目次

2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 7
2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 7
2.6.6.3.1 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による 16 週間休薬期間を含む 28 日間反復投与毒性試験（112699 試験） 8
2.6.6.3.2 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による 3 カ月間反復投与薬理試験（114375 試験） 10
2.6.6.3.3 カニクイザルにおける evolocumab の皮下投与による 21 週間の休薬期間を含む 6 週間反復投与毒性試験（110149 試験） 10
2.6.6.3.4 カニクイザルにおける evolocumab の皮下投与による 25 週間休薬期間を含む 6 カ月間反復投与毒性試験（110359 試験） 13
2.6.6.3.5 カニクイザルにおける evolocumab 及びロスバスタチンの 4 カ月間休薬期間を含む 3 カ月間併用反復投与毒性試験（112311 試験） 18
2.6.6.4 遺伝毒性試験 22
2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 22
2.6.6.5.1 試験計画 22
2.6.6.5.2 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による生涯投与試験（114976 試験） 24
2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 26
2.6.6.6.1 ハムスターにおける evolocumab の受胎能及び初期胚発生試験（114975 試験） 26
2.6.6.6.2 カニクイザルにおける evolocumab の生後 6 カ月までの評価を行った拡充型出生前及び出生後発生毒性（ePPND）試験（110370 試験） 26
2.6.6.6.3 幼若動物を対象とした試験 30
2.6.6.7 局所刺激性試験 30
2.6.6.7.1 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による局所刺激性試験（115815 試験） 30
2.6.6.7.2 ウサギにおける evolocumab の静脈内投与による局所刺激性試験（110151 試験） 31
2.6.6.8 その他の毒性試験 31
2.6.6.8.1 *in vitro* のゴールデンシリアンハムスターの組織を用いた Alexa Fluor 488 修飾 evolocumab の組織交差反応性試験（112876 試験）、並びにヒト及びカニクイザルの正常組織を用いた Alexa Fluor 488 修飾 evolocumab の交差反応性試験（110148 試験） 31
2.6.6.9 考察及び結論 33
2.6.6.10 参考文献 35

表一覧

表 2.6.6-1 非臨床毒性試験の一覧 6
表 2.6.6-2 2 年間生涯投与試験の用量（Q2W）の臨床用量に対するマージン（用量及び曝露量として） 23
表 2.6.6-3 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 34

図一覧

図 2.6.6-1 薬理作用：evolucumab 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 5
図 2.6.6-2 evolocumab の 30、100、300 mg/kg を QW で 28 日間投与したときの LDL-C 低下効果（112699 試験） 9

図 2.6.6-3　カニクイザルに evolocumab の 3、30、300 mg/kg を QW で 6 週間投与したときの LDL-C 低下効果（110149 試験）.....12
図 2.6.6-4　カニクイザルに evolocumab の 3、30、300 mg/kg を QW で 6 カ月間投与したときの LDL-C 低下効果（110359 試験）.....15
図 2.6.6-5　IgG 抗体価：すべての動物を対象とした場合.....17
図 2.6.6-6　IgG 抗体価：免疫前に抗 KLH 抗体が認められた動物を除外した場合.....17
図 2.6.6-7　カニクイザルにおける evolocumab とロスバスタチンの 3 カ月間併用毒性試験における LDL-C 低下効果（112311 試験）.....20
図 2.6.6-8　カニクイザルにおける evolocumab とロスバスタチンの 3 カ月間併用毒性試験における総コレステロールに対する効果（112311 試験）.....21
図 2.6.6-9　カニクイザルにおける ePPND 試験における母体及び出生児の LDL-C に対する evolocumab の影響（110370 試験）.....29

略語・用語一覧

Abbreviation or Term	Definition/Explanation
AMG 145	Evolocumab
ApoB	apolipoprotein B（アポリポ蛋白 B）
AUC	area under serum concentration-time curve（血中濃度－時間曲線下面積）
C_{max}	maximum concentration（最高血中濃度）
ePPND	enhanced pre and postnatal development（拡充型修正前及び出生後発生毒性）
FDA	Food and Drug Administration（食品医薬品局）
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）
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol（高比重リポ蛋白コレステロール）
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）
IV	intravenous(ly)（静脈内）
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol（低比重リポ蛋白コレステロール）
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）
QD	once daily（1 日 1 回）
Q2W	once every 2 weeks（2 週に 1 回）
Q4W	once every 4 weeks（4 週に 1 回）
QW	once weekly（週に 1 回）
SC	subcutaneous(ly)（皮下）
TDAR	T-cell dependent antibody response（T 細胞依存性抗体産生）

AUC 換算対照表

AUC (μg·hr/mL)	AUC (μg·day/mL)	AUC (μg·hr/mL)	AUC (μg·day/mL)
994	41.4	48500	2020
1090	45.4	52000	2170
1370	57.1	55000	2290
1680	70.0	58100	2420
4060	169	62300	2600
4380	183	64600	2690
4530	189	66500	2770
4600	192	66800	2780
4660	194	73200	3050
4700	196	76400	3180
4990	208	86900	3620
6500	271	110000	4580
6600	275	134000	5580
7710	321	137000	5710
8630	360	138000	5750
9300	388	150000	6250
9770	407	172000	7170
9850	410	195000	8130
10700	446	206000	8580
13100	546	208000	8670
14900	621	225000	9380
18400	767	229000	9540
18500	771	248000	10300
20500	854	266000	11100
22100	921	270000	11300
23100	963	317000	13200
25400	1060	331000	13800
25900	1080	646000	26900
27100	1130	833000	34700
38700	1610	1550000	64600
42800	1780	1730000	72100
44900	1870		

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

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）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。（図 2.6.6-1）

PCSK9 が LDLR と結合すると、LDLR は細胞内で分解され、細胞表面に戻って再利用されないため、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 を阻害することにより LDLR の細胞内での分解を抑制し、LDLR 発現量を増加させることにより、LDL-C の循環血液中濃度を低下させる。

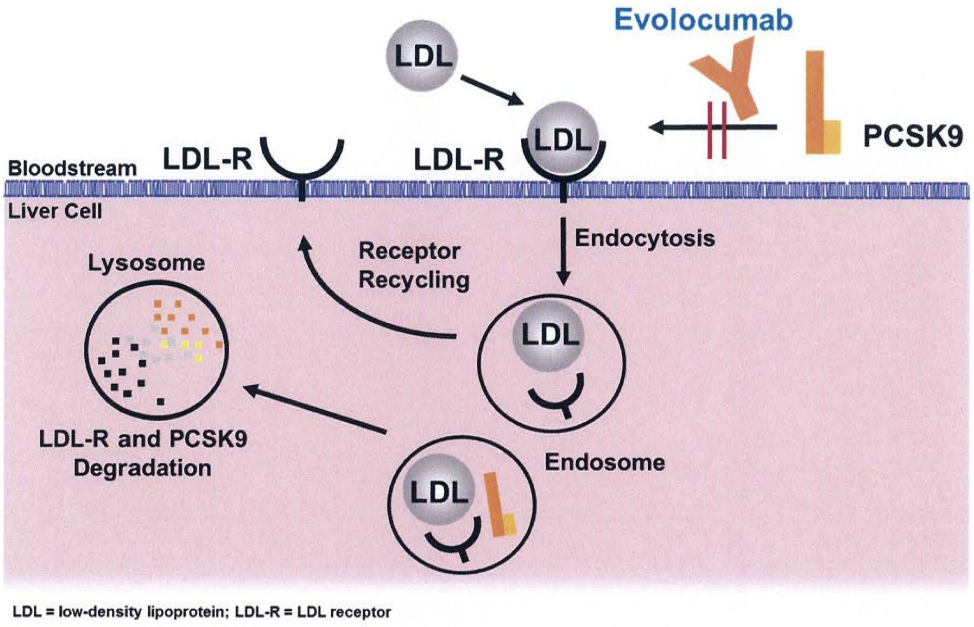


図 2.6.6-1　薬理作用：evolucumab は PCSK9 に結合する遺伝子組換えヒト IgG2 モノクローナル抗体であり、PCSK9 と LDLR の相互作用を阻害することで LDLR の分解を抑制し、LDLR 発現量を増加させ、血清中 LDL-C を低下させる

evolocumab の非臨床安全性プロファイルを明らかにするため、該当するガイダンス、特に日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）の S6（R1）、ICH M3（R2）、並びに ICH S5（R2）に沿い、毒性試験を実施した。evolocumab はヒト、カニクイザル、ハムスターの PCSK9 と同等の高い親和性で結合した（平衡解離定数［K_D］はそれぞれ 16、8、14 pmol/L、2.6.2.2.1.1 項）。臨床開発プログラムの安全性を担保する毒性試験は、ハムスター及びカニクイザルにおいて実施した。すべての反復投与毒性試験の投与経路は、臨床に準じ皮下（SC）投与とした。evolocumab の投与は、初期の試験では週 1 回（QW）としたが、その後の試験では臨床の最も高頻度な投与法である 2 週に 1 回（Q2W）とした。用量は、ICH S6（R1）に沿い、試験動物において最大もしくはそれに近い薬理作用（血清中 LDL-C の低下）を期待できる用量、及びヒトにおけるリスクを評価できる適切な薬物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 の役割を考慮して（2.6.2 項）、毒性試験において血清中 LDL-C 及び総コレステロールの評価を実施した。試験は、GLP 基準を遵守し実施した。

evolocumab の非臨床毒性試験の一覧を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1　非臨床毒性試験の一覧

試験の標題	試験施設	GLP	Amgen 社 試験番号
反復投与毒性試験			
ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による 16 週間休薬期間を含む 28 日間反復投与毒性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	112699
ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による 3 カ月間反復投与薬理試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	114375
カニクイザルにおける evolocumab の皮下投与による 21 週間の休薬期間を含む 6 週間反復投与毒性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	110149
カニクイザルにおける evolocumab の皮下投与による 25 週間休薬期間を含む 6 カ月間反復投与毒性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	110359
カニクイザルにおける evolocumab 及びロスバスタチンの 4 カ月間休薬期間を含む 3 カ月間併用反復投与毒性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	112311
がん原性			
ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による生涯投与試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	114976
生殖及び発生毒性			
ハムスターにおける evolocumab の受胎能及び早期胚発生試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	114975
カニクイザルにおける evolocumab の生後 6 カ月までの評価を行った拡充型出生前及び出生後発生毒性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	110370
局所刺激性			
ハムスターにおける evolocumab 皮下投与による局所刺激性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	115815
ウサギにおける evolocumab の静脈内投与による局所刺激性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	110151
その他の毒性試験			
in vitro のゴールデンシリアンハムスターの組織を用いた Alexa Fluor 488 修飾 evolocumab の組織交差反応性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	112876
ヒト及びカニクイザルの正常組織を用いた Alexa Fluor 488 修飾 evolocumab の交差反応性試験	[redacted]、米国[redacted]	適合	110148

GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令

evolocumabの300 mg/kgまでをQWで最長3カ月間投与したハムスター及び6カ月間投与したカニクイザルに、evolocumabと関連した毒性は認められなかった。これらの試験では薬理作用として血清中LDL-C及び総コレステロールが各々およそ最大85%及び40%低下し、投与終了後に投与前の水準に戻った。カニクイザルにおいて、evolocumabの100 mg/kgまでをQ2Wでロスバスタチン5 mg/kgの1日1回経口投与と3カ月間併用投与したが、有害な影響は認められなかった。本併用投与試験でみられた血清中LDL-C及び総コレステロールの低下は、evolocumab単独投与時に観察された低下よりやや大きかったが、投与終了後に投与前の水準に戻った。

evolocumabのがん原性を評価するために、ハムスターの生涯投与試験を実施した。ハムスターにevolocumabの100 mg/kgまでをQ2Wで最長2年間投与したが、腫瘍発生率は上昇しなかった。該当するガイダンス（ICH S6［R1］）に沿い、evolocumabの遺伝毒性試験は実施しなかった。

妊娠した雌カニクイザルにevolocumabを50 mg/kgの用量で、妊娠20日ないし22日から出産までQ2Wで投与したが、胚・胎児発生又は出生後の発育（生後6カ月までの骨格、神経行動、並びに外表／内臓評価を実施）に影響は認められなかった。ハムスターにevolocumabの100 mg/kgまでをQ2Wで投与したとき、雄又は雌の受胎能（発情周期、精子検査、交尾行動、並びに初期胚発生）に影響は認められなかった。なお、性成熟したカニクイザルにevolocumabの300 mg/kgまでをQWで6カ月間投与したとき、生殖器官の重量又は病理組織学的検査、月経周期、あるいは精子パラメータに影響は認められなかった。

