# 表一覧

Table 1: Nomenclature ..... 4

# 図一覧

Figure 1: Schematic Representation of the Structure of Evinacumab ..... 5

# 略語一覧

| Abbreviation | Definition |
|---|---|
| Ab | Antibody |
| ADA | Anti-drug antibody |
| ADCC | Antibody-dependent cellular cytotoxicity |
| ALT | Alanine aminotransferase |
| ANGPTL | Angiopoietin-like |
| ANOVA | Analysis of variance |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| AST | Aspartate aminotransferase |
| CDC | Complement-dependent cytotoxicity |
| CE | Cholesteryl ether |
| CETP | Cholesterol ester transfer protein |
| CIC | Circulating immune complexes |
| CNS | Central nervous system |
| DTL | Drug tolerance limit |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| EL | Endothelial lipase |
| ECG | Electrocardiogram |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FcRn | Neonatal Fc receptor |
| FPLC | Fast protein liquid chromatography |
| GD | Gestation day |
| GHS | Geisinger Health System |
| GLP | Good Laboratory Practice |
| HAGG | Heat aggregated human gamma globulin |
| HDL-C | High density lipoprotein cholesterol |
| His6 | Hexahistidine |
| His10 | Decahistidine |
| HoFH | Homozygous familial hypercholesterolemia |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IV | Intravenous (ly) |
| JET | Jacketed External Telemetry |

| Abbreviation | Definition |
|---|---|
| $K_D$ | Equilibrium dissociation constant |
| LD | Lactation day |
| LDL-C | Low-density lipoprotein cholesterol |
| LDLR | LDL receptor |
| LOF | Loss of function |
| LPL | Lipoprotein lipase |
| mAb | Monoclonal antibody |
| mFc | Mouse Fcγ domain |
| mmH | Myc-myc-hexahistidine |
| NHS | Normal human serum |
| NCA | Non compartmental analysis |
| Non-HDL-C | Non-high density lipoprotein cholesterol |
| PND | Postnatal day |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells |
| RGC | Regeneron Genetics Center |
| SC | Subcutaneous(ly) |
| SEM | Standard error of the mean |
| SPR | Surface plasmon resonance |
| TMC | Target-mediated clearance |
| TG | Triglycerides |
| UKB | UK Biobank |
| VLDL-C | Very low-density lipoprotein cholesterol |
| WT | Wild-type |

エビナクマブ（開発コード：REGN1500）は、アンジオポエチン様タンパク質 3（ANGPTL3）に特異的に結合する組換えヒト IgG4$^{P}$抗体である。エビナクマブが ANGPTL3 に結合するとリポタンパクリパーゼ（LPL）及び内皮リパーゼ（EL）を阻害する ANGPTL3 の活性が遮断される。エビナクマブはホモ接合体家族性高コレステロール血症（HoFH）の長期治療として、15 mg/kg を 1 ヵ月に 1 回（4 週ごと）に静脈内投与する。

有効成分（API）の命名を Table 1 に記載する。

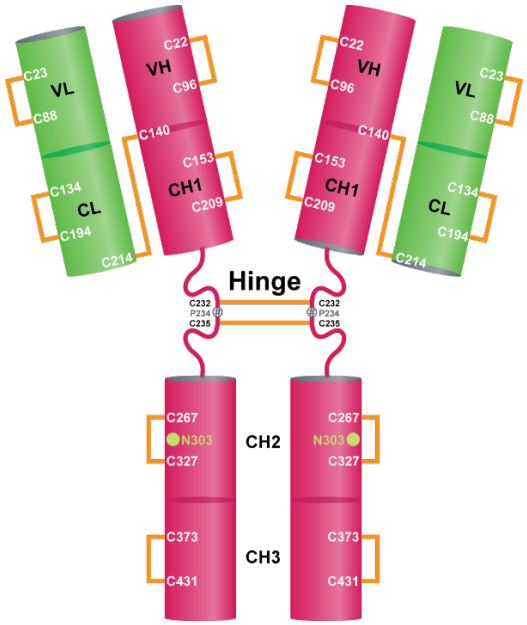
Table 1: Nomenclature

| **Type** | **Nomenclature** |
|---|---|
| Recommended International Nonproprietary Name | evinacumab |
| Chemical Name(s)<br>• Chemical Abstract Index<br>• United States Accepted Name Council<br>• World Health Organization | Immunoglobulin G4, anti-(human protein angptl3 (angiopoietin-like 3)) (human monoclonal REGN1500 heavy chain), disulfide with human monoclonal REGN1500 light chain, dimer |
| Company or Laboratory Code | REGN1500 |
| United States Accepted Name | evinacumab |
| Chemical Abstract Service Registry Number | 1446419-85-7 |

一次構造（N 結合型グリコシル化を除く）に基づき、ジスルフィド結合 16 ヵ所の形成を考慮するとエビナクマブの分子量は 146.08 kDa（$C_{6480}H_{9992}N_{1716}O_{2042}S_{46}$）である。各重鎖は Fc ドメインのヒンジ領域内でアミノ酸 234 位のセリンがプロリンに置換されており（S228P、Eu 番号、IgG4$^{P}$）、ヒト IgG1 ヒンジ配列（CPPC）が再構成されている。この置換により 2 重鎖間のジスルフィド結合が安定し、抗体が溶液中で半抗体になる傾向が抑えられる。

各重鎖における N 結合型グリコシル化部位の位置及びジスルフィド結合構造を含む、エビナクマブの概念図を Figure 1 に示す。

Figure 1: Schematic Representation of the Structure of Evinacumab




CH, constant region of the heavy chain; CL, constant region of the light chain; VH, variable region of the heavy chain; VL, variable region of the light chain

This representation of the structure of evinacumab depicts the location of each of the intra-chain and inter-chain disulfide bonds (orange). Heavy (magenta) and light (green) chains are connected by inter-chain disulfide bonds; heavy chain dimerization is achieved through two heavy chain intermolecular disulfide bonds located within the hinge region. The Fc domain glycosylation site is also indicated (light green). The hinge region substitution ($Ser^{234}$ to $Pro^{234}$) in each heavy chain is located between the two hinge region disulfide bonds and is annotated as #.

# 目次

略語一覧 ..... 4
1. まとめ ..... 5
2. ヒトの ANGPTL3 遺伝学的研究 ..... 10
3. 効力を裏付ける試験 ..... 11
3.1. エビナクマブの in vitro 薬理試験 ..... 11
3.1.1. エビナクマブと、ヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウス由来の ANGPTL3 の相互作用に関する平衡結合定数の測定（REGN1500-MX-12024） ..... 11
3.1.1.1. エビナクマブのヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 との結合 ..... 11
3.1.1.2. エビナクマブのヒト又はマウス ANGPTL4 又はヒト ANGPTL5 との結合（結合しない） ..... 11
3.1.2. エビナクマブとヒト、ウサギ及びラット由来の胎児性 Fc 受容体の相互作用に関する平衡解離定数の測定（R1500-PH-18158） ..... 13
3.1.2.1. エビナクマブのヒト、ウサギ及びラットの FcRn との結合 ..... 13
3.1.3. エビナクマブの in vitro 機能特性（REGN1500-MX-12023） ..... 13
3.1.3.1. エビナクマブによるヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 媒介性 LPL 阻害の遮断 ..... 14
3.1.4. ANGPTL3 媒介性の血管内皮リパーゼ活性阻害に対するエビナクマブの作用（REGN1500-MX-14032） ..... 19
3.1.4.1. エビナクマブによるヒト、ラット、サル及びマウスの ANGPTL3 が媒介するヒト血管内皮リパーゼ活性阻害の遮断 ..... 19
3.2. エビナクマブの in vivo 薬理試験 ..... 20
3.2.1. エビナクマブを正脂血症マウスモデルと高脂血症マウスモデルに単回投与したときの薬力学的作用（REGN1500-MX-12022） ..... 20
3.2.1.1. エビナクマブ単回投与による正脂血症マウスにおける血清中脂質レベルの用量依存的低下 ..... 21
3.2.1.2. エビナクマブ単回投与による *ApoE*$^{-/-}$マウスにおける血清中脂質レベルの低下 ..... 23
3.2.1.3. エビナクマブ単回投与による *Ldlr*$^{-/-}$マウスにおける血清中脂質の低下 ..... 24
3.2.1.4. エビナクマブ単回投与による *db*/*db* マウスにおける血清中脂質レベルの低下 ..... 26
3.2.1.5. 高脂肪・高コレステロール食を与えた野生型マウスにおけるエビナクマブ週 1 回投与による影響（REGN1500-MX-12022） ..... 29
3.2.2. エビナクマブが *Lipg*$^{-/-}$マウスの血清中脂質に及ぼす影響（REGN1500-MX-14032） ..... 31
3.2.2.1. エビナクマブの血管内皮リパーゼ依存性の機序による血清中 HDL-C の低下 ..... 31
3.2.3. エビナクマブの LDL-C 低下作用の評価（R1500-PH-19183） ..... 33
3.2.3.1. エビナクマブが *Ldlr*$^{-/-}$マウスの循環中脂質レベル及び脂質含有量に及ぼす影響 ..... 33
3.2.3.2. エビナクマブが LDLR 欠損マウス及び血管内皮リパーゼ LDLR 欠損マウスの循環中脂質に及ぼす影響 ..... 33
3.2.3.3. エビナクマブが VLDL と LDL のクリアランスに及ぼす影響 ..... 33

3.2.4. エビナクマブが APOE*3Leiden.CETP マウスのアテローム性動脈硬化に及ぼす影響の評価（R1500-PH-17081） ..... 34
3.2.4.1. エビナクマブの週 1 回投与による、APOE*3Leiden.CETP マウスにおける脂質レベル及びアテローム性動脈硬化病変の減少 ..... 35
3.2.5. スタチンと抗 PCSK9 mAb のアリロクマブを併用した強化コレステロール低下療法に抗 ANGPTL3 mAb を追加したとき、APOE*3Leiden.CETP トランスジェニックマウスの確立されたアテローム性動脈硬化に対する作用（R1500-PH-19099） ..... 35
3.2.5.1. 確立されたアテローム性動脈硬化を有する APOE*3Leiden.CETP マウスにアトルバスタチン、又はアリロクマブとアトルバスタチンに追加してエビナクマブを週 1 回投与したときの血漿中脂質の低下 ..... 35
3.2.5.2. 確立されたアテローム性動脈硬化を有する APOE*3Leiden.CETP マウスにアトルバスタチン、又はアリロクマブとアトルバスタチンに追加してエビナクマブを週 1 回投与したときのアテローム性動脈硬化の進行防止又は退縮促進 ..... 36
4. 副次的薬理試験 ..... 36
4.1. エビナクマブの Fc エフェクター機能の評価（REGN1500-MX-12025） ..... 36
4.1.1. エビナクマブの HepG2 標的細胞又は Hep3B 標的細胞に対する ADCC 活性及び CDC 活性（活性なし） ..... 36
4.1.2. エビナクマブをヒト ANGPTL3 と共にインキュベートしたときの C1q に結合能のある免疫複合体の形成（検出なし） ..... 37
5. 安全性薬理試験 ..... 37
5.1. In vivo 安全性薬理試験 ..... 37
6. 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 37
7. 考察及び結論 ..... 38
8. 参考文献 ..... 40

## 表一覧

Table 1: Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of Evinacumab with Recombinant ANGPTL3 Proteins at 25°C ..... 12
Table 2: Summary of $EC_{50}$ and $IC_{50}$ Values of Evinacumab Blockade of ANGPTL3-Mediated LPL Inhibition ..... 15
Table 3: Summary of $EC_{50}$ and $IC_{50}$ Values for ANGPTL3-Mediated Inhibition of Human Endothelial Lipase and Evinacumab Blockade of ANGPTL3 ..... 19

## 図一覧

Figure 1: Evinacumab Blocks Inhibition of LPL Activity Mediated by Human, Monkey, Rat, and Mouse ANGPTL3 ..... 16
Figure 2: Evinacumab Blocks Inhibition of LPL Activity Mediated by Rabbit and Human ANGPTL3 ..... 18
Figure 3: Evinacumab Blocks Inhibition of Human Endothelial Lipase Activity Mediated by Human, Rat, Monkey, and Mouse ANGPTL3 ..... 20
Figure 4: Single-Dose Evinacumab Results in a Dose-Dependent Reduction in Serum Lipid Levels in Normolipidemic Mice ..... 22

Figure 5: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum Lipid Levels in *ApoE*$^{-/-}$ Mice ..... 23
Figure 6: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum Lipid Levels in *Ldlr*$^{-/-}$ Mice ..... 25
Figure 7: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum TG and LDL-C Levels in *db*/*db* Mice ..... 27
Figure 8: Single-Dose Evinacumab Reduces Non-HDL-C, but Not Total Cholesterol or HDL-C in *db*/*db* Mice ..... 28
Figure 9: Single-Dose Evinacumab Increases Lipoprotein Lipase but Not Hepatic Lipase Activity in *db*/*db* Mice ..... 29
Figure 10: Weekly Administration of Evinacumab Results in Sustained Reductions in Serum Lipid Levels in Wild-Type Mice Maintained on a High-Fat, High-Cholesterol Diet ..... 30
Figure 11: Evinacumab Reduces HDL-C in Wild-Type but Not *Lipg*$^{-/-}$ Mice ..... 32
Figure 12: Evinacumab-Mediated ANGPTL3 Inhibition Promotes VLDL Clearance ..... 34

## 略語一覧

略語一覧は Module 2.6.1 の略語一覧を参照する。

# 1. まとめ

アンジオポエチン様タンパク質 3（ANGPTL3）は、脂質、グルコース、エネルギー代謝に重要な役割を果たす、構造が類似した 8 つの分泌タンパク質（ANGPTL1～ANGPTL8）ファミリーの一員である（Mattijssen, 2012; Santulli, 2014）。ANGPTL ファミリーでは、ANGPTL8 を除くメンバーは分子構造が共通しており、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、リポタンパクリパーゼ（LPL）と血管内皮リパーゼ（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トリグリセリド（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あって、血漿中の高密度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 高値及び低密度リポタンパクコレステロール（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 と血漿中の脂質レベル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 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。重要なことであるが、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）。

重要な点として、複数の集団を対象として *ANGPTL3* 変異の作用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血漿中 TG、LDL-C、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た（Dewey, 2017; Stitziel, 2017）。他の血漿中 LDL を修飾する変異体との比較解析では、*ANGPTL3* LOF 変異体による冠動脈疾患リスクの低下の程度は、これらの変異体が血漿中 LDL-C に及ぼす影響から予想されるリスク低下をはるかに上回っていることが示され、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）。

したがって、遮断抗体による ANGPTL3 阻害は高脂血症の有望な治療法である。遮断抗体による ANGPTL3 阻害は、高トリグリセリド血症患者（重度の高トリグリセリド血症及びこれに伴う急性

膵炎を有する患者も含まれる）で TG 値を下げる可能性がある。さらに、モノクローナル抗体（mAb）による ANGPTL3 の阻害は、ホモ接合体家族性高コレステロール血症（HoFH）患者を含む LDL-C 高値の患者で LDL-C 値を下げ、心血管疾患リスクを抑える可能性がある。

エビナクマブ（開発コード：REGN1500）は ANGPTL3 に特異的に結合し、ANGPTL3 による LPL 活性及び EL 活性の阻害を遮断する組換えヒト IgG4P 抗体である。エビナクマブは Regeneron 社の VelocImmune® ヒト抗体マウスプラットフォームを使用して単離され（Macdonald, 2014; Murphy, 2014）、ヒトκ定常領域に融合したヒト軽鎖可変領域、及びヒンジが安定化したヒト IgG4 定常領域に融合したヒト重鎖可変領域を含む（R1500-PH-18158 Section 2）。

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、冠動脈疾患リスクが低い（Section 2）。本文書に詳述するように、エビナクマブによって ANGPTL3 が阻害されると LDL-C、TG、HDL-C が低下し、ANGPTL3 LOF を有するヒトで観察される脂質表現型が再現される。

複数のマウスモデルを用いた一連の非臨床試験で、エビナクマブの ANGPTL3 に対する結合能力、ANGPTL3 による LPL 活性と EL 活性の阻害を遮断する能力、及び循環中の脂質レベルを調節する能力を評価した。

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、カニクイザル、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（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［平衡解離定数（KD）0.3～1.3 nM］が、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（pH 6.0）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評価したところ（Section 3.1.2）、ヒト FcRn 及びウサギ FcRn に対する親和性は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。

エビナクマブによる ANGPTL3 の遮断は、LPL と EL の活性を増加させると予想される。そのため一連の in vitro アッセイを行って、ANGPTL3 が媒介する LPL 活性（Section 3.1.3）及び EL 活性（Section 3.1.4）の阻害を遮断するエビナクマブの能力をリパーゼ依存蛍光アッセイで評価した。その結果、ヒト、カニクイザル、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、ラット及びマウス由来の ANGPTL3 とエビナクマブの相互作用では、EL 活性阻害も遮断されることを示すデータが得られた。

