目次

略語一覧 3
1. 非臨床試験計画概略 5
1.1. 高脂血症における ANGPTL3 の役割の背景の概略 5
1.2. 非臨床試験の戦略 6
2. 薬理試験 8
2.1. ヒト ANGPTL3 の遺伝学的研究 8
2.2. 効力を裏付ける試験 8
2.2.1. *In vitro* 薬理試験 8
2.2.2. *In vivo* 薬理試験 8
2.3. 副次的薬理試験 10
2.4. 安全性薬理試験 11
3. 薬物動態試験 12
3.1. ラットとサルを用いた薬物動態試験 12
3.2. ラットとサルを用いたトキシコキネティクス試験 12
3.3. 幼若ラットとウサギを用いたトキシコキネティクス試験 13
3.4. ラットとウサギを用いた胚・胎仔発生トキシコキネティクス試験 13
3.5. ラットを用いた受胎能、着床までの初期胚発生、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関するトキシコキネティクス試験 14
3.6. ラット、ウサギ及びサルにおけるエビナクマブの免疫原性 14
4. 毒性試験 15
4.1. 反復投与毒性試験 15
4.2. 生殖発生毒性試験 15
4.3. 幼若動物を用いた試験 16
4.4. エビナクマブ曝露と抗薬物抗体の形成 16
4.5. その他の毒性試験 17
5. 総括及び結論 18
6. 参考文献 22
APPENDIX A. 検討したデータがないことに対する根拠 25

表一覧

Table 1: Evinacumab Exposure Multiples Achieved in Monkeys, Rats, and Rabbits Relative to Human Exposure 21

APPENDIX 一覧

APPENDIX A. 検討したデータがないことに対する根拠 25

略語一覧

Abbreviation	Definition
ADA	Anti-drug antibody
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ALT	Alanine aminotransferase
ANGPTL3	Angiopoietin-like 3
AST	Aspartate aminotransferase
AUC_{tau}	Area under the concentration-time curve calculated during the dosing interval
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
C_{max}	Peak concentration
CNS	Central nervous system
DALA	Drug abuse liability assessment
DTL	Drug tolerance limit
EL	Endothelial lipase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F_0	Maternal animals
F_1	Offspring
GD	Gestation day
GHS	Geisinger Health System
GLP	Good Laboratory Practices
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol
His6	Hexahistidine
His10	Decahistidine
HoFH	Homozygous familial hypercholesterolemia
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	Intravenous
K_D	Equilibrium dissociation constant
LD	Lactation day
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LOF	Loss of function
LPL	Lipoprotein lipase
mFc	Mouse Fcγ domain
mmh	Myc-myc-hexahistidine

Abbreviation	Definition
NCA	Noncompartmental analysis
NOAEL	No-observed-adverse-effect level
PK	Pharmacokinetics
PND	Postnatal day
Q4W	Every 4 weeks
SC	Subcutaneous
SPR	Surface plasmon resonance
TCR	Tissue cross-reactivity
TG	Triglycerides
TK	Toxicokinetics
TMC	Target-mediated clearance
UKB	UK Biobank
VLDL	Very low-density lipoprotein
VLDL-C	Very low-density lipoprotein cholesterol

1. 非臨床試験計画概略

本文書は、エビナクマブ（開発コード：REGN1500）について実施した非臨床試験全体の概要である。エビナクマブはアンジオポエチン様タンパク質 3（ANGPTL3）と特異的に結合する組換えヒト IgG4^{P}抗体で、リポタンパクリパーゼ（LPL）と血管内皮リパーゼ（EL）の活性の ANGPTL3 による阻害を遮断する。

高脂血症の治療としてのエビナクマブの薬理作用、薬物動態（PK）及び毒性のプロファイルを動物で評価した。エビナクマブは重度の高トリグリセリド（TG）血症患者や関連する急性膵炎患者を含めた高 TG 血症患者で TG 値を低下させる可能性がある。さらに、エビナクマブは低比重リポタンパクコレステロール（LDL-C）高値の患者で LDL-C 値を低下させる可能性があり、この中にはホモ接合体家族性高コレステロール血症（HoFH）で心血管疾患リスクが高い患者も含まれる。薬理試験、PK 試験及び毒性試験の詳細な結果は、Module 2.6.2「薬理試験の概要文」、Module 2.6.4「薬物動態試験の概要文」、Module 2.6.6「毒性試験の概要文」でそれぞれ議論する。

非臨床毒性プログラムはバイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価に関する日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン（S6[R1], 2012）に従っており、補助的なデータを提供する試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に適宜従って実施した。

1.1. 高脂血症における ANGPTL3 の役割の背景の概略

ANGPTL3 は、構造が類似した 8 つの分泌タンパク質（ANGPTL1～ANGPTL8）ファミリーに属し、脂質、グルコース及びエネルギーの代謝に重要な役割を果たす（Mattijssen, 2012; Santulli, 2014）。ANGPTL8 を除くすべての ANGPTL ファミリーのメンバーはモジュール構造が共通であり、コイルドコイル領域を含む N 末端ドメイン及び大型の C 末端フィブリノーゲン様ドメインを含む。ANGPTL3 は主に肝臓に発現し、LPL と EL を阻害することにより脂質代謝の制御に重要な役割を果たしている。LPL は血漿中リポタンパクのコア TG の加水分解に主な役割を果たしており、食後及び空腹時における協調的な調節は、脂質ホメオスタシスとエネルギー供給の維持に関与する（Mattijssen, 2012）。EL は *LIPG* 遺伝子でコード化され、LPL 遺伝子ファミリーに属するホスホリパーゼで、血漿中高比重リポタンパクコレステロール（HDL-C）値の負の制御因子である（Shimamura, 2007）。ANGPTL3 のリパーゼ阻害活性は N 末端ドメインにある。N 末端ドメインは翻訳後にプロタンパク質転換酵素により、完全長タンパク質から切断される（Ono, 2003）。

ANGPTL3 はヒトの遺伝学（Hegele, 2009; Kathiresan, 2008; Kathiresan, 2009; Romeo, 2009; Teslovich, 2010; Willer, 2008）及び遺伝子改変マウスを用いた試験（Ando, 2003; Koishi, 2002; Koster, 2005; Shimizugawa, 2002）に基づき、高脂血症、特に TG 高値及び LDL-C 高値に対する治療標的として注目されるようになった。

ANGPTL3 遺伝子に変異のある家系の研究から、ANGPTL3 と血漿中の脂質の n 値の制御が関係していることを示すデータが得られている（Martín-Campos, 2012; Minicocci, 2012; Musunuru, 2010; Noto, 2012; Pisciotta, 2012）。*ANGPTL3* にヘテロ接合型又はホモ接合型機能欠失（LOF）変異を有するキャリアは対照家系と比べて TG 値が低く、平均差はヘテロ接合型で 51%、ホモ接合型で 84%にもなる。さらに、ヘテロ接合型又はホモ接合型 LOF *ANGPTL3* 変異のキャリアは LDL-C 値も低く、平均差はそれぞれ 34%と 70%である（Musunuru, 2010）。ホモ接合型 LOF 変異のキャリアは HDL-C 値も低い（約 40%）（Musunuru, 2010）。

複数の集団を対象として *ANGPTL3* 変異の影響を評価した最近実施された 2 試験では、*ANGPTL3* にヘテロ接合型 LOF 変異を有する患者はノンキャリアに比べて血漿中 TG、LDL-C 及び HDL-C 値が有意に低く、冠動脈疾患リスクも有意に低く、オッズ比は 0.61～0.66 であることが示されている（Dewey, 2017; Stitziel, 2017）。他の血漿中 LDL を修飾する変異体と比較して解析したところ、*ANGPTL3* LOF 変異体による冠動脈疾患リスク低下の程度は、血漿中 LDL-C に及ぼす影響から予想されるリスク低下よりはるかに大きいことが示され、リポタンパク媒介性脂肪分解を薬理学的に強化すれば、心血管に対して既存の LDL-C 低下戦略を超える治療効果が得られる可能性が示唆された（Kersten, 2019）。