全体として、evolocumab投与による影響は意図した薬理作用に限られた。ハムスター又はカニクイザルにおけるevolocumabの反復投与毒性試験では、ヒトに420 mgを4週に1回（Q4W）で投与したときの曝露量に比較して、それぞれ最大46倍及び300倍でも毒性は認められなかった（表2.6.6-3）。同じく最大15倍の曝露量で、ハムスターの受胎能及び初期胚発生あるいはカニクイザルの胚・胎児発生又は出生後発育に対する影響はなく、ハムスターの生涯投与試験においてevolocumab投与に関連した腫瘍発生の兆候はなかった（表2.6.6-3）。結論として、これらの非臨床毒性試験成績は、ヒトのリスクに関連する安全上の懸念の兆候はないことを示していた。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

ICH S6（R1）に沿い、evolocumabの単回投与毒性試験は実施していない。カニクイザルに単回静脈内（IV）投与（300 mg/kg）を行った安全性薬理試験（110150試験、2.6.2.4項）、あるいはハムスター及びカニクイザルに300 mg/kgまでSC投与した反復投与毒性試験（112699、114375、110149、110359試験）の初回投与後において、急性毒性の兆候は観察されなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

ハムスターにおいて最長3カ月間、カニクイザルにおいて最長6カ月間のSC投与による反復投与毒性試験を実施した。これらの試験で認められた本薬投与に関連した変化は、予測された血清中LDL-C（ハムスターではHDL-C）低下作用に限られた。そのため、引き続き実施した長期反復投与毒性試験には、ICH S6（R1）ガイドラインに沿って単一の動物種としてカニクイザルを用いた。ま

た、ハムスターにおける生涯投与試験（114976 試験）において、げっ歯類での慢性毒性評価も行われた。

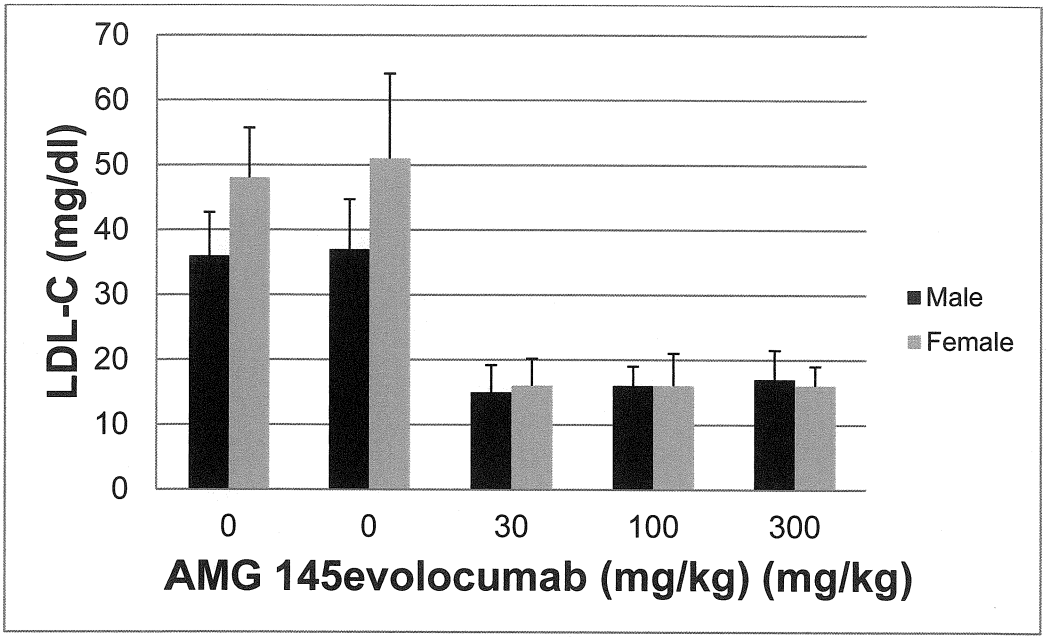
2.6.6.3.1 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による 16 週間休薬期間を含む 28 日間反復投与毒性試験（112699 試験）

evolocumab を 0、30、100、及び 300 mg/kg の用量で、成熟した雌雄のゴールデンシリアンハムスターに QW で反復 SC 投与した。主試験では各群 30 匹／性、トキシコキネティクス評価では各群 8 匹／性を使用した。ハムスターは背景データが限られるため、対照群を 2 群設定した。evolocumab を QW で 4 回投与した後、16 週間の休薬期間を設定した。回復試験は全用量について実施し、各群で最大 15 匹／性を用いた。

死亡、臨床症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、臓器重量、剖検所見、及び病理組織学的所見に、evolocumab 投与に関連した影響はなかった。

すべての evolocumab 投与群において、evolocumab の薬理作用による変化が観察された（図 2.6.6-2）。すなわち、すべての evolocumab 投与群で、血清中の LDL-C、総コレステロール、及び高比重リポ蛋白コレステロール（HDL-C）が低下した。LDL-C は雄で最大 59%及び雌で最大 69%低下し、HDL-C 及び総コレステロールの低下（雄で最大 41%及び雌で最大 53%）より顕著であった。観察された LDL-C 及び HDL-C の低下は、ハムスターにおける evolocumab の薬理活性と一致した。すなわち、すべての種で LDL 受容体は通常 LDL コレステロールの ApoB 成分と結合するが、ApoE に対する親和性も有する（Mahley et al, 1977、Bersot et al, 1976）。しかし、霊長類と比較してハムスターでは HDL-C 中の ApoE 量が多いため（Goulinet and Chapman, 1993）、HDL-C が低下すると考えられる。一方、カニクイザルにおける反復投与試験では、evolocumab による HDL-C の低下はまったく認められないか、若しくは極わずかな低下が散発される程度であった（2.6.6.3.3 項）。

すべての投与群において、コレステロール（LDL-C、総コレステロール、及び HDL-C）の低下は休薬期間に入ってからも 3 週間持続し、100 mg/kg 以上の投与群では、LDL-C の低下は休薬期間に入ってから 7 週間持続した。これらのコレステロールの変化は、薬物動態／薬力学的試験結果と一致した（2.6.2 項）。



ゴールデンシリアンハムスター（30匹／雄雌／群）にevolocumab（AMG 145）の30、100及び300 mg/kg（並びに2つの同時対照群）をQWで28日間SC投与し、投与29日に血中のLDL-C濃度を測定した。

図 2.6.6-2　evolocumab の 30、100、300 mg/kg を QW で 28 日間投与したときの LDL-C 低下効果（112699 試験）

その他の変化は、雄全evolocumab投与群における血清中アルカリホスファターゼ（ALP）のわずかな上昇（11%～13%）及び雄300 mg/kg群における血清中タンパク質及びグロブリンのわずかな増加に限られた。いずれの変化も完全に可逆的で、病理組織学的検査及びほかの臨床病理検査項目に関連する変化がみられなかったことから、軽微な変化で有害ではないと考えられた。これらの変化について、ALPの変化はハムスターでみられるコレステロール／胆汁処理における雌雄差によることが想定され、タンパク質とグロブリンのわずかな高値はevolocumab投与によるタンパク質負荷に関連すると考えられた。しかし、これらの軽微な変化は以降の長期試験では観察されなかったことから（2.6.6.3.2項）、一過性あるいは正常な変動を反映したものと考えられ、evolocumabの投与と関連がなかったことが示唆された。

この試験のトキシコキネティクスの成績を2.6.4.1.1.2.1項に示す。試験を通して抗evolocumab抗体が陽性となった動物はいなかったことから、evolocumabはハムスターにおいて免疫原性を示さない可能性が考えられた。一方で、すべての投与群において投与期間中の循環血液中のevolocumab濃度が高かったために、抗evolocumab抗体測定に使用した免疫検出法が妨げられた可能性がある。休薬期間中にevolocumabは抗evolocumab抗体検出の妨げとはならない濃度にまで低下したが、抗体は検出されなかった。

この試験では毒性が観察されなかったことから、無毒性量（NOAEL）は300 mg/kgで、最高血中濃度（C_{max}）が2630 μg/mL及び濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}168}$）が331000 μg•hr/mLであった。

2.6.6.3.2 ハムスターにおけるevolocumabの皮下投与による3カ月間反復投与薬理試験（114375試験）

この試験の主要な目的は、生涯投与試験（114976試験、2.6.6.5.2項）の高用量を選択するための情報を得ることであった。100 mg/kgが（a）ハムスターにおいて最大のLDL-C低下作用を誘発し、（b）420 mgのQ4W投与による臨床曝露量に対しておおよそ10倍の曝露量をもたらし、（c）生涯投与試験の期間を制限するような毒性を発生させないとの予想に基づき実施した。その結果、試験の目的をすべて達成することができた。

雌雄のゴールデンシリアンハムスターに、溶媒又はevolocumabの100及び300 mg/kgをQWで3カ月間SC投与した。主試験では各群6匹／性、薬物動態評価には各群4匹／性を使用した。

死亡、臨床症状、体重、摂餌量、血液検査値、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的検査に、evolocumabと関連した影響は認められなかった。

evolocumab投与に関連した影響は、薬理作用である血清中LDL-C、総コレステロール、並びにHDL-Cの低下のみであった。これらの変化はいずれの用量においても同等であったことから、最大の薬理作用は100 mg/kgで達成されたと考えられた。1カ月投与の試験と同様に（2.6.6.3.1項）、LDL-Cの低下（雄で最大55%及び雌で最大71%）は、総コレステロール及びHDL-Cの低下（雄で最大43%及び雌で最大54%）より大きかった。1カ月投与試験と曝露量は同じであったが、本試験においては血清中のALP、総タンパク及びグロブリンに変化はなかった。

この試験のトキシコキネティクスの成績を2.6.4.1.1.2.1項に示す。抗evolocumab抗体の評価は実施しなかったが、1カ月投与試験と類似の曝露が得られたことから、全期間に通じて免疫原性はevolocumabの毒性評価に影響しなかったと考えられた。すなわち、試験を通してevolocumabの曝露及び薬理作用を示す根拠が得られたことから、免疫原性はevolocumabの毒性評価に影響しなかった。

この試験のNOAELは300 mg/kgで、曝露量はC_{max}で2080 μg/mL及び$AUC_{0\text{-}168}$で266000 μg•hr/mLであった。100 mg/kgでは、C_{max}は993 μg/mL、$AUC_{0\text{-}168}$は138000 μg•hr/mLであった。また、100 mg/kgの薬物動態プロファイル及び薬力学的効果から、100 mg/kgがハムスターのがん原性試験（2.6.6.5項）の高用量に適当であることが確認された（ICH S6［R1］）。

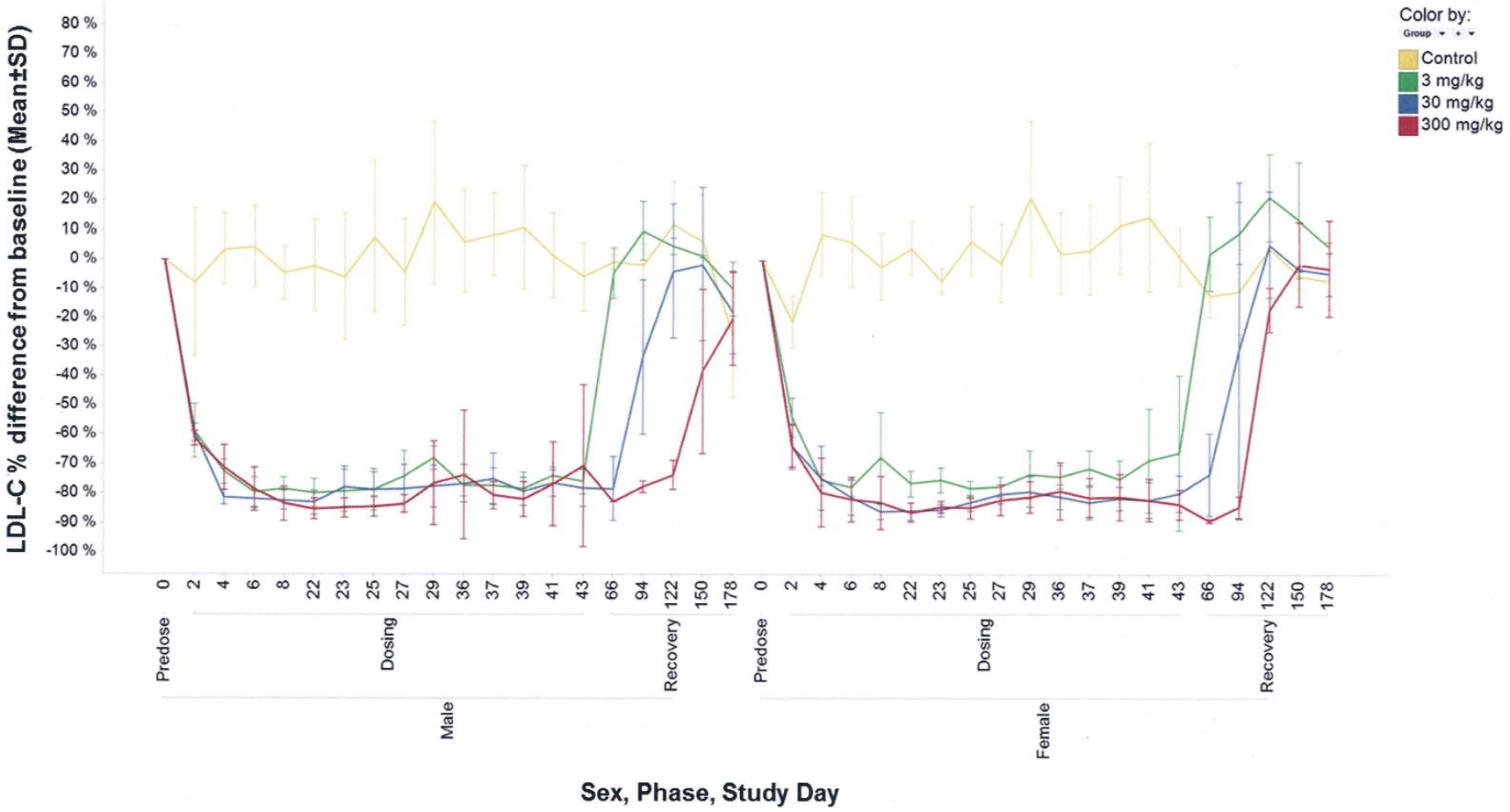
2.6.6.3.3 カニクイザルにおけるevolocumabの皮下投与による21週間の休薬期間を含む6週間反復投与毒性試験（110149試験）