さらに 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（Section 4.1）。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（Section 4.1.1）、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かった（Section 4.1.2）。

一連の in vivo マウス試験を実施し、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レベルを低下させる能力を評価した［高脂血症モデルとしてアポリポタンパク E （ApoE-/）-マウスと Ldlr-/-マウスの 2 モデル、糖尿病性脂質異常症の db/db マウス 1 モデル］（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、コレステロールと TG の大半はカイロミクロン及び超低密度リポタンパクコレステロール（VLDL-C）粒子中で循環する（Imaizumi, 2011）。Ldlr-/-マウスは低密度リポタンパク受容体（LDLR）に LOF 変異があるヒトの疾患、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、血漿中 TG 高値とリポタンパク高値を示す（Kobayashi, 2000; Nishina, 1994）。

さらに、高脂質、高コレステロール食を与えた野生型（WT）マウスで、エビナクマブが血清中脂質レベル及びいくつかの安全性パラメータに及ぼす影響を評価した（Section 3.2.2）。エビナクマブが血清中脂質レベルに及ぼす影響は *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、エビナクマブによる LDL-C 低下の機序を評価した（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. コレステロールエステル転送蛋白（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（Section 3.2.4）。アトルバスタチン（混餌投与）及びアリロクマブ（PCSK9 阻害薬）にエビナクマブを追加したとき、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（Section 3.2.5）。

エビナクマブが血清中脂質レベル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 を単回皮下（SC）投与した。エビナクマブは正脂血症マウスにおいて血清中 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 及び非高密度リポタンパクコレステロール（non-HDL-C）値も低下した（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（Section 3.2.1.2, Section 3.2.1.3）及び糖尿病性脂質異常症のマウスモデル（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レベル及び一部の安全性パラメータに及ぼす影響を評価するために、高脂質かつ高コレステロール食を与えた WT 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。その結果、循環中の TG、総コレステロール、LDL-C 及び HDL-C 値は有意に低下したが、試験期間を通じて、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（Section 3.2.1.5.1）。

エビナクマブが EL を介して血清中脂質レベル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。その結果、*Lipg*$^{-/-}$マウスでも WT 同腹仔マウスでも血清中 TG 値は有意に低下した（Section 3.2.2.1）。HDL-C 値は WT 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作用は EL を介することが示された。

エビナクマブによる、LDLR とは独立した 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（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、血清中脂質レベルを LDLR から独立して低下させる能力が示された（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レベルを低下させる能力を評価した（Section 3.2.3.2）。3 番目の試験では、*ApoE*$^{-/-}$マウスにエビナクマブ（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（Section 3.2.3.3）。これらの試験から得た結果は、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（Section 3.2.4）。APOE*3Leiden.CETP マウスに対する週 1 回の 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、病変の数やプラークの安定性に影響を及ぼさず、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）に追加する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 SC 投与した（Section 3.2.5）。2 剤併用（エビナクマブとアトルバスタチン）でも 3 剤併用（エビナクマブ、アリロクマブ、アトルバスタチン）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。

エビナクマブの安全性薬理試験の評価項目は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して、カニクイザルと Sprague-Dawley ラットを用いて実施した反復投与毒性試験に組み込まれている。最高 100 mg/kg/週を 5 週間又は 26 週間（それぞれラットとサル）連続して SC 投与又は静脈内（IV）投与したところ、心血管（心拍数、血圧及び心電図）、呼吸器（1 分あたりの呼吸数及びパルスオキシメトリー）、又は中枢神経系（CNS）に被験物質に関連した変化はみられなかった（Section 5）。

## 2. ヒトの ANGPTL3 遺伝学的研究

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、遺伝子関連研究を行った。Regeneron Genetics Center（RGC）で開発されたハイスループット自動化法を用いて、エクソームをキャプチャする高品質のゲノミック DNA を調製した。UKB 試験では、*ANGPTL3* LOF 変異体のキャリアは非キャリアと比べ、LDL-C、TG、HDL-C 値が低かった（Module 5.3.5.4 ANGPTL3 Genetics Study Table 2）。LDL-C 値と TG 値が低いことと一致して、*ANGPTL3* LOF 変異体のキャリアは、循環中の TG を豊富に含む VLDL 粒子とコレステロールを豊富に含む LDL 粒子中で高度に発現するアポリポタンパクであるアポリポタンパク B 値が有意に低かった。ポピュレーションベースの UKB コホートから得た結果は、ANGPTL3 の変異による家族性複合型低脂血症の家系を対象とした以前の試験（Musunuru, 2010; Tikkanen, 2019）、及び RGC が行った病院ベースの試験（GHS データの以前の発表）とも一致していた（Dewey, 2017）。

UKB において、*ANGPTL3* LOF 変異体の単一ホモ接合キャリアは、LDL-C、TG、アポリポタンパク B 値が非常に低かった。この結果は、家族性複合型低脂血症の家系を対象とした試験（Musunuru, 2010; Tikkanen, 2019）と一致し、*ANGPTL3* LOF 非キャリアと比べ、ヘテロ接合型 ANGPTL3 LOF キャリアでは脂質レベルが相加的に低く、ホモ接合型 ANGPTL3 LOF キャリアでは相加的を超えて低いことを示した。

冠動脈疾患を有する 26,846 例と対照の 233,127 例において、*ANGPTL3* LOF 遺伝子変異のキャリアでは冠動脈疾患のオッズが 34%低かった（Module 5.3.5.4 ANGPTL3 Genetics Study Table 3）。*ANGPTL3* LOF 変異体と冠動脈疾患のリスク低下の関連は、これまでに実施された複数の試験でみられた結果とも一致している。RGC が主導した最初の試験では、ヘテロ接合型 *ANGPTL3* LOF 変異体キャリアでは非キャリアと比べ冠動脈疾患のオッズが 41%低かった（Dewey, 2017）。アカデミックコンソーシアムが主導した独立試験でも（Stitziel, 2017）、2 試験のメタアナリシス（58,399 例と対照 305,796 例を含む）（Lotta, 2018）でも同様な結果が記述されている。このメタアナリシスでは、ヘテロ接合型 *ANGPTL3* LOF 変異体のキャリアは非キャリアと比べ冠動脈疾患のオッズが 34%低かった［OR、0.66；95%信頼区間（CI）、0.52-0.83；p = 0.00046］。

# 3. 効力を裏付ける試験

## 3.1. エビナクマブの in vitro 薬理試験

### 3.1.1. エビナクマブと、ヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウス由来の ANGPTL3 の相互作用に関する平衡結合定数の測定（REGN1500-MX-12024）

ヒト ANGPTL3 N 末端ドメイン（アミノ酸 17～220）のアミノ酸配列と、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 で対応する領域のアミノ酸配列との同一性はそれぞれ 98%、90%、83%及び 81%である（REGN1500-MX-12024 Appendix A）。

SPR-Biacore 技術を使用して、His10、His6、mmH 及び mFc タグをつけて作成したヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウス由来の ANGPTL3 タンパク質に対するエビナクマブの結合特性を測定した。25°C、pH 7.4 の条件下で種々の濃度のエビナクマブを表面認識した ANGPTL3 タンパク質（ヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウス）に注入し、その後、解離フェーズとした。動的結合パラメータは、マストランスポートリミテーションを含む 1:1 結合モデルで決定した。

#### 3.1.1.1. エビナクマブのヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 との結合

エビナクマブは単量体完全長及び N 末端ドメインのヒト ANGPTL3 に結合し、$K_D$ 値は 442 pM～1.28 nM であった。二量体 N 末端ドメインのヒト及びウサギ ANGPTL3 に結合し、$K_D$ 値はそれぞれ 486 pM、365 pM であった。単量体 N 末端ドメインカニクイザル、ラット及びマウス ANGPTL3 に結合し、$K_D$ 値は 261～435 pM であった。完全長単量体マウス ANGPTL3 に結合し、$K_D$ 値は 344 pM であった。この結果を Table 1 に要約する。

#### 3.1.1.2. エビナクマブのヒト又はマウス ANGPTL4 又はヒト ANGPTL5 との結合（結合しない）

エビナクマブとヒト ANGPTL4 又は ANGPTL5［hANGPTL4(G26-S406)-His6 及び GST-hANGPTL5 (M1-K388)］の結合、又はエビナクマブとマウス ANGPTL4［mANGPTL4 (R26-S411)-His6］との結合は検出されなかった（REGN1500-MX-12024 Figure 1）。

Table 1: Summary of Kinetic Binding Parameters for the Interaction of Evinacumab with Recombinant ANGPTL3 Proteins at 25°C

| Protein | Kinetic Binding Parameters | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $k_a$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $k_d$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (M) | $T_{1/2}$ (min) |
| hANGPTL3 (S17-K170)-His6 | $1.09 \times 10^{6}$ | $1.39 \times 10^{-3}$ | $1.28 \times 10^{-9}$ | 8.3 |
| hANGPTL3 (S17-P220)-His6 | $2.06 \times 10^{6}$ | $9.10 \times 10^{-4}$ | $4.42 \times 10^{-10}$ | 12.7 |
| hANGPTL3 (S17-E460)-His10 | $1.01 \times 10^{6}$ | $9.22 \times 10^{-4}$ | $9.15 \times 10^{-10}$ | 12.5 |
| MfANGPTL3 (S17-K170)-mmH | $2.30 \times 10^{6}$ | $5.99 \times 10^{-4}$ | $2.61 \times 10^{-10}$ | 19.3 |
| rANGPTL3 (S17-D240)-mmH | $2.00 \times 10^{6}$ | $7.71 \times 10^{-4}$ | $3.85 \times 10^{-10}$ | 15.0 |
| mANGPTL3 (S17-D240)-His6 | $1.98 \times 10^{6}$ | $8.64 \times 10^{-4}$ | $4.35 \times 10^{-10}$ | 13.4 |
| mANGPTL3 (S17-T455)-His6 | $1.83 \times 10^{6}$ | $6.29 \times 10^{-4}$ | $3.44 \times 10^{-10}$ | 18.4 |
| hANGPTL3 (S17-K170)-mFc | $8.90 \times 10^{5}$ | $4.33 \times 10^{-4}$ | $4.86 \times 10^{-10}$ | 26.7 |
| rbANGPTL3 (S17-Q170)-mFc | $9.99 \times 10^{5}$ | $3.65 \times 10^{-4}$ | $3.65 \times 10^{-10}$ | 31.7 |

ANGPTL3 proteins were immobilized onto the sensor surface by anti-penta-histidine capture or anti-mFc capture (hANGPTL3-mFc and rbANGPTL3-mFc only). Evinacumab was injected over the ANGPTL3-captured surfaces at concentrations ranging from 0.39 to 25nM and the real-time antibody binding signals were monitored.

### 3.1.2. エビナクマブとヒト、ウサギ及びラット由来の胎児性 Fc 受容体の相互作用に関する平衡解離定数の測定（R1500-PH-18158）

FcRn は、ヒトでもヒト以外の動物種でも IgG のホメオスタシス調節に重要な役割を果たしている（Datta-Mannan, 2012; Levin, 2015）。FcRn は IgG の Fc ドメインの CH2-CH3 領域と pH 依存的に相互作用し、酸性 pH の時には結合親和性が強く、中性 pH のときには結合親和性が弱い又は結合しない。この IgG と FcRn の pH 感受性結合により、酸性 pH（エンドソーム環境）では内部移行した IgG の細胞内分解が防止され、中性 pH（細胞外環境）では IgG が放出される。In vivo では、循環中の IgG は FcRn を介したリサイクリングで半減期が長くなる。組換え FcRn の種々の IgG アイソタイプに対する結合親和性は、マイクロモル以下範囲であることが報告されている（Levin, 2015）。

本試験では、SPR-Biacore 技術を使用して、エビナクマブのヒト FcRN、及び生殖発生毒性試験に用いた動物種であるウサギ由来とラット由来の FcRn に対する結合親和性を測定した。自然の FcRn は、αサブユニットとβ-2 ミクログロブリンのヘテロダイマーとして存在する（Preator, 2002）。そのため組換えヒト、ウサギ及びラット FcRn はそれぞれ、N 末端でβ-2 ミクログロブリン（β2m）サブユニットとの融合タンパク質として作成した。β2m サブユニットを 12～14 mer のペプチドリンカーを介して同じ動物種由来の FcRn αサブユニットの外部ドメインに融合させ、その後 C 末端に mmH-タグをつけた（β2m.FcRn.mmH）。25°C、pH 6.0 の条件下で、種々の濃度の可溶性エビナクマブと IgG4$^{P}$ アイソタイプ対照を表面認識した FcRn タンパク質に注入し、その後、解離フェーズとした。

#### 3.1.2.1. エビナクマブのヒト、ウサギ及びラットの FcRn との結合

ヒト、ウサギ及びラットの FcRn に対するエビナクマブの $K_D$ 値はそれぞれ 2.6 µM、1.9 µM 及び 670 nM であり、IgG4$^{P}$ アイソタイプ対照の $K_D$ 値はそれぞれ 4.6 µM、5.0 µM、1.6 µM であった（R1500-PH-18158 Table 2）。エビナクマブと IgG4$^{P}$ アイソタイプ対照 mAb は、ヒト FcRn と比べラット FcRn に対する親和性のほうが強かった。この結果は、ヒト IgG4 がヒト FcRn より高い親和性でラット FcRn に結合するという公表報告と一致する（Abdiche, 2015; Neuber, 2014）。

### 3.1.3. エビナクマブの in vitro 機能特性（REGN1500-MX-12023）

セルフリーin vitro 生化学アッセイで、エビナクマブがヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 媒介性 LPL 阻害を遮断する能力を測定した。このアッセイでは、蛍光発生 LPL 基質の切断を評価する。

#### 3.1.3.1. エビナクマブによるヒト、カニクイザル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 媒介性 LPL 阻害の遮断

完全長ヒト及びマウス ANGPTL3、並びに N 末端ドメインヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウス ANGPTL3 タンパク質（リパーゼ阻害領域を含む）は、LPL 活性を効果的に遮断した。エビナクマブはヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 タンパク質による LPL に対する ANGPTL3 媒介性阻害を効果的に遮断した。$EC_{50}$ 及び $IC_{50}$ を Table 2 に要約し、Figure 1 と Figure 2 にグラフとして提示する。さらに、完全長ヒト又はマウス ANGPTL4（LPL も阻害する構造的に関連するタンパク質）が媒介する LPL 阻害を遮断する能力を評価したところ、機能的交差反応性は観察されなかった（REGN1500-MX-12023 Figure 3）。

Table 2: Summary of $EC_{50}$ and $IC_{50}$ Values of Evinacumab Blockade of ANGPTL3-Mediated LPL Inhibition

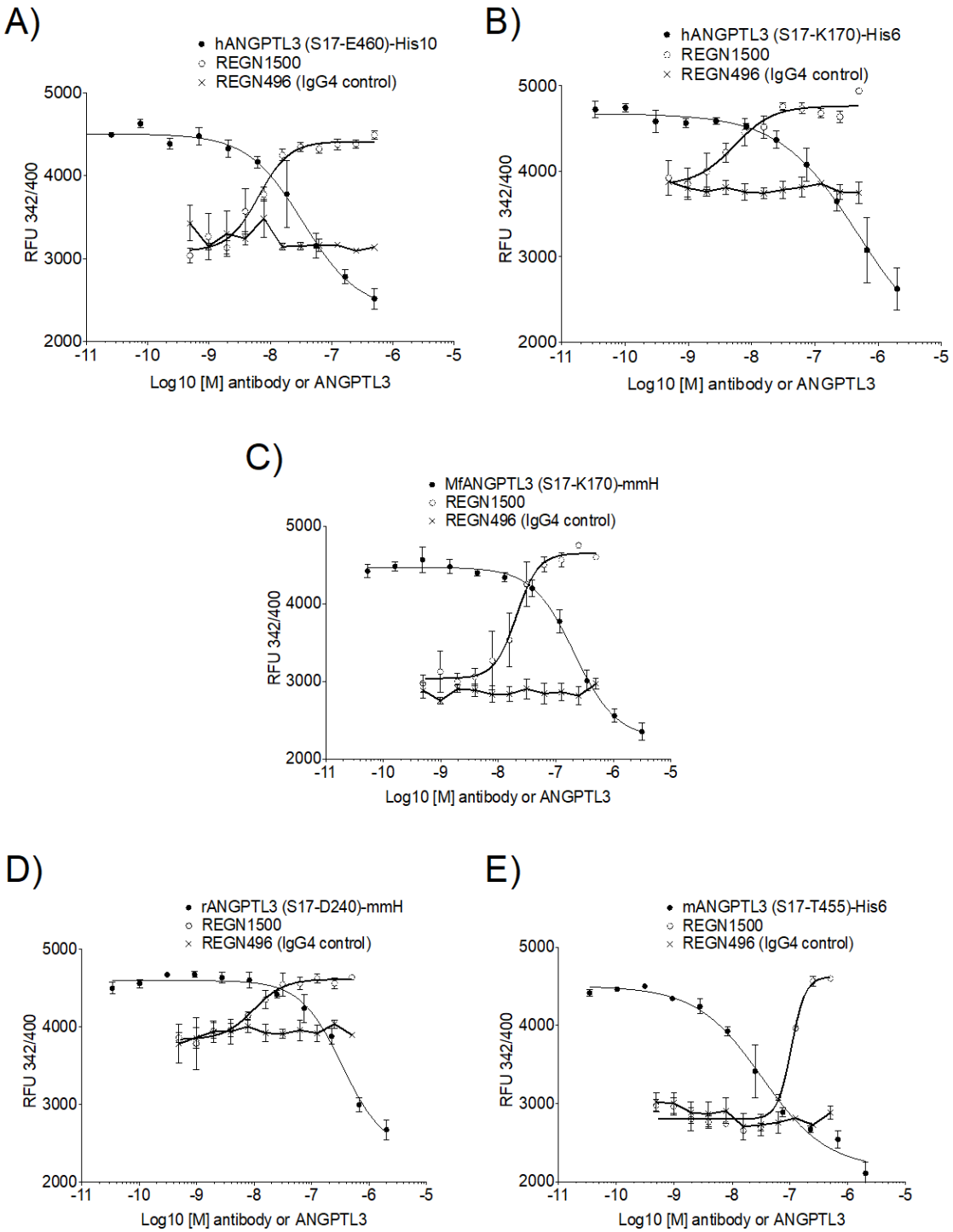
| | | **Protein** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Parameter** | | hANGPTL3 (S17-E460)-His10 | hANGPTL3 (S17-K170)-His6 | MfANGPTL3 (S17-K170)-mmH | rANGPTL3 (S17-D240)-mmH | mANGPTL3 (S17-T455)-His6 | hANGPTL3 (S17-K170)-mFc | rbANGPTL3 (17-170)-mFc |
| $EC_{50}$ (nM)[a] | | 34.2 | 484.8 | 208.1 | 344.0 | 32.3 | 77.6 | 17.9 |
| Constant ANGPTL protein concentration (nM)[a] | | 80 | 200 | 784 | 304 | 500 | 200 | 200 |
| $IC_{50}$ (nM) | evinacumab | 6.4 | 5.4 | 20.7 | 9.8 | 105.5 | 67.6 | 19.3 |

