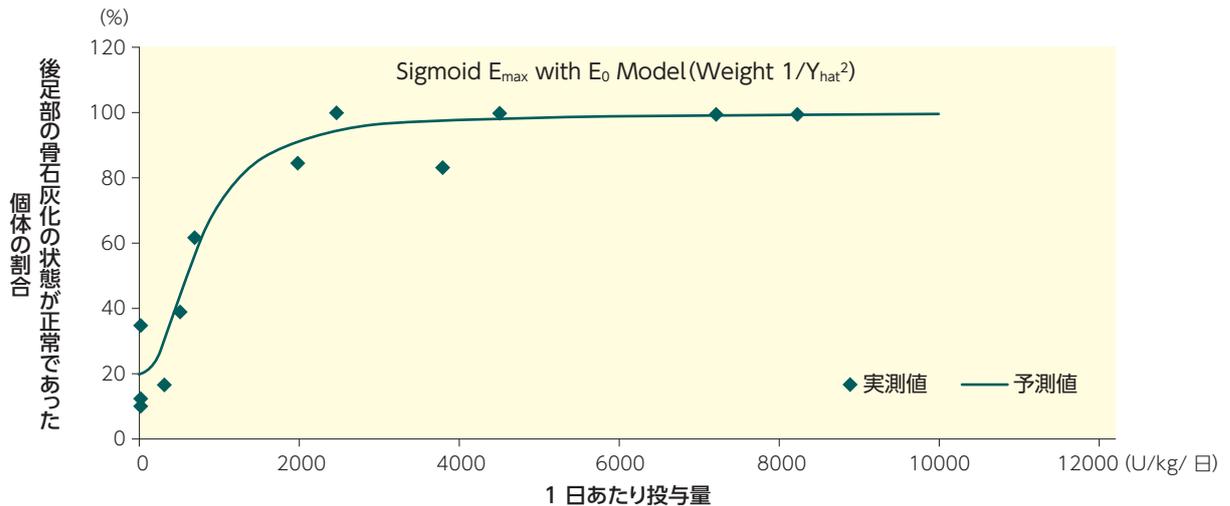
e) 溶媒群のX線画像が得られなかったため、データなし

試験方法：*Akp2*^{-/-}マウスに、アスホターゼ アルファ又は溶媒を、1日1回、3日に1回又は1週間に1回、43~52日間皮下投与した。最終投与24時間後又は死亡時点において、X線検査にて後足部骨石灰化異常、及び生存期間を評価した。同齢同腹の未投与野生型マウスを対照群とした。

●石灰化異常に対する作用の用量反応性

X線画像による骨石灰化異常の重症度分類における正常個体の割合は、本剤の1日あたり投与量(U/kg/日)依存的なシグモイドE_{max}モデルに当てはまることが示唆され(R²=0.94)、E_{max}の50%の効力を示す1日あたり投与量(ED₅₀)は743U/kg/日であり、2000U/kg/日で最大となることが示唆された。