カニクイザルの雄（2.6～3.2歳）及び雌（2.5～4.5歳）にevolocumabの0、3、30、及び300 mg/kgをQWで6週間SC投与し（5匹／性／群）、その後21週間の休薬期間（各用量で2匹／性）を設定した。

死亡、臨床症状、体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、臓器重量、剖検所見、及び病理組織学的検査に、evolocumabと関連した影響は認められなかった。

evolocumab投与に関連した知見は、薬理作用に限られた。すべての投与群で血清中LDL-Cが低下した（投与前値に対して最大82%減少）（図2.6.6-3）。血清中HDL-Cの極わずかなで低下が散見されたが、血清中総コレステロールの中等度の低下（投与前値に対して最大38%減少）は、LDL-C低下によるものであった。

これらのコレステロール分画の薬力学的変化は、休薬期間中の血清中 evolocumab の消失と一致した。この試験では、血清中 PCSK9 濃度も測定した。血清中 PCSK9 濃度の低下及びその持続、並びにベースラインへの回復は、evolocumab の曝露と同じ経時的な推移を示し、LDL-C の変化と密接に関連した。



evolocumab の 3、30 及び 300 mg/kg を QW で 6 週間 SC 投与した。投与期間及び 21 週間の回復期間について血中の LDL-C 濃度を測定し、投与前値に対する%を示す。

図 2.6.6-3　カニクイザルに evolocumab の 3、30、300 mg/kg を QW で 6 週間投与したときの LDL-C 低下効果（110149 試験）

本試験のトキシコキネティクスの成績を 2.6.4.1.1.2.2 項に示す。カニクイザルでは evolocumab の免疫原性は全般に低く、投与期間終了時に 300 mg/kg の雄 1 匹で抗 evolocumab 抗体が陽性となった。このカニクイザルでは、evolocumab 曝露量が減少したが、LDL-C 低下作用への影響は極めて軽微であった。休薬期間中に、2 匹の動物（30 mg/kg の雄 1 匹及び 300 mg/kg の雌 1 匹）で抗 evolocumab 抗体が検出され、このうちの雌では休薬期間終了時まで中和抗体が陽性であった。抗 evolocumab 抗体の陽性率が低かったことから、全試験期間にわたり evolocumab の毒性評価には影響しなかったと考えられた。

本試験において、休薬期間中に対照群の雄 1 匹及び投与期間の投与 30 日に高用量 300 mg/kg の雄 1 匹を安楽死させた。高用量群の雄では、病理組織学的検査で炎症性腸疾患及び二次的な全身性のリンパ球枯渇がみられた。カニクイザルのコロニーでは消化管感染症がしばしば発生することが知られており、未処置動物にも発生する（Sestak et al, 2003）。対照群の雄は、これら所見と一致した腸疾患及び脱水の兆候が観察されたため、早期に安楽死させた。炎症性腸疾患及び二次的な全身性リンパ球枯渇等の、上述の高用量群雄と類似した変化が認められた。ほかのいずれの evolocumab 投与動物にも同様の病理組織学的な消化管所見がみられなかったことから、高用量群雄の安楽死については evolocumab の投与とは関係がないと結論付けられた。免疫機能の詳細な評価も行った長期投与試験（2.6.6.3.4 項及び 2.6.6.3.5 項）において同様の所見は観察されなかったことから、この結論に更なる裏付けが得られた。

300 mg/kg の雄 1 匹及び雌 1 匹では、対照群の動物より顕著なリンパ組織の増生がみられた。これらの動物では、原因とされる寄生性感染症の既往を示す根拠（病理組織学検査による肝臓の石灰化した肉芽腫や多巣性の被膜線維化）が認められた。その他のリンパ系組織病変の頻度及び程度は、施設の対照群の背景データ及び文献値（Spoor et al, 2008; Sellers et al, 2007; Drevon-Gaillot et al, 2006; Haley et al, 2005）の範囲内であった。試験を通して血液検査には変化がなく、リンパ増生すなわち免疫刺激と胸腺退縮や脾臓胚中心の大きさ及び数の減少といった免疫抑制を示す病理組織所見が混在したことは、介入疾患及び正常な成熟と一致しており、evolocumab 投与とは関係がないと考えられた。

本試験の NOAEL は 300 mg/kg で、曝露量は C_{max} で 9940 μg/mL 及び $AUC_{0\text{-}168}$ で 1550000 μg•hr/mL であった。

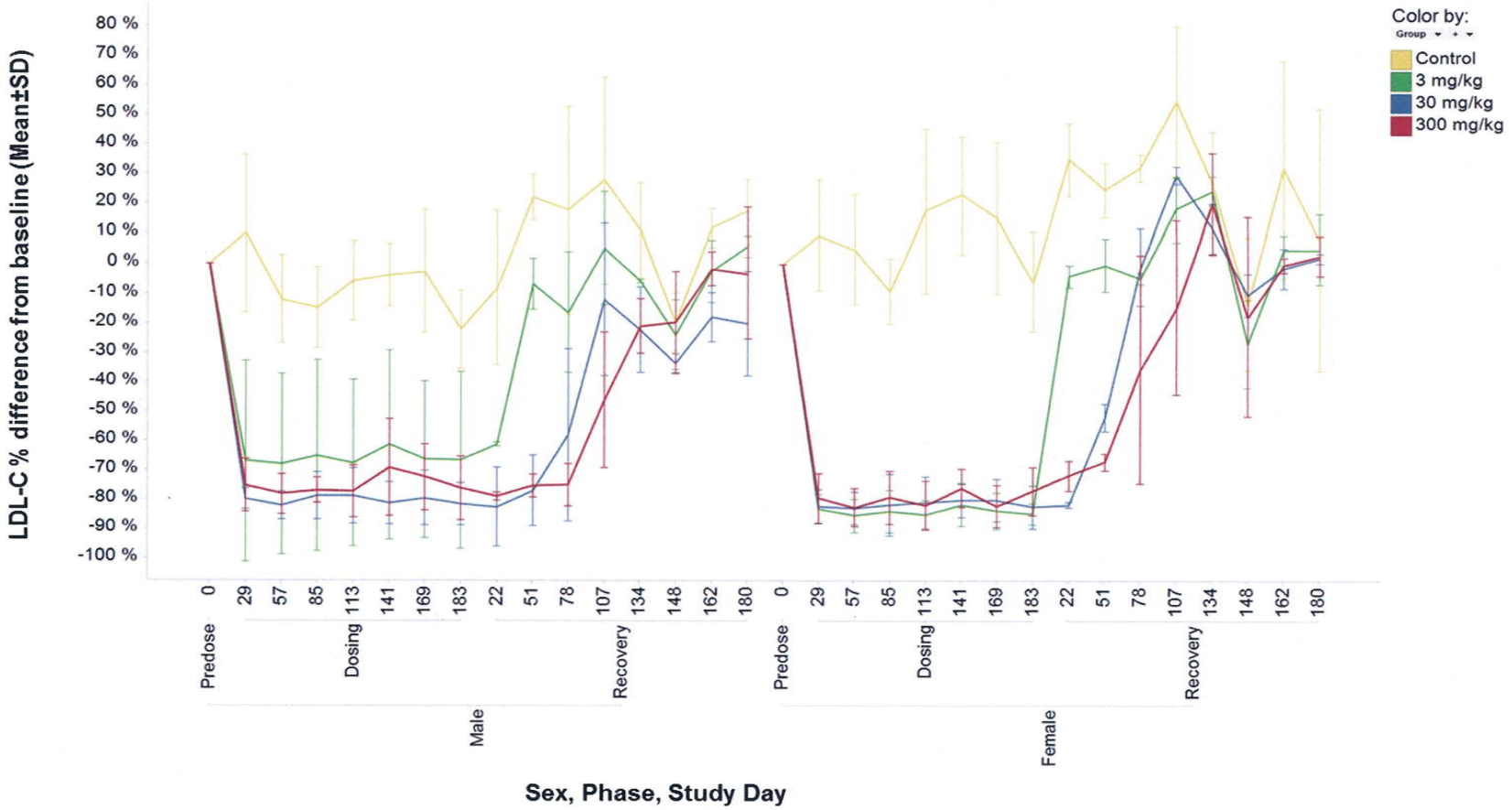
2.6.6.3.4 カニクイザルにおける evolocumab の皮下投与による 25 週間休薬期間を含む 6 カ月間反復投与毒性試験（110359 試験）

成熟カニクイザルの雄（5～6 歳）及び雌（4～6 歳）に、溶媒又は evolocumab の 3、30、及び 300 mg/kg を QW で 6 カ月間 SC 投与し（6 匹／性／群）、その後 25 週間の休薬期間（2 匹／性／群）を設定した。

死亡、臨床症状、体重又は摂餌量、バイタルサイン、血液検査、眼科学的検査、心電図、臓器重量、剖検所見又は病理組織学的検査に、evolocumab 投与と関連した影響はなかった。

カニクイザルにおける 6 週間投与試験と同様に、evolocumab 投与に関連した影響は薬理作用に限られ、両性で投与量にかかわらず同様の変化が認められた。血清中 LDL-C が雄では最大 81%、雌では最大 85%低下し、同時に血清中コレステロールが雄では最大 42%、雌では最大 44%低下した

（図 2.6.6-4）。血清中のトリグリセリドも低下したが（雄では最大 29%、雌では最大 30%）、すべての時点で一貫してみられた訳ではなかった。血清中 HDL-C の低下は散発的かつ極めてわずかで、evolocumab 投与と関係ないと考えられた。血清中 LDL-C、総コレステロール、並びにトリグリセリドに対する影響は、投与終了後に消失した。



evolocumab の 3、30g 及び 300 mg/kg を QW で 6 カ月間 SC 投与した。投与期間及び 21 週間の回復期間の血中の LDL-C 濃度を測定し、投与前値に対する%を示す。

図 2.6.6-4　カニクイザルに evolocumab の 3、30、300 mg/kg を QW で 6 カ月間投与したときの LDL-C 低下効果（110359 試験）

本試験のトキシコキネティクスの成績を 2.6.4.1.1.2.2 項に示す。投与期間中に 3 mg/kg の雄 1 匹及び休薬期間中に 30 mg/kg の雌 1 匹の合計 2 匹で、抗 evolocumab 抗体が陽性となった。いずれの動物においても中和抗体で、evolocumab のクリアランスの上昇及び薬理作用の低下あるいは早期の回復がみられた。抗 evolocumab 抗体の発現は 36 匹中 2 匹と少なかったことから、全試験期間において evolocumab の毒性評価には影響しなかった。

本試験では、受胎能及び免疫毒性を評価した。

組入れ動物（雄は 5～6 歳、雌は 4～6 歳）は性成熟した成獣で、ICH S6（R1）に沿って evolocumab の雄及び雌の受胎能に対する影響を評価することができた。評価項目は、生殖器の重量及び病理組織学的検査、月経周期（雌）及び精子の運動性、密度、形態（雄）で、どの検査項目にも影響は観察されなかった。

evolocumab の免疫機能に対する影響を評価するために、T 細胞依存性抗体産生（TDAR）及び末梢血リンパ球フェノタイプ検査を実施したが、evolocumab 投与に関連した影響は観察されなかった。TDAR では統計学的な有意差が散発的及び一過性にみられたが、対照群において抗キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）抗体が免疫前に高頻度で存在したためで、evolocumab 投与とは関連しないと考えられた。詳細な考察は、以降に示す。

これらの結果から、本試験の NOAEL は 300 mg/kg で、試験終了時の曝露量は、C_{max} で 11700 μg/mL 及び $AUC_{0\text{-}168}$ で 1730000 μg•hr/mL であった。