[a] ANGPTL protein concentration calculations assume monomeric molecular weights (except for mouse Fc reagents), which is an overestimate given the known homo-oligomerization that occurs for ANGPTL proteins in solution, mediated through the coiled-coil domain in the N-terminal region.

hANGPTL3=human ANGPTL3; MfANGPTL3=Monkey, *Macaca fascicularis* ANGPTL3; rANGPTL3=rat ANGPTL3; mANGPTL3=mouse ANGPTL3; His10=decahistidine tag; His6=hexahistidine tag; mmH=myc-myc-hexahistidine tag

Isotype control did not result in detectable blocking under the assay conditions used.

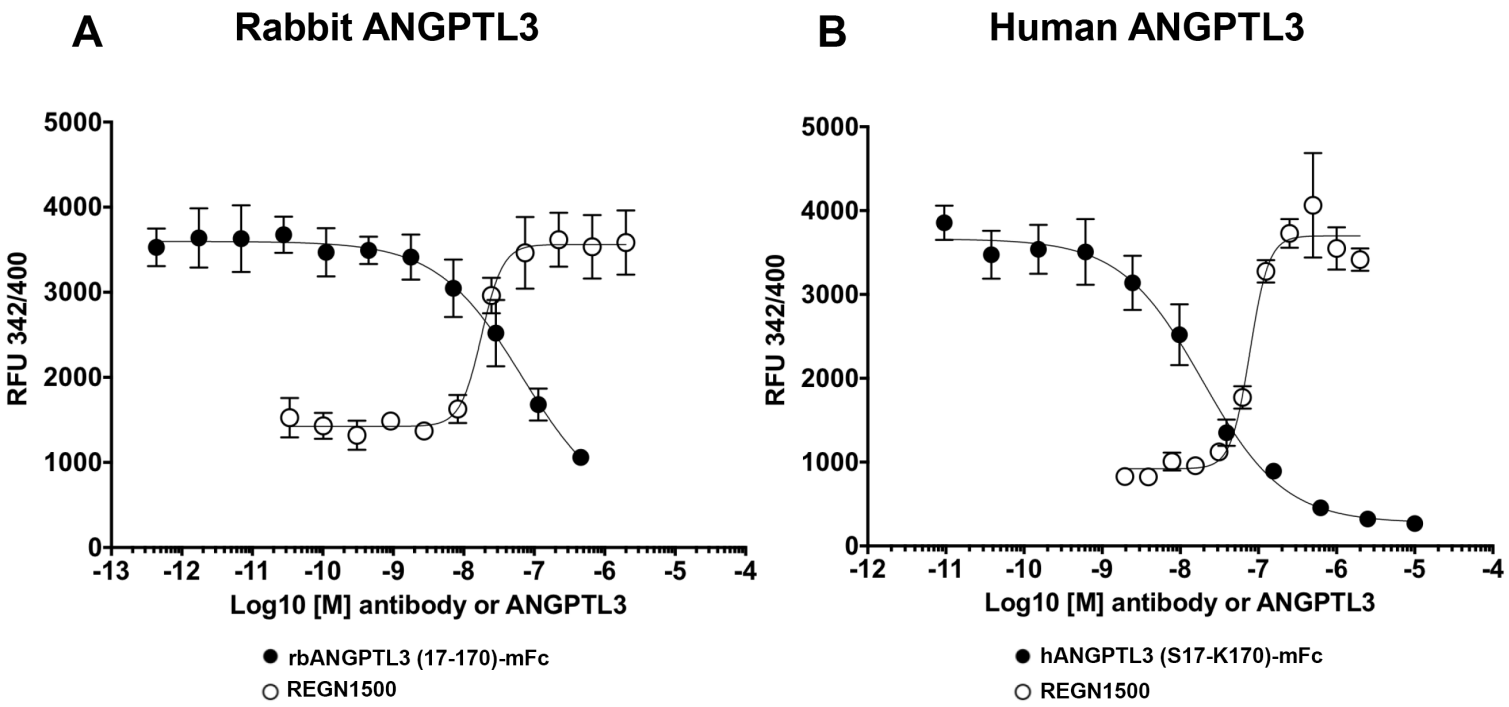
Figure 1: Evinacumab Blocks Inhibition of LPL Activity Mediated by Human, Monkey, Rat, and Mouse ANGPTL3




Inhibition of LPL activity by ANGPTL3 and blockade of ANGPTL3 activity by evinacumab was assessed using a fluorogenic substrate for lipase (CONFLUOLIP™ Continuous Fluorometric Lipase Test). Inhibition of lipase activity

was tested with a constant concentration of bovine LPL (20nM) mixed with human ApoCII (0.23μM), a cofactor for LPL, with serially diluted 3-fold dilutions of ANGPTL3 proteins (A) and (B) for human, (C) for monkey, (D) for rat, and (E) for mouse ANGPTL3. To determine the ability of evinacumab to inhibit ANGPTL3 activity, serial dilutions of evinacumab were tested with constant concentrations of ANGPTL3 proteins: (A) 80nM, (B) 200nM, (C) 784nM, (D) 304nM, (E) 500nM. Fluorescence was then measured at 342 nm/400 nm. All data were analyzed by a 4-parameter logistic equation from a sigmoidal dose response curve using GraphPad Prism software.

Figure 2: Evinacumab Blocks Inhibition of LPL Activity Mediated by Rabbit and Human ANGPTL3




Inhibition of LPL activity by ANGPTL3 and blockade of ANGPTL3 by evinacumab was assessed using a fluorogenic substrate for lipase (CONFLUOLIP Continuous Fluorometric Lipase Test). Inhibition of lipase activity was tested with a constant concentration of bovine LPL (24 U/mL) added to 4-fold serial dilutions of ANGPTL3 proteins: (A) rabbit ANGPTL3 (rbANGPTL3) and (B) human ANGPTL3 (hANGPTL3). To determine the ability of evinacumab to inhibit hANGPTL3 activity, 2- or 3-fold serial dilutions of evinacumab were added to LPL, followed by addition of a constant concentration of either rabbit or human ANGPTL3 protein (200nM). Fluorescence was then measured at 342 nm/400 nm (excitation/emission) using a FlexStation 3 Microplate Reader. All data were analyzed by a 4-parameter logistic equation from a sigmoidal dose-response curve using GraphPad Prism software.

### 3.1.4. ANGPTL3 媒介性の血管内皮リパーゼ活性阻害に対するエビナクマブの作用（REGN1500-MX-14032）

セルフリーin vitro リパーゼ依存蛍光アッセイで、エビナクマブが組換えヒト、サル、ラット及びマウス ANGPTL3 タンパク質が媒介する EL 活性阻害を遮断する能力を評価した。

#### 3.1.4.1. エビナクマブによるヒト、ラット、サル及びマウスの ANGPTL3 が媒介するヒト血管内皮リパーゼ活性阻害の遮断

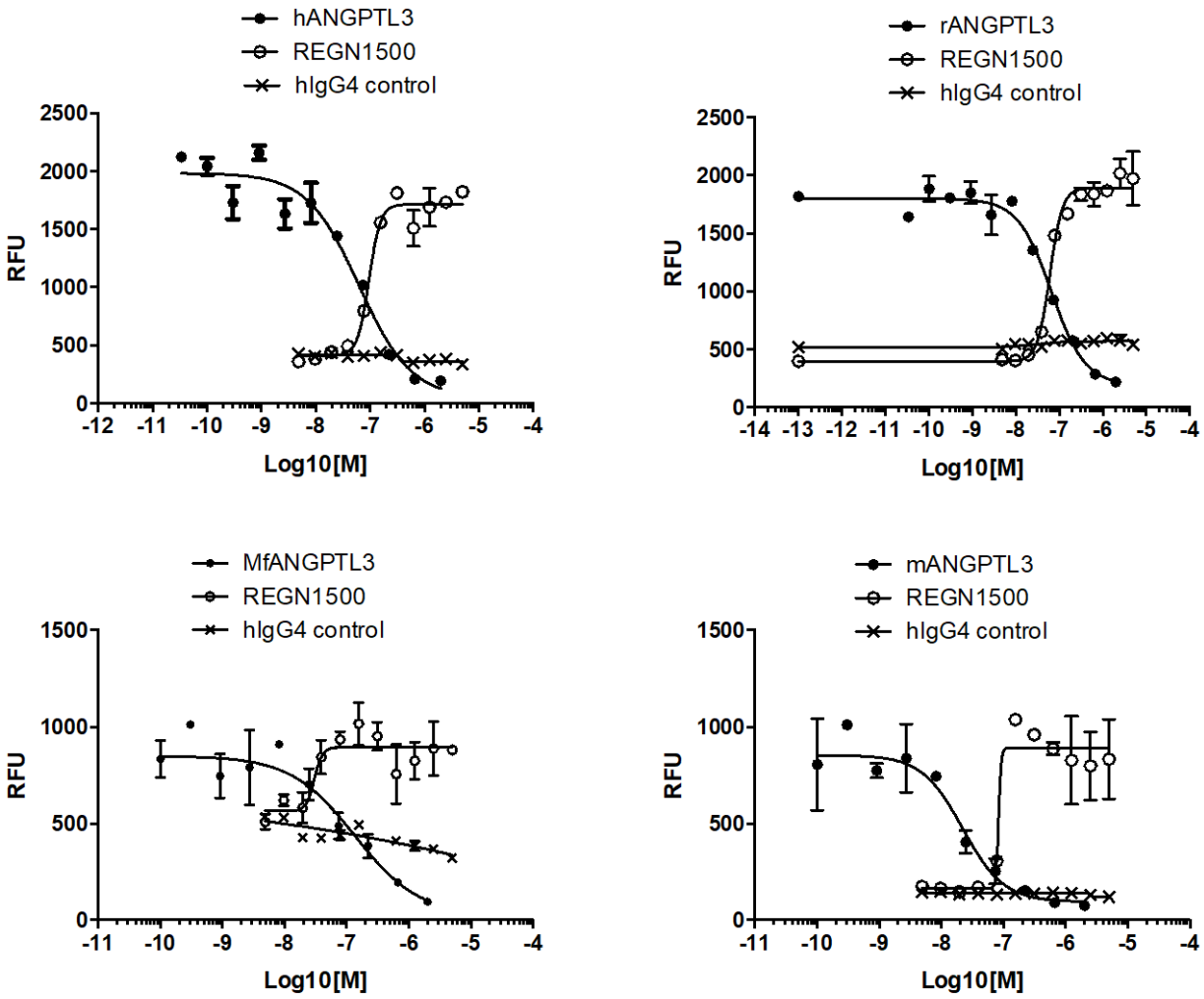
Table 3 に要約し Figure 3 に示すように、エビナクマブは試験に用いた 4 動物種すべてで、ANGPTL3 による LIPG 活性低下を遮断した。

Table 3: Summary of $EC_{50}$ and $IC_{50}$ Values for ANGPTL3-Mediated Inhibition of Human Endothelial Lipase and Evinacumab Blockade of ANGPTL3

| Parameter | Protein | | | |
|---|---|---|---|---|
| | hANGPTL3 (S17-E460)-His10 | rANGPTL3 (S17-D240)-mmH | MfANGPTL3 (S17-K170)-mmH | mANGTPL3 (S17-T455)-His6 |
| $EC_{50}$ (nM) ANGPTL3 on 200 nM LIPG | 62.99 | 66.37 | 135.2 | 22.06 |
| $IC_{50}$ (nM) evinacumab on 200 nM ANGPTL3 | 95.76 | 61.06 | 30.15 | 83.55 |

Abbreviations: hANGPTL3: human ANGPTL3; rANGPTL3: rat ANGPTL3, MfANGPTL3: Monkey, *Macaca fascicularis* ANGPTL3; mANGPTL3: mouse ANGPTL3. LIPG: endothelial lipase

Figure 3: Evinacumab Blocks Inhibition of Human Endothelial Lipase Activity Mediated by Human, Rat, Monkey, and Mouse ANGPTL3




Inhibition of EL activity by ANGPTL3 and blockade of ANGPTL3 by evinacumab was assessed using a fluorescence assay. EnzChek® phospholipase A1 fluorescent substrate and purified human EL (200nM) were added to serial dilutions of 200nM ANGPTL3 from human (hANGPTL3), monkey (MfANGPTL3), rat (rANGPTL3), and mouse (mANGPTL3). For the antibody inhibition assay, ANGPTL3 (200nM) was pre-incubated with serial dilutions of evinacumab or hIgG4 control antibody, after which human EL was added at a concentration of 200nM followed by fluorescent substrate. Fluorescence was measured in a Spectra Max M5 plate reader using excitation/emission/cut-off settings of 460/515/495 nm.

