

トファシチニブ

ゼルヤンツ[®]錠 5 mg

第 2 部（モジュール 2）CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

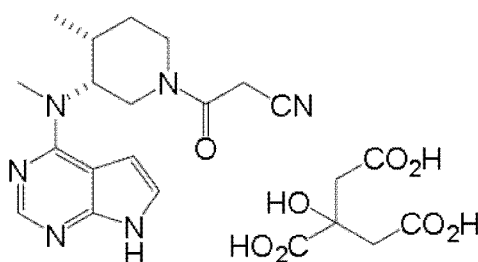
2.6.1 緒言

ファイザー株式会社

2.6.1 緒言

トファシチニブクエン酸塩（以後トファシチニブとする；研究コード：CP-690,550-10；化学名：(3*R*,4*R*)-4-methyl-3-(methyl-7*H*-pyrrolo [2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)- β -oxo-1-piperidinepropanenitrile, 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylate；図 1；分子量：504.5；遊離塩基分子量：312.4）はヤヌスキナーゼ（JAK）の強力な阻害薬であり、ヒトのキナーゼ群の中で高い選択性を示す。

図 1 トファシチニブクエン酸塩の化学構造式



関節リウマチ（RA）患者の滑膜組織においては、JAK3 の発現が増強されることが明らかになっており^{参考文献1)}、また、抗 IL-6 受容体抗体のトシリズマブは RA における疾患の活動性やびらの進行を抑制することが知られている^{参考文献2)}。また、IL-6、IL-23 および γ 鎖を有する受容体に結合するサイトカイン（IL-7、IL-15 および IL-21 など）は、JAK/STAT（シグナル伝達兼転写活性化因子）経路を介してシグナルを伝達し、IL-6、IL-21 および IL-23 は Th17 細胞の誘導、増殖および維持に働いていることから、これらの多種のサイトカインのシグナル伝達を媒介する JAK に対する低分子阻害薬は、新規の RA 療法となり得ると考えられている。

トファシチニブは、キナーゼアッセイで JAK1, JAK2, JAK3 を阻害し、チロシンキナーゼ 2 (TyK2) も軽度にも阻害する。細胞内では 2 分子の JAK が介在してシグナル伝達が行われるが、トファシチニブは JAK3 または JAK1 に会合するヘテロ二量体受容体によるシグナル伝達を強力に阻害し、その機能的選択性は JAK2 に会合するホモ二量体受容体によるシグナル伝達に対するよりも高い。JAK1 および JAK3 の阻害により、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 および IL-21 を含む数種類の共通の γ 鎖を有するサイトカイン受容体を介したシグナル伝達が遮断される。これらのサイトカインは、リンパ球の活性化、増殖および機能発現に不可欠であることから、これらのシグナル伝達の阻害により免疫反応を様々な形で抑制できると考えられる。また、JAK1 に対する阻害作用により、IL-6 や IFN γ など他の炎症誘発性サイトカインを介したシグナル伝達も抑制すると考えられる。より高用量では、JAK2 ホモ二量体シグナル伝達の抑制を介したエリスロポエチンのシグナル伝達の抑制が生じる可能性がある。

今回の申請にあたり、トファシチニブの有効性および安全性に関する特徴を明らかにする目的で、薬理、薬物動態および毒性の各非臨床試験を実施した。

トファシチニブについて予定している効能・効果および用法・用量（案）を以下に示す。

【効能・効果】

既存治療で効果不十分な関節リウマチ

[効能・効果に関連する使用上の注意]

過去の治療において、メトトレキサートをはじめとする少なくとも 1 剤の抗リウマチ薬等による適切な治療を行っても、疾患に起因する明らかな症状が残る場合に投与する。

【用法・用量】

通常、トファシチニブとして 1 回 5 mg を 1 日 2 回経口投与する。

[用法・用量に関連する使用上の注意]

1. 中等度又は重度の腎機能障害を有する患者には、5 mg を 1 日 1 回経口投与する。[「薬物動態」の項参照]
2. 中等度の肝機能障害を有する患者には、5 mg を 1 日 1 回経口投与する。[「薬物動態」の項参照]
3. 免疫抑制作用が増強されると感染症のリスクが増加することが予想されるので、本剤と TNF 阻害剤、IL-6 阻害剤、T 細胞選択的共刺激調節剤等の生物製剤や、タクロリムス、アザチオプリン、シクロスポリン、ミゾリビン等の強力な免疫抑制剤（局所製剤以外）との併用はしないこと。なお、関節リウマチ患者においてこれらの生物製剤及び免疫抑制剤との併用経験はない。

参考文献

- 1) Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, et al. Expression of JAK3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: unique JAK3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65: 149-56.
- 2) Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008; 118(11): 3537-45.

トファシチニブ

ゼルヤンツ[®]錠 5 mg

第 2 部（モジュール 2）CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

ファイザー株式会社

目 次

2.6.2	薬理試験の概要文	5
2.6.2.1	まとめ	5
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	8
2.6.2.3	副次的薬理試験	30
2.6.2.4	安全性薬理試験	38
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	40
2.6.2.6	考察および結論	40
2.6.2.7	参考文献	43

略語・用語の定義一覧

略号・用語	省略していない表現または用語の定義
ACR20	American College of Rheumatology 20% improvement criteria : 米国リウマチ学会による評価基準の 20%以上改善率
AIA	Adjuvant-induced arthritis : アジュバント誘発関節炎
ANOVA	Analysis of variance : 分散分析
APA	Action potential amplitude : 活動電位振幅
APD ₅₀ , APD ₉₀	Action potential duration at 50%, 90% repolarization : 50%, 90%再分極時の活動電位持続時間
apoAI	Apolipoprotein A-I : アポリポ蛋白 A-I
AUC ₀₋₂₄	Area under the concentration- time curve from time 0 to 24 hours after dosing : 投与後 0 から 24 時間の濃度-時間曲線下面積
A2M	Alpha-2-macroglobulin : α 2-マクログロブリン
BID	Bis in die : 1 日 2 回
bpm	Beats per minute : 1 分間あたりの心拍数
CaMK	Calmodulin-dependent protein kinase : カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ
Cave	Average concentration : 平均濃度
CE	Cholesteryl ester : コレステロールエステル
CIA	Collagen-induced arthritis : コラーゲン誘発関節炎
Cmax	Maximum concentration : 最高血漿中または血清中濃度
Cmin	Minimum concentration : 最低血漿中または血清中濃度
CII	Chicken type II collagen : ニワトリ II 型コラーゲン
EC ₅₀	Average concentration producing 50% of maximal effect : 50%有効濃度 (平均)
ED ₅₀	Effective median concentration : 50%有効濃度
EPO	Erythropoietin : エリスロポエチン
FACS	Fluorescence activated cell sorting : 蛍光活性化セルソーター
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor : 顆粒球コロニー刺激因子
GLP	Good Laboratory Practice : 医薬品非臨床安全性試験実施基準
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor : 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HDLc	High density lipoprotein cholesterol : 高比重リポ蛋白 (HDL) コレステロール
hERG	Human ether- α -go-go related gene : ヒト ether- α -go-go 関連遺伝子
IC ₅₀	50% inhibitory concentration : 50%阻害濃度
IFN	Interferon : インターフェロン
IHC	Immunohistochemistry : 免疫組織化学的検査
IL	Interleukin : インターロイキン
IL-6R	IL-6 Receptor : IL-6 受容体
IP-10	Interferon inducible protein-10
JAK	Janus kinase : ヤヌスキナーゼ
KC	Keratinocyte-derived chemokine :
Ki	Inhibition constant : 阻害定数
MCP	Monocyte chemotactic protein :
MIG	Monokine induced by interferon gamma
mRNA	Messenger ribonucleic acid : メッセンジャーリボ核酸
NK	Natural killer : ナチュラルキラー
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell : 末梢血単核球
PBNC	Peripheral blood neutrophil count : 末梢血好中球数
PK	Pharmacokinetics : 薬物動態
PL	Phospholipid : リン脂質
PTZ	Pentylentetrazole : ペンチレンテトラゾール