TDAR の結果の詳細評価

TDAR では、投与 99 日（投与 92 日の初回 KLH 免疫の 7 日後）の IgG 一次反応は、3 及び 300 mg/kg では、対照群と比較して統計学的（ANOVA による）に有意に低かったが、30 mg/kg では有意差は認められなかった。ほかの時点での IgG 一次反応、特に反応が十分に発現する免疫後 10 及び 14 日では、差はなかった。すなわち、一過性で用量に一貫性のない変化であったことから、evolocumab 投与との関連があるとは考えられなかった。2 回目の KLH 免疫（投与 106 日）後は、どの時点においても統計学的な有意差は認められなかった。

これらの有意差は、データの解釈に重大な影響を及ぼす抗 KLH 抗体が既に存在したために生じた可能性が高い（Lebrec et al, 2014 にてレビュー）。ヒト以外の霊長類の実験用コロニーでは、抗 KLH 抗体がしばしば検出される。これらの抗体の抗原となる可能性が最も高いのは、KLH とエピトープを共有するマンソン住血吸虫等で、これらの潜在感染がしばしばみられる（Grych et al, 1987、Kantelhardt et al, 2002、Geyer et al, 2005）。KLH との共通エピトープを有する抗原に事前に曝露されたために抗 KLH 抗体を有する動物では、KLH 免疫後に IgM 及び IgG 反応をより強く起こすとの報告がある（Lebrec et al, 2014）。

本試験では、対照動物 12 匹中 6 匹（50%）においては免疫に先立ち抗 KLH 抗体がみられ、その割合は非常に高かった。Amgen 社におけるカニクイザルの試験の対照群にみられた最も高い発現率は 38%で、本試験の evolocumab 投与群では 36 匹中 11 匹、すなわち 31%であった。

免疫前の抗 KLH 抗体の有無に関わらず、すべての動物を対象として解析した場合には、evolocumab 投与群の平均 IgG 一次反応は同じであるが、対照群では高かった（図 2.6.6-5）。

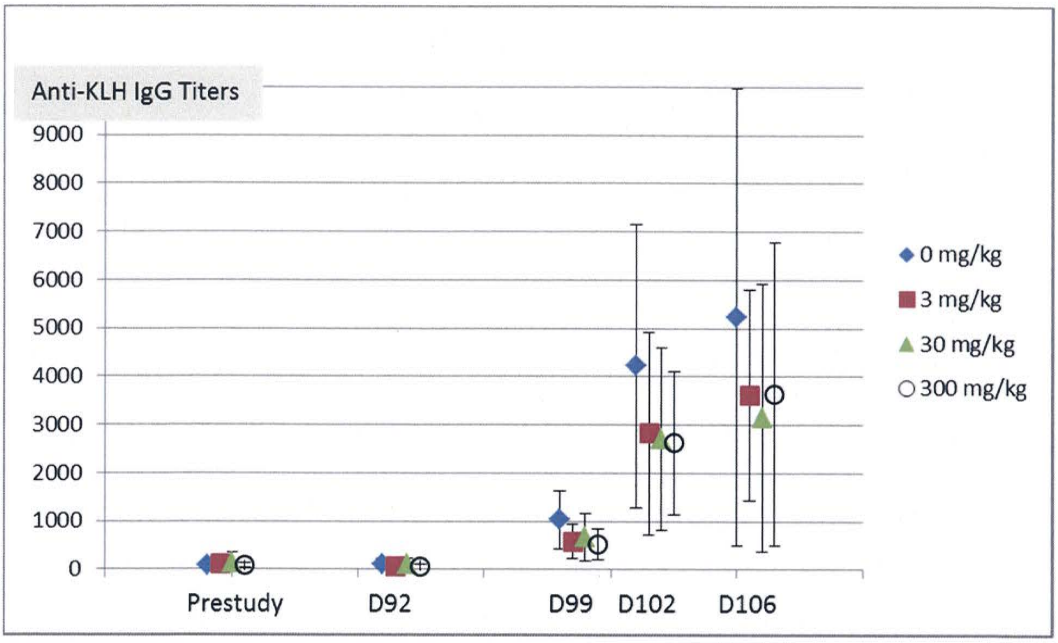


図 2.6.6-5　IgG 抗体価：すべての動物を対象とした場合

しかし、免疫前に抗 KLH 抗体が存在した動物を全群で除外する方法で解析すると（Lebrec et al, 2014）、平均 IgG 一次反応に対照群と evolocumab 投与群との差はなくなった（図 2.6.6-6）。

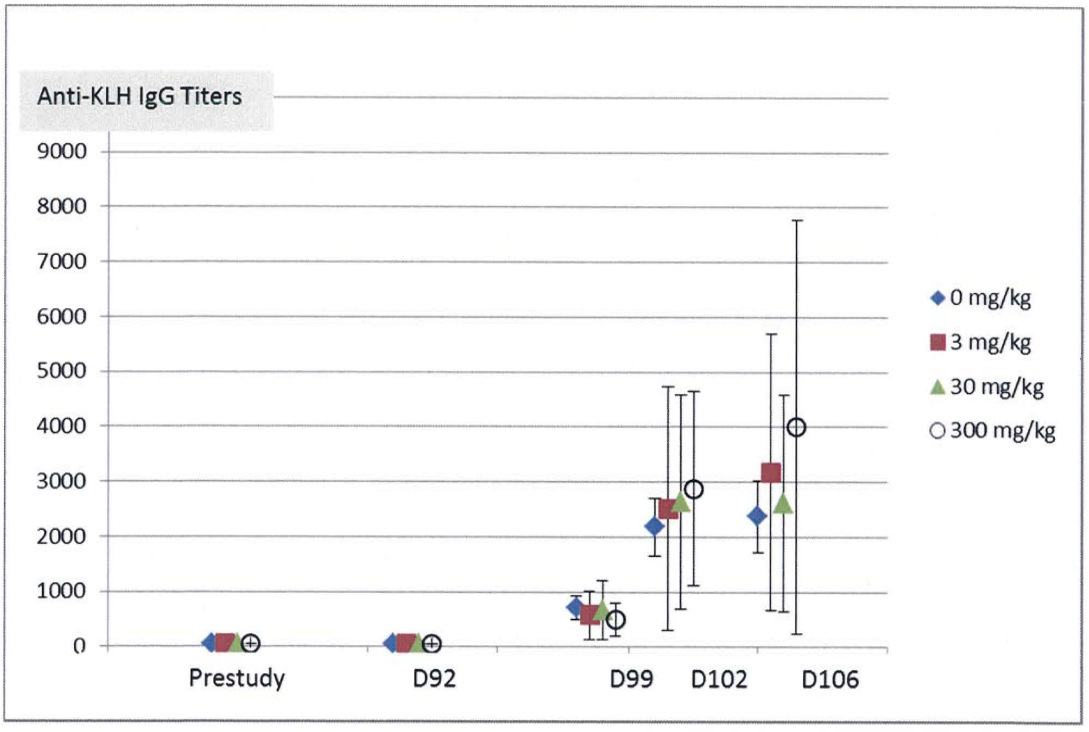


図 2.6.6-6　IgG 抗体価：免疫前に抗 KLH 抗体が認められた動物を除外した場合

IgG 二次反応について同様の方法で解析した結果、同じ結論が得られた。したがって、TDAR で認められた統計学的に有意な変化は、免疫前に抗 KLH 抗体が存在する動物の割合が対照群において高かったためで、evolocumab 投与との関係はないと考えられた。この結論は、evolocumab とロスバスタチンの併用毒性試験（2.6.6.3.5 項）の TDAR において、いかなる影響も認められなかったことから、更に裏付けられた。

免疫機能に対する影響がないことを示す追加データ

白血球数には evolocumab 投与による影響はみられず、末梢血リンパ球フェノタイプ（総 T リンパ球数［CD3+］、ヘルパー T リンパ球数［CD3+CD4+CD8-］、障害性 T リンパ球数［CD3+CD4-CD8+］、B リンパ球数［CD3-CD20+］、ナチュラルキラー細胞数［CD3-CD16+］）にも、evolocumab 投与に関連した影響は認められなかった。感染症又は寄生虫症への感受性の上昇を示す証拠はなく、リンパ系器官の重量あるいは病理組織学的検査において evolocumab 投与に関連した影響は認められなかった。

要約すると、TDAR の詳細な解析と、すべての免疫機能関連の評価項目を総合的に評価すると、evolocumab の投与によってカニクイザルに免疫抑制の兆候は生じなかったとする結論に一致する。

これらのデータは、メビノリンによる HMG CoA 還元酵素阻害で内因性コレステロールが合成されないときでさえ、マイトジェン誘発性ヒトリンパ球増殖の際の膜コレステロール維持には 0.5 mg/dL までの低い外因性 LDL-C 濃度で十分であることと矛盾しない（Cuthbert and Lipsky, 1984; Cuthbert and Lipsky, 1986; Cuthbert and Lipsky, 1987）。evolocumab の試験における血清中 LDL-C 濃度は、上記文献で示された 0.5 mg/dL より 1 桁以上高い上に、カニクイザルではリンパ球増殖に重要な HDL-C を含むほかのリポ蛋白分画は、evolocumab 投与では比較的影響を受けない。そのため、evolocumab による PCSK9 阻害単独、あるいはスタチン併用による LDL-C 低下効果は（2.6.6.3.5 項）、リンパ球の増殖能力に影響を与えるまでには達しないと考えられる。

2.6.6.3.5 カニクイザルにおける evolocumab 及びロスバスタチンの 4 カ月間休薬期間を含む 3 カ月間併用反復投与毒性試験（112311 試験）

本試験では、カニクイザルに evolocumab をロスバスタチンと併用して 3 カ月間投与し、その後 4 カ月の休薬期間を通して毒性を評価した。

動物数は各群 3 又は 5 匹／性で、以下のように投与した。

- 対照群：溶媒を Q2W で SC 投与し、空のゼラチンカプセルを 1 日 1 回（QD）経口投与した。
- ロスバスタチン単独投与群：5 mg/kg をゼラチンカプセルに入れ、QD で経口投与した。Amgen 社にて、カニクイザルの単回投与薬理試験（115757 試験、2.6.4 項）を実施し、ロスバスタチンの臨床曝露量（Crestor の米国承認パッケージ NDA 21-366 を参照）と比較した。本試験では、ロスバスタチンが臨床で最も多く処方される用量（10 mg）に対して約 10 倍の曝露マージンが生じる用量である 5 mg/kg を選択し、スタチンとの併用毒性試験の用量として適切であると判断した。
- evolocumab（10 mg/kg を Q2W で SC 投与）とロスバスタチン（5 mg/kg を QD で経口投与）の併用投与群

- evolocumab（100 mg/kg を Q2W で SC 投与）とロスバスタチン（5 mg/kg を QD で経口投与）の併用投与群：evolocumab の曝露量は、420 mg を Q4W で投与したときの臨床曝露量に比較して、AUC として 21 倍であった。

3 カ月間の投与期間終了時に、各群 3 匹／性を安楽死させ、対照群及び evolocumab（100 mg/kg）とロスバスタチン（5 mg/kg）併用群の残りの各々2 匹／性は、4 カ月間の休薬期間後に安楽死させた。