1.2. 非臨床試験の戦略

非臨床開発プログラムは、エビナクマブの薬理作用（*in vitro*、*in vivo*）、PK 及び毒性のプロファイルを評価することが目的であった。

UK Biobank（UKB）コホート（Sudlow, 2015）及び Geisinger Health System（GHS）の MyCode Community Health Initiative コホート（Carey, 2016）を対象として遺伝子関連解析を行い、*ANGPTL3* に LOF 変異があるヒトを解析した（Module 2.6.2 Section 2）。

エビナクマブの薬理作用を一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価し、エビナクマブが ANGPTL3 に結合して ANGPTL3 による LPL 活性及び EL 活性の阻害を遮断し、循環中の脂質を調節する能力の特徴を複数のマウスモデルで解析した。*In vitro* 薬理試験では、エビナクマブはヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 の N 末端ドメインと高い親和性で結合することが示された（Module 2.6.2 Section 1）。*In vitro* 結合データ及びヒト、サル、ウサギ及びラットの ANGPTL3 の間でみられるアミノ酸配列の相同性に基づき、カニクイザル、ウサギ及びラットが毒性評価に最も適した動物種であると判断された（Module 2.6.2 Section 3.1.1）。安全性薬理評価項目は、カニクイザルと Sprague-Dawley ラットを用いて実施した GLP 反復投与毒性試験に組み込まれている。心血管、呼吸器及び中枢神経系（CNS）の評価項目はサル、CNS の評価項目はラットで評価した。

エビナクマブの PK プロファイルは、雄の Sprague Dawley ラット及び雌雄のカニクイザルに単回静脈内（IV）投与又は皮下（SC）投与して評価した。エビナクマブのトキシコキネティクス（TK）プロファイルは、雌雄のラット、サル及びウサギに IV 又は SC で複数回投与して測定した。

反復投与毒性試験をラット（5 週間 IV／SC 及び 13 週間 IV／SC）及びカニクイザル（5 週間 IV／SC、13 週間 IV／SC 及び 26 週間 IV／SC）で実施した。具体的な免疫毒性評価項目は、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験及びサルを用いた 26 週間反復投与毒性試験で評価した。さらに、毒性試験ではエビナクマブ抗薬物抗体（ADA）も解析し、ADA がエビナクマブの曝露に及ぼす影響及び ADA 形成に伴う潜在的な毒性を評価した。ラットを用いた試験で、エビナクマブが雌の受胎能及び胚・胎仔／出生後発生に及ぼす影響を評価した。さらにウサギを用いた試験を実施し、エビナクマブが雄の受胎能及び胚・胎仔の発生に及ぼす影響を評価した。エビナクマブ投与については、幼若ラットとウサギを用いた毒性試験でも評価した。*Ex vivo* 組織交差反応性（TCR）試験を実施して、エビナクマブが正常なヒト、カニクイザル及び Sprague Dawley ラットの組織の凍結切片に結合する可能性を測定した。

エビナクマブの依存性又は乱用性を示唆する生物学的性質はなく、動物を用いた毒性試験や薬理試験でも依存性又は乱用性を支持するエビデンスはない。このため、薬物乱用性評価（DALA）試験は実施しなかった（Module 2.6.6 Section 9.3）。

がん原性リスクについては、反復投与毒性試験及び ANGPTL3 の阻害に関してこれまでに得られている文献データなどを網羅的に評価した結果、エビナクマブを慢性的に投与してもがんのリスクは上昇しないことが示された。このリスク評価の結果、エビナクマブのがん原性を評価する非臨床試験を（動物を用いたがん原性試験も含めて）追加で実施する必要はないと判断された。

2. 薬理試験

2.1. ヒト ANGPTL3 の遺伝学的研究

ヒトの遺伝学的研究では、*ANGPTL3* に LOF 変異のあるヒトは変異のないヒトと比べ、LDL-C、TG 及び HDL-C 値が低く、冠動脈疾患リスクも低い（Module 2.6.2 Section 2）。エビナクマブによって *ANGPTL3* が阻害されると LDL-C、TG 及び HDL-C が低下し（Module 2.6.2 Section 3.2）、*ANGPTL3* LOF 変異を有するヒトでみられる脂質表現型が再現される。

2.2. 効力を裏付ける試験

複数のマウスモデルを用いた一連の非臨床試験で、エビナクマブが ANGPTL3 に結合し、ANGPTL3 による LPL 活性及び EL 活性の阻害を遮断し、循環中の脂質の値を調節する能力の特徴を評価した。

2.2.1. *In vitro* 薬理試験

ANGPTL3 に対するエビナクマブ結合の特性は、完全長又は N 末端ドメイン組換え単量体で、C 末端にヘキサヒスチジン（His6）、デカヒスチジン（His10）又は myc-myc-ヘキサヒスチジン（mmH）タグを有するヒト、サル、ラット及びマウスの ANGPTL3 タンパク質、若しくは N 末端ドメイン組換え二量体で、C 末端にマウス Fcγ ドメイン（mFc）タグを有するヒト、ウサギの ANGPTL3 タンパク質を使用した表面プラズモン共鳴（SPR）-Biacore™アッセイ（pH 7.4）で評価した（Module 2.6.2 Section 3.1.1）。エビナクマブは試験に使用したすべての ANGPTL3 タンパク質と高い親和性で結合するが［平衡解離定数（K_D）0.3～1.3 nM］、ヒト又はマウスの ANGPTL4 又は ANGPTL5 とは結合しない。別の SPR-Biacore アッセイでヒト、ウサギ、及びラットの胎児性 Fc 受容体（FcRn）に対するエビナクマブの結合特性を pH 6.0 で評価したところ（Module 2.6.2 Section 3.1.2）、ヒト FcRn とウサギ FcRn に対する親和性はほぼ同じでマイクロモルレベルであり、ラット FcRn に対する親和性はその 3～4 倍である。

エビナクマブが ANGPTL3 を遮断すると、LPL と EL は ANGPTL3 による阻害から解放され、活性を増加させると予想される。このため、一連の *in vitro* リパーゼ依存蛍光アッセイを行って、ANGPTL3 が媒介する LPL 活性（Module 2.6.2 Section 3.1.3）及び EL 活性（Module 2.6.2 Section 3.1.4）の阻害を遮断するエビナクマブの能力を評価した。これらから得たデータは、ヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウス由来の ANGPTL3 とエビナクマブを相互作用させると、ANGPTL3 が媒介する LPL 活性の抑制が強力に遮断され、ヒト、サル、ラッ及び、マウス由来の ANGPTL3 とエビナクマブを相互作用させると、EL 活性の阻害も遮断されることを示している。

2.2.2. *In vivo* 薬理試験

一連の *in vivo* マウス試験を実施して、エビナクマブが正脂血症マウス及び脂質異常症マウスの血清中脂質を低下させる能力を評価した（高脂血症モデルとして *ApoE*$^{-/-}$マウスと *Ldlr*$^{-/-}$マウスの 2 モ

デル、糖尿病性脂質異常症として *db*/*db* マウス 1 モデル）（Module 2.6.2 Section 3.2.1）。*ApoE*$^{-/-}$マウスは高度にアテロームが生成される高脂血症モデルであり、カイロミクロンと VLDL レムナントのクリアランスが障害されているため、循環中のコレステロールと TG の大半はカイロミクロン及び超低比重リポタンパクコレステロール（VLDL-C）粒子中にある（Imaizumi, 2011）。*Ldlr*$^{-/-}$マウスは *LDLR* に LOF 変異があるヒトの疾患の HoFH のモデルであり、*db*/*db* マウスは肥満、糖尿病及び脂質異常症のモデルであって、空腹時高血糖と高インスリン血症を示し、血漿中 TG とリポタンパクが高値である（Kobayashi, 2000; Nishina, 1994）。

さらに、高脂肪・高コレステロール食を与えた野生型マウスで、エビナクマブが血清中脂質及びいくつかの安全性パラメータに及ぼす影響を高評価し、血清中脂質に及ぼす影響は EL を欠損したマウス（*Lipg*$^{-/-}$ マウス）でも評価した。

別の *in vivo* 試験では *Ldlr*$^{-/-}$マウス、*Lipg*$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$マウス、*ApoE*$^{-/-}$マウスを使用して、エビナクマブ n による LDL-C 低下の機序を評価した（Module 2.6.2 Section 3.2.3）。