略号・用語	省略していない表現または用語の定義
QD	Quaque die : 1日1回
QOD	Quaque one die : 隔日
RA	Rheumatoid arthritis : 関節リウマチ
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RMP	Resting membrane potential : 静止膜電位
SEM	Standard error of the mean : 平均値の標準誤差
STAT	Signal transducer and activator of transcription : シグナル伝達兼転写活性化因子
TC	Total cholesterol : 総コレステロール
Th	Helper T : ヘルパーT
TNF	Tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子
TyK	Tyrosine kinase : チロシンキナーゼ
VEGF	Vascular endothelial growth factor : 血管内皮細胞増殖因子
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor 1 : 血管内皮細胞増殖因子受容体 1
V _{max}	Maximal depolarization velocity : 最大脱分極速度

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

関節リウマチ (RA) は慢性の全身性自己免疫疾患であり、臨床的には、持続痛、硬直および滑膜炎を呈し、機能低下および重大な合併症を伴う関節破壊に至る。RA の病因には、先天性および適応性の免疫調節不全が関与し、RA の進行および慢性化にはサイトカインの持続的分泌が重要な役割を担っている^{参考文献1)}。TNF α を標的とする生物学的製剤の普及に伴い、RA におけるこの炎症性サイトカインの重要性が示されている。しかし、この治療に奏効を示す患者は3分の2にすぎないことから、新たな治療法の必要性が示唆されている^{参考文献2)}。例えば、IL-6、IL-23、IL-17ならびに γ 鎖を有する受容体に結合する IL-7、IL-15 および IL-21 などのサイトカインは、以下の理由から治療効果を得るための代替標的となり得る^{参考文献1)}。IL-6、IL-23 および γ 鎖を有する受容体に結合するサイトカインは、JAK/STAT (シグナル伝達兼転写活性化因子) 経路を介してシグナルを伝達する。また、IL-6、IL-21 および IL-23 は Th17 細胞の誘導、増殖および維持に働いている。したがって、これらの多種のサイトカインのシグナル伝達を媒介するヤヌスキナーゼ (JAK) に対する低分子阻害薬は、新規の RA 療法となり得ると考えられている。

JAK ファミリーは JAK1、JAK2、JAK3 およびチロシンキナーゼ 2 (TyK2) からなる細胞内チロシンキナーゼであり、I 型および II 型サイトカイン受容体との相互作用を介してシグナル伝達を媒介する^{参考文献3)}。この4種類の JAK ファミリーの中で、JAK1、JAK2 および TyK2 はユビキタスに発現し、多種のサイトカイン受容体と会合している。JAK3 は主に造血細胞に発現し、JAK3 が会合する γ 鎖サブユニットと JAK1 に会合する受容体サブユニットが二量体化した後、リンパ球の活性化、増殖およびその機能発揮に必要な IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 および IL-21 などのサイトカインと結合する^{参考文献4), 5)} (図1)。一方、JAK1 は JAK2 や TyK2 と対をなして IL-6、IFN γ および IFN α などの炎症や免疫反応に重要なその他のサイトカインのシグナルを伝達する (図2)。2分子の JAK2 が介在するシグナル伝達では、EPO、IL-3、GM-CSF、プロラクチン、レプチンおよび成長ホルモンなどの造血系のサイトカインやホルモンのシグナル伝達にとって重要である。JAK1 と TyK2 が介在すると、IL-10 および I 型インターフェロンなどのさまざまなサイトカインのシグナルを伝達する。IL-12 および IL-23 のシグナル伝達には Tyk2 と JAK2 が関与する^{参考文献6), 7)}。

RA 患者の滑膜組織において、JAK3 の発現が増強されることが明らかにされている^{参考文献8)}。また、IL-6R を標的とするトシリズマブは RA における疾患の活動性やびらの進行を抑制することが知られている^{参考文献1)}。このように、IL-6R シグナル伝達における JAK1 および JAK2 の役割の点からも、RA 治療については JAK 経路阻害が有用であると考えられる。

トファシチニブクエン酸塩 (以後トファシチニブとする; 研究コード: CP-690,550-10; 化学名: (3*R*,4*R*)-4-methyl-3-(methyl-7*H*-pyrrolo [2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)- β -oxo-1-piperidinepropanenitrile, 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylate; 分子量: 504.5; 遊離塩基分子量: 312.4) は強力な JAK ファミリー阻害剤であり、ヒトのキナーゼ群の中で JAK ファミリーに対して高い選択性を示す。トファシチニブは、酵素試験において JAK ファミリーのすべてのキナーゼに対して nmol/L レベルの阻害効力を示した。一方、細胞を用いた試験では JAK1 および JAK3 依存的シグナル伝達を優先的に阻害するが、同じ濃度では、JAK2 に会合するホモ二量体受容体に依存する経路に対する阻害は

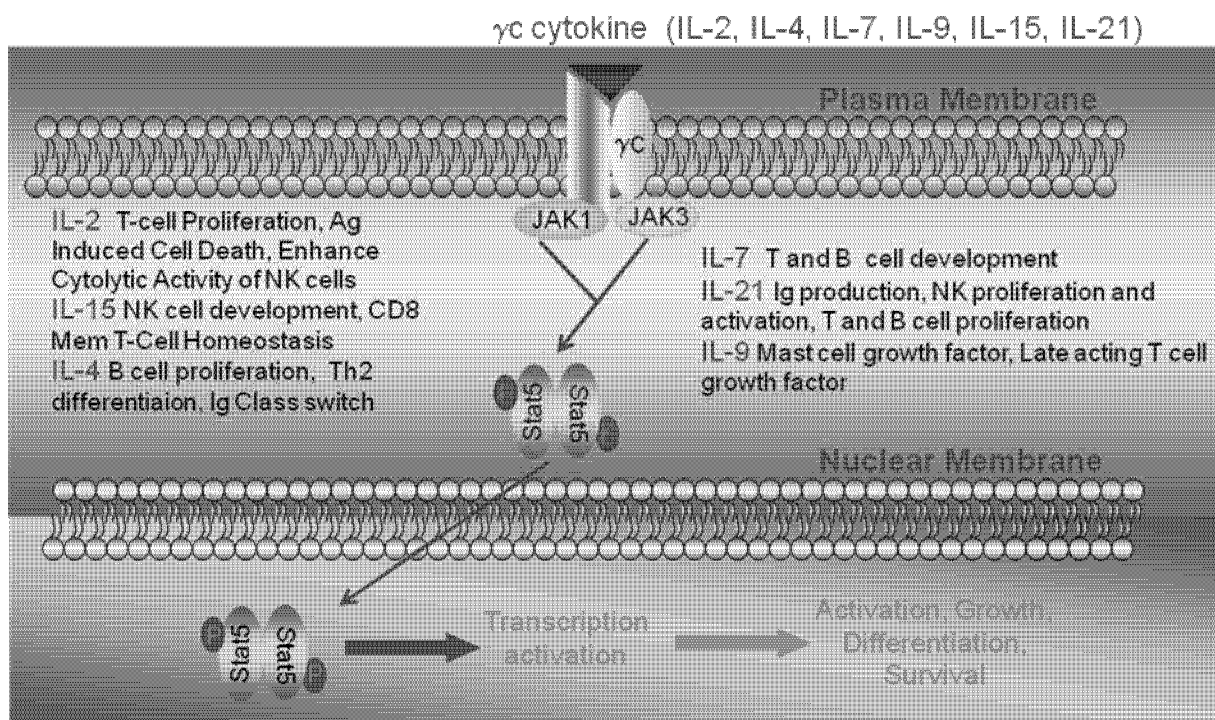
弱い。例えば、全血アッセイではトファシチニブは JAK1/3 が媒介するサイトカイン受容体のシグナル伝達を約 20~50 nmol/L の IC₅₀ で阻害したが、JAK2 に会合するホモ二量体受容体を介する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) シグナル伝達の阻害における IC₅₀ は約 1400 nmol/L であった。