## 3.2. エビナクマブの in vivo 薬理試験

### 3.2.1. エビナクマブを正脂血症マウスモデルと高脂血症マウスモデルに単回投与したときの薬力学的作用（REGN1500-MX-12022）

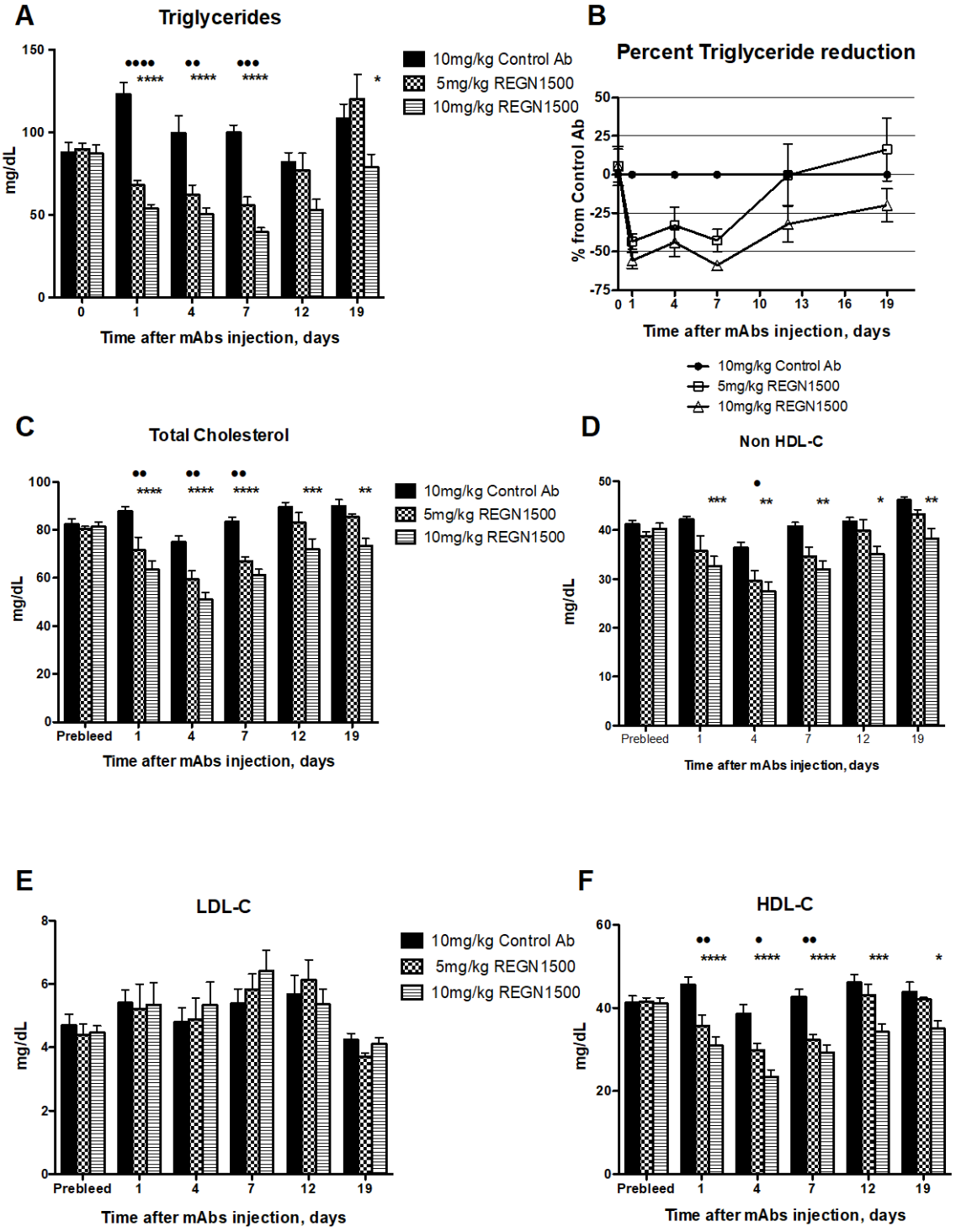
正脂血症 C57Bl/6 マウス、高脂血症の *ApoE*$^{-/-}$マウス及び *Ldlr*$^{-/-}$マウス、及び糖尿病性脂質異常症の *db/db* マウスに単回投与して、エビナクマブが血清中脂質レベルを低下させる能力を測定した。ま

た、高脂肪・高コレステロール食を与えた C57Bl/6 マウスを用いて、週 1 回のエビナクマブ投与が血清中脂質レベルを低下させる能力を評価した。血清中脂質レベルは血液化学分析装置で定量し、リポタンパクは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分離した。

#### 3.2.1.1. エビナクマブ単回投与による正脂血症マウスにおける血清中脂質レベルの用量依存的低下

正脂血症マウスにエビナクマブ又はアイソタイプ対照抗体 5 mg/kg 又は 10 mg/kg を SC 注射で単回投与した。Day 1、4、7、12 及び 19 の 4 時間絶食後にマウスから血清サンプルを採取し、血清中脂質濃度を評価した。エビナクマブはアイソタイプ対照と比べ、循環中の TG 値を用量依存的に低下させ、これに伴い、循環中の総コレステロール、HDL-C 及び non-HDL-C 値も低下した（Figure 4）。最小有効量のエビナクマブ（5 mg/kg）は、投与後最長 1 週間にわたり TG 値を 43%低下させた（REGN1500-MX-12022 Figure 3）。

Figure 4: Single-Dose Evinacumab Results in a Dose-Dependent Reduction in Serum Lipid Levels in Normolipidemic Mice




Serum samples (pre-bleed) were collected after a 4-hour fast from male C57Bl/6 mice 7 days before a single SC administration of evinacumab or REGN496 (Control Ab) at the doses indicated. Subsequent serum samples were

then collected (following a 4-hour fast) at the days indicated on the x-axis and analyzed for triglycerides, total cholesterol, LDL-C, HDL-C, and non-HDL-C. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. Evinacumab 10 mg/kg versus Control Ab: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. Evinacumab 5 mg/kg versus Control Ab: ●p<0.05; ●●p<0.01; ●●●p<0.001; ●●●●p<0.0001.

### 3.2.1.2. エビナクマブ単回投与による *ApoE*$^{-/-}$マウスにおける血清中脂質レベルの低下

*ApoE*$^{-/-}$ マウスにエビナクマブ又はアイソタイプ対照抗体 10 mg/kg を SC 注射で単回投与した。Day 1、4、7 及び 11 の 4 時間絶食後にマウスから血清サンプルを採取し、血清中脂質濃度を評価した。エビナクマブはアイソタイプ対照と比べ、高脂血症 *ApoE*$^{-/-}$マウスの循環中 TG、総コレステロール、HDL-C 及び non-HDL-C 値を有意に低下させ、この効果は投与後少なくとも 1 週間持続した（Figure 5）。また、このマウスモデルにおいて LDL-C も低下させたが、群内でベースラインの LDL-C 値の変動が大きかったため、この効果は統計的有意性に達しなかった（Figure 5C, D）。HPLC で分離したところ、エビナクマブは LDL-C、VLDL-C 及び VLDL-TG を低下させた（REGN1500-MX-12022 Figure 6）。

Figure 5: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum Lipid Levels in *ApoE*$^{-/-}$ Mice

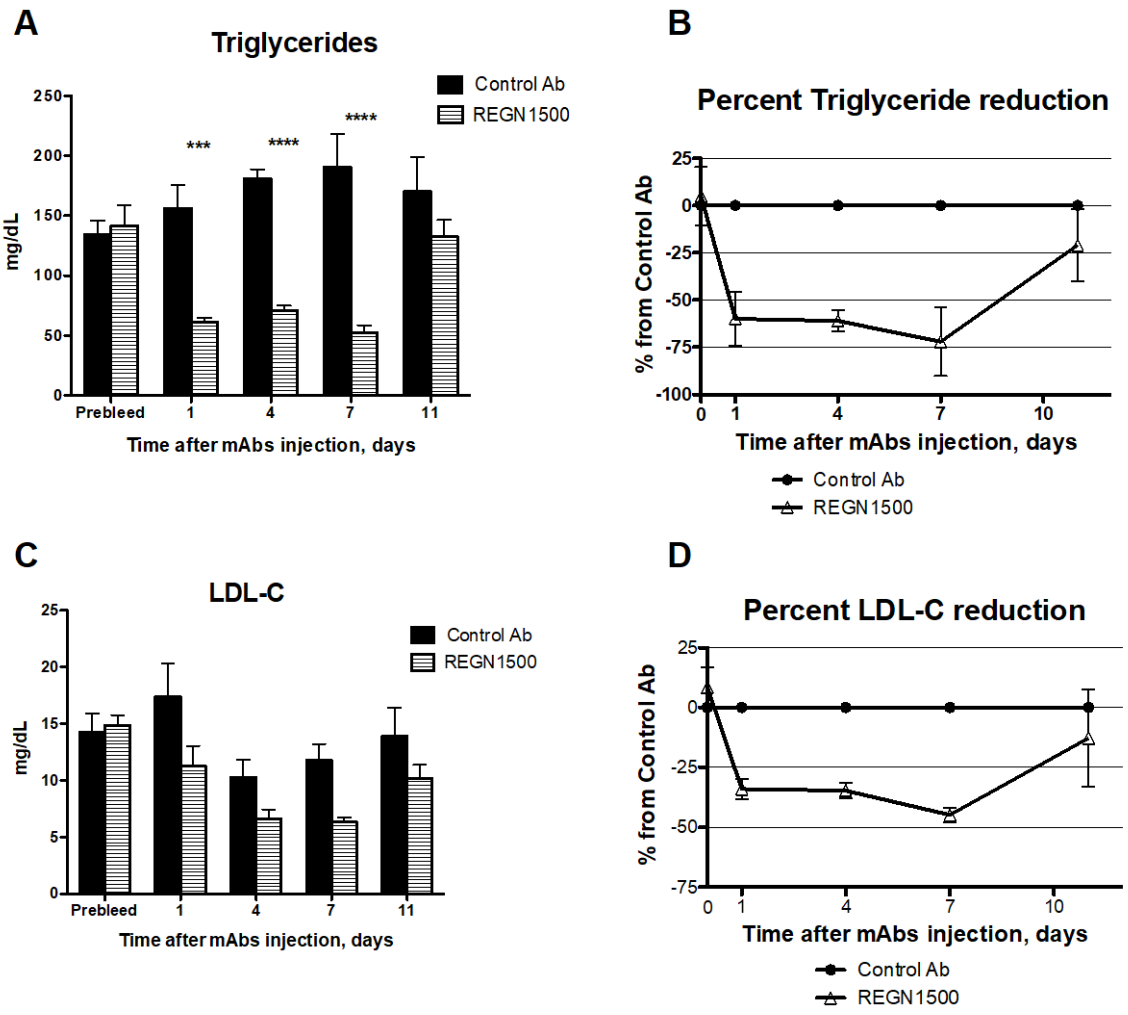
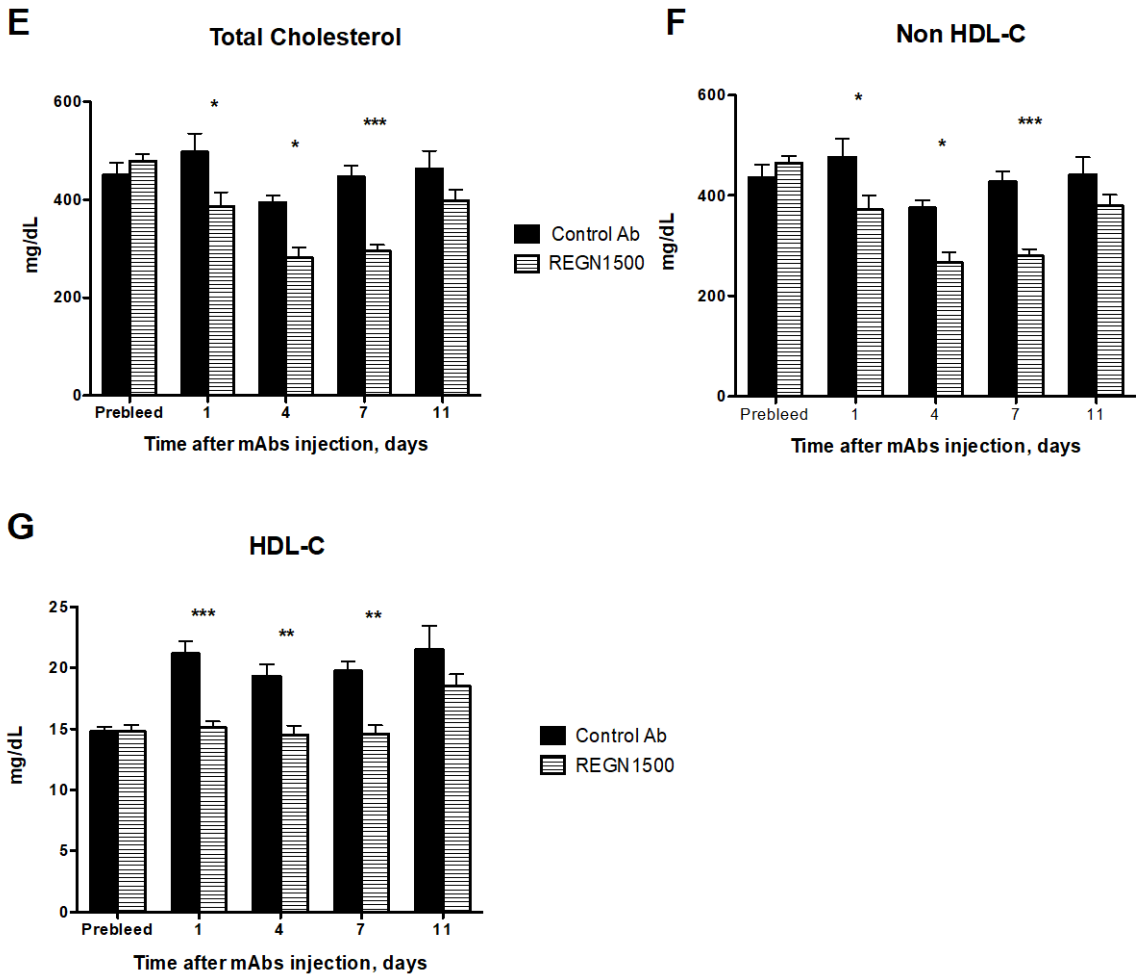


Figure 5: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum Lipid Levels in *ApoE*-/- Mice (Continued)




Serum samples (pre-bleed) were collected after a 4-hour fast from male *ApoE*$^{-/-}$ mice 7 days before a single SC administration of evinacumab or REGN496 (Control Ab) at 10 mg/kg. Subsequent serum samples were then collected (following a 4-hour fast) at the days indicated on the x-axis and analyzed for triglycerides, total cholesterol, LDL-C, HDL-C, and non-HDL-C. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. Evinacumab versus Control Ab: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

### 3.2.1.3. エビナクマブ単回投与による *Ldlr*$^{-/-}$マウスにおける血清中脂質の低下

*Ldlr*$^{-/-}$ マウスにエビナクマブ又はアイソタイプ対照抗体 10 mg/kg を SC 注射で単回投与した。Day 1、4、7 及び 11 の絶食 4 時間後にマウスから血清サンプルを採取し、血清中脂質濃度を評価した。エビナクマブはアイソタイプ対照と比べ、高脂血症 *Ldlr*$^{-/-}$マウスの循環中 TG、LDL-C、総コレステロール、HDL-C 及び non-HDL-C 値を有意に低下させ、この効果は投与後少なくとも 1 週間持続した（Figure 6）。HPLC で分離したところ、エビナクマブは LDL-C、VLDL-C、HDL-C、VLDL-TG 及び LDL-TG を低下させた（REGN1500-MX-12022 Figure 9）。エビナクマブを *Ldlr*$^{-/-}$マウスに投与した後にみられた LDL-C 低下は、エビナクマブが LDL 受容体から独立した機序で LDL-C を低下させることを示唆する。

Figure 6: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum Lipid Levels in *Ldlr*$^{-/-}$ Mice