高脂血症とアテローム性動脈硬化の確立されたモデルである APOE*3Leiden.CETP マウス（van Vlijmen, 1994）で、エビナクマブがアテローム性動脈硬化を予防する効果を評価した（Module 2.6.2 Section 3.2.4）。エビナクマブをアトルバスタチン（混餌投与）とアリロクマブ（PCSK9 阻害薬）を併用した集中コレステロール低下療法に追加した場合に確立されたアテローム性動脈硬化に及ぼす影響も APOE*3Leiden.CETP マウスで評価した（Module 2.6.2 Section 3.2.5）。

エビナクマブが血清中脂質に及ぼす影響を評価するために、正脂血症マウスに 10 mg/kg を単回 SC 投与した。エビナクマブは血清中 TG 値を著明に低下させ、これに伴って循環中の総コレステロール、HDL-C 及び非高比重リポタンパクコレステロール（non-HDL-C）値も低下した（Module 2.6.2 Section 3.2.1.1）。エビナクマブが TG 値に及ぼす影響は LPL 活性の増加によるものであり、HDL-C に及ぼす影響は EL 活性の増加によるものである。

エビナクマブは高脂血症のマウスモデル（Module 2.6.2 Sections 3.2.1.2, 3.2.1.3）及び糖尿病性脂質異常症のマウスモデル（Module 2.6.2 Section 3.2.1.4）において、循環中の TG 値を有意に低下させた。これは、おそらく LPL 活性がアップレギュレートされたためと考えられる。また、エビナクマブは総コレステロールと HDL-C の他に LDL-C も低下させた。特に、HoFH のマウスモデルである *Ldlr*$^{-/-}$マウスにおいて LDL-C を有意に低下させた。

エビナクマブが血清中脂質及び一部の安全性に関する評価項目に及ぼす影響を評価するために、高脂肪・高コレステロール食を与えた野生型マウスに、エビナクマブ 25 mg/kg を 8 週間にわたり週 1 回 SC 投与した。エビナクマブは循環中の TG、総コレステロール、LDL-C 及び HDL-C 値を有意に低下させたが、試験期間を通じ、体重、肝臓の重量、白色脂肪組織の重量、心臓の重量、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）／アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）比、又は肝臓 TG 含有量に影響はなかった（Module 2.6.2 Section 3.2.1.5.1）。

エビナクマブが EL を介して血清中脂質に及ぼす影響を評価するために、*Lipg*$^{-/-}$マウスに 10 mg/kg を単回 SC 投与した。この結果、*Lipg*$^{-/-}$マウスでも野生型同腹仔マウスでも血清中 TG 値は有意に低下した（Module 2.6.2 Section 3.2.2.1）。HDL-C 値は野生型マウスでは著明に低下したが、*Lipg*$^{-/-}$マウスでは影響はみられず、血清中 HDL-C 値に対するエビナクマブの影響は EL を介することが示された。

LDLR とは独立した、エビナクマブによる LDL-C 減少の機序を評価するために、*in vivo* 試験 3 試験を行った（Module 2.6.2 Section 3.2.3）。最初の試験では、*Ldlr*$^{-/-}$マウスにエビナクマブ 25 mg/kg を週 1 回、3 回にわたり SC 投与したところ、LDLR から独立して血清中脂質を低下させる能力が示された（Module Section 3.2.3.1）。2 番目の試験では、*Ldlr*$^{-/-}$マウスと *Lipg*$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$マウスにエビナクマブ（10 mg/kg）を単回 SC 投与して、エビナクマブが LDLR 非存在下又は EL と LDLR の非存在下で血清中脂質を低下させる能力を評価した（Module 2.6.2 Section 3.2.3.2）。3 番目の試験では、*ApoE*$^{-/-}$マウスに 10 mg/kg を週 1 回、2 回にわたって SC 投与して、エビナクマブが脂質クリアランス（VLDL と LDL）を促進する能力を評価した（Module 2.6.2 Section 3.2.3.3）。これらの試験で得た結果は、エビナクマブによる ANGPTL3 阻害により、LDL 形成の上流にある VLDL の処理とクリアランスが促進され、LDL-C 値が低下することを示している。

エビナクマブがアテローム性動脈硬化の発症に及ぼす影響を評価するために、洋風の食餌を与えた APOE*3Leiden.CETP マウスに 25 mg/kg を週 1 回、13 週にわたり SC 投与した（Module 2.6.2 Section 3.2.4）。APOE*3Leiden.CETP マウスにおいて、週 1 回のエビナクマブ SC 投与で血漿中脂質が低下し、アテローム性動脈硬化の進行が防止された。エビナクマブの投与により、病変面積及びプラーク中の壊死性コアの面積が有意に減少した。

エビナクマブとアトルバスタチン及びアリロクマブの併用がアテローム性動脈硬化の退縮に及ぼす影響を評価するために、既存のアテローム性動脈硬化を有する APOE*3Leiden.CETP マウスに対し、アトルバスタチン（混餌投与）に追加又はアトルバスタチン（混餌投与）とアリロクマブ（10 mg/kg を週 1 回）に追加して、エビナクマブ 25 mg/kg を週 1 回、25 週間にわたって SC 投与した（Module 2.6.2 Section 3.2.5）。エビナクマブの週 1 回 SC 投与とアトルバスタチンの併用でも、エビナクマブの週 1 回 SC 投与とアリロクマブとアトルバスタチンの併用でも、血漿中総コレステロール、non-HDL-C 及び TG は有意に低下した。2 剤併用では既存のアテローム性動脈硬化の進行が抑えられ、3 剤併用ではアテローム性動脈硬化病変の大きさが有意に退縮した。2 剤併用でも 3 剤併用でもプラーク表現型は改善した。

2.3.　副次的薬理試験

In vitro セルベースアッセイを行って、エビナクマブが抗体依存性細胞傷害（ADCC）又は補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する能力を評価した（Module 2.6.2 Section 3.1.5）。エビナクマブは、可溶性ヒト ANGPTL3 の存在下でヒト肝細胞の ADCC 又は CDC を媒介することはなく

（Module 2.6.2 Section 3.1.5.1）、また可溶性 ANGPTL3 との間で C1q に結合する能力のある免疫複合体を形成することもない（Module 2.6.2 Section 3.1.5.2）。

2.4. 安全性薬理試験

安全性薬理評価項目は、カニクイザルと Sprague-Dawley ラットを用いた GLP 反復投与毒性試験にも組み込まれている（Module 2.6.6. Section 3.2, REGN1500-TX-14006, Module 2.6.6. Section 3.1, REGN1500-TX-11073）。心血管、呼吸器及び CNS の評価項目はサル、CNS の評価項目はラットで評価した。最高で 100 mg/kg/週（SC 又は IV）までをラットに 5 週間、サルに 26 週間連続投与したところ、心血管（心拍数、血圧及び心電図）、呼吸器（1 分あたりの呼吸数、パルスオキシメトリー）、CNS に被験物質に関連した変化はみられなかった。

3. 薬物動態試験

ラット、ウサギ及びサルの血清中総エビナクマブ（遊離薬物及び標的と結合した薬物）濃度をバリデートした酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）で測定し、その後、ノンコンパートメント解析（NCA）で評価して PK パラメータを得た。

全体的に、エビナクマブの PK、TK 及び免疫原性のプロファイルに大きな性差はなかった。このため、本項では雌雄の結果をまとめて議論する。

3.1. ラットとサルを用いた薬物動態試験

雄の Sprague Dawley ラット（Module 2.6.4 Section 3.1.1）及び雌雄のカニクイザル（Module 2.6.4 Section 3.1.2）に 1～15 mg//kg を単回 IV 又は SC 投与して、エビナクマブの PK を評価した。ラットでもサルでも総エビナクマブの PK は、低濃度では非線形の標的介在性の動態、高濃度（全般的に 10～30 µg/mL 超）では線形の動態の特徴を示す。低濃度では標的介在性の経路が十分に飽和せず、投与量の増加に伴い曝露量は用量比例よりも大きく増加する。濃度が上昇し、標的介在性の経路が十分に飽和するレベルに近づくと、エビナクマブの全身曝露量は用量比例プロファイルを示す線形動態に近づく。