トファシチニブの RA に対する効果を、マウスコラーゲン誘発関節炎 (CIA) およびラットアジュバント誘発関節炎 (AIA) における疾患進行の症状観察および組織学的検査によって評価したところ、トファシチニブのこれらのげっ歯類の関節炎モデルに対する効果が確認された。また、効果がみられた用量では、炎症性蛋白および遺伝子セットの有意な減少も認められた。さらに、マウスの心臓移植モデル、サルの腎臓移植モデルおよびげっ歯類関節炎モデルにおいてもトファシチニブの効果が認められている^{参考文献⁹⁾, 10)}。以上のように、トファシチニブの効果は自己免疫および免疫調節不全の多くのモデルにおいて明らかにされている。

安全性薬理試験では、心血管系に関しては hERG カリウムチャンネルおよび摘出イヌプルキンエ線維の心筋活動電位に影響を与えなかったが、ラット *in vivo* 試験では血圧の低下、一過性の心拍数の増加、動脈血の PO₂ の上昇、体温低下が、サルの試験では心拍数の増加が認められた。中枢神経系への影響をマウスを用いた一般症状および行動観察 (Irwin 変法) または自発運動試験で評価したところ、32 mg/kg までのトファシチニブ投与では行動に及ぼす影響はみられなかったが、100 mg/kg 以上の用量 (非結合型 C_{max} 3216 ng/mL 以上) では、多くの中枢神経系行動変化が観察された。ラットを用いて腎臓に対する影響を検討したところ、3 または 10 mg/kg では尿量および電解質排泄に影響がなかったが、100 mg/kg ではカリウム排泄が増加し、塩素排泄および尿量が減少傾向を示した。ラットにおいて胃内容排出は 30 mg/kg 以上の用量で阻害 (68%まで低下) され、同用量では腸運動性も低下した。

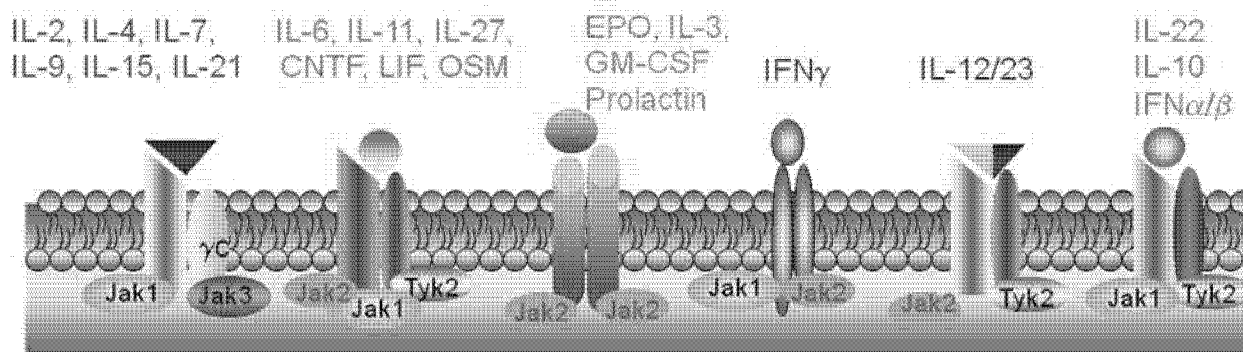
なお、経口投与試験ではトファシチニブクエン酸塩を用い、また、本概要文中ではトファシチニブの投与量を遊離塩基当量で表した。

図1 JAK1 および JAK 3 を介したシグナル伝達経路



Ag = Antigen; γ c = Common-gamma chain; Ig = Immunoglobulin; IL = Interleukin; JAK = Janus Kinase; NK = Natural killer; P = Phosphate; STAT = Signal transducer and activator of transcription.

図2 JAKファミリーと会合する受容体



CNTF = Ciliary neurotrophic factor; EPO = Erythropoietin; γ c = Common-gamma chain; GM-CSF = Granulocyte/macrophage colony stimulating factor; IFN = Interferon; IL = Interleukin; JAK = Janus Kinase; LIF = Leukemia inhibitory factor; OSM = Oncostatin M; STAT = Signal transducer and activator of transcription; Tyk=Tyrosine kinase.

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

- (1) *in vitro* および *ex vivo* 試験 (報告書番号 D08AI0333, D08AI0334, CP-690550, [REDACTED] 083053, D08AI0337, D08AI0338, CP-690,550/[REDACTED]/113015, CP-690,550/[REDACTED]/153609, [Immunology Discovery Biology Report] Effect of CP-690,550 on Interleukin-2 Dependent T-Cell Blast Proliferation, Effect of CP-690,550 in a Human Mixed Lymphocyte Response, Effect of CP-690,550 on GM-CSF Dependent HU03 Cell Proliferation, Effect of CP-690,550 in a Cynomolgus Mixed Lymphocyte Response, Effect of CP-690,550 in a Murine Mixed Lymphocyte Response, Effect of CP-690,550 on Human Foreskin Fibroblast Proliferation)

トファシチニブの主な *in vitro* での特性を表 1 に要約した。トファシチニブの JAK1, JAK2, JAK3 および Tyk2 に対する IC₅₀ はそれぞれ 3.2 nmol/L, 4.1 nmol/L, 1.6 nmol/L および 34 nmol/L で, JAK ファミリー以外のその他のキナーゼと比較して高い選択性を示した (報告書番号 D08AI0333, CP-690550, [REDACTED] 083053)。

細胞を用いた試験では, JAK はγ鎖サブユニットを有する受容体に結合するサイトカインに対しては JAK1 と JAK3, IL-6 に対しては JAK1, JAK2 と Tyk2, IFNα に対しては JAK1 と Tyk2 といったそれぞれ異なる JAK ファミリーが会合する受容体サブユニットを介したサイトカインシグナルを伝達した。造血性サイトカインは JAK2 が会合するホモ二量体受容体と結合してシグナルを伝達した。JAK の組み合わせに依存する細胞を用いた試験では, トファシチニブの効力を測定するために, 一連の細胞を用いたアッセイを実施した。トファシチニブは, JAK3 および JAK1 が媒介するヒト IL-2 依存的 T 細胞増殖試験 (IC₅₀ = 11 nmol/L) およびヒト混合リンパ球試験 (IC₅₀ = 87 nmol/L) において強力な阻害を示した。JAK2 により生じる GM-CSF 依存的ヒト赤血白血病細胞株 (HU03) 増殖試験における IC₅₀ は 324 nmol/L であったことから, *in vivo* でも高い曝露量で JAK2 阻害が生じる可能性が示唆される (表 1; Immunology Discovery Biology Report)。ヒト全血アッセイによる STAT リン酸化の検討では, 複数の種類の細胞において特定の STAT のリン酸化についてトファシチニブの活性が測定できた。トファシチニブはヒト全血中で JAK1/3 によるシグナル伝達を 25~56 nmol/L の IC₅₀ で阻害し, これと同等の濃度範囲で JAK1/Tyk2 および JAK1/2 によるシグナル伝達も阻害した。IC₅₀ は細胞のタイプとリン酸化される STAT の両方に依存していた。例えば, CD3 陽性 T リンパ球では, IL-6 で促進される STAT1 のリン酸化は STAT3 のリン酸化よりも阻害されやすかった。JAK2 依存性の GM-CSF で促進される STAT5 リン酸化は高濃度で阻害された (表 1; 報告書番号 CP-690,550/[REDACTED]/113015, D08AI0338)。IL-2 (JAK1/3) および IL-12 (JAK2/Tyk2) 刺激後の血液における IFNγ 蛋白の産生を比較したところ, 軽度な選択性も認められた (表 1; 報告書番号 D08AI0337)。以上より, *in vitro* でのヒト全血データから, 細胞レベルではトファシチニブは JAK3 および JAK1 依存的シグナル伝達を強力に阻害し, JAK1/Tyk2 および JAK2 ホモ二量体のシグナル伝達にも中等度の機能的選択性を有すると考えられた。また, マウス全血を用いた *ex vivo* 試験においても同様の結果が認められ, トファシチニブは IL-15 (JAK1/3), IL-6 (JAK1/2) および GM-CSF (JAK2) による STAT リン酸化をそれぞれ 273, 470 および 6656 nmol/L で阻害した (報告書番号 CP-690,550/[REDACTED]/153609)。