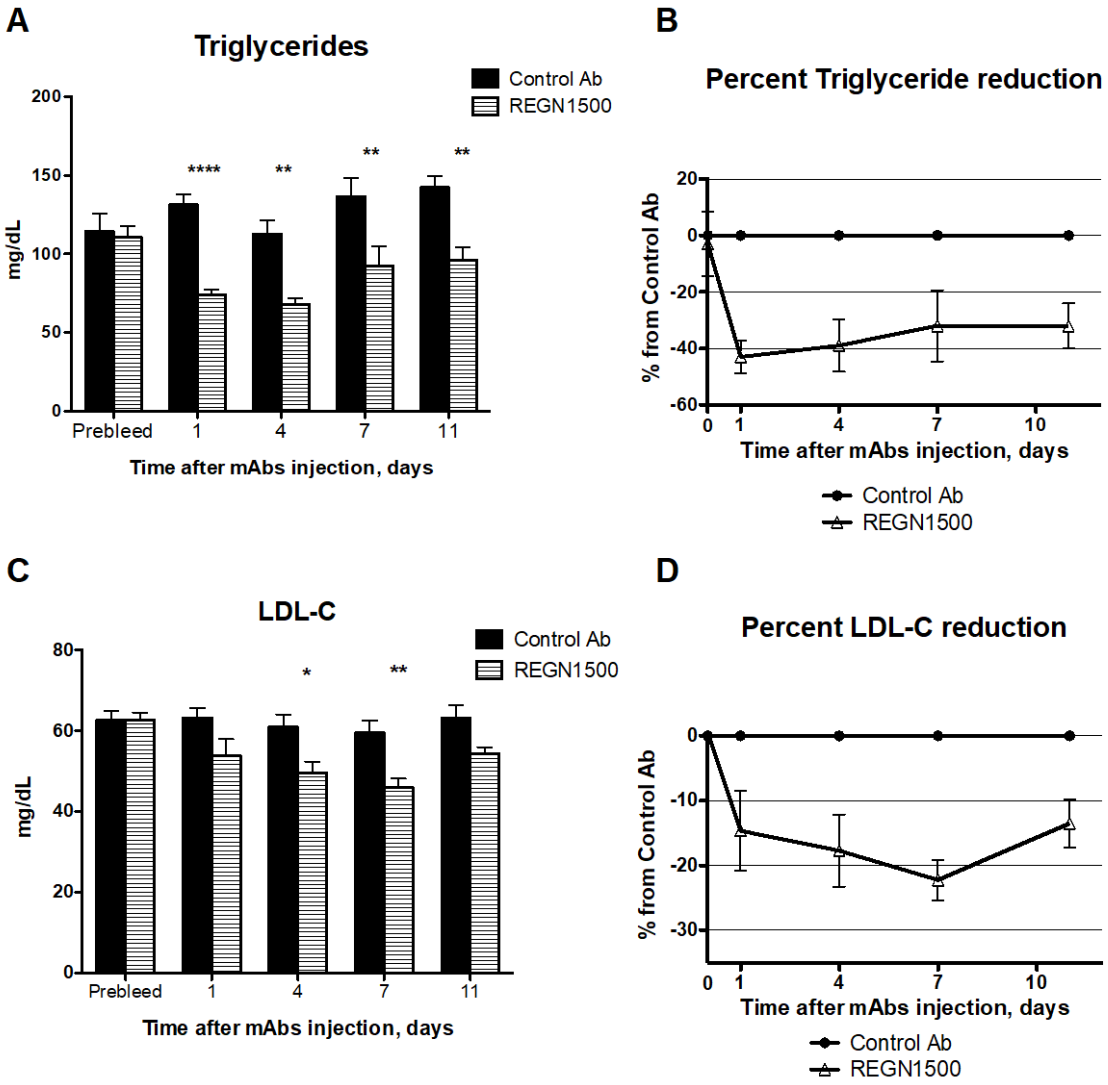
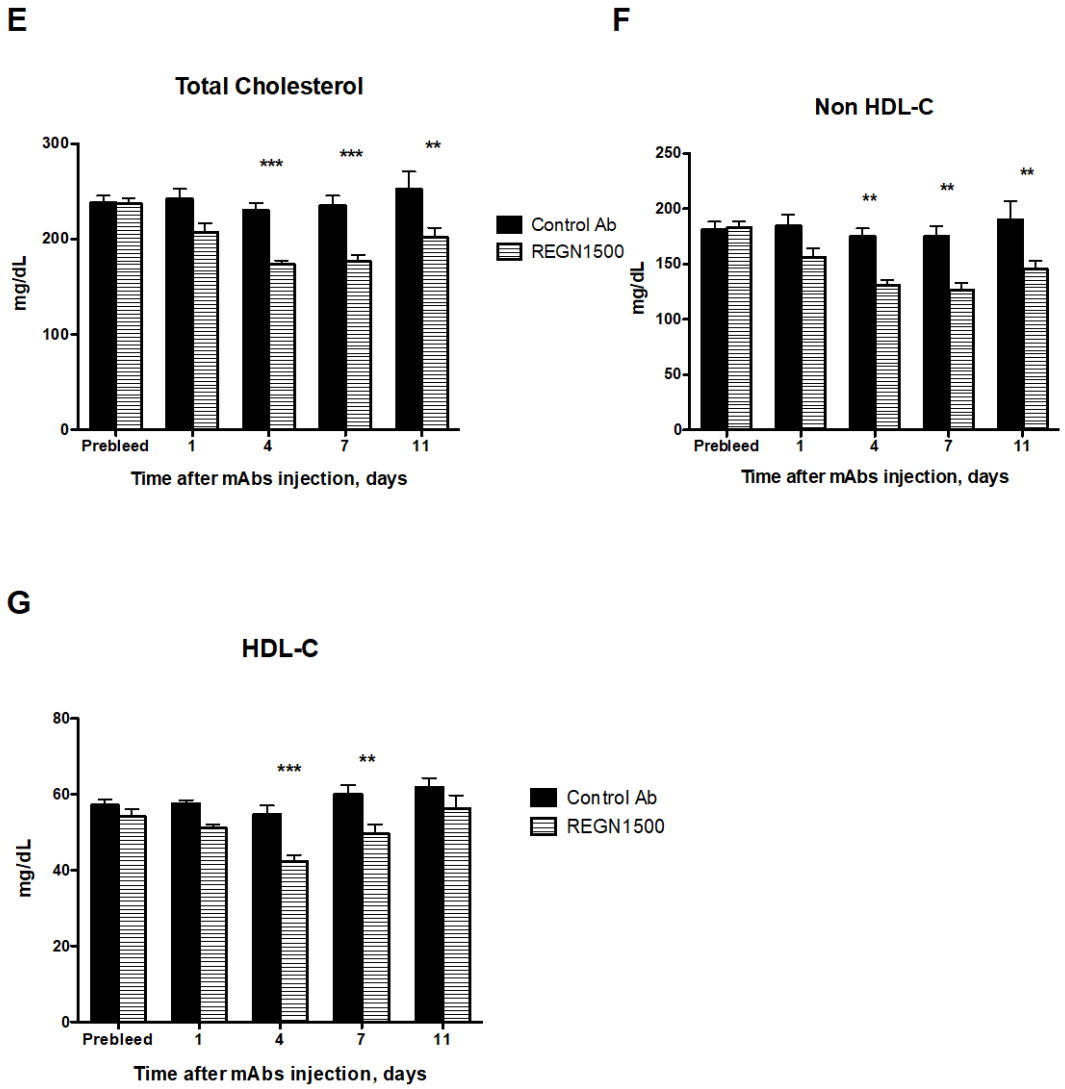


Figure 6: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum Lipids in *Ldlr*$^{-/-}$ Mice (Continued)



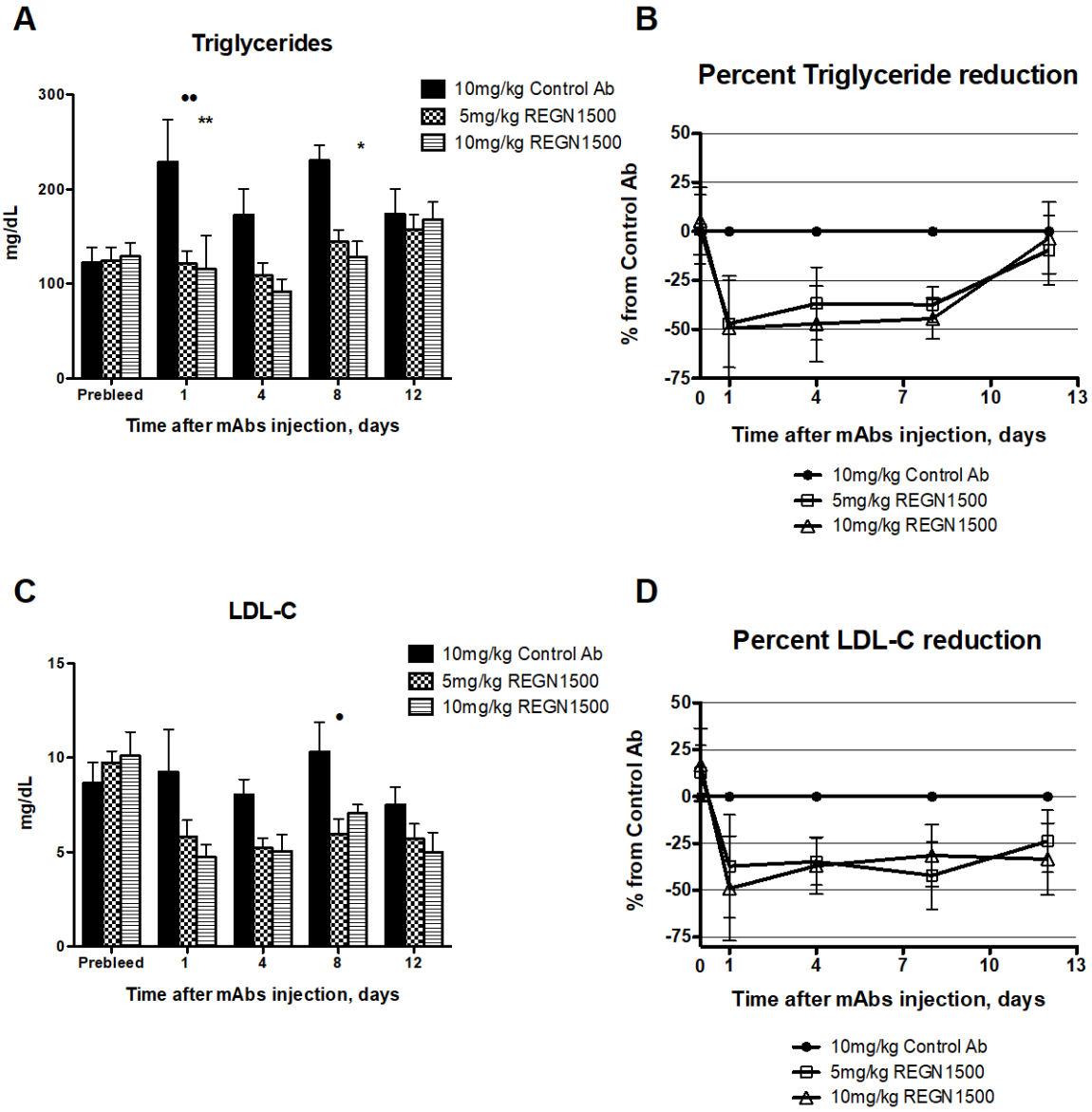

Serum samples (pre-bleed) were collected after a 4-hour fast from male *Ldlr*$^{-/-}$ mice 7 days before a single SC injection of evinacumab or REGN496 (Control Ab) at 10 mg/kg. Subsequent serum samples were then collected (following a 4 hour-fast) at the days indicated on the x-axis and analyzed for triglycerides, total cholesterol, LDL-C, HDL-C, and non-HDL-C. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. Evinacumab versus Control Ab: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

### 3.2.1.4. エビナクマブ単回投与による *db*/*db* マウスにおける血清中脂質レベルの低下

*Db*/*db* マウスにエビナクマブ又はアイソタイプ対照抗体 5 mg/kg 又は 10 mg/kg を SC 注射で単回投与した。Day 1、4、8 及び 12 の 4 時間絶食後にマウスから血清サンプルを採取し、血清中脂質濃度を評価した。エビナクマブは TG、LDL-C 及び non-HDL-C 値を有意に低下させた（Figure 7A-D, Figure 8B）が、循環中の総コレステロール、HDL-C（Figure 8A, C）、インスリン、グルコース及びグルカゴン値には影響はなかった（REGN1500-MX-12022 Figure 12）。*Db/db* マウスにエビナクマブ

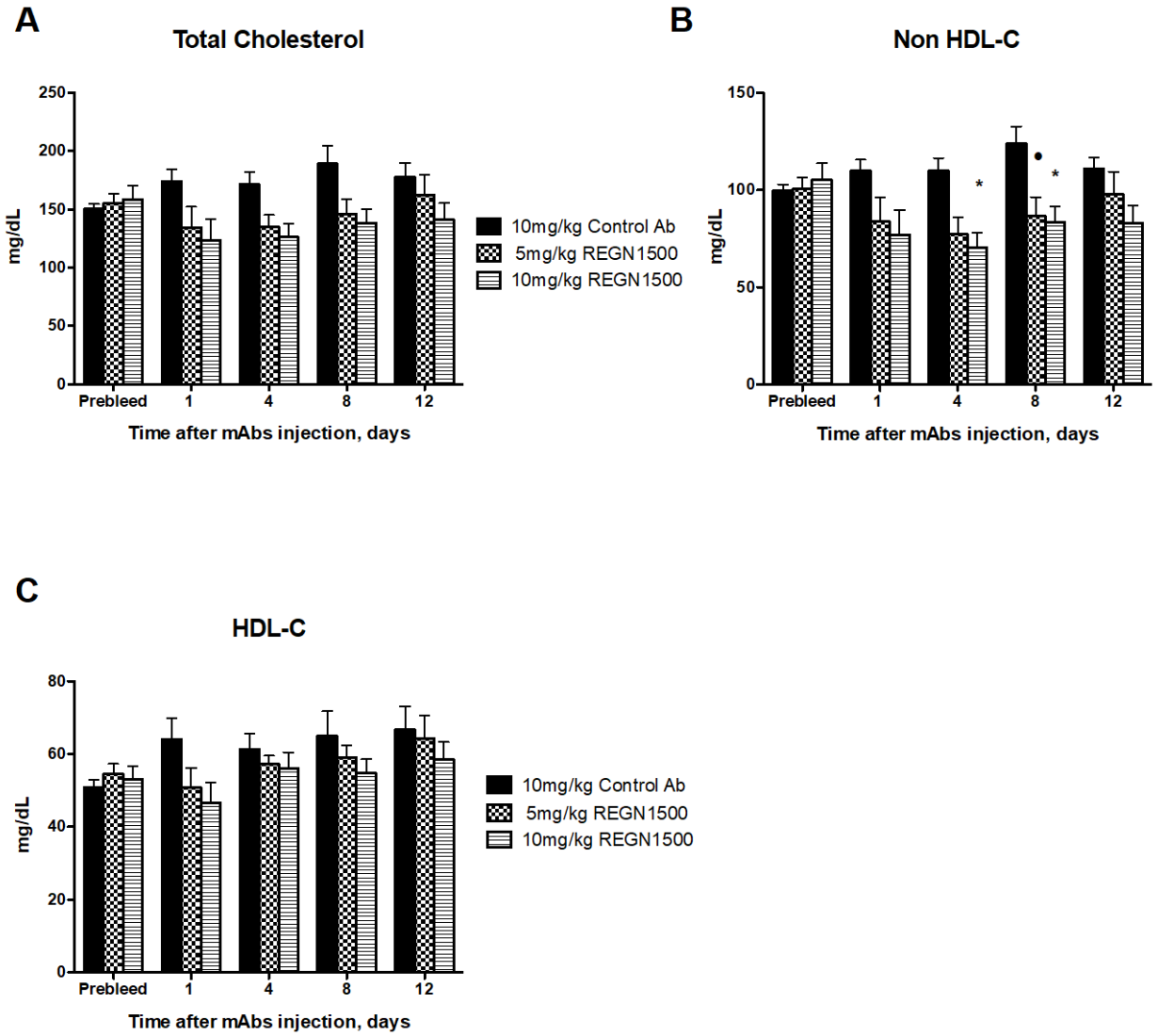
10 mg/kg を投与すると、TG 値の低下と一致して LPL 活性が 2.5 倍超増加し、肝性リパーゼ活性に対する作用はなく、エビナクマブの LPL と EL に対する作用がさらに支持された（Figure 9）。

Figure 7: Single-Dose Evinacumab Reduces Serum TG and LDL-C Levels in *db*/*db* Mice



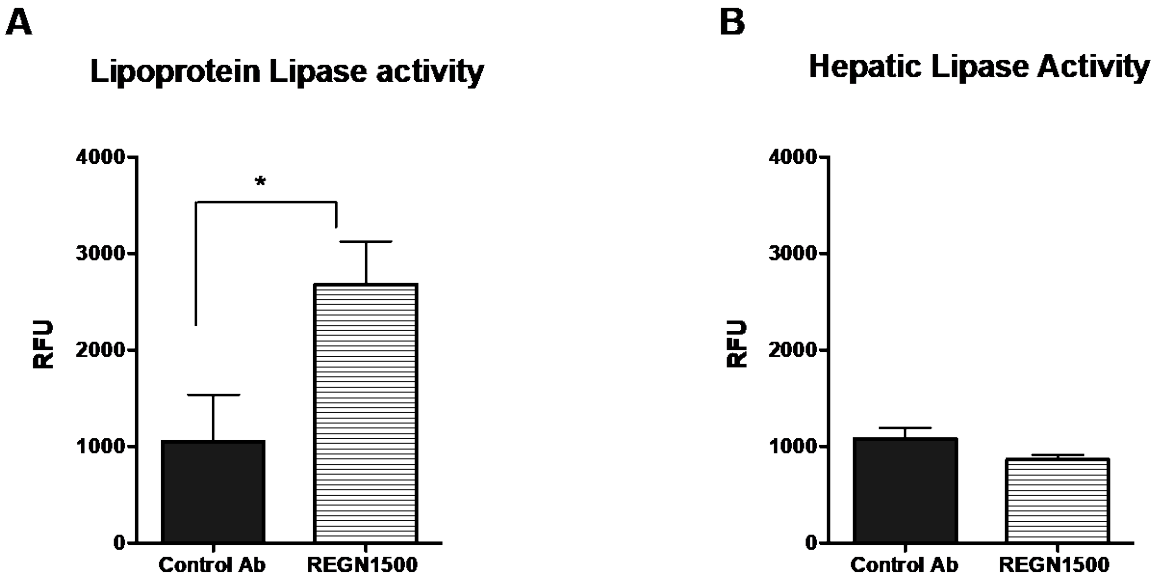

Serum samples (pre-bleed) were collected after a 4-hour fast from male *db/db* mice 7 days before a single SC injection of evinacumab or REGN496 (Control Ab) at the indicated doses. Subsequent serum samples were then collected (following a 4-hour fast) at the days indicated on the x-axis and analyzed for triglycerides and LDL-C. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. Evinacumab 5 mg/kg versus Control Ab: ●p<0.05; ●●p<0.01. Evinacumab 10 mg/kg versus Control Ab: *p<0.05; **p<0.01.

Figure 8: Single-Dose Evinacumab Reduces Non-HDL-C, but Not Total Cholesterol or HDL-C in *db*/*db* Mice




Serum samples (pre-bleed) were collected after a 4-hour fast from male *db/db* mice 7 days before a single SC injection of evinacumab or REGN496 (Control Ab) at the indicated doses. Subsequent serum samples were then collected (following a 4-hour fast) at the days indicated on the x-axis and analyzed for total cholesterol, HDL-C, and non-HDL-C. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. Evinacumab 5 mg/kg versus Control Ab: ●$p<0.05$. Evinacumab 10 mg/kg versus Control Ab: *$p<0.05$.

