目次

2.4 非臨床試験の概括評価....4
2.4.1 非臨床試験計画概略....5
2.4.2 薬理試験（2.6.2 項）....9
2.4.2.1 効力を裏付ける試験....9
2.4.2.2 副次的薬理試験....11
2.4.2.3 安全性薬理試験....27
2.4.3 薬物動態試験（2.6.4 項）....27
2.4.3.1 分析法....28
2.4.3.2 吸収....28
2.4.3.3 分布....28
2.4.3.4 代謝....29
2.4.3.5 排泄....29
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用....29
2.4.4 毒性試験（2.6.6 項）....29
2.4.4.1 単回投与毒性試験....30
2.4.4.2 反復投与毒性試験....30
2.4.4.3 遺伝毒性試験....33
2.4.4.4 がん原性試験....33
2.4.4.5 生殖発生毒性試験....35
2.4.4.6 局所刺激性試験....37
2.4.4.7 そのほかの毒性試験....38
2.4.5 総括及び結論....40
2.4.6 参考文献....43

表一覧

表 2.4-1 カニクイザル及びゴールデンシリアンハムスターを用いた evolocumab の重要な毒性試験における曝露マージン....8

図一覧

図 2.4-1 evolocumab は PCSK9 に結合する遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体であり、PCSK9 と LDLR の相互作用を阻害することで LDLR の分解を抑制し、LDLR 発現量を増加させ、血清中 LDL-C を低下させる....4
図 2.4-2 evolocumab を 10 mg/kg で単回 SC 投与した後の evolocumab の曝露量、遊離 PCSK9 の減少、並びに血清中 LDL-C の低下との間の PK/PD 関連性（111322 試験）....11
図 2.4-3 LDL 受容体ファミリータンパク質....16
図 2.4-4 LDLR ファミリータンパク質の EGFa ドメインの配列アラインメント....17

略語・用語一覧

Abbreviation or Term	Definition/Explanation
AD	alzheimer disease（アルツハイマー病）
AERS	Adverse Event Reporting System（有害事象報告システム）
AMG 145	evolocumab
ApoE	apolipoprotein E（アポリポ蛋白 E）
ApoER2	apolipoprotein E receptor 2（アポリポ蛋白 E 受容体 2）
APP	amyloid beta-protein precursor（β部位アミロイド前駆体蛋白）
AUC_{inf}	area under serum concentration-time curve from time zero to infinity（投与後 0 時間から無限大時間までの血中濃度－時間曲線下面積）
Aβ	amyloid beta-peptide（アミロイドβペプチド）
BACE1	beta-site amyloid beta A4 precursor protein-cleaving enzyme 1（β部位アミロイド前駆体蛋白切断酵素 1）
BBB	blood brain barrier（血液脳関門）
CL/F	apparent clearance（見かけのクリアランス）
CNS	central nervous system（中枢神経系）
CSF	cerebrospinal fluid（ヒト脳脊髄液）
CVD	cardiovascular disease（心血管系疾患）
DDI	drug-drug Interaction（薬物間相互作用）
EDL	extensor digitorum longus muscle（長趾伸筋）
EGF	epidermal growth factor（上皮成長因子）
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素免疫測定法）
ePPND	enhanced pre-and post-natal development（拡充型出生前及び出生後発生毒性）
FcRn	neonatal Fc receptor（新生児 Fc 受容体）
FDA	Food and Drug Administration（米国食品医薬局）
FH	familial hypercholesterolemia（家族性高コレステロール血症）
GLP	Good Laboratory Practice
HbA1c	hemoglobin A1c（血中グルコース及び糖化ヘモグロビン）
HCV	hepatitis C virus（C 型肝炎ウイルス）
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol（高比重リポ蛋白コレステロール）
HMG CoA	hydroxymethylglutaryl-coenzyme A（ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A）
HoFH	homozygous familial hypercholesterolemia（家族性高コレステロール血症ホモ接合体）
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IgG2	Immunoglobulin G2（免疫グロブリン G2）
K_D	equilibrium dissociation constant（平衡解離定数）
KLH	keyhole limpet hemocyanin（キーホールリンペットヘモシアニン）
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol（低比重リポ蛋白コレステロール）
LDLR	low density lipoprotein receptor（低比重リポ蛋白受容体）
LOF	loss of function（機能喪失）
LRP's	LDL-receptor related protein (LDLR 関連受容体)
NOAEL	no observed adverse effect level（無毒性量）
NOEL	no observed effect level（無影響量）
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9（プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型）
Q2W	once every 2 weeks（2 週に 1 回）
Q4W	once every 4 weeks（4 週に 1 回）
QD	once daily（1 日 1 回）
QW	once weekly（週に 1 回）
SC	subcutaneous（皮下）
SNP	single nucleotide polymorphisms（一塩基変異多型）