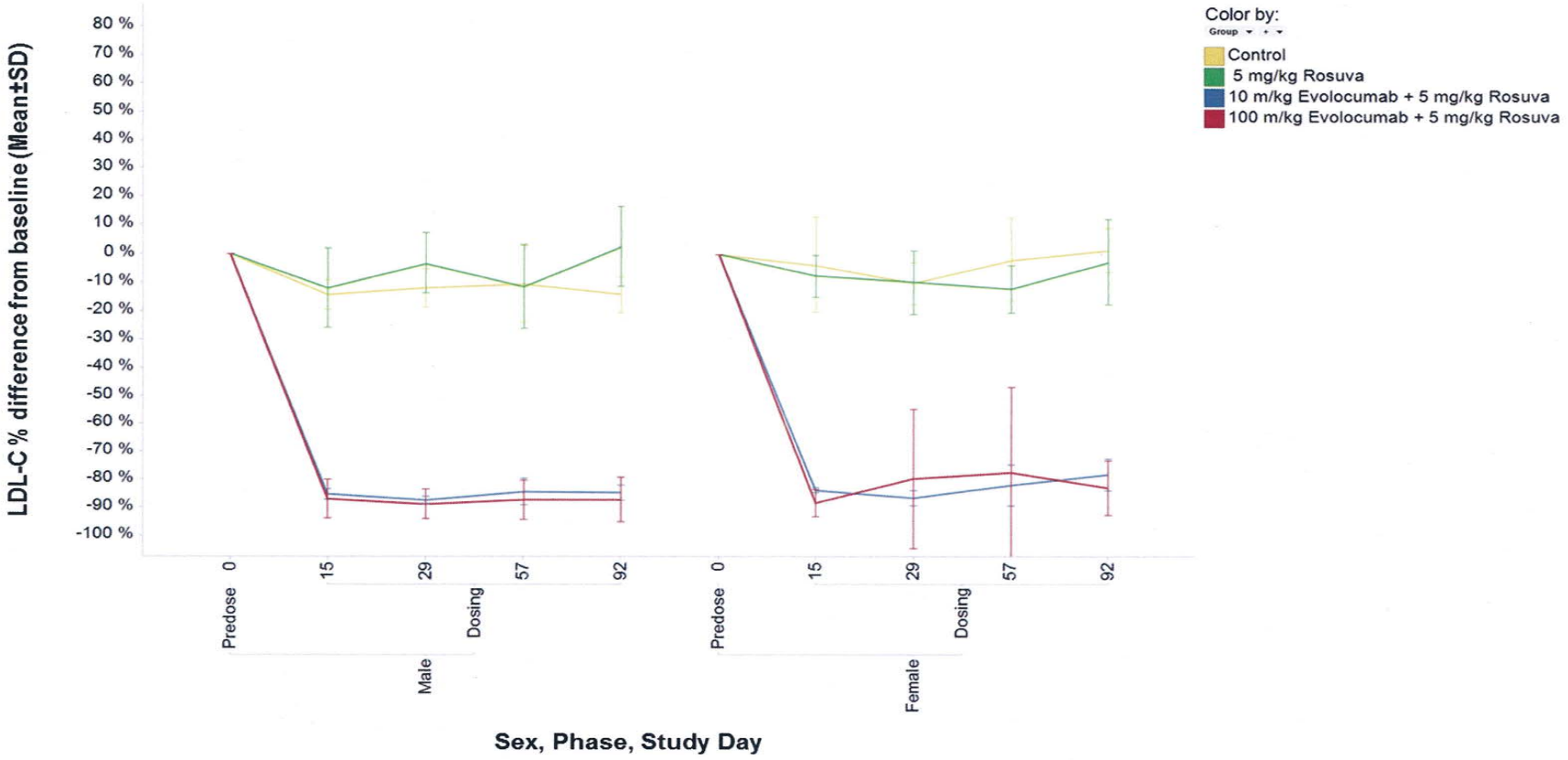
この試験のトキシコキネティクスの成績を 2.6.4 項に示す。evolocumab をロスバスタチンと併用投与したときに、薬物動態に関して薬物相互作用は認められなかった。

投与期間中、evolocumab 10 mg/kg とロスバスタチン 5 mg/kg 併用群の 1 匹及び evolocumab 100 mg/kg とロスバスタチン 5 mg/kg 併用群の 1 匹に、抗 evolocumab 抗体が検出された。後者は中和抗体で、投与 29 日から投与 85 日までの血清中 LDL-C 低下作用の減弱がみられ、evolocumab 曝露量減少が薬力学的効果の低下を伴った。evolocumab 100 mg/kg 投与では、休薬期間中の投与 175 日以降に evolocumab の血清中濃度が定量限界未満となった。休薬期間中は、いずれの動物にも抗 evolocumab 抗体は検出されなかった。他試験同様、抗 evolocumab 抗体の発生頻度は低く、evolocumab の全試験期間の毒性評価には影響しなかった。

臨床症状、摂餌量、体重、眼科検査、バイタルサイン、血液検査、臓器重量、剖検所見及び病理組織学的所見に evolocumab あるいはロスバスタチン投与と関連した影響はなかった。

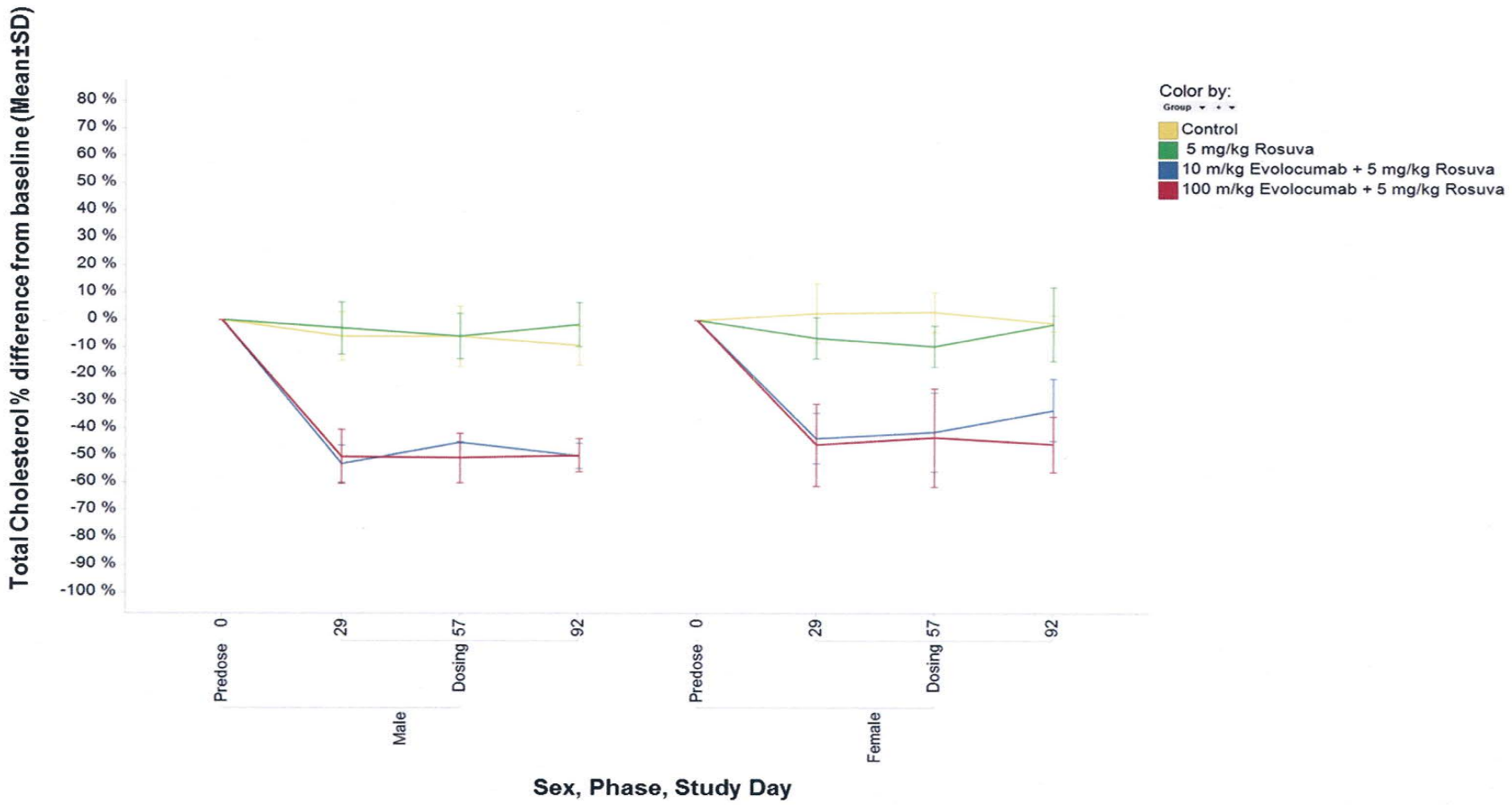
evolocumab とロスバスタチンの併用投与あるいはロスバスタチン単剤投与によって、免疫毒性評価項目である末梢リンパ球サブセット、抗 KLH 抗体（IgM 及び IgG）産生あるいはナチュラルキラー細胞機能に、影響は認められなかった。血液検査及びリンパ系組織の病理組織学的検査に影響はなく、投与による免疫系への影響は認められなかった。

evolocumab とロスバスタチン併用群の、投与期間中にみられた臨床病理検査値の変化は、血清中脂質への作用に限られ、すなわち用量反応のない LDL-C の低下（最大 89%）と総コレステロールの低下（最大 53%）がみられた。これらの低下の程度は、以前の試験において evolocumab 単剤で観察されたものより、わずかに顕著であった（図 2.6.6-7 及び図 2.6.6-8）。evolocumab 100 mg/kg とロスバスタチンを併用投与した雌では、血清中トリグリセリドも低下した（最大 44%）。以上の LDL-C、総コレステロール、並びにトリグリセリドの低下は、休薬期間中に元の水準に戻った。



カニクイザルにロスバスタチン（5 mg/kg、QD）単独又はロスバスタチン（5 mg/kg、QD）と evolocumab（10 又は 100 mg/kg、Q2W、SC）の併用で 3 カ月間投与した。 試験期間中の血中 LDL-C 濃度の投与前値に対する%を示す。

図 2.6.6-7　カニクイザルにおける evolocumab とロスバスタチンの 3 カ月間併用毒性試験における LDL-C 低下効果（112311 試験）



カニクイザルにロスバスタチン（5 mg/kg、QD）単独又はロスバスタチン（5 mg/kg、QD）と evolocumab（10 又は 100 mg/kg、Q2W、SC）の併用で 3 カ月間投与した。試験期間中の血中 LDL-C 濃度の投与前値に対する%を示す。

図 2.6.6-8　カニクイザルにおける evolocumab とロスバスタチンの 3 カ月間併用毒性試験における総コレステロールに対する効果（112311 試験）

結論として、カニクイザルに evolocumab の 10 又は 100 mg/kg を Q2W で SC 投与及びロスバスタチンの 5 mg/kg を QD で経口投与を 3 カ月間行った際に、すべての用量で予測された薬理作用である血清中 LDL-C の低下と関連した総コレステロールの低下が認められた。これらの薬理効果は、休薬期間中に完全に消失した。免疫系に対する影響（血液検査、病理組織学的検査、リンパ球サブセット、TDAR、ナチュラルキラー細胞機能）はなかった。evolocumab とロスバスタチンの併用投与による薬物動態の相互作用はなかった。NOAEL は、試験に用いた最高用量である evolocumab 100 mg/kg とロスバスタチン 5 mg/kg で、曝露量は投与 85 日の C_{max} 及び AUC_t として、evolocumab はそれぞれ 1740 μg/mL 及び 248000 μg•hr/mL、ロスバスタチンはそれぞれ 15.7 ng/mL 及び 184 ng•hr/mL であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

evolocumab は、天然のアミノ酸のみで構成される組換えタンパクであり、無機又は有機合成リンカーあるいはほかの非タンパク質部分を含まない。このことは、evolocumab が DNA あるいはほかの染色体物質と直接反応する可能性が極めて低いことを示す。そのため、ICH S6（R1）に沿い、遺伝毒性試験は実施及び計画はしていない。

2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

PCSK9 を慢性的に阻害することによる潜在的な発がんリスクを評価するために、ハムスターにおいて evolocumab の生涯投与試験を実施した。Special Protocol Assessment として、試験計画（2.6.6.5.1 項）を米国 FDA の Executive Carcinogenicity Assessment Committee と議論し、合意を得て実施した。

2.6.6.5.1　試験計画

2.6.6.5.1.1　投与頻度及び投与経路

evolocumab の臨床における投与頻度及び投与経路に準じ、ハムスターに evolocumab を Q2W で SC 投与した。Q2W 投与の投与間隔で、薬理活性が持続することは 2.6.6.5.1.2.1 項に示す。

2.6.6.5.1.2　用量

ICH S6（R1）に示される薬物動態／薬力学及びヒトでの曝露量との比較に基づいて、試験の用量を設定した。高用量は、（a）ハムスターにおける最大薬理作用（LDL-C の低下）及び（b）臨床で到達することが予想される最大曝露量と比較して約 10 倍の曝露量の、両方を達成する用量とした。低用量は、最大薬理作用より小さい作用で臨床で予想される同程度の曝露量を得る用量を選択した。中間用量には、用量反応情報を得ることができる用量を設定した。

2.6.6.5.1.2.1 高用量の選択

ハムスターでの evolocumab の最大薬理作用は、30 mg/kg 以上を QW で投与したときにみられた（2.6.6.3.1 項の図 2.6.6-2）。一方、evolocumab の 30 mg/kg をハムスターに単回投与した後の薬理活性は投与後 14 日間持続し（2.6.2.2.2.1 項）、Q2W の投与での最大薬理作用は、30 mg/kg で得られる。

また、100 mg/kg を Q2W でハムスターに投与すると、曝露量は 420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量の 12.5 倍になると推定された（表 2.6.6-2）。ハムスターにおける 3 カ月間投与試験（114375 試験、2.6.6.3.2 項）では、evolocumab の 100 mg/kg で最大の LDL コレステロール低下効果が得られた。したがって、ICH S6（R1）に沿って、最大の薬理作用が得られ、かつ 420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量のおよそ 10 倍の曝露量になる用量である、Q2W 投与による 100 mg/kg を高用量に選択した。ハムスターにおいて QW で 3 カ月間投与した試験で、100 mg/は良好な忍容性を示す用量で（114375 試験）、この用量では投与期間を制限する毒性は発生しないことが予想された。