エビナクマブを IV 又は SC で単回投与したラット及びサルでは、総エビナクマブの濃度-時間プロファイルはそれぞれ分布相（IV 投与の場合）又は吸収相（SC 投与の場合）の特徴を示し、その後、線形のβ消失相と標的介在性消失（TMC）相となり、濃度が非常に低いと線形消失相（TMC 後の相）が延長した。低用量ではβ相はやや不明瞭であったが、プロファイルは非線形 TMC と一致している。観察された非線形動態と一致して、消失は TMC 経路の飽和が不十分な濃度では濃度依存性であり、用量の増加に伴い全身濃度が上昇すると低下した。線形β消失相が最も長かった 15 mg/kg の IV 投与では、消失半減期（$t_{1/2}$）はラットで 4 日、サルで 10 日と推定された。15 mg/kg を単回 SC 投与したときのバイオアベイラビリティは、ラットで 76%、サルで 77%と推定された。

3.2. ラットとサルを用いたトキシコキネティクス試験

エビナクマブの TK プロファイルは、ラットを用いた最長 13 週間の毒性試験（Module 2.6.4 Section 3.2.1）及びサルを用いた最長 26 週間の毒性試験（Module 2.6.4 Section 3.2.2）で測定した。すべての投与群の動物の大多数で投与期間を通して総エビナクマブの継続曝露が認められ、これらの試験は薬剤の曝露と観察された安全性データを解釈するために適切であることが確認された。いずれの動物種でも C_{max} と曝露量（AUC）平均値は投与期間を通してほぼ用量比例的に増加し、検討した投与レジメンにより、投与期間を通して投与間隔全体で、標的介在性の経路を十分に飽和させるエビナクマブの全身濃度が達成されたことが示された。回復期間中はいずれの動物種でも曝露量は用量比例性を上回る増加を示し、サルでは低用量（30 mg/kg/週未満）で非線形の TMC であり、対応する単回投与 PK 試験で観察された非線形の動態と TMC に一致する。10 mg/kg/週以上の投与で、ラットでは（13 週間まで投与）約 1～2 倍、サルでは（26 週間まで投与）3～5 倍の蓄積がみられ

た。ラットでは 13 週間試験で週 1 回の投与で約 7 回投与後、サルでは 26 週間試験で週 1 回の投与で約 12 回投与後に定常状態に達した。

3.3. 幼若ラットとウサギを用いたトキシコキネティクス試験

幼若ラットには 10 週間まで週 1 回 30～100 mg/kg/週を SC 投与又は 100 mg/kg/週を IV 投与し（Module 2.6.4 Section 3.3.1）、幼若ウサギには 10 週間又は 17 週間まで 5 日毎に 30～300 mg/kg を SC 又は IV 投与したところ（Module 2.6.4 Sections 3.3.2.1, 3.3.2.2）、投与期間中、動物の大多数で総エビナクマブへの継続曝露が認められた。ラットでは回復期間中、非線形で標的介在性の動態が観察された。ウサギを用いた GLP 試験では、最終試料採取時点［出生後日数（PND）336］までに大多数の動物で検出可能な濃度の総エビナクマブは観察されなくなった。ラットではすべての用量、ウサギでは 30 mg/kg 超の用量で、SC 又は IV による投与期間中、C_{max} と AUC_{tau}（曝露量）平均値が用量比例的に増加し、低用量では ADA が曝露量に影響を及ぼした。反復投与後のエビナクマブの蓄積は、ラットでは SC でも IV でもすべての用量で約 4 倍、ウサギでは SC で 30 mg/kg 超で 2～3 倍、IV ですべての用量で 3～6 倍であった。幼若ラットでは、いずれの投与群でも週 1 回の 7 回投与後に定常状態に達した。幼若ウサギでは一過性の ADA による影響のため最長 17 週間の IV 投与では定常状態達成がやや遅れたが、25 回目の投与（最終投与）までに全般的に達成された。

3.4. ラットとウサギを用いた胚・胎仔発生トキシコキネティクス試験

ラットを用いた生殖発生毒性試験では、妊娠ラットに妊娠日数（GD）6 から GD 18 まで 3 日毎にエビナクマブ（5～100 mg/kg）を合計 5 回 SC 投与した（Module 2.6.4 Section 4.1.1）。ウサギを用いた生殖発生毒性試験では、妊娠ウサギに GD 7 から GD 19 まで 3 日毎にエビナクマブ（1～30 mg/kg）を合計 5 回 SC 投与した（Module 2.6.4 Section 4.1.2.2）。

妊娠ラットでは、すべての動物で投与期間中、継続曝露が維持された。妊娠ウサギでは、30 mg/kg を投与した動物の大多数で GD 22 まで、約半数で GD 29 まで継続曝露が維持された。30 mg/kg 未満の投与では断続的な曝露がみられており ADA の影響による可能性が高いが、いずれの群でも薬力学作用が生じるのに十分な曝露量であった。C_{max} 及び曝露量（AUC）平均値は、ラットでは投与期間を通してほぼ用量比例的に増加し、ウサギでは用量比例を上回る増加を示し、ウサギに低用量を投与したときの TMC が反映された。妊娠ウサギに 10～100 mg/kg を SC で反復投与又は 100 mg/kg を IV で反復投与した非ピボタル毒性試験でも、ほぼ同じ結果であった（Module 2.6.4 Section 4.1.2.1）。

総エビナクマブ濃度は、ラットでは投与した母動物のすべての胎仔試料で剖検時（GD 21）に測定可能であり（Module 2.6.4 Section 4.1.1）、ウサギでは GD 29 に 10 mg/kg 投与群と 30 mg/kg 投与群の 38%の母動物の胎仔で測定可能であった（Module 2.6.4 Section 4.1.2）。胎仔で濃度が測定可能であったことは、エビナクマブが胎盤を通過することを示す（Kane, 2009; Pentsuk, 2009; Stengel, 2008; Vasiliauskas, 2006）。

3.5. ラットを用いた受胎能、着床までの初期胚発生、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関するトキシコキネティクス試験

雌ラットを用いた受胎能及び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の一部として、授乳日数（LD）21 又は GD 21 までエビナクマブ 30 mg/kg 又は 100 mg/kg を 3 日毎に SC 投与して TK プロファイルを評価した（Module 2.6.4 Section 4.2.1）。雄ウサギを用いた受胎能試験の一部として、エビナクマブ 100 mg/kg 又は 300 mg/kg を 5 日毎に IV 投与して、雄ウサギ血清中のエビナクマブの TK を評価した（Module 2.6.4 Section 4.2.2）。

エビナクマブを投与した TK 群の母動物（F_0）の大多数で、投与期間を通して総エビナクマブへの継続曝露が維持された。すべての母動物及び胚・胎仔 TK 群の F_0 動物の胎仔で、検出可能な総エビナクマブ濃度がみられた。F_1 動物（TK 群の F_0 動物の仔）では、すべてのプール試料、及び 22 匹中 12 匹で検出可能な濃度がみられた。反復投与後は全般的にすべての投与群でエビナクマブが蓄積していた。また、投与した動物では投与期間中、全般的に曝露量が用量比例的に増加した。

エビナクマブを投与した動物の大多数で、投与期間を通して総エビナクマブへの継続曝露が維持された。雄ウサギに IV 投与したとき、すべての用量で投与期間中、C_{max} と曝露（AUC_{tau}）平均値は用量比例的に増加した。反復投与後、100 mg/kg 投与群と 300 mg/kg 投与群のいずれにおいても蓄積がみられた。