Abbreviation or Term	Definition/Explanation
SPR	surface plasmon resonance（表面プラズモン共鳴）
TDAR	T cell - dependent antibody response（T 細胞依存性抗体反応）
TK	toxicokinetics（トキシコキネティクス）
VLDL-C	very low density lipoprotein cholesterol（超低比重リポ蛋白コレステロール）
VLDLR	very low density lipoprotein receptor（超低比重リポ蛋白受容体）
V_{ss}	volume of distribution at steady state（定常状態分布容積）
V_z/F	apparent volume of distribution（見かけの分布容積）

2.4　非臨床試験の概括評価

緒言

evolocumab（AMG145）は、プロ蛋白転換酵素サブチリシン／ケキシン 9 型（PCSK9）と特異的に結合し、PCSK9 と低比重リポ蛋白受容体（LDLR、図 2.4-1）との相互作用を阻害する遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体である。PCSK9 が LDLR と結合すると、LDLR は細胞表面に戻って再利用されずに細胞内で分解されるため、血流からの低比重リポ蛋白コレステロール（LDL-C）のクリアランスを担う LDLR の量が減少する。evolocumab は PCSK9 を阻害することで LDLR の分解を抑制し、LDLR 発現量を増加させることにより、LDL-C の循環血中濃度を低下させる。LDL-C の循環血中濃度の低下は、心血管系疾患（CVD）のリスク低下において確立された代替評価項目である（Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration［CTTC］, 2010）。

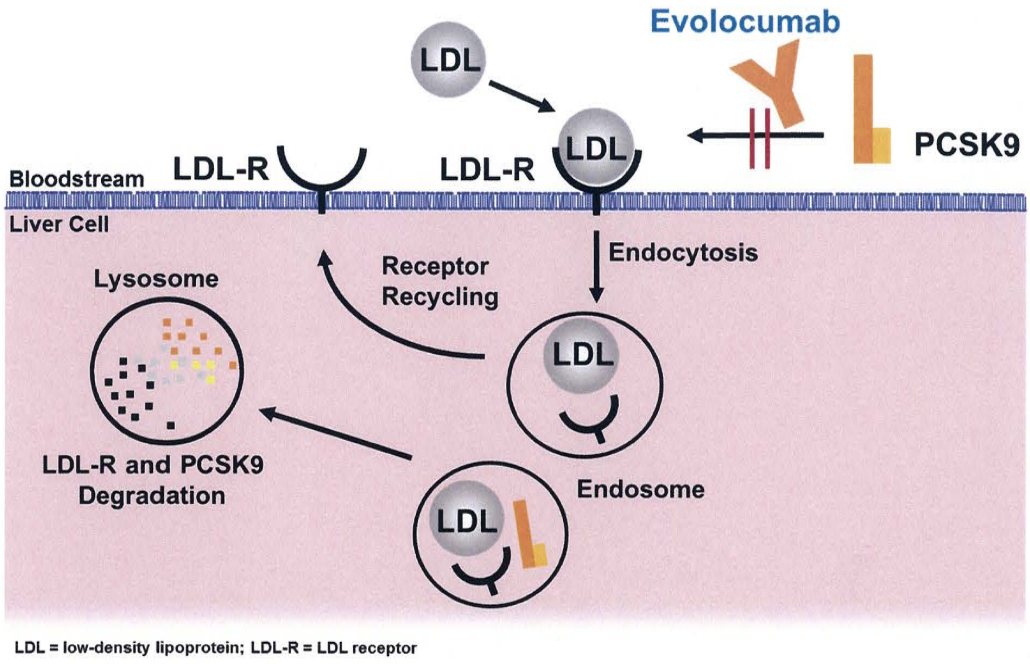


図 2.4-1　evolocumab は PCSK9 に結合する遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体であり、PCSK9 と LDLR の相互作用を阻害することで LDLR の分解を抑制し、LDLR 発現量を増加させ、血清中 LDL-C を低下させる