表 2.6.6-2　2 年間生涯投与試験の用量（Q2W）の臨床用量に対するマージン（用量及び曝露量として）

ヒトに対する用量の乗算によるマージン			
ハムスターに対する設定用量 (mg/kg)	ヒトに対する用量 (mg)	ヒトに対する投与量 (mg/kg)	ハムスター／ヒト用量比
10	140	2.3	4.3×
	420	7.0	1.4×
30	140	2.3	12.9×
	420	7.0	4.3×
100	140	2.3	43.5×
	420	7.0	14.3×

ヒト曝露量の乗算によるマージン				
		曝露量比（ハムスターに対する各用量の $AUC_{0\text{-}tau}$ に基づく）		
ヒトに対する用量 (mg)	ヒトの $AUC_{0\text{-}24}$ (mg·hr/mL)	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
140 Q2W	6.5	2.1×	6.4×	21.2×
420 Q4W	22.1	1.2×	3.7×	12.5×

用量比は体重 60 kg の被験者に 140 mg 又は 420 mg のいずれかを投与したとして算出した（mg/kg 動物種）/（mg/kg ヒト）。

曝露量比の算出には、ハムスターにおける 3 カ月間反復投与 GLP 薬理試験（114375 試験）の投与 85 日の 100 mg/kg 皮下投与後の TK データを用いた。第 II 相試験の最大用量（140 mg Q2W 及び 420 mg Q4W）でのヒト $AUC_{0\text{-}tau}$ は、最初の単回投与臨床試験（20080397 試験）においてモデルに基づく推定値として算出し、脂質異常症患者を対象とした漸増反復投与試験（20080398 試験）において確認した。頑健な標的介在性薬物分布モデル（TMDD）を用いて全 PK データを十分に説明することができ、$AUC_{0\text{-}14d}$ 又は $AUC_{0\text{-}28d}$ のそれぞれについては 140 mg 及び 420 mg の用量の典型的な母集団値を用いた。ハムスターの 100 mg/kg での曝露に基づいて 10 mg/kg 及び 30 mg/kg の薬物動態を線形と仮定し、また投与間隔について調整し、反復投与時の曝露量比は以下の式により算出した：

$$\text{曝露量比} = \frac{\text{ハムスターの AUC, Day 85, 1 週}}{\text{ヒトの AUC, 定常状態, 2 週又は 4 週}} * \frac{\text{ヒトの投与間隔（2 週又は 4 週）}}{\text{ハムスターの投与間隔案（2 週）}}$$

$AUC_{0\text{-}tau}$ = 0 から最終測定時点までの血中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}24}$ = 0 から投与後 24 時間までの血中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}14d}$ = 0 から投与後 14 日までの血中濃度-時間曲線下面積；$AUC_{0\text{-}28d}$ = 0 から投与後 28 日までの血中濃度-時間曲線下面積；PK = 薬物動態；Q2W = 2 週に 1 回；Q4W = 4 週に 1 回；TK = トキシコキネティクス

2.6.6.5.1.2.2 低用量及び中間用量の選択

低及び中間用量は、それぞれ 10 mg/kg 及び 30 mg/kg で、図 2.6.6-9 及び表 2.6.6-2 に示すように、低用量（10 mg/kg）は 420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量と同じ曝露量で、ハムスターにおいて最大に近いの薬理作用を発現する。中間用量（30 mg/kg）では最大の薬理作用が発現し、変化がみられた際の用量反応に関する情報を得ることができると考えられた。

2.6.6.5.1.3 使用動物数

げっ歯類における生涯投与によるがん原性試験に関するガイドライン（FDA Draft Guidance for Industry: Statistical aspects of the design, analysis and interpretation of chronic rodent carcinogenicity studies of pharmaceuticals, 2001）に沿い、試験終了時の解析に十分な数の動物が生存するように、各用量群の動物数は各性 60 匹とした。薬力学的及び薬物動態学的検査用のサテライト群は、各用量について各性 15 匹とした。

2.6.6.5.1.4 薬力学的検査

複数の試験成績から（112699、114375、R20080179 試験）、evolocumab はハムスターにおいて設定用量での薬理活性が明らかで、抗薬物抗体産生はわずかであることが想定された。主試験動物への影響を考慮し、サテライト動物においてトキシコキネティクスサンプル採取時点での薬理活性を評価した。

2.6.6.5.2 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による生涯投与試験（114976 試験）

本試験の目的は、雌雄のゴールデンシリアンハムスターに evolocumab を Q2W の頻度で生涯を通じて SC 投与し、がん原性を評価することである。

試験計画の詳細を 2.6.6.5.1 項に示す。各群雌雄各々60 匹のゴールデンシリアンハムスター（Crl : LVG［SYR］）に、溶媒又は evolocumab の 10、30、及び 100 mg/kg を Q2W で、雄では 105 週間、雌では 86 週間の SC 投与し、投与終了後に剖検した。死亡、臨床症状、体重、摂餌量、剖検所見、並びに病理組織学的所見を評価した。

サテライト動物（15 匹／性／群）に同様に投与し、薬物動態及び薬力学的評価（非結合型 evolocumab 及び血清中 LDL-C 測定）を行った。

evolocumab 投与に関連する変化は、予測された薬理作用（血清中 LDL-C の低下）のみであった。血清中 LDL-C の低下は、雄が雌よりわずかに大きかった。対照群と比較し、10、30、及び 100 mg/kg 群は雄でそれぞれ最大 77%、86%、及び 85%、雌でそれぞれ最大 47%、70%、及び 70%低下しており、全 evolocumab 投与群において薬理学的に有効な evolocumab が投与期間を通して曝露された。高用量（100 mg/kg Q2W）の投与 27 週の AUC_{last} は 172000 μg・hr/mL で、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量の 15 倍で、用量設定時の予測とほぼ一致した。

死亡及び腫瘍性又は非腫瘍性の変化を含めたほかの検査項目に、evolocumab と関連した影響は観察されなかった。

病理組織学的検査におけるすべての腫瘍性変化は、いずれもハムスターにおいて通常観察される変化の範囲内であった（Kamino et al, 2001; McInnes et al, 2013; Pour et al., 1976a; Pour et al., 1976b; Pour et al., 1976c; Pour et al., 1976d）。本試験における発現は大半が両性においてみられ、対照群を含む全投与群を通じて概ね同様の頻度で観察された。個別あるいは統合腫瘍発生においてevolocumab投与群が対照群より高かった例は、副腎皮質腺癌、甲状腺濾胞細胞腺腫、ハーダー腺腺腫、並びに子宮上皮の腫瘍で、いずれも頻度が極めて低く、同種がん原性試験において報告されている対照群の発生頻度の範囲内であった（McInnes et al, 2013; Pour et al, 1976b）。また、腫瘍発生率とevolocumabの曝露量及び薬力学的効果に関連性は認められなかった。

対照群を含むすべての投与群において、雄に比較して雌の生存率が低かったが、ハムスターにおける長期試験で報告された各性の死亡率と一致しており、evolocumab投与との関係はなかった。雌対照群の生存数は投与86週までに20匹に達したため、がん原性試験の常法に則り、また、FDAのSpecial Protocol Assessmentの勧告に従い、雌の全群については早期に終了した。生存している雄への投与は、投与105週まで継続した。

結論として、evolocumabのがん原性を評価するために、雌雄のゴールデンシリアンハムスターに、evolocumabの0、10、30、及び100 mg/kgをQ2Wで最長105週間SC投与した。すべてのevolocumab投与群で予測された薬力学的効果（血清中LDL-C低下）が観察されたが、死亡、腫瘍性あるいは非腫瘍性病変を含め、ほかの検査項目にevolocumabに関連した影響は認められなかった。

本試験においてevolocumab投与に関連したがんの兆候がなかったことは、ヒトにおけるPCSK9機能喪失型突然変異（人口の約3%に存在と推定される）に関する知見と一致する。突然変異を持つ場合、生涯を通じて血清中LDL-Cが低く、一般人口と比較して冠動脈心疾患が大幅に少ない等の健康には有益なことが報告されており、PCSK9レベルの低下による健康への悪影響はないとされる（Cohen et al, 2005、Cohen et al, 2006、Kotowski et al, 2006、Zhao et al, 2006）。循環血液中にPCSK9が検出されず、血清中LDL-C濃度が14 mg/dLであった女性（32歳）は、健康かつ妊娠が可能で、血圧は正常で、肝及び腎機能検査には異常はなかった（Zhao et al, 2006）。

さらに、前向き疫学研究からは、PCSK9の機能喪失型突然変異によってコレステロール値が低い人ではすべてのがんの発生率が低いことが報告されている（Folsom et al, 2007）。この研究では、低LDL-C血症（PCSK9変異体を持たない場合に比較して最大30%の低下）を伴うPCSK9の機能喪失型突然変異を持つ約400名を含む、年齢45～64歳の13250名について9年間追跡調査を行った。その結果、対照集団に対するPCSK9遺伝子機能喪失型変異を持つ集団の全がんの発生率における補正ハザード比は、黒人で0.66、白人で0.77であった。ただし、大腸がんについては、検討した黒人集団では補正ハザード比が1.87で高かった。

これらの結果も含めて、ハムスターのevolocumab生涯投与試験において、どの種類の腫瘍発生率も投与に関連して上昇しなかったことは注目される。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.6.1　ハムスターにおける evolocumab の受胎能及び初期胚発生試験（114975 試験）

雌雄のゴールデンシリアンハムスター（25 匹／性／群）に、交配前（雄では 4 週間、雌では 2 週間）から交配さらに着床までの期間、媒体又は evolocumab の 10、30、及び 100 mg/kg を Q2W で SC 投与した（雄で合計 5 回、雌で 2 回あるいは 3 回投与）。

評価項目は、死亡、臨床症状、体重、発情周期、交尾行動、剖検所見、卵巣及び子宮の検査、雄の生殖能評価（輸精管精子運動性、精巣上体尾部精子密度、及び生殖器重量）であった。

雌雄で、死亡、臨床症状、及び体重に対する影響は認められなかった。

雄のいずれの用量でも、交尾及び受胎能、生殖器重量、精子に関して、投与による影響は認められなかった。

雌のいずれの用量でも、剖検所見、発情周期、交尾及び受胎能、卵巣及び子宮に対して、投与による影響は認められなかった。0、10、30、及び 100 mg/kg での妊娠数（妊娠率）は、それぞれ 22 匹（88.0%）、24 匹（96.0%）、23 匹（92.0%）、及び 24 匹（96.0%）であった。

トキシコキネティクスの成績から、本試験の evolocumab 曝露量は、ほかのハムスターの試験と一致した。また、高用量（100 mg/kg Q2W）の曝露量は、420 mg を Q4W で投与した臨床の曝露量と比較して 15 倍のマージンがあると推定された。

結論として、evolocumab の 10、30、あるいは 100 mg/kg を Q2W で SC 投与したとき、死亡、臨床症状、体重、及び剖検所見に投与による影響は認めらなかった。また、交尾、受胎能、発情周期、雄生殖能（臓器重量あるいは精子パラメータ）、あるいは胚・胎児の生存に影響はなかった。

2.6.6.6.2　カニクイザルにおける evolocumab の生後 6 カ月までの評価を行った拡充型出生前及び出生後発生毒性（ePPND）試験（110370 試験）

カニクイザルにおける IgG2 抗体（evolocumab を含む）の胎盤移行は、器官形成期を含めてヒトと同様とされる（Moffat et al, 2014）。一方、ハムスターにおける抗体の胎盤移行性は十分に解明されておらず、ハムスターを用いた試験結果をヒトに外挿しリスク評価を行うことの有用性は不明である。ICH S6（R1）ガイドラインに沿って、科学的な妥当性に基づきカニクイザルでの拡充型出生前及び出生後発生毒性試験を実施し、evolocumab の胚・胎児の発生及び出生児の発達に対するリスクを評価した。

カニクイザルの evolocumab の PK/PD 試験（111322 試験、2.6.4.1.1.1.1 項）において、3 mg/kg 以上の用量では PCSK9 阻害作用が飽和することが示された。さらに、カニクイザルにおける毒性試験（110149、110359、並びに 112311 試験）では、50 mg/kg の Q2W 投与による曝露量は、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量の 10 倍以上と推定された。そこで、本 ePPND 試験においては、ICH S6（R1）に沿い Q2W での単一の用量（50 mg/kg）群及び対照群を設定し、胚・胎児の発生及び出生児の発達に対する潜在的な有害性を評価した。

妊娠したカニクイザル36匹に、媒体又はevolocumabの50 mg/kg（18匹／群）を、妊娠20日から22日（妊娠判定により異なる）に1回、妊娠35日に1回、その後の出産までの妊娠期間を通じてQ2Wで最大で合計11回SC投与した。