43~52日間予防的投与におけるAkp2^{-/-}マウスの後足部石灰化の改善に対するアスホターゼ アルファの用量反応曲線

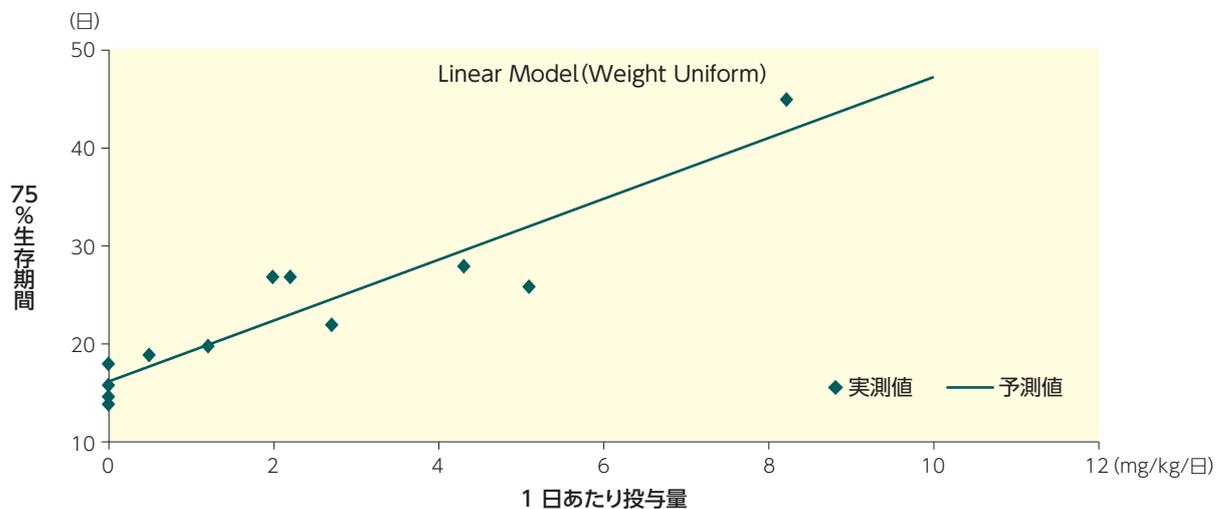


試験方法：U/mgの単位で表されるアスホターゼ アルファの酵素比活性はロットにより異なったため、上記試験で使用したアスホターゼ アルファの投与量(mg/kg)をALP活性に変換し、1日あたりの投与量をU/kg/日として標準化して、投与量と有効性の関係を調べた。

●生存期間に対する作用の用量反応性

溶媒投与Akp2^{-/-}マウスの生存率は全試験で一貫しており、すべての個体の生存率データをプールして用いた。データ統合後の溶媒投与Akp2^{-/-}マウスの生存期間中央値は19.5日であった。アスホターゼ アルファを予防的に投与したAkp2^{-/-}マウスの生存期間は、試験したすべての用量で生存期間が有意に改善した(p=0.0006又はp<0.0001、Log-rank test)。また、ALP-PT-12試験³¹⁾で、本薬の1日あたり投与量(mg/kg/日)と75%生存期間の間に明らかな用量反応関係性がみられた(R²=0.89)。

予防的投与試験におけるAkp2^{-/-}マウスの75%生存期間とアスホターゼ アルファの1日投与量の関係



試験方法：溶媒、又は、試験に応じてさまざまな投与量のアスホターゼ アルファを43~52日間皮下投与したAkp2^{-/-}マウスの生存率について検討した。さらに、用量反応分析において最大限のデータが使用可能な75%生存率を有効性評価項目として選択し、アスホターゼ アルファの投与量と生存率の関係性について検討した。

(5) 低ホスファターゼ症のモデルマウス ($Akp2^{-/-}$ マウス) に対する治療的投与 (生後12日目又は15日目からの投与)^{28,29)}

$Akp2^{-/-}$ マウスを用いて、有意な石灰化障害が観察される時点である生後12日目又は15日目からアスホターゼ アルファの投与を開始した (ALP-PT-08試験²⁸⁾及びALP-PT-09試験²⁹⁾。

$Akp2^{-/-}$ マウスに対する本薬の治療的投与により、生存期間が有意に延長した。一般的に、連日投与が最も有効であった。

出生後から投与を開始した $Akp2^{-/-}$ マウスの生存率中央値に対するアスホターゼ アルファの治療的投与の作用

A. 出生後15日目から投与

試験番号	例数	投与量と投与期間		生存期間中央値(日)
		生後15日～43日		
ALP-PT-08 ²⁸⁾	16	0mg/kg,sc/日		20
	17	8.2mg/kg,sc/日		39 ^{a)}

a) 0mg/kgと統計学的有意差あり。p=0.0002、Log-rank test

B. 出生後12日目から投与

試験番号	例数	投与量と投与期間		生存期間中央値(日)
		生後12日～18日	生後19日～46/47日	
ALP-PT-09 ²⁹⁾	17	0mg/kg,sc/日	0mg/kg,sc/週	20
	19	8.2mg/kg,sc/日	8.2mg/kg,sc/日	38 ^{a)}
	20	8.2mg/kg,sc/日	24.6mg/kg,sc/3日毎	30.5 ^{a)}
	18	8.2mg/kg,sc/日	57.4mg/kg,sc/週	21 ^{b)}

a) 0mg/kgと統計学的有意差あり。p<0.0001、Log-rank test

b) 0mg/kgと統計学的有意差あり。p=0.0054、Log-rank test

試験方法：[ALP-PT-08試験]