evolocumab は、原発性高脂血症（家族性ヘテロ接合体及び非家族性）及び混合型脂質異常症（PHMD）の成人の治療を目的として（本申請においては、高コレステロール血症［HC］及び家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体［HeFH］）、Amgen 社により開発されてきた。evolocumab の作用は、これらの患者集団を対象として、2 種類の臨床的に同等な投与法、すなわち 140 mg を 2 週に 1 回、皮下（SC）投与する方法（Q2W）及び 420 mg を 4 週に 1 回 SC 投与する方法（Q4W）で評価された。

また、evolocumab は、成人及び 12 歳以上の家族性高コレステロール血症ホモ接合体（HoFH）においても開発されている。HoFH は希少疾病であるため（約 100 万人に 1 人）、Amgen 社は、

2013年9月12日にFDAよりHoFHの適応症について、Office of Orphan Drug Productsから希少疾病用医薬品の指定を受けた（指定番号13-4041）。HoFHでは、420 mg SC Q4W及び420 mg SC Q2Wの用量が評価された。高用量となる420 mg Q2Wは、この集団における高いPCSK9濃度及び使用可能な臨床データに基づいて選択された。また、Q2Wという投与頻度は、家族性高コレステロール血症（FH）患者のアフェレーシス治療で最も多く実施されている頻度と同じである。

高脂血症の性質及びそれが心血管系疾患（CVD：虚血性心疾患、脳卒中、その他の心血管系疾患）リスクに及ぼす長期的な影響を考慮して、evolocumabは長期使用を想定している。本概要文の目的は、添付資料の2.6項及び第4部に示す薬理学、薬物動態、並びに毒性に関する資料について総合的に評価し、臨床使用における安全性を予測することである。本概要文の各項では、考察している試験の報告書番号及び該当する概要表との相互参照を示す（2.6.3項、2.6.5項、2.6.7項）。

2.4.1　非臨床試験計画概略

evolocumabの非臨床試験計画は、生物薬剤に関する規制ガイダンス、特に日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインであるICH S6（R1）、ICH M3（R2）、並びにICH S5（R2）に従い実施した。本申請資料に含まれている非臨床薬理及び薬物動態（PK）試験の多くは、カリフォルニア州サンフランシスコ又はワシントン州シアトルのAmgen社が実施した。主要な毒性試験（トキシコキネティクス［TK］を含む）は、受託試験機関（[redacted]［[redacted]又は[redacted]］又は[redacted]［[redacted]又は[redacted]］）で実施した。

evolocumabはヒト、カニクイザル、ハムスターのPCSK9に同程度の高い親和性を示したため（平衡解離定数［K_D］はそれぞれ16、8、14 pmol/L）、evolocumabの臨床開発プログラムを裏付ける薬理、薬物動態、並びに毒性試験ではハムスター及びカニクイザルを使用した（2.6.2項）。臨床投与経路に準じ、すべての反復投与毒性試験は皮下投与で実施した。evolocumabの投与頻度は、初期の試験では週に1回（QW）としたが、その後の試験では最もよく行われている臨床投与法に合わせQ2Wとした。ICH S6（R1）に従い、（a）試験動物においてdynamic range（ほぼ最大に近い）の薬理効果（血清中LDL-Cの低下）が得られる用量、及び（b）ヒトにおけるリスクの評価を可能にする薬物の曝露マージンを得ることができる用量を選択した。特にコレステロール恒常性及び血清中LDL-Cの調節におけるPCSK9の役割を考慮し（2.6.2項）、毒性試験には血清中LDL-C及び総コレステロールの評価を含めた。