表 1 トファシチニブの *in vitro* での薬理学的特性

パラメータ	IC ₅₀ (nmol/L)	Ki (nmol/L)
酵素活性阻害 (報告書番号 D08AI0333, D08AI0334)		
遺伝子組換え型ヒト JAK3	1.6	0.24
遺伝子組換え型ヒト JAK2	4.1	0.97
遺伝子組換え型ヒト JAK1	3.2	0.68
遺伝子組換え型ヒト TyK2	34	4.4
増殖作用に基づく細胞活性 (Immunology Discovery Biology Report)		
ヒト IL-2 による T 細胞芽球増殖	11	
GM-CSF による HU03 増殖	324	
ヒト混合リンパ球培養	87	
カニクイザル混合リンパ球培養	52	
マウス混合リンパ球培養	115	
ヒト包皮線維芽細胞増殖	>10000	
蛋白質情報に基づく細胞活性 (報告書番号 D08AI0337)		
ヒト PBMC における IL-2 による IFN γ 産生 (JAK1/3)	26	
ヒト PBMC における IL-12 による IFN γ 産生 (JAK2/TyK2)	129	
ヒト全血における IL-2 による IFN γ 産生 (JAK1/3)	34	
ヒト全血における IL-12 による IFN γ 産生 (JAK2/TyK2)	501	
STAT リン酸化に基づくヒト全血中の細胞活性^a (報告書番号 CP-690,550/██████████/113015, D08AI0338)		
CD3+ T リンパ球		
IL-2 JAK1/3 依存的 STAT5 リン酸化	28	
IL-4 JAK1/3 依存的 STAT6 リン酸化	50	
IL-7 JAK1/3 依存的 STAT5 リン酸化	38	
IL-15 JAK1/3 依存的 STAT5 リン酸化	30	
IL-21 JAK1/3 依存的 STAT3 リン酸化	25	
IL-10 JAK1/TyK2 依存的 STAT3 リン酸化	141	
IFN α JAK1/TyK2 依存的 STAT1 リン酸化	44	
IL-6 JAK1/2 依存的 STAT1 リン酸化	54	
IL-6 JAK1/2 依存的 STAT3 リン酸化	367	
CD8+ T リンパ球		
IL-15 JAK1/3 依存的 STAT5 リン酸化	56	
CD14+ 単球		
GM-CSF JAK2 依存的 STAT5 リン酸化	1377	
IL-6 JAK1/2 依存的 STAT3 リン酸化	406	
IFN γ JAK1/2 依存的 STAT1 リン酸化	178	
IFN α JAK1/TyK2 依存的 STAT1 リン酸化	148	
IL-10 JAK1/TyK2 依存的 STAT3 リン酸化	206	
CD20+ B リンパ球		
IL-4 JAK1/3 依存的 STAT6 リン酸化	111	

GM-CSF = 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子; IC = 阻害濃度; IFN = インターフェロン; IL = インターロイキン; JAK = ヤヌスキナーゼ; PBMC = 末梢血単核球; STAT = シグナル伝達兼転写活性化因子; TyK = チロシンキナーゼ

^a STAT リン酸化は FACS による細胞内染色により検出

(2) 関節炎モデル動物での *in vivo* 試験

コラーゲン誘発関節炎モデル (CIA モデル) では、雄性 DBA/1J マウスの尾根部内にフロイント完全アジュバントと混合したニワトリ II 型コラーゲン (CII) 50 μ g を注射し、3 週後にフロイント不完全アジュバントと混合した CII 50 μ g を接種することにより関節炎を誘発させた。初回免疫処置の約 45 日後に、各足蹠の炎症の重症度を 0~3 のスコアで点数化し (各動物で最高 12 点)、足蹠の関節炎を評価した。すなわち、腫脹または発赤がない場合は 0 点、足蹠の腫脹、発赤また

はそれらの両方の場合は1点、足蹠全体の著しい腫脹、変形またはそれらの両方の場合は2点、関節強直は3点とした。

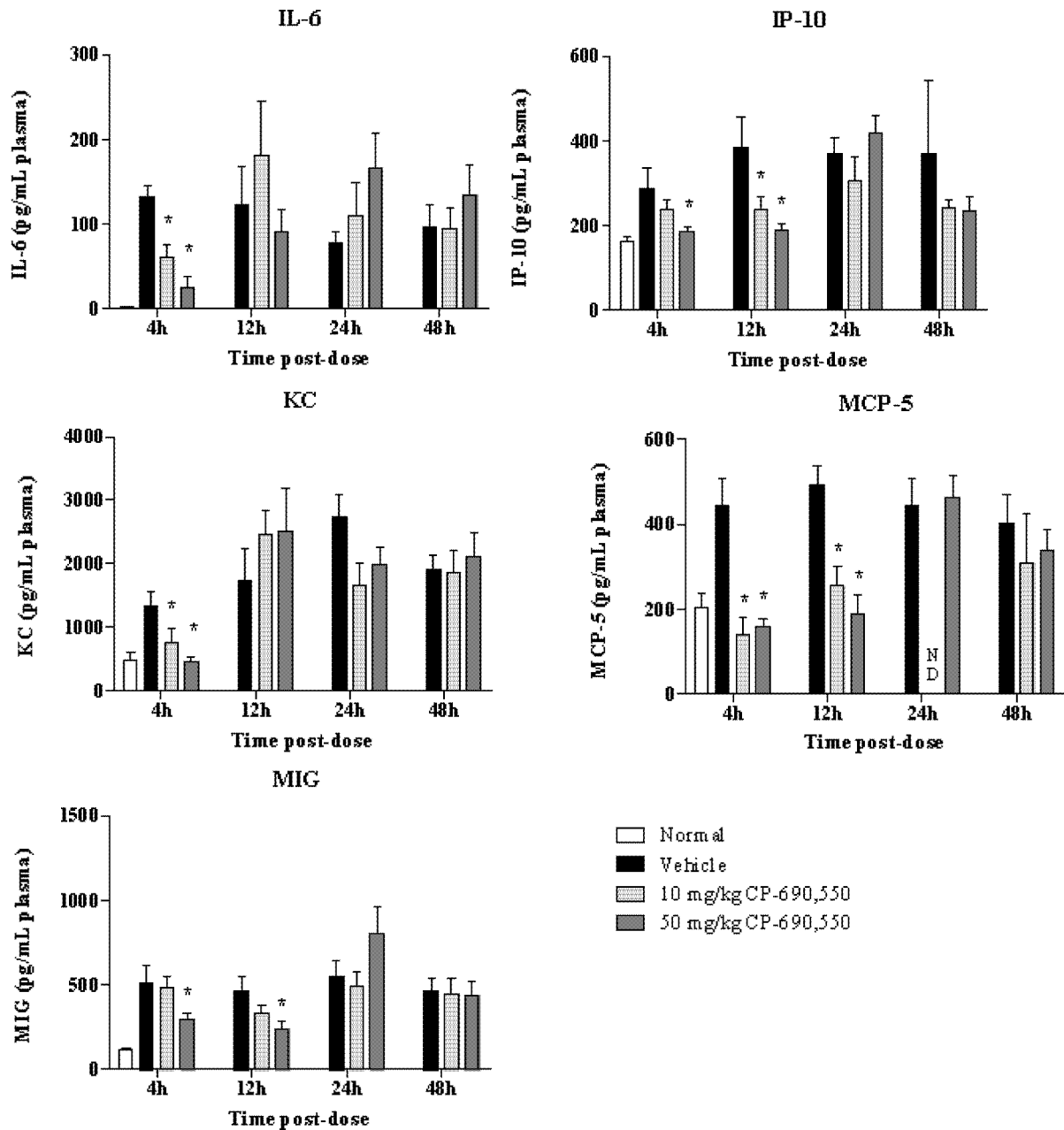
一方、アジュバント誘発関節炎モデル（AIA モデル）では、雌性 Lewis ラットに熱殺菌した *Mycobacterium butyricum* 15 mg/mL の油懸濁液を浅麻酔下で尾根部に3回皮内注射（計 2.5 mg/ラット）して関節炎を誘発させた。関節炎の重症度は、足容積測定装置を用いて平均足蹠容積で評価した。