投与終了後、自然分娩し、出生児は生後全期間を通して母動物が飼育した。妊娠期間を通し妊娠状態を超音波検査によって確認し、臨床症状、摂餌量、体重を観察した。生後およそ6カ月間にわたり、臨床症状及び体重（母動物及び出生児）、摂餌量（母動物）、及び出生児の成長並びに発育について観察した。母動物及び出生児は、妊娠及び出生後の適切な時点で採血を行い、薬力学的検査（LDL-C及び総コレステロール）、トキシコキネティクスあるいは抗薬物抗体の分析を行った。出生児は、生後180±2日で安楽死させた。すべての出生児を対象に、外表及び内臓検査並びに肉眼的組織検査を含む剖検を実施した。一部の臓器は重量を測定し、すべての臓器組織を採取保存したが、病理組織学的検査は行わなかった。生後28日に撮影したX線画像から、出生児の骨格を評価した。

妊娠カニクイザルにevolocumabの50 mg/kgを、Q2WでSC投与したときの忍容性は良好であった。臨床症状、摂餌量、体重、妊娠期間、あるいは妊娠及び生後の転帰（胎児又は出生児の死亡）に、evolocumabと関連した変化はなかった。

流産が、対照群では17例中3例（17.6%）に、evolocumab群では18例中5例（27.8%）に認められた。evolocumab群の流産の頻度は、施設の対照群における発生率（6.7%～38.9%、平均23.9%：2008年から2012年の12試験）の範囲内で、対照群との差はevolocumab投与とは関係がないと結論された。対照群の流産は、すべて妊娠第三期に発生した。evolocumab群では、器官形成期である妊娠第一期及び妊娠第二期にそれぞれ2例が、妊娠第三期に1例が発生したが、各妊娠期における流産数は、過去の対照群より低いか、あるいは同程度であった。

出生児の死亡は対照群では14例中2例（14.3%）に、evolocumab群では13例中2例（15.4%）に認められ、過去の対照群（0%～20%、平均11.2%）の範囲内であった。母体に対するevolocumabの投与は、出生児の生存あるいは評価項目に影響しなかった。evolocumab群の雄あるいは雌出生児の体重増加量は、対照群と同様であった。また、生後の神経行動学的評価、骨格評価、並びに6カ月間の生後観察期間終了時の剖検における外表と内臓検査結果から、胚・胎児発生及び出生児の発育にevolocumab投与と関連した影響はなかった。

evolocumabの50 mg/kgをQ2Wで投与した妊娠雌カニクイザルでは、投与期間を通して血清中LDL-C及び総コレステロール濃度が一貫して低下した（平均LDL-Cは対照群より65%～70%低下。図2.6.6-9）。分娩後のevolocumab群の母体における血清中LDL-C及び総コレステロール濃度は、分娩91日までにベースラインの水準に戻り、evolocumab血清中濃度の減少に関連していた。また、evolocumab投与は、母体又は出生児の血清中HDL-Cあるいはトリグリセリド濃度には影響しなかった。

一方、出生児の血清中evolocumab濃度は生後14日でおよそ100 μg/mLで、成獣においてLDL-C及び総コレステロールについて最大の効果を発現する血清中濃度が全身曝露された。しかし、evolocumab群の出生児の血清中LDL-C及び総コレステロール濃度の平均値は、対照群よりわずかに低いだけで、対照群とevolocumab群の個別値は期間を通すとかなり重複した。これらの結果は、出生児におけるevolocumabの薬理効果は成獣と比較して小さいことを示唆している。カニクイザルに

おけるIgG2モノクローナル抗体の胎盤通過性についての知見（Moffat, 2014）及び出生後の母体由来IgGの全身曝露量は無視できる程度であること（Van de Perre, 2003; Hurley, 2011）から、観察された出生児の曝露は、子宮内で胎盤通過を介した可能性が高いと考えられる（図2.6.6-9）。

evolocumabの50 mg/kgをQ2Wで投与したとき、妊娠133日の投与後における母動物のevolocumabの平均曝露値は、C_{max}が598 μg/mLでAUC_{168h}が3500 μg•day/mLであった。2週間の投与間隔での定常状態の曝露量は、AUC_{336h}として5600 μg•day/mLと算出され、420 mgをQ4Wで投与した際の臨床曝露量と比較して12倍のマージンがあった。生後のevolocumabの濃度は、すべての母動物では分娩後91日までに、すべての出生児では生後180日までに検出限界以下に到達したことから、evolocumabのクリアランスは出生児において遅い可能性が示唆された。この試験ではPCSK9濃度は測定しなかったが、ヒトでは新生児のPCSK9濃度が母親の約1/2であることが近年報告された（Peticca et al, 2013）。すなわち、出生後のevolocumabの血中濃度推移は、出生児における抗原によるクリアランスの低下にも関連すると考えられる。evolocumab群の母動物3匹に抗evolocumab抗体が検出された（2匹では分娩後に、1匹は中和抗体が検出された）が、抗体産生に伴ったトキシコキネティクスあるいは薬理効果の変化はみられなかった。出生児には、抗evolocumab抗体は検出されなかった。

結論として、妊娠カニクイザルにevolocumabの50 mg/kgをQ2Wで妊娠20日から22日と出生時までの期間にSC投与した結果、忍容性は良好で、母体に対する毒性は観察されず、生後6カ月間の出生児の成長あるいは発達に影響はなかった。発生に関する無影響量（NOEL）は50 mg/kgで、母体におけるevolocumab投与の影響は、予測された薬理効果（血清中LDL-C及び総コレステロールの低下）に限られた。生後14日の出生児におけるevolocumabの全身曝露量は、成獣において最大の薬理効果を発現する水準にあったが、evolocumab群の新生児における血清中LDL-C及び総コレステロールの平均値は対照群の新生児と比較してわずかに低いだけで、個別値はかなり重複していたことから、新生児のevolocumabの薬理効果は成獣に比較して弱いことが示唆された。



溶媒対照又は evolocumab（50 mg/kg）を妊娠したカニクイザル（18 匹/群）に Q2W で妊娠 20～22 日と出生までの期間 SC 投与した。母体については妊娠期間並びに出産後 6 カ月間、出生児については生後 14 日から生後 6 カ月間の血中 LDL-C 濃度を測定した。BD = 生後日数、GD = 妊娠、LDL-C = 低比重リポ蛋白コレステロール、PPD = 産後日数、SD = 標準偏差

図 2.6.6-9　カニクイザルにおける ePPND 試験における母体及び出生児の LDL-C に対する evolocumab の影響（110370 試験）

胚胎児発生及び出生児の発育に evolocumab が影響しなかったことは、報告された知見と一致する。妊娠中の胚・胎児へのコレステロール供給は母体のステロールの状態と関係なく、胚・胎児はコレステロール必要量の少なくとも 80%を、母体からの循環血液ではなく、内因性の生合成から得ている（Woollett, 2005, Bartels and O'Donoghue, 2011）。ヒトを含む複数の動物種において、胎児のコレステロール生合成は成人のそれを大きく上回る（Dietschy et al, 1993）。さらに、食事若しくは遺伝子突然変異（例えば ApoB の変異）により妊娠期間を通して低コレステロール状態であった母親から産まれた児の発達に、有害な影響は認められていなかったことから、母体の低コレステロール状態と出産転帰への悪影響に因果関係はなかった（Connor et al, 1978、McMurry et al, 1981、Homanics, 1993）。これらの知見は、妊娠期間を通して母体の血清中 LDL-C が約 70%低下したが、胚・胎児発生又は出生後の発育への影響がなかった本試験結果と一致しており、全体として、ヒト胎児へのリスクがほとんどないことを示唆している。

2.6.6.6.3 幼若動物を対象とした試験

2.5 項で述べたように、evolocumab は 12 歳以上の家族性高コレステロール血症ホモ接合体（HoFH）治療を目的として治験が実施された。幼若動物を対象とした非臨床試験は実施及び計画していない。しかし、終了した非臨床安全性試験から、小児での臨床試験の安全性についての若干の成績が得られている。

反復投与毒性試験には発達中の年齢の動物が含まれており、ヒトでの後期小児期及び早期思春期から性成熟期に少なくとも対応していた。すなわち、カニクイザルにおける 6 週間反復投与毒性試験では 2.5 歳の動物が使用され、これらの動物はヒトのおよそ 10 歳に相当する。免疫系の発達など出生後に起こるいくつかの事象に関しては、より低年齢層への外挿が可能かもしれない（Morford et al, 2011; Martin and Weinbauer, 2010; Beck et al, 2006）。

カニクイザルにおける ePPND 試験では母動物の曝露によって、ヒトの 0 歳から 2 歳に相当する生後発育期（Weinbauer et al, 2012）の evolocumab が及ぼす潜在的な影響が評価され、小児（乳幼児）への安全性についての非臨床成績が得られた（2.6.6.6.2 項）。発育に対する NOEL は 50 mg/kg (Q2W)で、血清中 LDL-C 及び総コレステロールの低下がみられ、投与に関連する影響は evolocumab の薬理作用に限られた。

いずれの試験においても毒性は観察されず、evolocumab の非臨床安全性プロファイルは、幼若動物と成獣では同様と推定された。12 歳以上を対象にした HoFH の臨床試験の安全性について、これらの試験成績は支持するものと考えられた。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 ハムスターにおける evolocumab の皮下投与による局所刺激性試験（115815 試験）

evolocumab（140 mg/mL 注射剤、プロセス 2、3.2.P.2.3 項）の 1 mL を、ゴールデンシリアンハムスター雄 5 匹の左腰部に単回 SC 投与し、その局所刺激性を評価した。

すべての動物が、試験4日の剖検時まで生存した。臨床症状、体重、摂餌量に対する影響は観察されなかった。局所の変化は、投与後48時間までに完全に消失した軽度あるいは極軽度の浮腫に限られ、一過性でSC投与の手技によって生じたものと考えられた。投与部位に肉眼的に観察された変化はなく、低頻度で極わずかな投与部位と投与部位以外の皮膚の病理組織学的変化は、投与あるいは剃毛による皮膚処理によって生じたもので、evolocumabとの関連はなかった。

2.6.6.7.2 ウサギにおけるevolocumabの静脈内投与による局所刺激性試験（110151試験）

対照物質又はevolocumab注射剤の1 mL／部位を雄ウサギ（ニュージーランドホワイト種）3匹にIV投与した。evolocumab（プロセス1、3.2.P.2.3項）の濃度は74.8 mg/mLであった。対照物質をウサギの左耳辺縁静脈から、evolocumabを右耳辺縁静脈から単回急速注入した。死亡、臨床症状、体重、あるいは投与部位の肉眼及び病理組織学的評価に、evolocumabの影響は観察されなかった。したがって、evolocumabのIV投与による局所刺激性はないものと考えられた。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 *in vitro*のゴールデンシリアンハムスターの組織を用いたAlexa Fluor 488修飾evolocumabの組織交差反応性試験（112876試験）、並びにヒト及びカニクイザルの正常組織を用いたAlexa Fluor 488修飾evolocumabの交差反応性試験（110148試験）

以下の正常組織において、*in vitro*でのevolocumabの細胞表面成分への結合が観察された。

- ヒト：横紋骨格筋、心筋細胞、皮膚の平滑筋細胞
- カニクイザル：横紋骨格筋、心筋細胞、眼（虹彩）及び皮膚の平滑筋細胞
- ハムスター：横紋骨格筋、心筋細胞、皮膚の平滑筋細胞

*in vivo*心機能評価、並びに心筋及び骨格筋、皮膚、眼の病理組織学的検査成績より、反応性がみられた組織に対するevolocumabの機能的な影響あるいは形態学的な変化はなかった。間接検眼鏡やスリットランプ検眼鏡を用いた前眼部及び後眼部の詳細な評価を含む*in vivo*の検査を、カニクイザル及びハムスターにおいて実施したが、影響は認められなかった。カニクイザルのePPND試験での生後7日及び14日の出生児の神経行動学的検査において、瞳孔光反射、眼振の有無、更に眉間タップ反射（三叉神経、顔面神経並びに輪筋によるまばたき反射を評価）に、影響は認められなかった。

また、いくつかの組織の細胞内成分に対して、検査したすべての動物種で交差反応性が観察された。しかしevolocumabは、その大きさのために細胞質コンパートメントに到達しないため、細胞内成分への結合はevolocumabの安全性評価に関係しないと考えられた。

組織交差反応性アッセイには多くの技術的な限界があり、治療用のモノクローナル抗体についてこのアッセイを使用するための十分な最適化がなされていないため、データの解釈には困難を伴うことがある（Leach et al, 2010）。113種類のモノクローナル抗体の組織交差反応性試験成績を検討したBussiereらの広範な調査では、これらの限界について言及された（Bussiere et al ,2011）。治療標的を発現することが既知の組織を95%以上染色したのは、ヒト以外の霊長類及びヒト組織におい