毒性試験及びトキシコキネティクス（TK）試験はGood Laboratory Practice（GLP）基準を遵守し実施した。

非臨床の課題に関する記述

evolocumabの開発中に、非臨床試験において安全性に関する課題は特定されなかった。evolocumabに関連した影響は、予測された薬理作用（血清中LDL-C及び総コレステロールの低下）に限られた。毒性評価として、evolocumabを最高300 mg/kgの用量でハムスター及びカニクイザルに投与した反復投与試験（それぞれ最長3及び6カ月間）、ロスバスタチン（5 mg/kg）とevolocumab（最高100 mg/kg）を併用したカニクイザルにおける3カ月間反復投与試験、ハムスター

におけるがん原性試験（最大 100 mg/kg）、ハムスターの受胎能（最大 100 mg/kg）、並びにカニクイザルを用いた拡充型出生前及び出生後発生毒性（ePPND）試験（50 mg/kg）を行った。いずれの試験でも evolocumab と関連した毒性は確認されなかった。抗 evolocumab 抗体の発現がわずかであったことから（≤10%）、これらの試験では十分な毒性評価が可能であった。これらの成績から、PHMD（140 mg Q2W 及び 420 mg Q4W）、並びに HoFH 患者（420 mg Q4W 又は Q2W、表 2.4-1）における evolocumab の臨床試験の安全性を担保するのに十分な曝露マージンが得られた。結論として、これらの非臨床試験成績からは、安全上懸念となる点はみられていない。

evolocumab の非臨床プログラムの主要な結論

- *in vitro* で、evolocumab は PCSK9 と LDLR との相互作用を阻害して、PCSK9 を介した LDLR の分解を抑制する。その結果、PCSK9 による細胞への LDL 取り込み減少を抑制する。また、スタチン存在下及び非存在下で、HepG2 細胞の LDLR 蛋白濃度を上昇させる。
- evolocumab は、ヒト PCSK9 と高い親和性で結合する（K_D = 16 pmol/L）。
- evolocumab は、ハムスター及びカニクイザルの PCSK9 とも高い親和性で結合し（それぞれ K_D = 14 及び 8 pmol/L）、PCSK9 と LDLR の相互作用を抑制することにより、肝臓 LDLR 蛋白濃度を上昇させ、血清中 LDL-C を低下させる。
- ハムスター及びカニクイザルを用いた単回投与及び反復投与試験で evolocumab の PK 及び TK の特徴を明らかにした。
  - evolocumab は、標的介在性消失と一致した非線形の PK を示し、また分布容積が小さいことから組織分布は限られる。
  - evolocumab の反復投与では、単回投与と比較して、時間に依存した PK の変化を示す兆候はなかった。
  - 血清中の非結合型 evolocumab と LDL-C の間に、濃度－反応の関連性が認められた。
- ハムスター及びカニクイザルにおいて、最高 300 mg/kg を QW で投与した反復投与毒性試験（ハムスターで最長 3 カ月間、カニクイザルで最長 6 カ月間）、並びにカニクイザルを用いたロスバスタチンとの 3 カ月間併用毒性試験（最高 100 mg/kg Q2W）では、evolocumab による毒性は認められなかった。これらの試験の無毒性量（NOAEL）における曝露マージンは、evolocumab の 420 mg を Q4W で投与したときの臨床曝露量と比較して、ハムスターでは最大 46 倍、カニクイザルでは最大 300 倍であった。
  - evolocumab による影響は、薬理作用（血清中 LDL-C 及び総コレステロールの低下）に限られた。
  - カニクイザルでは、免疫機能、眼及び心血管系について詳細に検査した。
  - どちらの種でも筋毒性の証拠はなかった。
  - ハムスター及びカニクイザルでは抗 evolocumab 抗体の発現がわずかであったことから（≤10%）、全試験期間において evolocumab の毒性評価に影響はなかった。
- ハムスターにおける受胎能及び初期胚発生試験では、生殖及び発生に関する無影響量（NOEL）は試験した最高用量（100 mg/kg Q2W）で、420 mg Q4W の臨床曝露量と比較して推定 15 倍のマージンがあった。性成熟したカニクイザルに 420 mg Q4W の臨床曝露量の 300 倍を 6 カ月継