Figure 9: Single-Dose Evinacumab Increases Lipoprotein Lipase but Not Hepatic Lipase Activity in *db*/*db* Mice




*db/db* mice were administered a single SC injection of 10 mg/kg evinacumab or REGN496 (Control Ab) and lipoprotein lipase and hepatic lipase activities assessed 4 days later in post-heparin plasma samples. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by student's t-test. Evinacumab 10 mg/kg versus Control Ab: *p<0.05. RFU: relative fluorescent units.

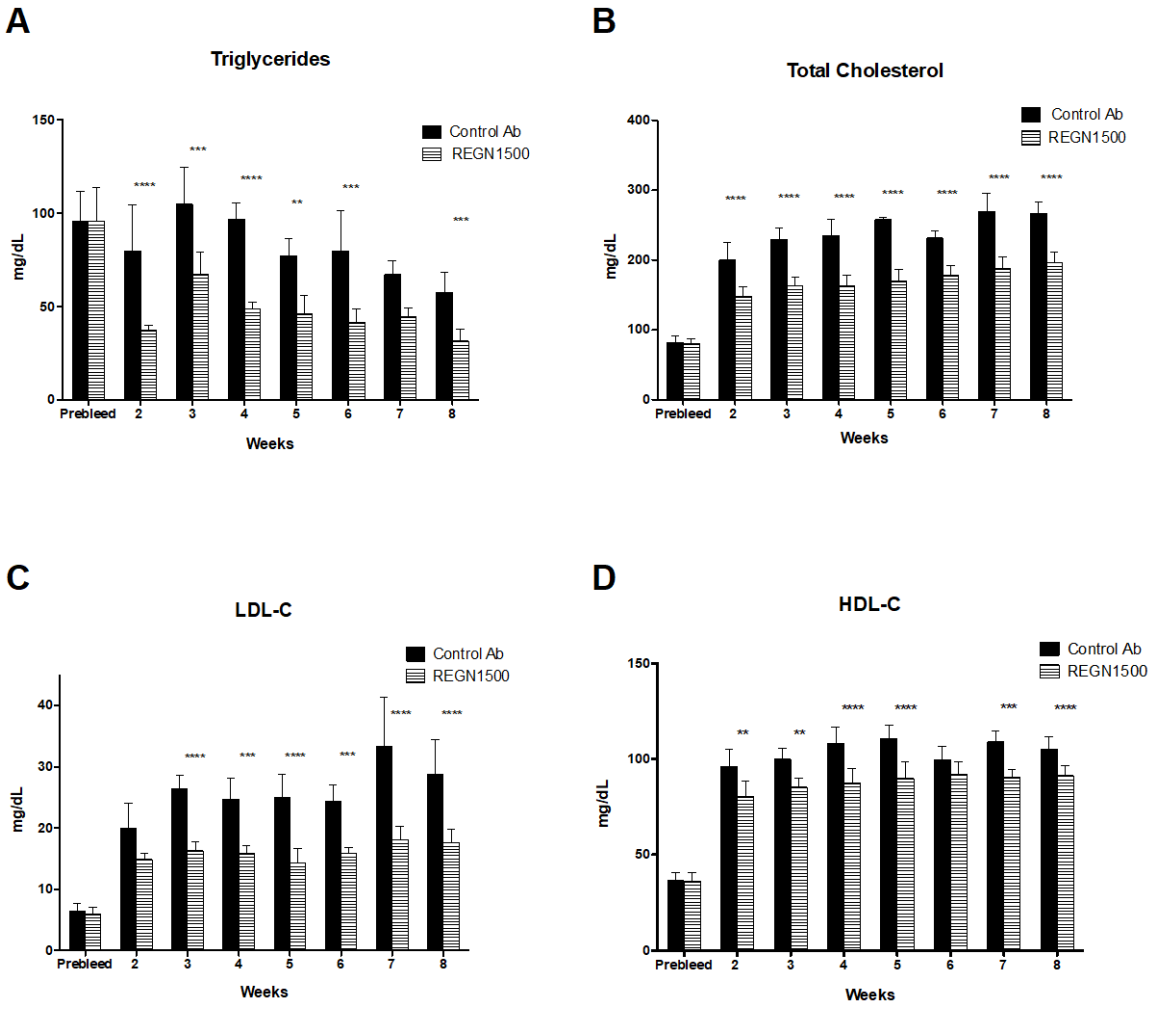
### 3.2.1.5. 高脂肪・高コレステロール食を与えた野生型マウスにおけるエビナクマブ週 1 回投与による影響（REGN1500-MX-12022）

投与開始前の 3 日間に洋風の高脂肪・高コレステロール食を与えた C57Bl/6 WT マウスで、エビナクマブの週 1 回投与が血清中脂質レベルに及ぼす影響を評価した。エビナクマブが体重、肝臓重量、白色脂肪組織重量、心臓重量、ALT／AST 比及び肝臓 TG 含有量に及ぼす影響も評価した。

#### 3.2.1.5.1. 高脂肪・高コレステロール食を与えた野生型マウスにおけるエビナクマブの週 1 回投与の血清中脂質レベルの持続的な低下作用

C57Bl/6 マウスにエビナクマブ又は対照抗体 25 mg/kg を週 1 回、合計 8 週間にわたって投与した。各投与から 6 日後に血清サンプルを採取し（4 時間の絶食後）、血清中脂質濃度を評価した。エビナクマブの週 1 回投与は対照抗体と比べ、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（Figure 10）、この効果は試験中持続した。

Figure 10: Weekly Administration of Evinacumab Results in Sustained Reductions in Serum Lipid Levels in Wild-Type Mice Maintained on a High-Fat, High-Cholesterol Diet




Serum samples (pre-bleed) were collected after a 4-hour fast from male C57Bl/6 mice 8 days before the start of dosing. Mice were then placed on a high-fat diet 3 days before the start of dosing. Evinacumab or REGN496 (Control Ab) were administered SC once a week at 25 mg/kg. Subsequent serum samples were then collected (following a 4-hour fast) 6 days after each injection starting at week 2, and analyzed for triglycerides, total cholesterol, LDL-C, and HDL-C. All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. Evinacumab versus Control Ab: **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

### 3.2.1.5.2. エビナクマブの週 1 回投与による体重、肝臓重量、白色脂肪組織重量、心臓重量、ALT／AST 比又は肝臓トリグリセリド含有量への影響

エビナクマブの週 1 回の投与は体重、肝臓重量、白色脂肪組織重量又は心臓重量に影響を及ぼさなかった（REGN1500-MX-12022 Figure 17）。試験終了時点で、ALT／AST 比又は肝臓 TG 含有量に対する影響はなかった（REGN1500-MX-12022 Figure 18）。

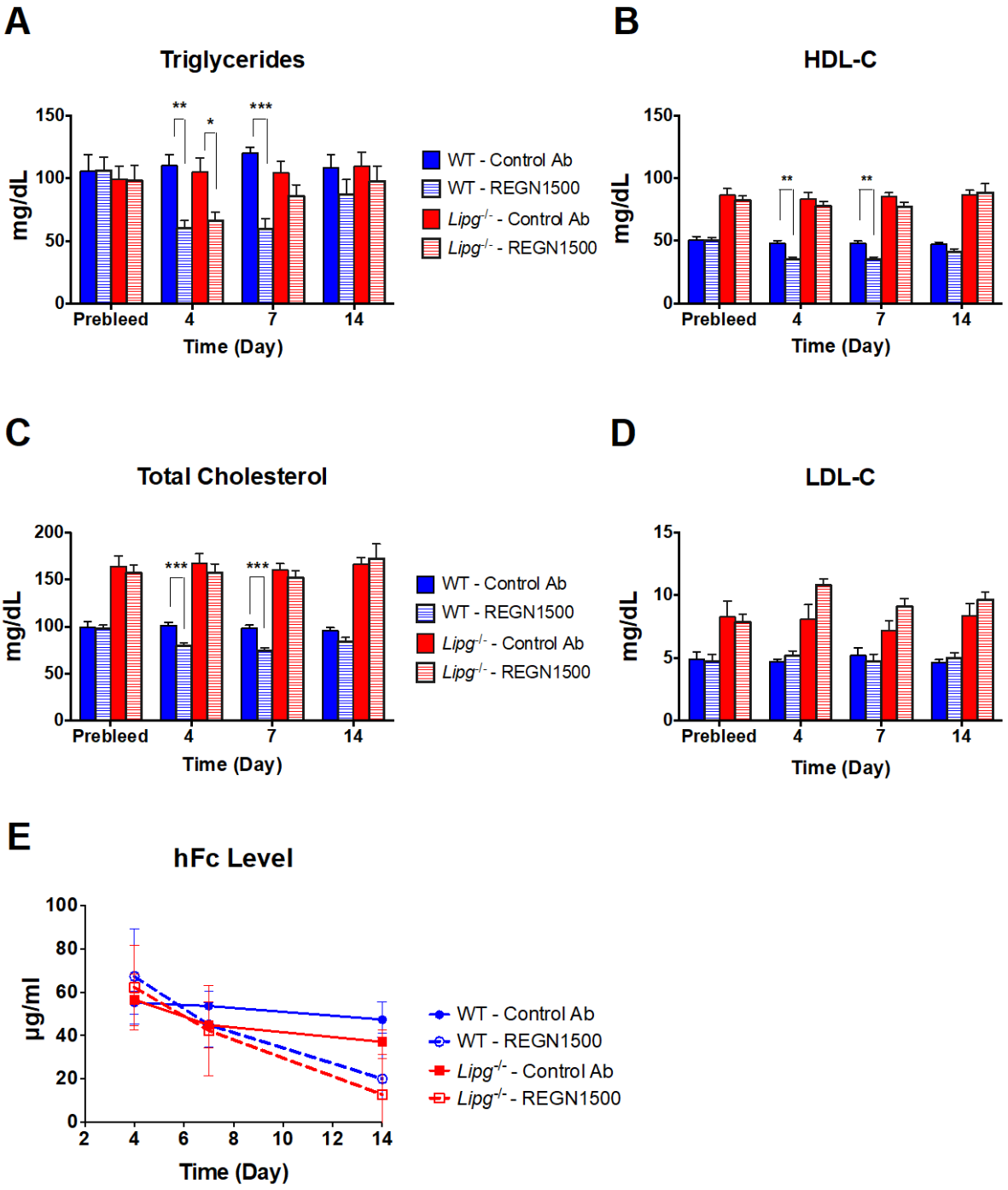
### 3.2.2. エビナクマブが *Lipg*$^{-/-}$マウスの血清中脂質に及ぼす影響（REGN1500-MX-14032）

*Lipg*$^{-/-}$マウス及びその同腹仔の WT マウスで、エビナクマブが血清中脂質レベルに及ぼす影響を評価した。

#### 3.2.2.1. エビナクマブの血管内皮リパーゼ依存性の機序による血清中 HDL-C の低下

*Lipg*$^{-/-}$ マウスとその同腹仔の WT マウスにエビナクマブ 10 mg/kg を SC で単回投与した。エビナクマブ又はアイソタイプ対照抗体の単回投与の 7 日前（前採血）及び単回投与から 4、7 及び 14 日後の絶食 4 時間後に、マウスから血清サンプルを採取した。エビナクマブの投与は *Lipg*$^{-/-}$マウス及びその同腹仔の WT マウスの血漿中 TG を有意に低下させた（Figure 11A）。また、WT マウスの HDL-C と総コレステロールも著明に低下させたが、*Lipg*$^{-/-}$マウスでは HDL-C 値及び総コレステロール値に影響はなかった（Figure 11B, C）。WT マウスでも *Lipg*$^{-/-}$マウスでもエビナクマブの投与は LDL-C 値に影響を及ぼさなかった（Figure 11D）。抗体（ヒト Fc）レベルは 2 系統のマウスでほぼ同じであり、観察された有効性と一致していた（Figure 11E）。エビナクマブは LIPG の非存在下では HDL-C 値に対する影響がないことから、ANGPTL3 が阻害されている条件下では WT マウスで HDL-C 値を媒介する役割が確認される。

Figure 11: Evinacumab Reduces HDL-C in Wild-Type but Not *Lipg*$^{-/-}$ Mice




Serum samples were collected after a 4 hour-fast from male *Lipg*$^{-/-}$ mice and their WT littermates 7 days before (pre-bleed) and 4, 7, and 14 days after a single SC administration of evinacumab or isotype control antibody (Control Ab) at 10 mg/kg (n=7 per group). Serum was analyzed for triglycerides (A), HDL-C (B), Total Cholesterol (C), LDL-C (D), and hFc (E). All values are mean ± SEM. Statistical analysis by 2-way ANOVA with Bonferroni post-test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

### 3.2.3. エビナクマブの LDL-C 低下作用の評価（R1500-PH-19183）

In vivo 試験 3 試験を行い、エビナクマブが媒介した、LDLR から独立した LDL-C 低下の基礎的な機序を明らかにした。

#### 3.2.3.1. エビナクマブが *Ldlr*$^{-/-}$マウスの循環中脂質レベル及び脂質含有量に及ぼす影響

*Ldlr*$^{-/-}$マウスにエビナクマブ（25 mg/kg）又はアイソタイプ対照（25 mg/kg）を週 1 回、3 回にわたり SC 投与し、ANGPTL3 阻害が循環中の脂質レベルに及ぼす影響を評価した。高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）で解析したところ、エビナクマブはアイソタイプ対照に比べ、すべての脂質分画（VLDL、LDL 及び HDL）の TG、総コレステロール、及びリン脂質を LDLR とは独立して低下させることが示された。最も著明な変化は VLDL でみられ、エビナクマブは VLDL の脂質組成を広範囲に変化させることが示唆された（R1500-PH-19183 Figure 1）。

#### 3.2.3.2. エビナクマブが LDLR 欠損マウス及び血管内皮リパーゼ LDLR 欠損マウスの循環中脂質に及ぼす影響

*Ldlr*$^{-/-}$マウス及び *Lipg*$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$マウスにエビナクマブ（10 mg/kg）又はアイソタイプ対照（10 mg/kg）を単回 SC 投与し、LDLR 非存在下で循環中の TG、総コレステロール、LDL-C、及びリン脂質における EL の寄与を評価した。最初の試験の結果と一致して、エビナクマブの投与はアイソタイプ対照の投与と比べ、*Ldlr*$^{-/-}$マウスで循環中の TG、総コレステロール、LDL-C 及びリン脂質値を有意に低下させた。エビナクマブを投与した *Ldlr*$^{-/-}$マウス及び *Lipg*$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$マウスは、アイソタイプ対照と比べ循環中の TG 値が有意に低く、エビナクマブが EL 又は LDLR の有無にかかわらず LPL 活性をアップレギュレートし、TG の加水分解を促進する能力と一致した。特に、エビナクマブの総コレステロール、LDL-C 及びリン脂質に対する脂質低下作用は *Lipg*$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$マウスではみられず、エビナクマブの LDLR から独立した、コレステロールとリン脂質低下作用は、ANGPTL3 媒介性の EL 阻害を遮断することによるものであることが示された（R1500-PH-19183 Figure 2）。

#### 3.2.3.3. エビナクマブが VLDL と LDL のクリアランスに及ぼす影響

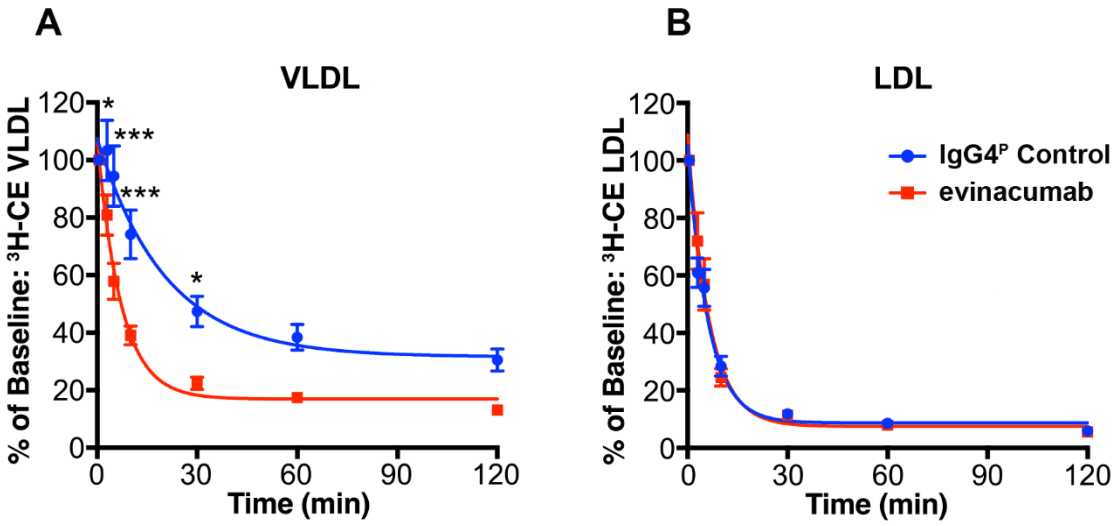
VLDL は肝臓から循環中に分泌され、LPL が媒介する TG 脂肪分解を介して VLDL レムナントに変換される。VLDL レムナントは肝臓に取り込まれるか、さらに脂肪分解され、LDL に変換される（Wolska, 2017）。すなわち VLDL は LDL の直接の前駆物質である。*ApoE*$^{-/-}$マウスを使用して、エビナクマブが循環中からの VLDL 及び LDL のクリアランスに及ぼす影響を評価した。VLDL クリアランスは非常に迅速であり *Ldlr*$^{-/-}$マウスでは適切に測定できないため、脂質クリアランスの評価には *ApoE*$^{-/-}$マウスを選択した。ApoE の非存在下では VLDL 取り込みが妨げられるが（Kowal, 1989; Mortimer, 1995）、エビナクマブの脂質低下作用には影響がなく（Wang, 2015）、脂質クリアランスを評価するための検出枠が広くなる。