て、試験した分子の各々22%及び10%のみであった。標的の発現が不明で、*in vivo* の毒性又は薬効の証拠がない組織への反応、すなわち偽陽性の結果もよくみられた。ICH S6（R1）では、アッセイの能力不足、*in vivo* 試験結果との低い相関性、種間での不一致、及び組織交差反応性のみで特定された臨床安全性課題が少ないことから、ヒト組織を使用した組織交差反応性の検討のみが推奨される。また、同ガイドラインには「組織結合自体は *in vivo* の生物活性を示すものではない。（中略）知見は、全体の薬理及び安全性評価パッケージに照らして評価及び解釈すべきである」との記載がある。種を問わず様々な組織が evolocumab によって多少染色されたが、PCSK9 の主要な発現部位である肝臓（Seidah et al, 2003）ではどの種においても染色が観察されなかった結果は、本アッセイが特異性を欠く一例かもしれない。

2.6.6.8.1.1　免疫原性

免疫原性を評価することを目的とした試験は実施しなかった。一般毒性試験において免疫原性を評価した結果、evolocumab はハムスター及びカニクイザルのいずれにおいても、高い免疫原性は示さなかった。evolocumab を投与したハムスターの試験では、抗 evolocumab 抗体は検出されなかった。カニクイザルの 4 試験（110149、110359、112311、110370 試験）において、抗 evolocumab 抗体について検査した。その結果、evolocumab を投与したサルの 100 例中 10 例（10%）に抗 evolocumab 抗体が検出され、半数は中和抗体陽性であった。しかし、抗 evolocumab 抗体が検出された動物でも薬理効果が示され、非臨床試験全般では抗 evolocumab 抗体産生の頻度が低かったことから、免疫原性は evolocumab の安全性評価に影響しなかったと考えられる。臨床試験では、evolocumab を 1 回以上投与した患者の 0.1%において evolocumab に結合する抗体が陽性であったが、中和抗体は検出されなかったことから、evolocumab に結合する抗体の存在は、evolocumab の薬物動態プロファイル、臨床、あるいは安全性評価に影響しなかった（2.7.3 項及び 2.7.4 項）。

2.6.6.8.1.2　免疫毒性試験

反復投与毒性試験の一部として、スタチン併用（112311 試験）及び evolocumab 単独投与（110359 試験）下での、evolocumab の免疫毒性を評価した。免疫毒性の評価項目は、TDAR、末梢リンパ球サブセット、並びにナチュラルキラー細胞機能で、どの評価項目についても evolocumab による影響は観察されず、免疫系の統合性あるいは機能に evolocumab は影響しないと考えられた。免疫毒性に関する更なる考察は、副次的薬理試験の項（2.4.2.2.7.2 項）で行った。

2.6.6.8.1.3　作用機序に関する試験

いずれの非臨床試験でも毒性は観察されず、作用機序に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.8.1.4　依存性試験

evolocumab に、薬物の乱用又は誤用の可能性を示唆する証拠はなく、また実際にいずれも観察されていない。ほかの抗体と同様に、血液脳関門を通過する可能性は低い（Poduslo et al, 1994;

Triguero et al, 1989; Jones and Shusta, 2009; Frank et al, 2011; Yu and Watts, 2013）。非臨床試験では、420 mg を Q4W で投与した際の臨床曝露量に対して最高で 300 倍の曝露量でも、幼若動物（110370 試験）あるいは成獣（110150 試験）に神経行動学的な影響は認められていない。さらに、evolocumab の単一リガンドである PCSK9 に対する特異性、作用機序（PCSK9 の阻害）、あるいはスタチンを含む脂質低下薬の当該情報から、薬物依存に関する理論上の警告はないと判断した。

2.6.6.8.1.5　代謝物の毒性試験

evolocumab の代謝においては活性代謝物は特定されていない（2.6.4.5 項）ため、代謝物に関する試験は不要と判断された。

2.6.6.8.1.6　不純物の毒性試験

evolocumab はバイオテクノロジー由来医薬品であるため、不純物に関する試験は該当しない。

2.6.6.8.1.7　その他の試験

そのほかに実施した試験はない。

2.6.6.9　考察及び結論

該当する規制ガイドライン（主に ICH S6［R1］）に沿い、evolocumab の臨床試験及び承認の裏付けとなる一連の包括的な非臨床毒性試験を実施した。evolocumab の種特異性に基づき、臨床開発プログラムの安全性を担保する毒性試験にはカニクイザル及びハムスターを使用し、免疫毒性評価及び心血管機能評価を含む最長 6 カ月の反復投与毒性試験、スタチン併用時の evolocumab の安全性を評価した 3 カ月間併用毒性試験（詳細な免疫毒性評価を実施）、がん原性を評価した生涯投与試験、受胎能及び初期胚発生試験、及び胚・胎児発生と出生後発育を評価した ePPND 試験を実施した。

これらの試験で認められた evolocumab 投与に関連した影響は、予測された薬理作用に限られた。どの試験においても、420 mg を Q4W で投与したときの臨床曝露量より高い曝露レベル（最大 300 倍）で試験された結果、evolocumab による毒性は認められなかった（表 2.6.6-3）。

結論として、これらの非臨床安全性試験成績は、ヒトのリスクに関連する安全上の懸念の兆候はないことを示している。

表 2.6.6-3　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。

すなわち、以下の式により曝露マージンを算出した。

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

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

2.6.6.10 参考文献

Bartels A, O'Donoghue K. Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns. Obstetric Medicine 2011; 4:147-151.

Beck MJ, Padgett EL, Bowman CJ, et al. Nonclinical juvenile toxicity testing. In: Hood RD, ed. Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach. 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; 2006;263-327.

Bersot TP, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL Interaction of swine lipoproteins with the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. J Biol Chem. 1976;251:2395-2398.

Bussiere JL, Leach MW, Price KD, Mounho BJ, Lightfoot-Dunn R Survey results on the use of the tissue cross-reactivity immunohistochemistry assay Regul Toxicol Pharmacol 2011;59:493-502.

Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. Nat Genet. 2005;37:161-165.

Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. N Engl J Med. 2006;354:1264-1272.

Connor WE, Cerquera MT, Connor RW, et al. The plasma lipids, lipoproteins, and diet of the Tarahumara Indians of Mexico. Amer J Clin Nutr. 1978:31:1131-1142.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Provision of cholesterol to lymphocytes by high density and low density lipoproteins: requirements for low density lipoprotein receptors. J Biol Chem. 1987;262;7808-7818.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Promotion of human T lymphocyte activation and proliferation by fatty acids in low density and high density lipoproteins. J Biol Chem. 1986;261:3620-3627.

Cuthbert JA, Lipsky PE. Modulation of human lymphocyte responses by low density lipoproteins (LDL): enhancement but not immunosuppression is mediated by LDL receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81:4539-4543.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. J Lipid Res. 1993;34:1637-1659.

Drevon-Gaillot E, Perron-Lepage MF, Clement C, Burnett R. A review of background findings in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) from three different geographical origins. Exp Toxicol Pathol. 2006;58:77–88.

FDA Draft Guidance for Industry, "Statistical Aspects of the Design, Analysis, and Interpretation of Chronic Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals," Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Maryland 2001.

Folsom AR, Peacock JM, Boerwinkle E. Sequence variation in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease gene, low LDL cholesterol, and cancer incidence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16:2455-2458.

Frank RT, Abody KS, Najbauer J. Strategies for enhancing antibody delivery to the brain. Biochim Biophys Acta. 2011; 1816:191-198.

Geyer H, Wuhrer M, Resemann A, Geyer R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with Schistosoma mansoni. J. Biol. Chem. 2005;280: 40731–40748.

Goulinet S, Chapman MJ. Plasma lipoproteins in the Golden Syrian hamster (Mesocricetus auratus): heterogeneity of apoB- and apoA-1-containing particles. J Lipid Res. 1993;34:943-959.

Grzych JM, Dissous C, Capron M, Torres S, Lambert PH, Capron A. Schistosoma mansoni shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. J. Exp. Med. 1987;165, 865–878.

Haley P, Perry R, Ennulat D. Society of Toxicologic Pathology position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. Toxicol Pathol. 2005;33:404–407.

Homanics GE, Smith TJ, Zhang SH, et al. Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice. Proc Natl Acad Sci 1993;90:2389-2393.

Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. Nutrients 2011:3:442-474

International Conference on Harmonisation (ICH) 2011. Tripartite Guideline S6 (R1) Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals.

International Conference on Harmonisation (ICH) 2009. Tripartite Guideline M3 (R2) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals.

International Conference on Harmonisation (ICH) 2005. Harmonised Tripartite Guideline S5 (R2). Guideline for Industry: detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility.

Jones AR, Shusta EV.Antibodies and the blood-brain barrier In: An Z, ed. Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc. 2009; Ch21:483-502.

Kamino K, Tillmann T, Boschmann E, Mohr U Age-related incidence of spontaneous non-neoplastic lesions in a colony of Han:AURA hamsters. Exp Toxicol Pathol. 2001:53:157-164.

Kantelhardt SR, Wuhrer M, Dennis RD, Doenhoff MJ, Bickle Q, Geyer R. Fuc(alpha1→3)GalNAc-: the major antigenic motif of Schistosoma mansoni glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity. Biochem. J. 2002;366:217-223.

Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. Am J Hum Genet. 2006;78:410-422.

Leach MW, Halpern WG, Johnson CW, et al Use of tissue cross-reactivity studies in the development of antibody-based biopharmaceuticals: history, experience, methodology, and future directions. Toxicol Pathol. 2010;38:1138-1366.

Lebrec, H, Molinier B, Boverhof D, et al. The T-cell-dependent antibody response assay in nonclinical studies of pharmaceuticals and chemicals: Study design, data analysis, interpretation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2014;69:7-21.

Mahley RW, Innerarity TL, Pitas RE, Weisgraber KH, Brown JH, Gross E. Inhibition of lipoprotein binding to cell surface receptors of fibroblasts following selective modification of arginyl residues in arginine-rich and B apoproteins. J Biol Chem 1977;252:7279-7287.

Martin PL, Weinbauer GF. Developmental toxicity testing of biopharmaceuticals in nonhuman primates: previous experience and future directions. Int J Toxicol. 2010;29:552-568.

McInnes EF, Ernst H, Germann PG. Spontaneous neoplastic lesions in control Syrian hamsters in 6-, 12-, 24-month short-term and carcinogenicity studies. Toxicol Pathol. 2013;41:86-97.

McMurry MP, Connor WE, Goplerud CP. The effects of dietary cholesterol upon the hypercholesterolemia of pregnancy. Metabolism. 1981;30:869-879.

Moffat GJ, Retter MW, Kwon G et al. Placental transfer of a fully human IgG2 monoclonal antibody in the cynomolgus monkey, rat and rabbit: a comparative assessment from during organogenesis to late gestation. Birth Defects Res Part B 2014; 101:178-188.

Morford LL, Bowman CJ, Blanset DL, et al. Preclinical safety evaluations supporting pediatric drug development with biopharmaceuticals: strategy, challenges, current practices. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2011;92:359-380.

NDA 21-366: CDER Approval Package for Crestor (rosuvastatin calcium) tablets. 2003.

Peticca P, Raymond A, Gruslin A, et al. Human serum PCSK9 Is elevated at parturition in comparison to nonpregnant subjects while serum PCSK9 from umbilical cord blood is lower compared to maternal blood. ISRN Endocrinol. 2013, 341632.

Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-brain barriers. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 ;91:5705-5709.

Pour P, Kmoch N, Greiser E, Mohr U, Althoff J, Cardesa A. Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters. I. Incidence and sites. J Natl Cancer Inst 1976a;56:931-935.

Pour P, Mohr U, Althoff J, Cardesa A, Kmoch N. Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters.. III. Urogenital system and endocrine glands J Natl Cancer Inst 1976c;56:949-961.

Pour P, Mohr U, Althoff J, Cardesa A, Kmoch N. Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters.. IV. Vascular and lymphatic systems and lesions of other sites J Natl Cancer Inst, 1976c;56:963-973.

Pour P, Mohr U, Cardesa A, Althoff J, Kmoch N (1976d) Spontaneous tumors and common diseases in two colonies of Syrian hamsters.. II. Respiratory tract and digestive system J Natl Cancer Inst 1976b;56:937-948.

Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:928-933.

Sellers R, Morton D, Michael B, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. Toxicol Pathol. 2007;35:751-755.

Sestak K, Merritt CK, Borda J, et al. Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques. Infect Immun. 2003;71:4079-4086.

Spoor MS, Radi ZA, Dunstan RW. Characterization of age- and gender-related changes in the spleen and thymus from control cynomolgus macaques used in toxicity studies. Toxicol Pathol. 2008;36:695-704.

Triguero D, Buciak JB, Yang J, Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: enhanced delivery compared to native protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86:4761-4765.

Yu YJ, Watts RJ. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. Neurotherapeutics. 2013;10:459-472.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. Vaccine. 2003;21:3374-3376

Weinbauer GF, Chellman GJ, Rasmussen AD, Vogelwedde E. Use of primate pediatric model. In Hoberman AM and Lewis EM, ed. Pediatric Non-Clinical Drug Testing. Principles, Requirements and Practices. John Wiley & Sons, Inc. 2012; Ch13:255-279.

Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. Am J Clin Nutr. 2005;82:1155-1161.

Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. Am J Hum Genet. 2006;79:514-523.