続したとき、生殖器の重量又は病理組織検査所見、月経周期、あるいは精子パラメータに影響はなかった。

- カニクイザルにおける ePPND 試験では、妊娠、胚・胎児あるいは生後の成長及び発達に影響はなかった。発生への NOEL は試験した最高用量（50 mg/kg Q2W）で、420 mg Q4W の臨床曝露量に対して 12 倍のマージンがあった。母体における evolocumab に関連した影響は、薬理作用に限られていた。出生児では、成獣での最大の薬理作用を誘発する曝露量であったことから、evolocumab の胎盤通過が確認された。しかし、平均 LDL-C 濃度は、対照の出生児と比較してわずかに低いだけであった。
- ハムスターにおける 2 年間の生涯投与試験では、死亡、腫瘍性又は非腫瘍性変化に evolocumab に関連した影響は認められなかった。evolocumab 投与による影響は、薬理作用に限られた。NOAEL は試験した最高用量（100 mg/kg Q2W）で、420 mg Q4W の臨床曝露量の 15 倍のマージンがあった。

表 2.4-1　カニクイザル及びゴールデンシリアンハムスターを用いた evolocumab の重要な毒性試験における曝露マージン

ヒトに対する用量 (mg)	ヒトの $AUC_{0\text{-}tau}$ (mg·hr/mL)	曝露量比（NOAEL での $AUC_{0\text{-}tau}$ に基づく）			
		サル 6 カ月	ハムスター 3 カ月	サル ePPND	ハムスター がん原性
140 Q2W	4.6	745×	115×	29×	37×
420 Q4W	23.1	300×	46×	12×	15×
420 Q2W	25.9	133×	21×	5×	7×

略語：$AUC_{0\text{-}tau}$：非結合 evolocumab の血中濃度－時間曲線下面積、ePPND：拡充型出生前及び出生後発生毒性、NOAEL：無毒性量、Q2W：2 週に 1 回、Q4W：4 週に 1 回

曝露マージン算出には、6 カ月間 GLP サル毒性試験（110359 試験）における投与 180 日の NOAEL（QW 投与で 1730000 μg·hr/mL ［1730 mg·hr/mL］）、ハムスター3 カ月間反復投与 GLP 薬理試験（114375 試験）の投与 85 日の NOAEL（QW 投与で 266000 μg·hr/mL ［266 mg·hr/mL］）、カニクイザルの ePPND 試験（110370 試験）の GD133 の NOAEL（Q2W 投与で 5600 μg·day/mL［134.4 mg·hr/mL］）、並びにハムスターにおける生涯投与試験（114976 試験）の投与 27 週の NOAEL（Q2W 投与で 172000 μg·hr/mL ［172 mg·hr/mL］）を用いた。evolocumab のヒトの曝露量には、原発性高脂血症及び混合型脂質異常症の患者に対する単剤療法として 140 mg Q2W 又は 420 mg Q4W で SC 投与後（20101154 試験）、あるいは重症の家族性高コレステロール血症患者に対して 420 mg Q2W で SC 投与後（20110271 試験）の $AUC_{0\text{-}tau}$ を用いた。更に、ハムスター及びサルの試験の投与間隔（1 又は 2 週間）とヒトの試験の投与間隔（2 又は 4 週間）の差について調整した。

曝露マージンは、以下の式により算出した。

$$\text{ヒトでの曝露マージン} = \frac{\text{サルの } AUC_{0\text{-}tau}}{\text{ヒトの } AUC_{0\text{-}tau}} * \frac{\text{ヒトの投与間隔（2 週又は 4 週）}}{\text{サルの投与間隔（1 週又は 2 週）}}$$

$$\text{ヒトでの曝露マージン} = \frac{\text{ハムスターの } AUC_{0\text{-}tau}}{\text{ヒトの } AUC_{0\text{-}tau}} * \frac{\text{ヒトの投与間隔（2 週又は 4 週）}}{\text{ハムスターの投与間隔（1 週又は 2 週）}}$$