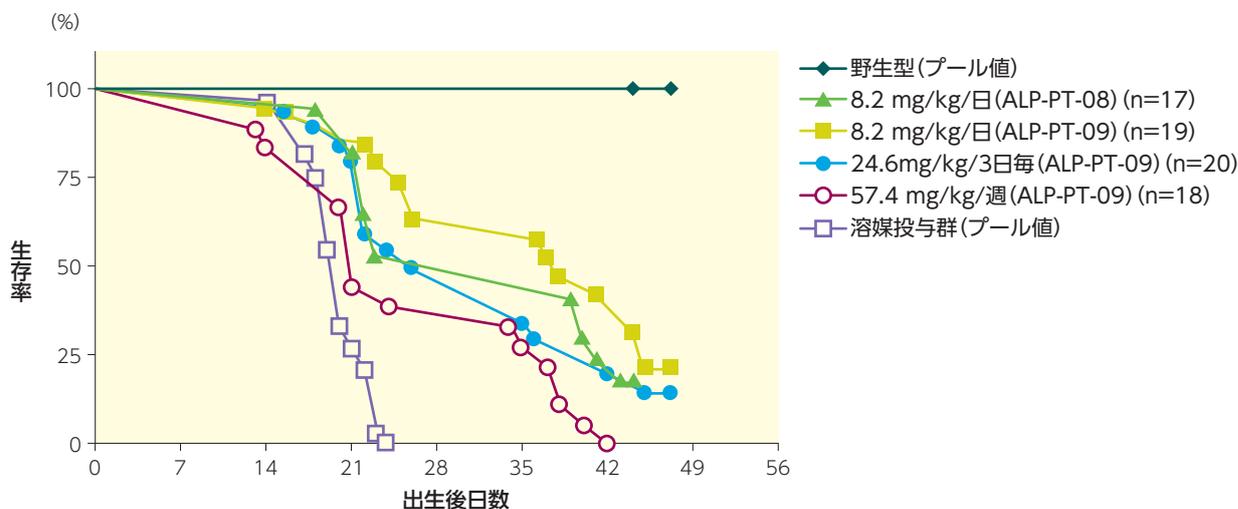
$Akp2^{-/-}$ マウスに溶媒又はアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを15日目から43日目まで毎日投与し、生存率を評価した。同齢同腹の未投与野生型マウスを対照群とした。

[ALP-PT-09試験]

下記用量の4群を設定し生存率を評価した。同齢同腹の未投与野生型マウスを対照群とした。

- ・ 第1群： $Akp2^{-/-}$ マウスに溶媒を12日目から46日目まで毎日投与
- ・ 第2群： $Akp2^{-/-}$ マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを12日目から46日目まで毎日投与
- ・ 第3群： $Akp2^{-/-}$ マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを12日目から18日目まで毎日投与後、24.6mg/kgを46日目まで3日おきに投与
- ・ 第4群： $Akp2^{-/-}$ マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを12日目から18日目まで毎日投与後、57.4mg/kgを46日目まで1週間おきに投与

治療的投与試験におけるAkp2^{-/-}マウスの生存曲線に対するアスホターゼ アルファの作用



試験方法: [ALP-PT-08試験]

Akp2^{-/-}マウスに溶媒又はアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを15日目から43日目まで毎日投与し、生存率を評価した。同齢同腹の未投与野生型マウスを対照群とした。

[ALP-PT-09試験]