*ApoE*$^{-/-}$ドナーマウスに、エビナクマブ（10 mg/kg）又はアイソタイプ対照（10 mg/kg）を週 1 回、2 回にわたり投与した。2 回目の mAb 投与から 5 日後に各群から VLDL 及び LDL を精製し、[$^{3}$H]-コ

レステリルエーテル（CE）で標識した。次に[$^3$H]-CE 標識 VLDL 又は LDL を未投与 *ApoE*$^{-/-}$ レシピエントマウスに IV 注射した。20 匹（10 匹が VLDL、10 匹が LDL）にエビナクマブ投与ドナー由来の VLDL 及び LDL、20 匹（10 匹が VLDL、10 匹が LDL）にアイソタイプ対照投与ドナー由来の VLDL 及び LDL を投与し、循環中からの VLDL と LDL の消失速度を 2 時間にわたりモニタリングした。

エビナクマブによる VLDL の変更で、アイソタイプ対照を投与したマウスに比べ、これらの粒子のクリアランスはより速くなった（Figure 12）。同時に、エビナクマブ投与は LDL クリアランス速度に影響を及ぼさず、エビナクマブによる LDL-C 低下は、LDL 形成の上流にある VLDL のクリアランスが加速したことによるものであることが示唆された。

Figure 12: Evinacumab-Mediated ANGPTL3 Inhibition Promotes VLDL Clearance




*ApoE*$^{-/-}$ donor mice (n=24 to 29/group) received 2 once-weekly SC injections of 10 mg/kg evinacumab or IgG4$^P$ control on days 0 and 7. Five days after the second dose, mice were bled and VLDL and LDL were isolated from plasma. VLDL and LDL particles were labeled with [$^3$H]-cholesteryl-ether (CE)-labeled particles from evinacumab- or isotype (IgG4$^P$ control)-treated donor mice. *ApoE*$^{-/-}$ recipient mice (n=10/group) were IV administered equal volumes of labeled VLDL or LDL from evinacumab- or isotype-treated donor mice. Blood from recipient mice was collected at 30 seconds, 3, 5, 10, 30, 60, and 120 minutes after VLDL and LDL injection. The amount of [$^3$H]-CE VLDL (A) and LDL (B) remaining in the plasma was expressed as a percentage of the initial concentration, measured as the amount of [$^3$H]-radioactivity in the plasma at 30 seconds after injection. Lipoprotein half-life was then calculated by fitting an exponential to the decay curve plotted against time. Data are expressed as mean and error bars indicate SEM. Data were analyzed using a 2-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons. Statistical significance compared with isotype control is indicated by asterisks: *p<0.05, ***p<0.001.

### 3.2.4. エビナクマブが APOE*3Leiden.CETP マウスのアテローム性動脈硬化に及ぼす影響の評価（R1500-PH-17081）

エビナクマブがアテローム性動脈硬化の進行を防止する能力を評価するために、APOE*3Leiden.CETP マウスに洋風の食餌を与え、エビナクマブ（25 mg/kg）又は対照を週 1 回、13 週間にわたって SC 注射で投与した。血漿中脂質、リポタンパク、及びアテローム性動脈硬化病変

の数、大きさ、重症度、病変の組成に対する作用を評価した。ヒト Fc 濃度も評価した。初回投与後 Week 0、2、4、6、8、11 及び 13 に 4 時間絶食後に血液試料を採取した。

#### 3.2.4.1. エビナクマブの週 1 回投与による、APOE*3Leiden.CETP マウスにおける脂質レベル及びアテローム性動脈硬化病変の減少

エビナクマブを週 1 回投与するとアイソタイプ対照抗体と比べ、すべての時点で血漿中コレステロール値（R1500-PH-17081 Section 4.5 Figure 4.5.1）及び TG 値（R1500-PH-17081 Figure 4.6.1）が有意に低下した。また Week 13 時点ではアイソタイプ対照と比べ大動脈根横断面で病変面積が減少したが（R1500-PH-17081 Figure 4.8.1）、病変の数（R1500-PH-17081 Section 4.9 Figure 4.5.1）、病変の重症度（R1500-PH-17081 Figure 4.10.1）又は非アテローム性動脈硬化セグメント（R1500-PH-17081 Figure 4.11.1）に影響はなかった。さらに、エビナクマブは壊死性コアの面積（R1500-PH-17081 Figure 4.13.1）を有意に減少させた。線維性被膜中の平滑筋細胞面積（R1500-PH-17081 Figure 4.14.1）、コラーゲン含有量（R1500-PH-17081 Figure 4.15.1）、病変あたりのマクロファージ含有量（R1500-PH-17081 Figure 4.12.1）、単球の接着（R1500-PH-17081 Figure 4.16.1）又はプラーク安定性インデックス（R1500-PH-17081 Figure 4.17.1）には変化はなかった。

### 3.2.5. スタチンと抗 PCSK9 mAb のアリロクマブを併用した強化コレステロール低下療法に抗 ANGPTL3 mAb を追加したとき、APOE*3Leiden.CETP トランスジェニックマウスの確立されたアテローム性動脈硬化に対する作用（R1500-PH-19099）

アトルバスタチンとアリロクマブの併用にエビナクマブを追加したとき、確立されたアテローム性動脈硬化に及ぼす影響を評価するために、APOE*3Leiden.CETP マウスに洋風の食餌を 13 週間にわたって与え、その後 25 週間にわたってアトルバスタチン（5～13 mg/kg/日）を混餌投与し、エビナクマブ（25 mg/kg）、アリロクマブ（10 mg/kg）又は両 mAb を併用で週 1 回 SC 注射投与し、溶媒対照と比較した。血漿中脂質、リポタンパク、及びアテローム性動脈硬化の面積、病変の数、大きさ及び重症度に及ぼす影響を評価した。またヒト Fc 濃度も評価した。Week 0、4、8、12、14、15、16、18、20、24、28、32、36 及び 38 時点で 4 時間絶食後に血液試料を採取した。

#### 3.2.5.1. 確立されたアテローム性動脈硬化を有する APOE*3Leiden.CETP マウスにアトルバスタチン、又はアリロクマブとアトルバスタチンに追加してエビナクマブを週 1 回投与したときの血漿中脂質の低下

エビナクマブは 2 剤併用（エビナクマブとアトルバスタチン）でも 3 剤併用（エビナクマブ、アリロクマブ及びアトルバスタチン）でも対照と比べ、血漿中総コレステロール（R1500-PH-19099 Figure 8.5a, Figure 8.5b）、non-HDL-C（R1500-PH-19099 Figure 8.7）及び TG（R1500-PH-19099 Figure 8.8）を有意に低下させた。

#### 3.2.5.2. 確立されたアテローム性動脈硬化を有する APOE*3Leiden.CETP マウスにアトルバスタチン、又はアリロクマブとアトルバスタチンに追加してエビナクマブを週 1 回投与したときのアテローム性動脈硬化の進行防止又は退縮促進

アトルバスタチンにエビナクマブ週 1 回投与を追加したとき、既存のアテローム性動脈硬化のさらなる進行が防止され、3 剤併用ではアテローム性動脈硬化病変の大きさがベースラインに比べ有意に退縮した（R1500-PH-19099 Figure 8.12a, 8.12b, 8.20）。アトルバスタチンへのエビナクマブ週 1 回投与の追加又は 3 剤併用で、対照と比べプラークの表現型が改善した（R1500-PH-19099 Figure 8.15a-e, 8.16）。

## 4. 副次的薬理試験

### 4.1. エビナクマブの Fc エフェクター機能の評価（REGN1500-MX-12025）

Section 3.1.3 に記述した in vitro 薬理試験は、エビナクマブは ANGPTL3 媒介性の LPL 阻害を効果的に遮断することを示している。しかし、in vivo ではエビナクマブ Fc ドメインを介したエフェクター機能活性、又は循環中の免疫複合体（CIC）の形成による補体活性化など、別の機序が作動している可能性がある。

エビナクマブは、IgG4$^{P}$ 重鎖 Fc 定常領域を含んでいるため、エフェクター機能を媒介することは予想されない。IgG4、IgG4$^{P}$ はいずれも、IgG1 ほど Fcγ 受容体に結合せず（Warncke, 2012）、補体成分 C1q とも結合しない（Patel, 2015）。さらに ANGPTL3 は可溶性標的であるため、細胞表面で生じる Fc エフェクター機能はエビナクマブの活性に寄与しないと推定される。

しかし一連の in vitro 細胞ベースアッセイを行って、エビナクマブがエフェクター細胞である末梢血単核球細胞（PBMC）の関与を介して ADCC を媒介し、正常なヒト血清（NHS）存在下で CDC を媒介する可能性を評価した。

ヒト肝細胞癌細胞株の HepG2 細胞と Hep3B 細胞を使用し、組換え完全長 hANGPTL3 の存在下又は非存在下で ADCC 実験と CDC 実験を行った。上皮増殖因子受容体（EGFR）陽性 A431 細胞及び社内で作成した EGFR 抗体（REGN171）を PBMC 媒介性 ADCC の陽性対照として使用し、公表文献の記述に従った PBMC の活性がみられることを確認した（Flieger, 2000）。CD20$^{+}$ヒト Daudi 細胞及びヒト抗 CD20 IgG1（リツキシマブ）を陽性対照として使用し、公表文献の記述に従ったヒト血清補体の活性を確認した（Gazzano-Santoro, 1997）。

#### 4.1.1. エビナクマブの HepG2 標的細胞又は Hep3B 標的細胞に対する ADCC 活性及び CDC 活性（活性なし）

エビナクマブは 8 pM から 500 nM の範囲の濃度で ADCC も CDC も媒介しなかった。EGFR mAb REGN171 は同じ濃度範囲とアッセイの条件下で EGFR$^{+}$ A431 標的細胞の ADCC を媒介し（REGN1500-MX-12025 Figure 1）、アッセイで使用したエフェクター細胞である PBMC が標的細胞

株の ADCC を誘発する能力が確認された。抗 CD20 IgG1 であるリツキシマブは CD20+ヒト Daudi 細胞の CDC を媒介し（REGN1500-MX-12025 Figure 2）、アッセイで使用した NHS が標的細胞株の CDC を誘発する能力が確認された。

#### 4.1.2. エビナクマブをヒト ANGPTL3 と共にインキュベートしたときの C1q に結合能のある免疫複合体の形成（検出なし）

CIC は、抗体と可溶性抗原が多量体化することで形成される。CIC が組織中に沈着すると炎症性反応が生じ、沈着部位に組織の損傷が生じることがある。大型の免疫複合体は血清中で C1q を活性化する場合もある（Rojko, 2014）。

エビナクマブと可溶性ヒト ANGPTL3 の複合体について、C1q 結合能を評価した。具体的には、エビナクマブを可溶性組換えヒト完全長 ANGPTL3（hANGPTL3[S17-E460]-His10）又は N 末端ドメインヒト ANGPTL3（hANGPTL3[S17-K170]-His6）と共にインキュベートし、プレートに吸着した C1q に添加し、その後、酵素結合免疫吸着測定法で抗ヒト IgG を使用して検出を行った。このアッセイでは、エビナクマブ：hANGPTL3 複合体は検出可能なレベルの C1q 結合を示さなかった（REGN1500-MX-12025 Figure 3）。対照的に、陽性対照複合体である熱凝集ヒトγグロブリン（HAGG）では、検出可能な結合が観察された。高 HAGG 陽性対照と低 HAGG 陽性対照について観察された値は、各サンプルについて予想される値の範囲内であった。

## 5. 安全性薬理試験

### 5.1. In vivo 安全性薬理試験

安全性薬理試験の評価項目は、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（Module 2.6.6. Section 3.2, REGN1500-TX-14006, Module 2.6.6. Section 3.1, REGN1500-TX-11073）。最高 100 mg/kg/週（SC 又は IV）を 5 週間又は 26 週間（それぞれラットとサル）連続して投与したところ、心血管（心拍数、血圧及び心電図）、呼吸器（1 分あたりの呼吸数及びパルスオキシメトリー）、又は CNS に被験物質に関連した明らかな変化はみられなかった。

## 6. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

# 7. 考察及び結論

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 LDL-C、TG 及び HDL-C 値が低く、冠動脈疾患リスクも低い。エビナクマブは HoFH を含む高脂血症の治療薬として開発されている。エビナクマブは高い親和性でヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 と結合し、ヒト、ウサギ及びラットの FcRn に対する親和性はマイクロモルレベルである。In vivo 試験では、ANGPTL3 媒介性の LPL 阻害と EL 阻害を遮断し、血清中脂質レベルを低下させるが、可溶性 ANGPTL3 の存在下では標的細胞の ADCC 又は CDC を媒介しない。

正脂血症マウス、高脂血症マウス及び糖尿病性脂質異常症マウスを用いた in vivo 試験では、エビナクマブ 10 mg/kg の単回 SC 投与で循環中の TG 値が低下した。高脂血症マウス及び糖尿病性脂質異常症マウスでは、総コレステロール、HDL-C 及び non-HDL-C に加え、LDL-C も低下した。In vivo 作用機序検討試験では、エビナクマブが LDL 形成の上流にある VLDL の処理とクリアランスを促進することで LDL-C 値を低下させることが示された。

高脂肪・高コレステロール食を与えた WT マウスを使いた試験で、エビナクマブ 25 mg/kg を週 1 回、8 週間にわたり投与したところ、試験中を通じて、循環中の TG、総コレステロール、LDL-C 及び HDL-C 値が有意に低下したが、体重、肝臓重量、白色脂肪組織重量、心臓重量、ALT／AST 比又は肝臓 TG 含有量に影響はなかった。

APOE*3Leiden.CETP マウスにエビナクマブ 25 mg/kg を週 1 回 SC 投与すると、アテローム性動脈硬化の進行が防止され、既存のアテローム性動脈硬化を有する APOE*3Leiden.CETP マウスにアトルバスタチン（混餌投与）又はアリロクマブ（10 mg/kg/週）との併用でエビナクマブ 25 mg/kg を週 1 回投与すると、血漿中総コレステロール、non-HDL-C 及び TG 値が有意に低下し、アテローム性動脈硬化の進行が防止され（アトルバスタチンとの併用）、既存のアテローム性動脈硬化病変が退縮し（アトルバスタチン及びアリロクマブとの併用）、プラーク表現型が改善する。

安全性薬理試験の評価項目は、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。最高 100 mg/kg/週（SC 又は IV）を 5 週間又は 26 週間（それぞれラットとサル）連続して投与したところ、心血管（心拍数、血圧及び心電図）、呼吸器（1 分あたりの呼吸数及びパルスオキシメトリー）又は CNS に被験物質に関連した変化はみられなかった。

要約すると、エビナクマブは高い親和性でヒト、サル、ウサギ、ラット及びマウスの ANGPTL3 と結合し、in vitro で ANGPTL3 が媒介する LPL 阻害と EL 阻害を遮断し、可溶性 ANGPTL3 の存在下で標的細胞の ADCC 又は CDC を媒介しない。カニクイザル、ウサギ及びラットは、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、毒性評価に最も適した動物種と考えられる。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レベルを低下させ、ANGPTL3 LOF 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進行を防止し退縮を促進する。これらの観察はいずれも、HoFH 患者を対象とした臨床評価を支持するものである。

# 8. 参考文献

Abdiche Y, Yeung Y, Chaparro-Riggers J, Barman I, Strop P, Chin S, et al. The Neonatal Fc Receptor (FcRn) Binds Independently to Both Sites of the IgG Homodimer with Identical Affinity. Mabs. 2015;7(2):331-43.

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.

Datta-Mannan A, Chow CK, Dickinson C, Driver D, Lu J, Witcher DR, et al. FcRn Affinity Pharmacokinetic Relationship of Five Human IgG4 Antibodies Engineered for Improved in Vitro FcRn Binding Properties in Cynomolgus Monkeys. Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals. 2012;40(8):1545-55.

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.

Flieger D, Renoth S, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I. Mechanism of Cytotoxicity Induced by Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody IDEC-C2B8 in CD20-Expressing Lymphoma Cell Lines. Cellular Immunology 2000;204:55-63.

Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp TC, Chen AB, Mukku, VR. A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay for Anti-CD20 Monoclonal Antibody. Journal of Immunological Methods 1997;202:163-171.

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. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2011;75(6):1023-35.

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.

Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989;86(15):5810-4.

Levin D, Golding B, Strome SE, Sauna ZE. Fc Fusion as a Platform Technology: Potential for Modulating Immunogenicity. Trends in Biotechnology. 2015;33(1):27-34.