3.6. ラット、ウサギ及びサルにおけるエビナクマブの免疫原性

非定量的電気化学発光法ベースのブリッジングイムノアッセイを使用して、ラット、ウサギ及びサルの血清中でヒト IgG4 抗体の保存領域に特異的な抗ヒト IgG4 抗体（ADA；Module 2.6.4 Section 7）を検出した。ADA 反応陽性率はサルとラットでは全般的に低かった（典型的には 1 試験で 25%未満の動物）が、ウサギでは高かった（典型的には 50%超）。抗ヒト IgG4 抗体反応は、サルでは用量に逆相関しており、低用量では発現率が高かったが、ラットとウサギでは用量非依存的であった。いずれの動物種でも用量 30 mg/kg 以上ではアッセイの薬物耐性限界（DTL）を全般的に超えており、これらの用量では ADA 反応が過小評価されている可能性がある。ADA 陽性となった動物の大多数では ADA 陰性動物と比べ ADA の存在とエビナクマブ低濃度が相関しており、ADA を介してエビナクマブの消失が加速したことが示唆された。しかし、全身曝露は継続していたため、ADA の存在がエビナクマブの薬物動態や安全性プロファイルの特徴付けに影響を及ぼさなかった。

4. 毒性試験

4.1. 反復投与毒性試験

エビナクマブの毒性プロファイルは、Sprague Dawley ラットとカニクイザルに、10～100 mg/kg の週 1 回 IV 低速ボーラス注射又は 100 mg/kg の SC 注射で最長 5 週間にわたり反復投与し、最終投与後、最長 10 週間にわたる回復期間を設定して評価した（Module 2.6.6 Sections 3.1.1, 3.2.1）。また、Sprague Dawley ラットとカニクイザルに 10～100 mg/kg の週 1 回 SC 注射又は 100 mg/kg の週 1 回 IV 低速ボーラス注射で最長 13 週間又は 26 週間にわたり反復投与し、最終投与後、最長 13 週間にわたる回復期間を設定して評価した（Module 2.6.6 Sections 3.1.2, 3.2.2, 3.2.3）。

ラットとサルを用いたすべての試験において、投与期間を通して総エビナクマブへの継続曝露が認められ、また動物の大多数では回復期間を通して検出可能な濃度が観察された。ラットとサルを用いた反復投与試験では、C_{max} 及び曝露量（AUC_{tau}）は投与期間を通してほぼ用量比例的に増加した。回復期間中はいずれの動物種でも曝露量は用量比例を上回る増加を示し、サルに 30 mg/kg 未満を投与したとき、非線形の TMC が明らかであった。

ラット又はサルに反復 IV 投与又は SC 投与したとき、総エビナクマブ曝露量に性差はなく、またエビナクマブの TK 又は免疫原性プロファイルにも性差はなかった。

Sprague Dawley ラットでもカニクイザルでもエビナクマブの週 1 回投与の忍容性は良好であり、最長 13 週間及び 26 週間の試験中、有害作用はみられなかった。血清中 TG、HDL-C 及び総コレステロール値が低下し、エビナクマブが ANGPTL3 と LPL 及び EL との相互作用を遮断する能力と一致する。回復期間中は血清中脂質に対する影響は部分的に可逆的であった。反復投与試験で有害作用がなかったため、ラットとサルの各毒性試験で無毒性量（NOAEL）は、投与した最高用量である 100 mg/kg/週（IV 又は SC）と考えられる。

サルを用いて受胎能を評価した 26 週間試験では、雄の精巣の測定と精液の分析及び雌の月経周期の評価を行ったが、有害作用はなかった。

4.2. 生殖発生毒性試験

ラットを用いた胚・胎仔及び受胎能／出生後発生試験でエビナクマブに関連した影響は、30 mg/kg 以上の投与で母動物及び F_1 動物における血清中 TG の低下のみであった。エビナクマブに関連する胎仔の奇形はなく受胎能に対する影響もなかったため、ラットの胚・胎仔／発生毒性の NOAEL は 100 mg/kg/dose である。

ウサギを用いた胚・胎仔発生試験では、胚・胎仔毒性は母動物に対して毒性があった用量のみで観察された。母動物の毒性として、早期の死亡、早産、及び／又は流産がすべての用量で生じ、一般状態も観察され、体重と摂餌量も変化した。さらに、血清中 TG、HDL-C、総コレステロールが低下し、エビナクマブの薬理作用と一致していた。5 mg/kg 以上の用量では仔に催奇形性がみられ

た。ウサギを用いたこの試験の結果に基づき、母動物の NOAEL は決定できず、発生に対する NOAEL は 1 mg/kg/dose と考えられる。

ウサギはベースラインでの脂質の値がヒトに比べて有意に低く（Yin, 2012）、妊娠中、エビナクマブの脂質低下作用に対する感受性が特に強い可能性があるため、ウサギでみられた所見がヒトの臨床において持つ意味は不明である。さらに、ウサギは妊娠の最初の三半期にいくつかの脂質パラメータが低下するが（Zilversmit, 1972）、ラット及び特にヒトでは上昇する（Abbassi-Ghanavati, 2009; Ghio, 2011; Liberati, 2004）ことが知られている。この事実により、ウサギのデータをヒトの患者に外挿するのが難しい。

ウサギを用いた雄受胎能試験では、エビナクマブの薬理作用に関連する有害所見はなかった。投与期間中の交配前に、ADA 関連の免疫反応によるエビナクマブに関連した早期死亡が 6 件生じた。血清中 TG、HDL-C、総コレステロールが低下し、エビナクマブの薬理作用と一致していた。雄の受胎能には影響はなかったため、この試験の NOAEL は投与した最高用量である 300 mg/kg/dose と考えられる。未投与雌の仔では尾椎の骨化が遅延した。この所見は発生時の正常な多様性を反映しており、有害ではないと判断された（DeSesso, 2018）。本試験で仔に催奇形性はみられなかった。

4.3. 幼若動物を用いた試験

幼若ラットを用いた試験では、エビナクマブ曝露の忍容性は良好でいずれの用量でも有害作用はなかった。エビナクマブに関連した影響は意図される薬理作用と一致しており、血清中 TG、HDL-C 及び平均コレステロール値が低下し、これらは全般的に回復期間終了時には可逆的であった。有害作用がなかったため、幼若ラットにおける NOAEL は投与した最高用量である 100 mg/kg/dose（IV 又は SC）と考えられる。同様に、幼若ウサギを用いた用量設定試験でもエビナクマブに関連した影響は意図される薬理作用と一致した影響のみであり、血清中 TG、HDL-C 及び／又はコレステロールが低下した。その後、幼若ウサギを用いた GLP 試験では 300 mg/kg 以下のエビナクマブを PND 21 から PND 141 まで IV 注射で 5 日毎に投与したところ、忍容性は良好であった。エビナクマブに関連する影響は、血清中 TG、HDL-C、LDL 及び総コレステロールの低下であり、これらの影響は投与を中止すると全般的に可逆的であり、意図される薬理作用と一致していた。試験の生殖段階では、雌の生殖性能、子宮内の成長と生存、及び胎仔の形態にエビナクマブに関連する影響はなかった。有害作用がなかったため、NOAEL は評価した最高用量である 300 mg/kg/dose と考えられる。

4.4. エビナクマブ曝露と抗薬物抗体の形成

サルとラットでは抗エビナクマブ抗体陽性率は全般的に低かった（典型的には 1 試験で 25%未満の動物）が、ウサギでは高かった（典型的には 50%超）。ADA 陽性は血清中エビナクマブ低濃度と相関していたが、ラットとサルではすべての用量で動物の大多数、ウサギでは 30 mg/kg を投与した動物で、投与期間を通して総エビナクマブへの継続曝露が維持されたため、ADA によって安全性評価が妨げられることはなかった。

4.5. その他の毒性試験

正常なヒト、カニクイザル及び Sprague Dawley ラットの組織の凍結切片（1 動物種あたり 30～34 の組織）を使用してエビナクマブが結合する可能性を測定する *ex vivo* TCR 試験を行った。この結果、評価したいずれの組織でもエビナクマブが標的及び標的外へ結合するリスクは示されなかった。

ICH ガイドライン（S6[R1], 2012）に従い、動物を用いたエビナクマブの毒性試験及び関連する文献に基づき、がん原性について科学的根拠の重要度評価を行った。この結果、エビナクマブを慢性的に投与してもがんのリスクは上昇しないことが示された。リスク評価に基づき、エビナクマブのがん原性を評価する非臨床試験を（動物を用いたがん原性試験も含めて）これ以上実施する必要はないと判断された。