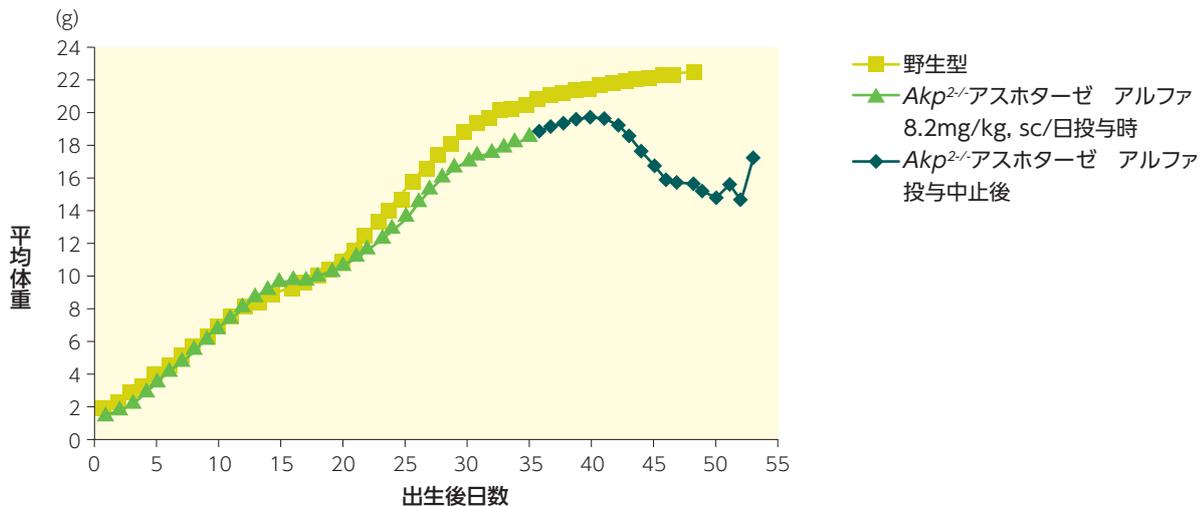
下記用量の4群を設定し生存率を評価した。同齢同腹の未投与野生型マウスを対照群とした。

- ・ 第1群: Akp2^{-/-}マウスに溶媒を12日目から46日目まで毎日投与
- ・ 第2群: Akp2^{-/-}マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを12日目から46日目まで毎日投与
- ・ 第3群: Akp2^{-/-}マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを12日目から18日目まで毎日投与後、24.6mg/kgを46日目まで3日おきに投与
- ・ 第4群: Akp2^{-/-}マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを12日目から18日目まで毎日投与後、57.4mg/kgを46日目まで1週間おきに投与

(6) 低ホスファターゼ症のモデルマウス ($Akp2^{-/-}$ マウス) に対する予防的投与の中止試験 (35日間投与)³²⁾

$Akp2^{-/-}$ マウスの本薬投与群の全例が生後53日(投与終了18日後)までに死亡し、投与終了後の生存期間(中央値)は14日であった。死亡時の石灰化異常の程度について、 $Akp2^{-/-}$ マウスの本薬投与群及び野生型の全例で正常であり、投与終了による悪化は認められなかった。体重について、 $Akp2^{-/-}$ マウスの本薬投与群で投与終了の7日後以降に体重の減少及び臨床徴候の悪化(活動性低下、脱水、猫背様姿勢及びけいれん発作)が認められた。

出生時から35日間アスホターゼ アルファを投与し、その後36日目から投与を中止した $Akp2^{-/-}$ マウスの体重曲線



試験方法：食餌にピリドキシンを補充しない条件下で行った。 $Akp2^{-/-}$ マウスにアスホターゼ アルファ8.2mg/kgを出生時から35日間毎日皮下投与した。36日目に投与中止した後、動物が死亡するまで経過観察を行った。投与開始から死亡時までの有効性の評価項目は体重及び生存率とし、死亡時に後足部骨の石灰化異常について評価を行った。同齢の非処置野生型マウスを対照群とした。