Lotta LA, Stewart ID, Sharp SJ, Day FR, Burgess S, Luan J, et al. Association of Genetically Enhanced Lipoprotein Lipase-Mediated Lipolysis and Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Alleles With Risk of Coronary Disease and Type 2 Diabetes. JAMA Cardiol 2018a; 3(10):957-66.

Macdonald LE, Karow M, Stevens S, Auerbach W, Poueymirou WT, Yasenchak J, et al. Precise and in Situ Genetic Humanization of 6 Mb of Mouse Immunoglobulin Genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(14):5147-52.

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. Clinica Chimica Acta. 2012; 413(5-6):552-5.

Mattijssen F, Kersten S. Regulation of Triglyceride Metabolism by Angiopoietin-Like Proteins. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids. 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.

Mortimer BC, Beveridge DJ, Martins IJ, Redgrave TG. Intracellular localization and metabolism of chylomicron remnants in the livers of low density lipoprotein receptor-deficient mice and apoE-deficient mice. Evidence for slow metabolism via an alternative apoE-dependent pathway. The Journal of biological chemistry. 1995;270(48):28767-76.

Murphy AJ, Macdonald LE, Stevens S, Karow M, Dore AT, Pobursky K, et al. Mice with Megabase Humanization of Their Immunoglobulin Genes Generate Antibodies as Efficiently as Normal Mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(14):5153-8.

Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome Sequencing, ANGPTL3 Mutations, and Familial Combined Hypolipidemia. New England Journal of Medicine. 2010 Dec 2;363(23):2220-7.

Neuber T, Frese K, Jaehrling J, Jager S, Daubert D, Felderer K, et al. Characterization and Screening of IgG Binding to the Neonatal Fc Receptor. Mabs. 2014;6(4):928-42.

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, Yoshida K, Noji-Sakikawa C, Ando Y, Koishi R, Furukawa H. 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.

Patel R, Neill A, Liu H, Andrien B. IgG Subclass Specificity to C1q Determined by Surface Plasmon Resonance Using Protein L Capture Technique. Analytical Biochemistry. 2015 Jun 15;479:15-7. PubMed PMID: 25797348.

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.

Preator A, Hunziker W. β2-Microglobulin Is Important for Cell Surface Expression and pH-Dependent IgG Binding of Human FcRn. Journal of Cell Science. 2002;115(11):2389-97.

Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, Haynes J, Freimark B, Martin P, Raymond JT, Evering W, Rebelatto MC, Schenck E, Horvath C. Formation, Clearance, Deposition, Pathogenicity, and Identification of Biopharmaceutical-Related Immune Complexes: Review and Case Studies. Toxicologic Pathology. 2014 Apr 3; 42(4):725-764.

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.

Santulli G. Angiopoietin-Like Proteins: a Comprehensive Look. Frontiers in Endocrinology. 2014;5:4.

Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Shimizugawa T, Ando Y, Koishi R, Sakai N, Kotani K, Komuro R, Ishida T, Hirata K, Yamashita S, Furukawa H, Shimomura I. Angiopoietin-Like Protein 3 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.

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.

Tikkanen E, Minicocci I, Hallfors J, Di Costanzo A, D'Erasmo L, Poggiogalle E, et al. Metabolomic Signature of Angiopoietin-Like Protein 3 Deficiency in Fasting and Postprandial State. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2019; 39(4):665-74.

van Vlijmen BJ, van den Maagdenberg AM, Gijbels MJ, van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Diet-Induced Hyperlipoproteinemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E3-Leiden Transgenic Mice. The Journal of Clinical Investigation. 1994 Apr;93(4):1403-1410.

Wang Y, Gusarova V, Banfi S, Gromada J, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion. Journal of lipid research. 2015;56(7):1296-307.

Warncke M, Calzascia T, Coulot M, Balke N, Touil R, Kolbinger F, et al. Different Adaptations of IgG Effector Function in Human and Nonhuman Primates and Implications for Therapeutic Antibody Treatment. Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950). 2012 May 1;188(9):4405-11.

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.

Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. Atherosclerosis. 2017;267:49-60.

# 目次

2.6.3.1. 薬理試験 2
2.6.3.2. 効力を裏付ける試験 9
2.6.3.3. 副次的薬理試験 9
2.6.3.4. 安全性薬理試験 9
2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験 9

## 2.6.3.1. 薬理試験

| **Overview** | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics – *In Vitro* Studies** | | |
| **Type of Study** | **Test System** | **Study Number<br>Testing Facility** |
| Determination of the Equilibrium Binding Parameters for the Interaction of Evinacumab with Angiopoietin-Like 3 (ANGPTL3) from Human, Cynomolgus Monkey, Rabbit, Rat, and Mouse | Surface plasmon resonance (SPR)-Biacore™ technology was used to determine the binding characteristics for the interaction of sensor surface-captured ANGPTL3 with recombinant full-length or N-terminal domain monomeric human, cynomolgus monkey, rat, and mouse ANGPTL3 proteins or recombinant N-terminal dimeric human and rabbit ANGPTL3 proteins at pH 7.4 and 25°C. Binding of evinacumab to recombinant full-length human and mouse ANGPTL4 and full-length human ANGPTL5 was also assessed. | REGN1500-MX-12024<br>Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY |
| Determination of Equilibrium Dissociation Constants for the Interaction of Evinacumab with the Neonatal Fc Receptor from Human, Rabbit, and Rat | SPR-Biacore technology was used to determine the binding characteristics of evinacumab to the neonatal Fc receptor (FcRn) of human, rabbit, and rat at pH 6.0 and 25°C. | R1500-PH-18158<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| Characterization of the Effect of Evinacumab on ANGPTL-3-Mediated Inhibition of Lipoprotein Lipase Activity | A cell-free *in vitro* biochemical assay examining cleavage of a fluorogenic lipoprotein lipase (LPL) substrate was used to determine the ability of evinacumab to block human, monkey, rabbit, rat, and mouse ANGPTL3-mediated inhibition of LPL. | REGN1500-MX-12023<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| Characterization of the Effect of Evinacumab on ANGPTL3-Mediated Inhibition of Endothelial Lipase Activity | A cell-free lipase-dependent fluorescence assay was used to determine the ability of evinacumab to block human, monkey, rat, and mouse ANGPTL3-mediated inhibition of endothelial lipase. | REGN1500-MX-14032<br>Regeneron, Tarrytown, NY |

| **Overview** | | | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics – *In Vivo* Studies** | | | | |
| **Type of Study** | **Strain/Sex/N** | **Dosing & Route of Administration** | **Parameter Measured** | **Study Number Testing Facility** |
| Pharmacodynamic (PD) Effects of a Single Dose of Evinacumab in Normolipidemic Mice | C57Bl/6, Male, N=6/group | SC, 1x, 5 or 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- $IgG4^P$ control (10 mg/kg) | Serum samples were collected 1, 4, 7, 12, and 19 days postdose and were assessed for lipid concentrations (triglycerides [TG], total cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol [non-HDL-C], low-density lipoprotein cholesterol [LDL-C], and high-density lipoprotein cholesterol [HDL-C]). All serum samples were collected after a 4-hour fast. | REGN1500-MX-12022<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| PD Effects of a Single Dose of Evinacumab in Hyperlipidemic *ApoE*$^{-/-}$ Mice | *ApoE*$^{-/-}$, Male, N=6/group | SC, 1x, 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- $IgG4^P$ control | Serum samples were collected 1, 4, 7, and 11 days postdose and were assessed for lipid concentrations (TG, total cholesterol, non-HDL-C, LDL-C, and HDL-C). All serum samples were collected after a 4-hour fast. | REGN1500-MX-12022<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| **Primary Pharmacodynamics – *In Vivo* Studies** | | | | |
| **Type of Study** | **Strain/Sex/N** | **Dosing & Route of Administration** | **Parameter Measured** | **Study Number Testing Facility** |

| **Overview** | | | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|---|---|
| PD Effects of a Single Dose of Evinacumab in Hyperlipidemic *Ldlr*$^{-/-}$ Mice | *Ldlr*$^{-/-}$, Male, N=6/group | SC, 1x, 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | Serum samples were collected 1, 4, 7, and 11 days postdose and were assessed for lipid concentrations (TG, total cholesterol, non-HDL-C, LDL-C, and HDL-C). All serum samples were collected after a 4-hour fast. | REGN1500-MX-12022<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| PD Effects of a Single Dose of Evinacumab in Dyslipidemic db/db Mice | *db*/*db*, Male, N=6/group | SC, 1x, 5 or 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control (10 mg/kg) | Serum samples were collected 1, 4, 8, and 12 days postdose and were assessed for concentrations of LPL, hepatic lipase, and lipids (TG, total cholesterol, non-HDL-C, LDL-C, and HDL-C). All serum samples were collected after a 4-hour fast. | REGN1500-MX-12022<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| PD Effects of Repeat-Doses of Evinacumab in Wild-Type Mice Maintained on a High-Fat, High-Cholesterol Diet | C57Bl/6, Male, N=10/group | SC, 1x/week for 8 weeks, 25 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | Serum samples were collected 6 days after each dose and were assessed for lipid concentrations (TG, total cholesterol, LDL-C, and HDL-C). All serum samples were collected after a 4-hour fast.<br><br>Body and tissue (liver, white adipose, heart) weights, serum alanine aminotransferase (ALT)/aspartate aminotransferase (AST) ratio, and hepatic TG content assessed at termination of study. | REGN1500-MX-12022<br>Regeneron, Tarrytown, NY |

| **Overview** | | | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics – *In Vivo* Studies** | | | | |
| **Type of Study** | **Strain/Sex/N** | **Dosing & Route of Administration** | **Parameter Measured** | **Study Number Testing Facility** |
| PD Effect of a Single Dose of Evinacumab on Serum Lipid Levels in Endothelial Lipase-Deficient *Lipg*$^{-/-}$ Mice | *Lipg*$^{-/-}$, wild-type littermates, Male, N=7 to 8/group | SC, 1x, 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | Serum samples were collected 7 days prior to dosing and on days 4, 7, and 14 postdose and were assessed for lipid concentrations (TG, total cholesterol, LDL-C, and HDL-C). All serum samples were collected following a 4-hour fast.<br>Human antibody concentrations in serum were also assessed. | REGN1500-MX-14032<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| Effect of Evinacumab on Circulating Lipid Levels and Lipid Content in *Ldlr*$^{-/-}$ Mice | *Ldlr*$^{-/-}$, Male, N=5 to 6/group | SC, 1x/week for 3 weeks, 25 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | Serum samples were collected 6 days prior to dosing and 6 days after the last dose of antibody and assessed for lipid content (TG, total cholesterol, and phospholipids) in all lipid fractions (Very Low-Density Lipoprotein [VLDL], LDL, and HDL). Serum samples were collected from non-fasted mice. | R1500-PH-19183<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| Effect of Evinacumab on Circulating Lipids in LDLR-Deficient and Endothelial Lipase-LDLR-Deficient Mice | *Ldlr*$^{-/-}$ and *Lipg*$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$, Male, N=14 to 18/group | SC, 1x, 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | Serum samples were collected 7 days prior to dosing and on day 7 postdose and were assessed for lipid concentrations (TG, total cholesterol, LDL-C, and phospholipids). Serum samples were collected from non-fasted mice. | R1500-PH-19183<br>Regeneron, Tarrytown, NY |

| **Overview** | | | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics – *In Vivo* Studies** | | | | |
| **Type of Study** | **Strain/Sex/N** | **Dosing & Route of Administration** | **Parameter Measured** | **Study Number Testing Facility** |
| Effect of Evinacumab on VLDL and LDL Clearance | *ApoE*$^{-/-}$, Male, N=24 to 29/group | SC, 1x/week for 2 weeks, 10 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | VLDL and LDL were harvested from donor *ApoE*$^{-/-}$ mice that received either evinacumab or isotype control. VLDL and LDL were labeled ex vivo and injected intravenously (IV) into untreated recipient *ApoE*$^{-/-}$ mice. The amount of labeled VLDL and LDL in circulation was measured over time (30 seconds, 3, 5, 10, 30, 60, and 120 minutes after injection). | R1500-PH-19183<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| Effect of Repeat-Doses of Evinacumab on Atherosclerosis Development in APOE*3Leiden.CETP Mice Fed a Western Diet | Heterozygous APOE*3Leiden.CETP, Female, N=20 to 30/group | SC, 1x/week for 13 weeks, 25 mg/kg<br>- evinacumab<br>- IgG4$^{P}$ control | Plasma samples collected after a 4-hour fast at weeks 0, 2, 4, 6, 8, 11, and 13 and assessed for plasma lipid concentrations (TG and total cholesterol). Mice were assessed for atherosclerotic area, lesion number, size, severity, and lesion composition.<br>Human Fc concentrations in plasma were also assessed. | REGN1500-PH-17081<br>TNO Metabolic Health Research, Leiden, The Netherlands |

| **Overview** | | | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|---|---|
| Effect of Repeat-Doses of Evinacumab on Top of High Intensive Cholesterol-Lowering Treatment (Atorvastatin and Alirocumab [Anti-PCSK9]) on Established Atherosclerosis in APOE*3Leiden.CETP Transgenic Mice Fed a Western Diet | APOE*3Leiden.CETP, Female, N=15 to 48/group | mAbs given SC, 1x/week for 25 weeks, each alone and in combination<br>- 25 mg/kg evinacumab<br>- 10 mg/kg alirocumab<br>All mAb treatment groups also received atorvastatin mixed with food, 5-13 mg/kg/day | Plasma samples collected after a 4-hour fast at weeks 0, 4, 8, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, and 38 and assessed for plasma lipid concentrations (TG, total cholesterol, non-HDL-C), and lipoproteins. Mice were assessed for atherosclerotic area, lesion number, size, and severity<br>Human Fc concentrations in plasma were also assessed. | R1500-PH-19099<br>TNO Healthy Living, Leiden, The Netherlands |
| **Secondary Pharmacodynamics** | | | | |
| **Type of Study** | | **Test System** | | **Study Number Testing Facility** |
| Evaluation of Fc Effector Functions of Evinacumab; Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) and Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) | | ADCC assays using human peripheral blood mononuclear cell effector cells and CDC assays using normal human serum with complement components were performed by incubating evinacumab with human hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B in the presence or absence of recombinant full-length human ANGPTL3. Cell death was quantified using a commercially available luminescence-based assay. | | REGN1500-MX-12025<br>Regeneron, Tarrytown, NY |
| Evaluation of the Ability of Evinacumab:ANGPTL3 Immune Complexes to Bind Complement Component C1q | | Complexes of evinacumab with soluble recombinant human full-length or N-terminal domain ANGPTL3 proteins were tested for the ability to bind immobilized C1q using a commercially available immunoassay. | | REGN1500-MX-12025<br>Regeneron, Tarrytown, NY |

| **Overview** | | **Test Article: evinacumab (also known as REGN1500)** |
|---|---|---|
| **Safety Pharmacology** | | |
| **Type of Study** | **Test System** | **Study Number**<br>**Testing Facility** |
| Safety Pharmacology Evaluation of Evinacumab in Monkeys (GLP) | Safety pharmacology endpoints of evinacumab were integrated into a repeat-dose 26-week SC injection or IV infusion toxicity and toxicokinetic study in cynomolgus monkeys with a 13-week recovery period. | REGN1500-TX-14006<br>Covance Laboratories Inc, Madison, WI |
| Safety Pharmacology Evaluation of Evinacumab in Sprague-Dawley Rats (GLP) | Safety pharmacology endpoints of evinacumab were integrated into a repeat-dose 5-week SC injection or IV infusion toxicity and toxicokinetic study in Sprague-Dawley rats with a 10-week recovery period. | REGN1500-TX-11073<br>Charles River Laboratories<br>Reno, NV |
| **Pharmacodynamic Drug Interactions** | | |
| Pharmacodynamic drug interaction studies were not performed. | | |

Abbreviations: Fc, fragment crystallizable; GLP, Good Laboratory Practice; mAb, monoclonal antibody; N, number of animals; SC, subcutaneous(ly)

### 2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の詳細な結果は Module 2.6.2 Section 2 を参照のこと。

### 2.6.3.3. 副次的薬理試験

副次的薬理試験の詳細な結果は Module 2.6.2 Section 4 を参照のこと。

### 2.6.3.4. 安全性薬理試験

エビナクマブの安全性薬理試験の評価項目は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に準拠した、カニクイザルと Sprague-Dawley ラットを用いて実施した反復投与毒性試験に組み込まれている（それぞれ、Module 2.6.6. Section 3.2; REGN1500-TX-14006、及び Module 2.6.6. Section 3.1; REGN1500-TX-11073）。最高 100 mg/kg/week を 5 週間又は 26 週間（それぞれラットとサル）連続して皮下投与又は静脈内投与したところ、心血管（心拍数、血圧及び心電図）、呼吸器（1 分あたりの呼吸数及びパルスオキシメトリー）、又は中枢神経系に被験物質に関連した変化はみられなかった。

### 2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。