エビナクマブの IV 投与及び SC 投与の局所忍容性は、ラットとサルを用いたすべての GLP 反復投与毒性試験及び幼若ラットとウサギを用いた試験の一部として、IV 及び／又は SC 注射部位を肉眼と顕微鏡で観察して評価した（Module 2.6.6 Section 8）。全般的に IV 注射部位でも SC 注射部位でも、エビナクマブに関連した有害な肉眼的所見や顕微鏡所見はなかった。

カニクイザルの CNS に対してエビナクマブに関連した影響はみられず、また、動物を用いた毒性試験や薬理試験でもエビナクマブの依存性や乱用性を示唆するエビデンスはなかったため、薬物乱用性を評価した試験は特に実施しなかった。さらに、CNS で発現して薬理活性を発揮する、乱用性と関連のある受容体やトランスポーター（オピエート、ドパミン系、ノルアドレナリン系、セロトニン系、NMDA 系、シグマ及び GABA 系）とエビナクマブが結合するエビデンスはない。

5. 総括及び結論

ANGPTL3 はヒトの遺伝学（Hegele, 2009; Kathiresan, 2008; Kathiresan, 2009; Romeo, 2009; Teslovich, 2010; Willer, 2008）及び遺伝子改変マウスを用いた試験（Ando, 2003; Koishi, 2002; Koster, 2005; Shimizugawa, 2002）に基づき、高脂血症、特に TG 高値及び LDL-C 高値に対する治療標的として注目されるようになった。ヒトの遺伝学的研究では、*ANGPTL3* に LOF 変異があるヒトは変異がないヒトに比べて LDL-C、TG、HDL-C 値が低く、冠動脈疾患リスクも低い。

エビナクマブは *in vitro* で高い親和性でヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 と結合し、ANGPTL3 を介して LPL と EL の阻害を遮断するため、HoFH 患者を含む高脂血症患者の新たな治療選択肢となる。さらに、エビナクマブは可溶性 ANGPTL3 の存在下で標的細胞の ADCC 又は CDC を引き起こさない。*In vivo* 試験では、エビナクマブは複数のマウスモデルで一貫して循環中の脂質を低下させ ANGPTL3 LOF 変異を有するヒトで観察される脂質表現型を再現し、*Ldlr* 欠損マウスにおいて LDL 形成の上流にある VLDL の処理とクリアランスを介して LDL-C を低下させ、アテローム性動脈硬化のマウスモデルにおいてアテローム性動脈硬化の発達を防ぎ、退縮を促進した。これらの観察は HoFH 患者を対象とした臨床評価を支持する。*In vitro* 結合データ、並びにヒト、サル、ウサギ及びラットの ANGPTL3 のアミノ酸相同性に基づき、カニクイザル、ウサギ及びラットは毒性評価に最も適した動物種と考えられた。このため、Sprague Dawley ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いた試験をさらに実施し、エビナクマブの薬物動態と毒性のプロファイルの特性を解析した。

ラットとサルでは総エビナクマブの PK は、低濃度では非線形の標的介在性の動態、高濃度（一般に 10～30 µg/mL 超）では線形の動態という特徴を示す。低濃度では標的介在性経路が十分に飽和せず、投与量の増加に伴い曝露量は用量比例を上回る増加を示す。濃度が上昇して標的介在性の経路が十分に飽和するレベルに近づくと、エビナクマブの全身曝露量は用量比例プロファイルを示す線形の動態に近づく。

エビナクマブ 10～100 mg/kg を週 1 回 IV 又は SC で、ラットには最長 13 週間、サルには 26 週間投与したところ、すべての用量で動物の大多数で投与期間を通して総エビナクマブの継続曝露が認められ、いずれの動物種でも最長 13 週間の回復期間を通して総エビナクマブの濃度が検出された。C_{max} と曝露量（AUC）平均値はラットでもサルでも投与期間を通してほぼ用量比例的に増加した。回復期間中の曝露量はいずれの動物種でも用量比例を上回る増加を示し、サルでは低用量（30 mg/kg/週未満）を投与したとき TMC は非線形であったため、対応する単回投与 PK 試験で観察された非線形動態及び TMC と一致していた。ラットでは最長 13 週間、サルでは 26 週間、10 mg/kg/週以上を投与したところ、エビナクマブはそれぞれ約 1.3～2 倍、3～5 倍蓄積した。定常状態はラットを用いた 13 週間試験で週 1 回の投与で約 7 回投与後、サルを用いた 26 週間試験で週 1 回の投与で約 12 回投与後に達成された。

幼若ラットにエビナクマブ 30～100 mg/kg をおよそ週 1 回 IV 投与又は SC 投与したときの曝露量及び動態は、成熟ラットに反復投与した毒性試験でみられた曝露量及び動態とほぼ同じであった。幼若ラットに 30 mg/kg 以上を投与したときの蓄積は約 4 倍であり、定常状態はいずれの投与群でも週 1 回の投与で 7 回投与後に達成された。

幼若ウサギにエビナクマブ 30～300 mg/kg を 5 日毎に、最長 10 週間又は 17 週間にわたって IV 投与又は SC 投与したとき、毒性試験の投与期間中、動物の大多数で総エビナクマブの継続曝露が観察された。ウサギを用いた GLP 試験では、最後の試料採取時点（PND 336）までに動物の大多数で検出可能な濃度の総エビナクマブはみられなくなった。SC 投与群では、C_{max} と曝露量平均値は 30 mg/kg 超の用量で投与期間中、用量比例的に増加し、低用量では ADA が曝露量に影響を及ぼした。IV 投与群では、C_{max} と曝露量平均値は投与期間を通して用量比例的に増加した。反復投与後にすべての投与群で薬剤が蓄積した。幼若ウサギに最長 17 週間 IV 投与したとき、一過性の ADA による影響により定常状態達成はやや遅れたが、全般的に 25 回目の投与までに達成された。

妊娠ラットに最高で 100 mg/kg を 3 日毎に SC 投与し、妊娠ウサギに最高で 30 mg/kg を 3 日毎に SC 投与した生殖発生毒性試験では、ラットではすべての動物で投与期間を通して継続曝露が維持され、ウサギでは 30 mg/kg 投与群の半数の動物で GD 29 まで維持された。C_{max} と曝露量平均値は、ラットでは投与期間を通して用量比例的であり、ウサギでは用量比例を上回り、ウサギでは低用量を投与したときの TMC を反映している。

総エビナクマブの濃度は、ラットでは薬剤を投与した動物のすべての胎仔試料で剖検時（GD 21）に測定可能であり、ウサギでは GD 29 に 10 mg/kg 投与群と 30 mg/kg 投与群の 38%の母動物の胎仔で測定可能であった。胎仔で測定可能な濃度がみられたことは、エビナクマブが胎盤を通過することを示す（Kane, 2009; Pentsuk, 2009; Stengel, 2008; Vasiliauskas, 2006）。

雌ラットを用いた受胎能及び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の一部として、エビナクマブ 30 mg/kg 又は 100 mg/kg を 3 日毎に、LD 21 又は GD 21 まで SC 投与して TK を評価した。エビナクマブを投与した TK 群の F_0 動物の大多数で、投与期間を通して総エビナクマブの継続曝露が維持された。すべての母ラット及び胚・胎仔 TK 群の F_0 動物の胎仔で、検出可能な濃度の総エビナクマブがみられた。F_1 動物では、すべてのプール試料及び 22 匹中 12 匹で検出可能な濃度の総エビナクマブがみられた。TK 群及び胚・胎仔 TK 群の F_0 動物で総エビナクマブへの継続曝露が維持された動物が多かったため、毒性群の F_0 動物は試験中、総エビナクマブに曝露していたと想定される。反復投与後には全般的にすべての投与群で蓄積が観察された。エビナクマブを投与した動物での曝露量は、投与期間中、全般的に用量比例的に増加した。

雄ウサギを用いた受胎能試験の一部として、エビナクマブ 100 mg/kg 又は 300 mg/kg を 5 日毎に IV 投与して TK を評価した。エビナクマブを投与した動物の大多数で、投与期間を通して総エビナクマブの継続曝露が維持された。反復投与後は、100 mg/kg 投与群でも 300 mg/kg 投与群でも蓄積がみられた。投与期間中、すべての投与群で曝露量は用量比例的に増加した。