すべての動物を、投与前の重症度スコアおよび足蹠容積の平均値が各群で同等となるように割り付けた。ベースライン比較のために、各試験に無処置動物群も設けた。関節炎モデルに対するトファシチニブの効果は、炎症スコア、軟骨障害、パンス形成および骨吸収、関節の病理組織学的検査、免疫組織化学的検査ならびに JAK/STAT リン酸化、足蹠容積およびサイトカインの測定等により評価した。

1) マウス CIA モデルにおけるトファシチニブ単回投与試験（報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /141423）

炎症反応が確立した時期（試験 43 日）にトファシチニブ（10 または 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与 4、12、24 および 48 時間後に血漿中の炎症性サイトカインおよびケモカインを測定した。トファシチニブの 10 mg/kg 投与により、IL-6、KC (keratinocyte-derived chemokine) および MCP (monocyte chemotactic protein) -5 の血漿中レベルが投与 4 時間後に有意に低下した（図 3）。MCP-5 の低下は、10 mg/kg の投与 12 時間後でも統計学的に有意なままであったが、他には本薬と関連のある作用は認められなかった。50 mg/kg を単回投与した群では、IL-6、IP-10、KC、MCP-5 および MIG (monokine induced by interferon gamma) の有意な低下が投与 4 時間後に認められた。投与 12 時間後には、IL-6 および KC のレベルは溶媒対照群と同程度となったが、IP-10、MCP-5 および MIG のレベルは有意に低下したままであった。10 または 50 mg/kg の投与 24 および 48 時間後には、炎症性サイトカインの低下は認められなかった。

図3 マウス CIA モデルの血漿中サイトカインに対するトファシチニブの作用



炎症反応が確立した時期（試験 43 日）にトファシチニブ（10 または 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与 4、12、24 および 48 時間後に血漿中の炎症性サイトカインおよびケモカインを測定した。データは、mean±SEM で示す。* p < 0.05 (t-test, 対照群との比較。)

(出典：報告書番号

CP-690,550/ /141423, Figure 1)

2) マウス CIA モデルにおける予防的投与試験（報告書番号 CP-690,550/ /151443）

CIA 疾患モデルにおいてトファシチニブの予防療法としての有用性を検討した。トファシチニブ [1~100 mg/kg BID (Study 2), 0.5~50 mg/kg BID (Study 3) または 1~100 mg/kg QD (Study 4, 5)] を追加免疫翌日から試験終了日（試験 22~56 日）まで経口投与したところ、関節炎症状の発現頻度および重症度が有意に低下した (ED₅₀: 15 mg/kg BID; 29 mg/kg QD, 表 2)。試験終了日の

投与 1 時間後に採血した血液を用いて、JAK-STAT リン酸化を評価したところ、IL-15 (JAK1/3)、IL-6 (JAK1/2) および GM-CSF (JAK2) の ED₅₀ はそれぞれ、 BID では 3, 5 および > 100 mg/kg, QD では 3, 7 および 91 mg/kg であり (表 3)、 JAK1/3 および JAK1/2 の阻害に比し、 JAK2 阻害は軽微であった。

表2 マウス CIA モデルにおけるトファシチニブの作用（病態の重症度スコアと ED₅₀）

2A: Study 2 efficacy and ED ₅₀ estimates									
Treatment Group	Dose (mg/kg)	Average Severity Score ± SEM			% Incidence	AUC ± SEM	% Control (AUC)	ED ₅₀ (AUC)	
		Day 42	Day 49	Day 56				mg/kg/day	95% CI
Vehicle BID	-	3.4 ± 0.8	4.4 ± 0.7	5.2 ± 0.6	92	132 ± 25.6	100 ± 0.0	-	-
CP-690,550 BID	1	3.0 ± 0.6	3.8 ± 0.6	5.3 ± 0.5	100	118.7 ± 19.2	89 ± 13.9	14	7 - 28
	3	1.0 ± 0.5	2.1 ± 0.7	2.8 ± 0.7	75	49.0 ± 18.8*	37 ± 14.1		
	10	1.8 ± 0.5	2.1 ± 0.4	3.3 ± 0.5	83	69.1 ± 15.9**	52 ± 11.9		
	30	0.6 ± 0.2	2.2 ± 0.7	2.6 ± 0.6	75	38.5 ± 11.0	29 ± 8.3		
	100	0.0	0.0	0.0	0	0.0 ± 0.0*	0		
Prednisolone BID	10	0.0	0.0	0.0	0	0*	0	-	-
Normal	-	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0	-	-

Analysis of variance on AUC for severity score. * p=0.000 vs vehicle BID; ** p=0.004 vs vehicle BID

3A: Study 3 efficacy									
Treatment Group	Dose (mg/kg)	Average Severity Score ± SEM			% Incidence	AUC ± SEM	% Control (AUC)	ED ₅₀ (AUC)	
		Day 42	Day 49	Day 56				mg/kg/day	95% CI
Vehicle BID	-	2.2 ± 0.4	4.2 ± 0.6	5.2 ± 0.5	100	102 ± 14.7	100.0 ± 0.0	-	-
CP-690,550 BID	0.5	2.3 ± 0.5	3.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7	100	97 ± 16.2	95.2 ± 15.9	16	7 - 37
	5	1.6 ± 0.4	2.4 ± 0.5	3.5 ± 0.5	90	68 ± 13.8	67.2 ± 13.6		
	50	0.0	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.4	30	6 ± 3.4*	6.0 ± 3.3		
Prednisolone BID	10	0.0	0.0	0.0	0	0*	0.0	-	-
Normal	-	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	-	-

Analysis of variance on AUC of severity score. * p=0.000 vs vehicle

4A: Study 4 efficacy									
Treatment Group	Dose (mg/kg)	Average Severity Score ± SEM			% Incidence	AUC ± SEM	% Control (AUC)	ED ₅₀ (AUC)	
		Day 42	Day 49	Day 56				mg/kg/day	95% CI
Vehicle	-	2.6 ± 0.7	4.2 ± 0.8	4.7 ± 0.7	90	110 ± 23.6	100 ± 0.0	-	-
CP-690,550 QD	1	3.1 ± 0.4	4.4 ± 0.4	5.5 ± 0.5	100	126 ± 11.5	115 ± 10.5	31	12 - 79
	3	2.8 ± 0.6	5.0 ± 0.4	5.5 ± 0.4	100	123 ± 15.9	112 ± 14.5		
	10	2.0 ± 0.5	4.0 ± 0.6	4.6 ± 0.6	90	93.1 ± 17.3	85 ± 15.8		
	30	2.0 ± 0.6	3.4 ± 1.1	3.6 ± 1.0	80	85.4 ± 26.4	78 ± 24.1		
	100	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.5	30	10.9 ± 5.6*	10 ± 5.1		
Prednisolone BID	10	0.0	0.0	0.0	0	0*	0	-	-
Normal	-	0.0	0.0	0.0	0	0	0	-	-

Analysis of variance on AUC of severity score. * p=0.000 vs vehicle

5A: Study 5 efficacy									
Treatment Group	Dose (mg/kg)	Average Severity Score ± SEM			% Incidence	AUC ± SEM	% Control (AUC)	ED ₅₀ (AUC)	
		Day 42	Day 49	Day 56				mg/kg/day	95% CI
Vehicle	-	2.5 ± 0.9	3.4 ± 0.8	3.2 ± 0.9	70	96 ± 26.4	100 ± 0.0	-	-
CP-690,550 QD	1	1.7 ± 0.7	2.7 ± 0.8	3.6 ± 0.9	70	73 ± 23.6	76 ± 24.6	27	10 - 73
	3	1.9 ± 0.7	3.1 ± 0.7	3.7 ± 0.4	100	80 ± 22.3	84 ± 23.2		
	10	2.1 ± 0.7	5.1 ± 0.5	5.4 ± 0.5	100	106 ± 21.6	110 ± 22.4		
	30	0.8 ± 0.6	1.7 ± 0.7	1.3 ± 0.6	40	36 ± 19.5*	38 ± 20.2		
	100	0.3 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.7 ± 0.4	78	22 ± 8.1**	23 ± 8.4		
Prednisolone BID	10	0.1 ± 0.1	0.0	0.1 ± 0.1	10	3 ± 2.4#	3 ± 2.5	-	-
Normal	-	0.0	0.0	0.0	0	0	0	-	-

Analysis of variance: * p<0.05 vs vehicle, **p=0.007 vs vehicle, #p=0.001 vs vehicle

トファシチニブ [0.5~100 mg/kg 1日2回 (BID) または 1日1回 (QD)] を追加免疫翌日から試験終了日 (試験 22~56 日) まで経口投与し、関節炎症状の発現頻度および重症度 (スコア) を評価した。

(出典: 報告書番号 CP-690,550/151443, Tables 4, 8, 13, 18)

表3 マウス CIA モデルにおけるトファシチニブの BID あるいは QD 投与時の
各種パラメータに対する ED₅₀ あるいは EC₅₀

Summary Table: CP-690,550 BID and QD combined data for ED ₅₀ and EC ₅₀ estimates					
BID dosing	Study 3: ED ₅₀ and EC ₅₀ from target modulation and efficacy				
	Cytokine Pathway	ED ₅₀ (C _{max})		EC ₅₀ (C _{max})	
		mg/kg/day	95% CI	nM	95% CI
	IL-15 (JAK1/3)	3	2 - 5	130	40 - 480
	IL-6 (JAK1/2)	5	4 - 5	190	10 - 580
	GM-CSF (JAK2)	> 100	-	> 5520	-
	% Control AUC	16	7 - 37	-	-
AUC (efficacy vs exposure)	ND	-	-	-	
QD dosing	Studies 4 & 5: ED ₅₀ and EC ₅₀ from target modulation and efficacy				
	Cytokine Pathway	ED ₅₀ (C _{max})		EC ₅₀ (C _{max})	
		mg/kg/day	95% CI	mM	95% CI
	IL-15 (JAK1/3)	3	2 - 4	90	54 - 160
	IL-6 (JAK1/2)	7	4 - 9	200	10 - 400
	GM-CSF (JAK2)	91	57 - 221	> 3860	-
	% Control AUC	29	10 - 79	-	-
AUC (efficacy vs exposure)	37	-	-	-	

Estimates of ED₅₀ and EC₅₀ was calculated based on the fitted model in Lab stats program

(出典: 報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /151443, Table 23)

3) マウス CIA モデルにおける重症度, 病理組織学的検査, 免疫組織化学的検査および転写遺伝子に関する試験 (報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /160243, CP-690,550/ [REDACTED] /165255, CP-690,550/ [REDACTED] /135046)

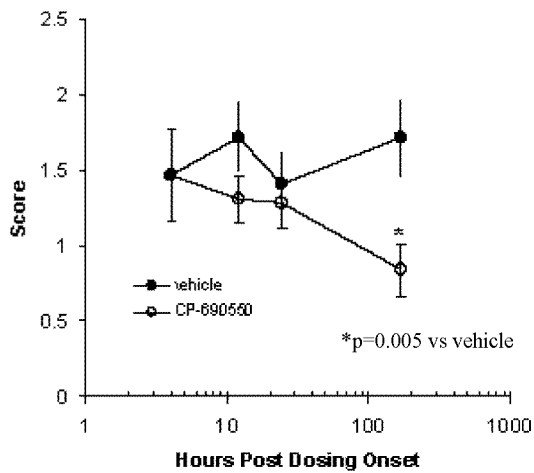
関節炎発症後にトファシチニブを投与したときの治療効果について評価した。すなわち, 免疫処置後の試験 48~55 日に, トファシチニブ (50 mg/kg BID) を CIA マウスに経口投与した。炎症反応は, 投与 4, 12, 24 時間および 168 時間 (7 日) 後に病理組織学的検査および免疫組織化学的検査で評価した。溶媒対照と比較して, トファシチニブ投与 7 日後には組織中および関節腔の炎症細胞浸潤, F4/80 陽性細胞数および CD3 陽性細胞数が統計学的に有意に減少した (図 4)。トファシチニブ投与群の投与 24 時間後および 7 日後に, 破骨細胞が媒介する骨吸収の減少も認められたが, この減少は有意ではなかった (図 4)。本試験に用いた用量では, トファシチニブ投与による軟骨障害の低減およびパンス形成抑制はみられなかった (報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /160243)。

CIA マウスにおけるトファシチニブの効果を分子レベルでさらに検討するために, トファシチニブ (50 mg/kg BID) を免疫処置後の試験 48~55 日に経口投与し, 後肢足蹠組織中および血漿中の炎症性サイトカインを投与 4 時間, 24 時間, 4 日および 7 日後 (試験 48~55 日) に評価した。トファシチニブの投与から 3 日以内に足蹠の炎症が低減し, 投与 4 日後には重症度スコアが有意に低下した (図 5)。血漿中 G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), IL-6, IP-10 (interferon inducible protein-10), MCP-1 および血清アミロイド A 濃度に加えて足蹠組織中 G-CSF, IL-6 および MCP-1 濃度が投与 4 時間後に統計学的に有意に低下したことから (図 6), トファシチニブの作用発現は速いものと考えられた (報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /165255)。

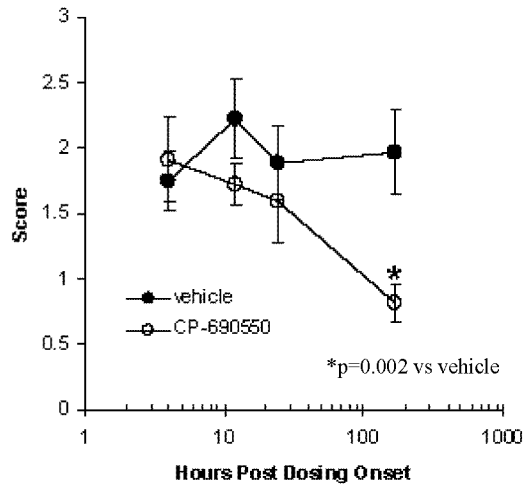
同様に, CIA マウスにトファシチニブ (50 mg/kg BID) を免疫処置後の試験 48~55 日に投与したところ, 炎症を惹起した後肢では投与 4 時間後から試験終了時まで STAT1 応答遺伝子群の統計学的に有意な低下がみられた (表 4)。各種の細胞マーカーも, 投与 4 日から投与 7 日の間に溶媒対照と比較して有意な変化を示した。トファシチニブ投与群では, ナチュラルキラー (NK) 細胞関連遺伝子が mRNA レベルで急速 (24 時間) かつ強力に抑制され, マクロファージ, B 細胞, T 細胞および破骨細胞に関連する遺伝子群は投与 7 日までに有意に抑制された (報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /135046)。