免疫原性はサルとラットでは全般的に低かった（典型的には 1 試験で 25%未満の動物）が、ウサギでは高かった（典型的には 50%超）。抗ヒト IgG4 抗体反応は、サルでは用量依存的で低用量では発現率が高かったが、ラットとウサギでは用量非依存的であった。すべての動物種で用量 30 mg/kg 以上ではアッセイの DTL を全般的に超えており、これらの用量では ADA 反応が過小評価されている可能性がある。ADA 陽性となった動物の大多数では、ADA 陰性動物と比べて ADA の存在とエビナクマブの低濃度が相関しており、ADA を介してエビナクマブの消失が加速したことが示唆された。一般的にラット、ウサギ及びサルで免疫原性がみられても、ヒトにおける免疫原性を予測するわけではない。すべての試験で動物の大多数で継続曝露が認められたため、ADA の存在がエビナクマブの薬物動態や安全性プロファイルの特徴付けに影響を及ぼさなかった。

エビナクマブ曝露はラットでもサルでも忍容性が良好で、ラットで最長 13 週間、サルで 26 週間にわたる試験の間、有害作用はみられなかった。エビナクマブに関連する影響は TG、HDL-C、コレステロールの低下のみであり、意図される薬理作用と一致していた。有害作用がなかったため、NOAEL は評価した最高用量である 100 mg/kg/dose（IV 又は SC）と考えられる。妊娠ラットがエビナクマブへ曝露したときの忍容性は良好で、母動物にも胚・胎仔にも毒性はみられず、ラットにおける発生 NOAEL は 100 mg/kg/dose である。ウサギではすべての用量（1 mg/kg の低用量を含む）で母動物に明らかな毒性が生じ、5 mg/kg 以上で催奇形性がみられたため、発生 NOAEL は 1 mg/kg/dose と考えられる。ウサギとヒトではベースラインも妊娠中も脂質の値が著明に異なるため、上記のウサギでみられた所見がヒトに対して持つ意味は不明である。幼若ラットとウサギがエビナクマブに曝露したときの忍容性は良好で、薬剤に関連する所見は薬理作用から予想される TG、HDL-C 及び／又はコレステロールの低下のみであり、これらの影響は投与を中止すると全般的に可逆的であった。幼若ウサギの GLP 試験の生殖段階では、雌の生殖能、子宮内成長と生存、胎仔の形態にエビナクマブに関連する影響はなかった。したがって NOAEL は、投与した最高用量である幼若ラットで 100 mg/kg、幼若ウサギで 300 mg/kg と考えられる。*Ex vivo* TCR 試験では、評価したヒト、サル及びラットの組織にエビナクマブ染色はみられなかった。

Table 1 に示すように、ヒトで推定される曝露量と比較すると、サルを用いた 26 週間反復投与毒性試験で NOAEL の用量である 100 mg/kg/週を投与したときの曝露量は 18.1 倍、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験で NOAEL の用量である 100 mg/kg/週を投与したときの曝露量は 3.1 倍となる。さらに、ヒトで推定される曝露量と比較すると、ウサギを用いた 11 週間反復投与受胎能試験で NOAEL である 300 mg/kg/週を投与したときの曝露量は 11.4 倍となる。サルの受胎能は 26 週間毒性試験でも評価した。さらに、ラットとウサギを用いた胚・胎仔発生試験では、NOAEL である 100 mg/kg/dose（ラット）と 1 mg/kg/dose（ウサギ）を投与したときの曝露量は、ヒトで推定される曝露量のそれぞれ 0.2 倍と 2.0×10^{-5} 倍となる。

第 3 相試験（R1500-CL-1629）では、HoFH の患者に対してエビナクマブ 15 mg/kg を 4 週毎に IV 投与する。

Table 1: Evinacumab Exposure Multiples Achieved in Monkeys, Rats, and Rabbits Relative to Human Exposure

Toxicology Reference Study	Species	NOAEL	Evinacumab AUC_{cum} in Animal Exposure[a] (day•mg/L)	Estimated Exposure Multiples: Animal (AUC_{cum}) Relative to Human (AUC_{0-24wk})[b],[c]
26-Week Study (REGN1500-TX-14006)[d]	Cynomolgus monkey	100 mg/kg IV	920000	18.1
13-Week Study (REGN1500-TX-12062)	Sprague Dawley rat	100 mg/kg IV	159000	3.1
Embryo-Fetal Development Study (REGN1500-TX-14149)	Sprague Dawley rat	100 mg/kg SC	9880	0.2
11-Week Fertility Study (R1500-TX-17095)	New Zealand White rabbit	300 mg/kg IV	578000	11.4
Embryo-Fetal Development Study (REGN1500-TX-14092)	New Zealand White rabbit	1 mg/kg SC	1.02	2.0×10^{-5}

[a] AUC_{cum} determined over the entirety of the study from first dose until final necropsy. For study REGN1500-TX-14092, AUC_{tau} in the first dosing interval was used to represent AUC_{cum}, as evinacumab was undetectable for the vast majority of animals by dose 2, due to the presence of ADA; values are reported in the TK subreport. For studies REGN1500-TX-14006 and R1500-TX-17095, AUC_{cum} values are reported in the respective TK subreports. For studies REGN1500-TX-12062 and REGN1500-TX-14149, AUC_{cum} values are calculated and reported in R1500-PM-20031.

[b] The estimated mean human exposure at AUC_{0-24wk} in HoFH patients following 15 mg/kg IV given Q4W for a total of 6 doses is 50800 day•mg/L (rounded to 3 significant figures) reported in R1500-PK-19139. Evinacumab exposures in humans were estimated using a population PK model; the model and utilized human PK data are also described in this report.

[c] Exposure multiples were generated using the ratios of the AUC_{cum} values determined in the toxicology studies and the human AUC_{0-24wk} value reported in R1500-PK-19139.

[d] Fertility in cynomolgus monkeys was also assessed in this study.

ADA, Anti-drug antibody; AUC, Area under the concentration-time curve; HoFH, homozygous familial hypercholesterolemia; IV, Intravenous; NOAEL, No-observed-adverse-effect level; PK, Pharmacokinetics; Q4W, Every 4 weeks; SC, Subcutaneous; TK, Toxicokinetic

結論として、エビナクマブ曝露は、健康で妊娠していない動物において最大限標的へ作用し、予想される薬理作用として脂質の変化を示し、有害作用はなかった。薬剤に関連した催奇形性がウサギで観察されたが、ラットでは観察されなかった。ウサギでの所見がヒトの臨床に対して持つ意味は不明であるが、妊娠中のエビナクマブの使用についてはリスクとベネフィットを注意深く考慮する必要がある。すべてのピボタル安全性試験は、該当する ICH と国際ガイダンスに従って実施された。非臨床プログラムから得て本文書に記述したデータは全体的に、エビナクマブの本邦での承認申請を支持している。

6. 参考文献

Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, and Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. Obstet Gynecol. 2009 Dec;114(6):1326-31.

Ando Y, Shimizugawa T, Takeshita S, Ono M, Shimamura M, Koishi R, et al. A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. Journal of lipid research. 2003;44(6):1216-23.

Carey DJ, Fetterolf SN, Davis FD, Faucett WA, Kirchner HL, Mirshahi U, et al. The Geisinger MyCode community health initiative: an electronic health record-linked biobank for precision medicine research. Genet Med 2016; 18(9):906-13.

DeSesso JM and Scialli AR. Bone Development in Laboratory Mammals Used in Developmental Toxicity Studies. Birth Defects Res. 2018 Sep 1; 110(15):1157-1187.

Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, O'Dushlaine C, Schurmann C, Gottesman O, et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. New England Journal of Medicine. 2017;377(3):211-21.

Ghio A, Bertolotto A, Resi V, Volpe L, and Di Cianni G. Triglyceride metabolism in pregnancy. Adv Clin Chem. 2011;55:133-53.

Hegele RA, Ban MR, Hsueh N, Kennedy BA, Cao H, Zou GY, et al. A polygenic basis for four classical Fredrickson hyperlipoproteinemia phenotypes that are characterized by hypertriglyceridemia. Human molecular genetics. 2009 Nov 1;18(21):4189-94.