図4 マウス CIA モデルにおける炎症スコアに対するトファシチニブの作用

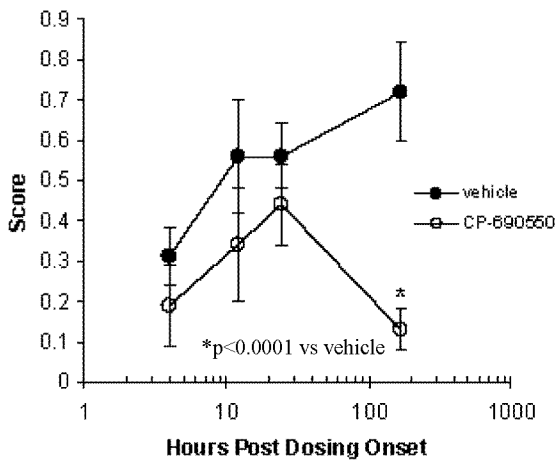
(a) 炎症の病理組織学的スコア



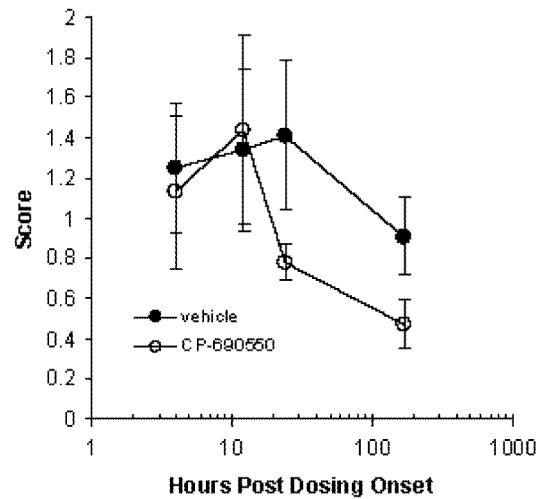
(b) F4/80 陽性細胞の IHC スコア



(c) CD3 陽性細胞の IHC スコア



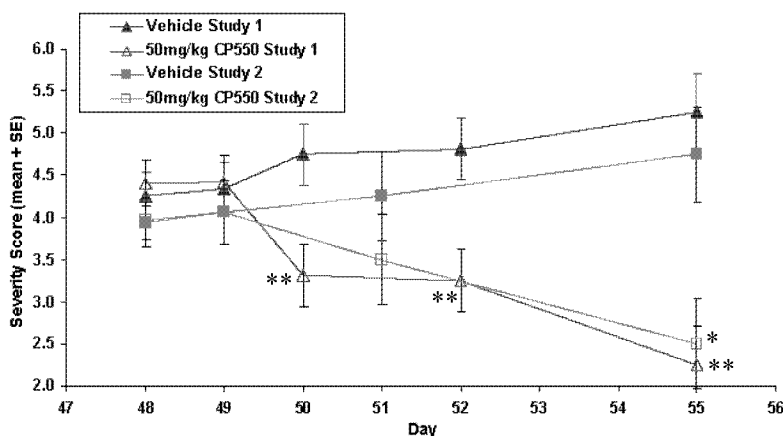
(d) 骨吸収の病理組織学的スコア



免疫処置後の試験 48~55 日に、トファシチニブ (50 mg/kg BID) を CIA マウスに経口投与した。炎症反応は、投与 4, 12, 24 および 168 時間 (7 日) 後に病理組織学的検査および免疫組織化学的検査で評価した。データは mean±SEM で示す。統計的有意差が認められた際の p 値は図中に示す (ANOVA, 対照群との比較)。IHC: 免疫組織化学的検査

(出典: 報告書番号 CP-690,550/160243, Figure 1~4)

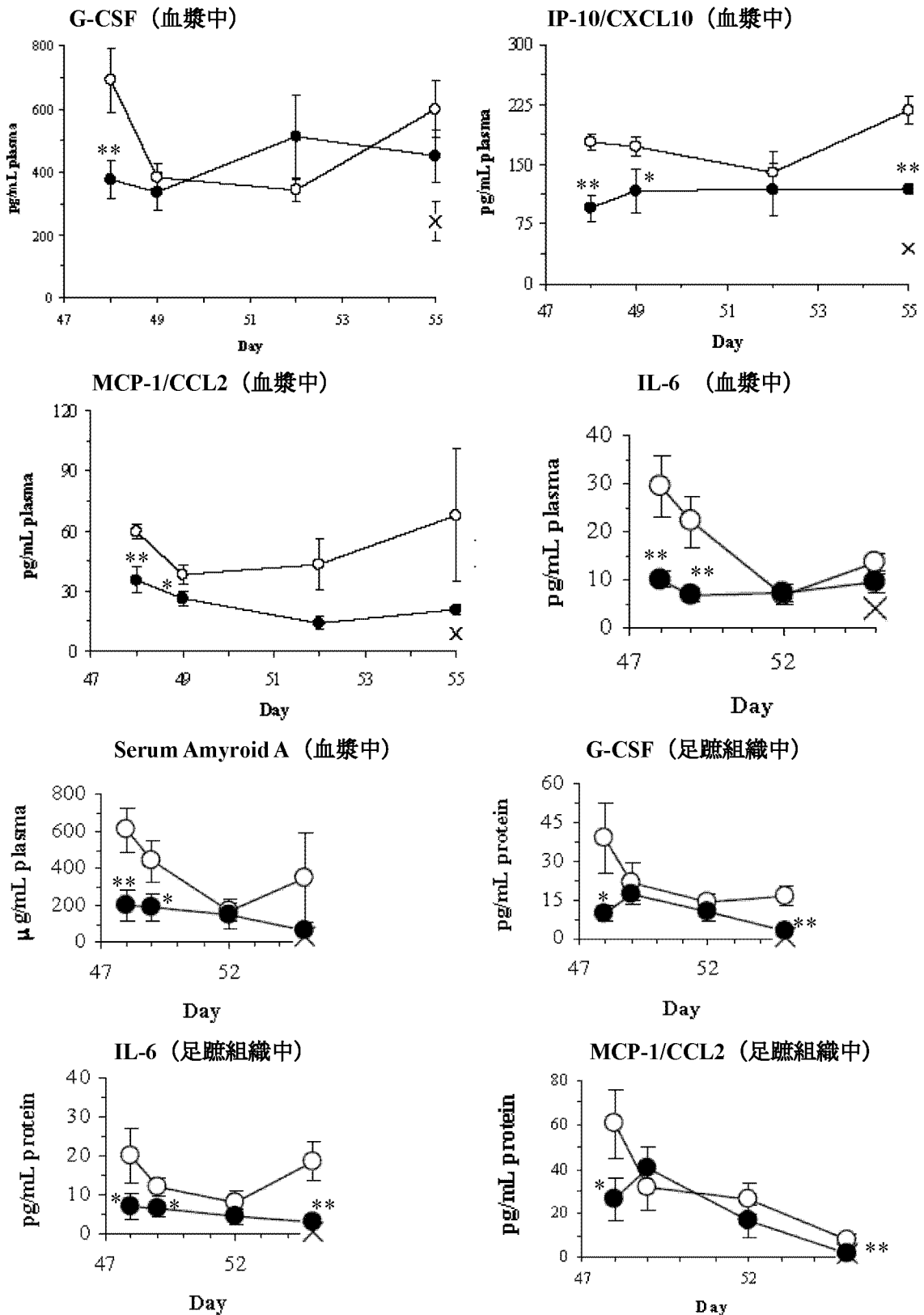
図5 マウス CIA モデルにおける重症度スコアに対するトファシチニブの作用



トファシチニブ (50 mg/kg BID) を免疫処置後の試験 48~55 日に経口投与し、重症度を評価した。データは mean±SEM で示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA, 対照群との比較)。

(出典: 報告書番号 CP-690,550/165255, Figure 1, Table 1)

図6 マウス CIA モデルにおける血漿中および足蹠組織中炎症性サイトカインに対するトファシチニブの作用



X : 無処置, O : 溶媒投与群, ● : CP-690,550 投与群

トファシチニブ (50 mg/kg BID) を免疫処置後の試験 48~55 日に経口投与し, 後肢足蹠組織中および血漿中の炎症性サイトカインを投与 4 時間, 24 時間, 4 日および 7 日後 (試験 48~55 日) に評価した。データは mean±SEM で示す。*p<0.05, **p<0.01 (t-test, 対照群との比較)

(出典 : 報告書番号 CP-690,550 /165255, Figure 2~3, Table 2~3)