Imaizumi K. Diet and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(6):1023-35.

Kane SV, Acquah LA. Placental transport of immunoglobulins: a clinical review for gastroenterologists who prescribe therapeutic monoclonal antibodies to women during conception and pregnancy. Am J Gastroenterol 2009;104:228-233; doi: 10.1038/ajg.2008.71.

Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. Nature genetics. 2008 Feb;40(2):189-97.

Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. Nature genetics. 2009 Jan;41(1):56-65.

Kersten S. New insights into angiopoietin-like proteins in lipid metabolism and cardiovascular disease risk. Current opinion in lipidology. 2019;30(3):205-11.

Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. Metabolism. 2000 Jan;49(1):22-31.

Koishi R, Ando Y, Ono M, Shimamura M, Yasumo H, Fujiwara T, et al. Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. Nature genetics. 2002 Feb;30(2):151-7.

Koster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, et al. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. Endocrinology. 2005 Nov;146(11):4943-50.

Liberati TA, Sansone SR, and Feustn MH. Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls. Vet Clin Pathol. 2004;33(2):68-73.

Martín-Campos JM, Roig R, Mayoral C, Martinez S, Martí G, Arroyo JA, Julve J, et al. Identification of a novel mutation in the ANGPTL3 gene in two families diagnosed of familial hypobetalipoproteinemia without APOB mutation. Clin Chim Acta. 2012; 413(5-6):552-5.

Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. Biochim Biophys Acta. 2012 Oct 25: 1821(5):782-99.

Minicocci I, Montali A, Robciuc MR, Quagliarini F, Censi V, Labbadia G, et al. Mutations in the ANGPTL3 gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2012;97(7):E1266-75.

Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. N Engl J Med. 2010 Dec 2;363(23):2220-7.

Nishina PM, Lowe S, Wang J, Paigen B. Characterization of plasma lipids in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. Metabolism. 1994 May;43(5):549-53.

Noto D, Cefalù AB, Valenti V, Fayer F, Pinotti E, Ditta M et al. Prevalence of ANGPTL3 and APOB Gene Mutations in Subjects With Combined Hypolipidemia. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012, 32(3):805-9.

Ono, M.; Shimizugawa, T.; Shimamura, M., et al. Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. The Journal of biological chemistry. 2003 Oct 24;278(43):41804-41809.

Pentsuk N, van der Laan JW. An interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. Birth Defects Research (Part B) 2009;86:328-344; doi: 10.1002/bdrb.20201.

Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, Simonelli S, Adorni MP, Sallo R, et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. Circulation. Cardiovascular genetics, 2012. 5(1):42-50.

Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. The Journal of Clinical Investigation. 2009 Jan;119(1):70-9.

S6(R1) Guidance for Industry: S6 Addendum to Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology Derived Pharmaceuticals. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), ICH, May 2012: ucm194490.

Santulli, G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. Frontiers in endocrinology. 2014;5:4.

Shimamura, M.; Matsuda, M.; Yasumo, H., et al. Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2007 Feb;27(2):366-372.

Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, Yoshida K, Ando Y, Koishi R, et al. ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. The Journal of biological chemistry. 2002 Sep 13;277(37):33742-8.

Stengel JZ, Engel HL. Is infliximab safe to use while breastfeeding? World J Gastroenterol 2008;14(19):3085-3087; doi: http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.3085.

Stitziel NO, Khera AV, Wang X, Bierhals AJ, Vourakis AC, Sperry AE, et al. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. Journal of the American College of Cardiology. 2017;69(16):2054-63.

Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, et al. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. PLoS Med 2015; 12(3):e1001779.

Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature. 2010 Aug 5;466(7307):707-13.

van Vlijmen, B.J.; van den Maagdenberg, A.M.; Gijbels, M.J., et al. Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. The Journal of clinical investigation. 1994 Apr;93(4):1403-1410.

Vasiliauskas EA, Church JA, Silverman N, Barry M, Targan SR, Dubinsky MC. Case report: evidence for transplacental transfer of maternally administered infliximab to the newborn. Clinical Gastronenterology 2006;4:1255-1258; doi:10.1016/j.cgh.2006.07.018.

Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nature genetics. 2008 Feb;40(2):161-9.

Yin W, Carballo-Jane E, McLaren DG, Mendoza VH, Gagen K, Geoghagen NS, et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. J Lipid Res. 2012 Jan; 53(1):51-65.

Zilversmit DB, Hughes LB, and Remington M. Hypolipidemic effect of pregnancy in the rabbit. J Lipid Res. 1972 Nov;13(6):750-56.

APPENDIX A. 検討したデータがないことに対する根拠

CTD のセクション	根拠
薬理試験	
4.2.1.3 安全性薬理試験	独立した安全性薬理試験は実施しなかった。心血管系、呼吸器系及び CNS は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部として評価した。
4.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験	非臨床薬力学的薬物相互作用試験を実施しても、有用なデータが得られるわけではないと判断されたため、実施しなかった。
薬物動態	
4.2.2.3 分布	モノクローナル抗体については組織分布試験が規制上の要件となっていないため、エビナクマブについて組織分布試験は実施していない[a]。 妊娠中の全身曝露及び胎盤関門の通過性は、妊娠 Sprague Dawley ラットとウサギで評価した（4.2.3.5.2 胚・胎仔発生、4.2.3.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能）。
4.2.2.4 代謝	ICH のガイドライン S6（R1）では、モノクローナル抗体は小さなペプチドと個別のアミノ酸に分解されると予想され、代謝経路は全般的に理解されているため、従来の生体内分解に関する試験は必要ないとされており、このガイドラインに従った[a]。
4.2.2.5 排泄	モノクローナル抗体が排泄で除去されることは予想されないため、排泄試験は実施しなかった[a]。
4.2.2.6 薬物動態学的薬物相互作用	本剤及びモノクローナル抗体の ADME プロファイルに基づき、薬物動態学的薬物相互作用試験が必要とは判断されなかったため、薬物動態学的薬物相互作用は実施しなかった。
毒性	
4.2.3.1 単回投与毒性試験	モノクローナル抗体では急性毒性所見はまれであるため、最初の毒性試験として反復投与毒性試験を実施した。急性毒性については、反復投与毒性試験の初回投与後に評価可能である。
4.2.3.3 遺伝毒性試験 4.2.3.3.1 *In vitro* 試験 4.2.3.3.2 *In vivo* 試験	モノクローナル抗体が細胞に入り DNA と結合することは予想されない。したがって、遺伝毒性試験は実施しなかった[a]。

CTD のセクション	根拠
4.2.3.4 がん原性試験 4.2.3.4.1 長期がん原性試験 4.2.3.4.2 短期又は中期がん原性試験 4.2.3.4.3 その他の試験	エビナクマブの動物を用いた毒性試験及び ANGPTL3 阻害に関する文献データに基づいた科学的根拠の重要度で、エビナクマブの慢性的投与によりがんのリスクは上昇しないことが支持されるため、がん原性試験は実施しなかった。CHMP からも FDA からも動物を用いたがん原性試験は要請されていない。
4.2.3.5.2 胚・胎仔毒性試験 4.2.3.5.3 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	胚・胎仔毒性及び出生前／後の発生毒性は、Sprague Dawley ラットとウサギを用いた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で評価した。
4.2.3.6 局所刺激性試験	従来の局所刺激性試験は実施しなかった。局所刺激性については、反復投与毒性試験で投与した動物の IV 注入部位と SC 注射部位を評価した（目視、肉眼及び顕微鏡観察）。IV 注入部位にも SC 注射部位にもエビナクマブに関連する有害所見はなかった。
4.2.3.7.1 抗原性試験 4.2.3.7.3 毒性発現の機序に関する試験 4.2.3.7.4 依存性試験 4.2.3.7.5 代謝物の毒性試験 4.2.3.7.6 不純物の毒性試験	一般毒性試験の結果、他の試験の結果について一般毒性試験で解釈を補う必要はないことが示される及び／又はエビナクマブは生物製剤であるため、これらの試験は実施しなかった。

[a] ICH のガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価 S6（R1）」に基づいて妥当性を判断している。