表 4 マウス CIA モデルの足蹠組織における STAT1 応答遺伝子群に対するトファシチニブの作用

		Mouse CIA Fold Change							
		Vehicle vs Normal				CP-690550 vs Vehicle			
Stat1 Activation	Agilent ProbeID	0.17 Day	1 Day	4 Day	7 Day	0.17 Day	1 Day	4 Day	7 Day
Stat1	A_52_P70261	2.8	3.0	3.4	2.2	-1.9	-1.7	-2.3	-2.5
Oas2	A_51_P387123	4.2	4.0	4.6	5.7	-2.7	-2.9	-6.4	-6.0
Ifi47	A_51_P129229	2.8	3.2	4.1	2.6	-1.8	-1.9	-1.9	-2.8
Oas1a	A_52_P337357	5.7	6.1	6.7	5.4	-2.0	-2.5	-4.7	-6.6
Cxd11	A_52_P676403	2.2	2.0	1.5	1.1	-1.8	-2.7	-1.9	-2.3
Ifi204	A_51_P377620	2.8	2.6	2.9	1.8	-1.7	-1.7	-2.1	-1.9
Ifi7	A_51_P421876	3.3	3.9	4.5	2.1	-1.5	-2.3	-5.5	-5.0
Cxd10	A_51_P432641	3.3	1.9	2.3	2.3	1.1	-1.6	-2.6	-6.4
Sox3	A_51_P474459	1.2	1.3	-1.0	2.1	-1.6	-1.8	-2.1	-2.0

		Mouse CIA tTest							
		Vehicle vs Normal				CP-690550 Vs Vehicle			
Stat1 Activation	Agilent ProbeID	0.17 Day	1 Day	4 Day	7 Day	0.17 Day	1 Day	4 Day	7 Day
Stat1	A_52_P70261	7.E-04	4.E-04	9.E-06	4.E-04	9.E-05	6.E-04	7.E-09	2.E-10
Oas2	A_51_P387123	2.E-03	1.E-04	3.E-05	1.E-04	1.E-04	1.E-06	2.E-11	5.E-11
Ifi47	A_51_P129229	7.E-04	2.E-04	9.E-05	4.E-05	1.E-04	1.E-04	2.E-05	1.E-11
Oas1a	A_52_P337357	5.E-04	2.E-05	1.E-05	4.E-05	5.E-04	6.E-06	1.E-10	3.E-12
Cxd11	A_52_P676403	5.E-03	NS	2.E-02	NS	1.E-03	5.E-03	2.E-06	2.E-07
Ifi204	A_51_P377620	4.E-03	2.E-03	5.E-04	1.E-02	5.E-03	1.E-03	6.E-06	1.E-05
Ifi7	A_51_P421876	1.E-02	6.E-03	1.E-03	2.E-03	4.E-02	2.E-03	5.E-08	9.E-12
Cxd10	A_51_P432641	5.E-02	NS	NS	1.E-02	NS	NS	6.E-03	2.E-08
Sox3	A_51_P474459	NS	NS	NS	3.E-03	NS	1.E-02	3.E-04	8.E-06

Genes known to be upregulated by STAT1 signaling are listed below, both by fold change and value.

CIA マウスにトファシチニブ (50 mg/kg BID) を免疫処置後の試験 48~55 日に投与し, STAT1 応答遺伝子群の変化を測定した。STAT1 活性化マーカーの変化率 (上段) と t-test 結果 (下段) を示す。NS: not significant

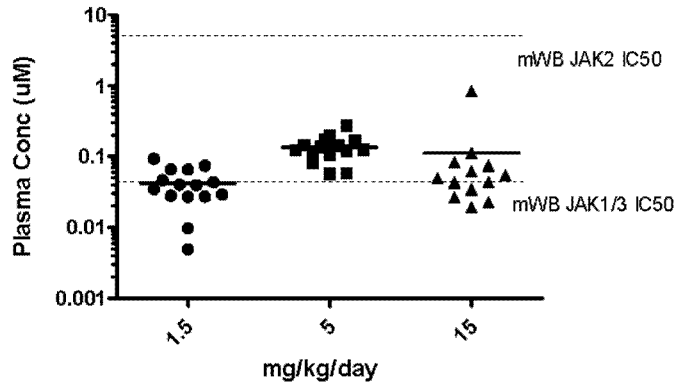
(出典: 報告書番号 CP-690,550/135046, Table 2)

4) マウス CIA モデルにおける薬物動態/薬力学モデリング (報告書番号 CP-690550/150736)

マウス CIA モデルにおけるトファシチニブの有効性を, 異なる投与方法, すなわち, BID 経口投与, QD 経口投与および浸透圧ポンプによる皮下投与により評価した。試験 (報告書番号 CP-690,550/151443) で採取した血漿検体から得られた薬物動態の曝露量をモデル化し, JAK に対する *in vitro* での効力および有効性エンドポイントと関連づけた。浸透圧ポンプによる皮下投与試験において得られた定常状態での血漿中薬物濃度より, トファシチニブが有効性を発揮する (EC₅₀ 44 nmol/L) には JAK1/3 阻害 (IL-15 STAT5 リン酸化 IC₅₀ 42 nmol/L) が重要であるが, JAK2 (GM-CSF STAT5 リン酸化 IC₅₀ 4379 nmol/L) は重要でないことが示された (図 7)。全体的に, BID (Cave 90~115 nmol/L) および QD (Cave 128~272 nmol/L) の投与スケジュールで投与したときの 24 時間 AUC₀₋₂₄ 値および Cave 値 (C_{max} および C_{min} ではない) が非臨床試験での有効性と最も相関した (表 5)。さらに, 経口投与での薬物動態プロファイルから, JAK1/3 シグナル伝達の持続的阻害は必要ではない可能性が唆された (図 8) が, BID または QD の投与スケジュールのどちらを用いるにかかわらず, 連日ある程度以上の時間 (約 9~13 時間/日) ED₅₀ 以上の濃度を維持する必要があることが示された (表 5)。臨床において, 関節リウマチの症状に対する有効性の評価から, 総 AUC₀₋₂₄ と良好な相関を示すこと, またトファシチニブが有効性を示すには, ヒト全血 JAK1/3 IC₅₀ (IL-21 STAT3 リン酸化 25 nmol/L) を上回る時間が持続する必要はなく, また JAK2 を阻害 (GM-CSF STAT5 リン酸化 1377 nmol/L) する必要もないことが明らかとなり, このことは非臨床試験モデル動物での結果と符合している。総合的に, JAK1/3 IC₅₀ 以上の

濃度を示す時間に基づいて非臨床関節炎モデルから予測した ACR20 ED₅₀ の臨床用量は、優れた外挿性を示した（報告書番号 CP-690550_150736）。

図7 トファシチニブを浸透圧ポンプで皮下投与したときの CIA マウスへの投与量と血漿中トファシチニブ濃度（Cave）



マウス CIA モデルにおいてトファシチニブを浸透圧ポンプで皮下投与したときの血漿中トファシチニブ濃度とマウス全血（mWB）での JAK1/3 IC₅₀ 値(42±12 nmol/L)と mWB JAK2 IC₅₀ 値（4379±655 nmol/L）の比較(mean±SEM)。

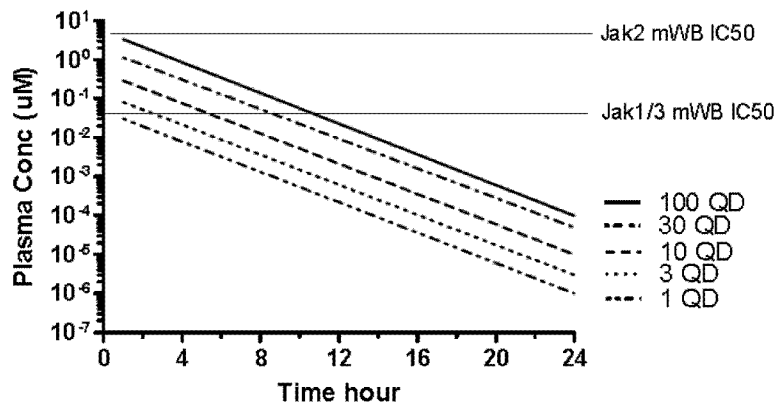
（出典：報告書番号 CP-690550_150736, Figure 2）

表5 トファシチニブを CIA マウスに浸透圧ポンプ（皮下）， BID あるいは QD（経口）投与したときの薬物動態パラメーター

Dosing Paradigm	mCIA Efficacy Parameters				
	24h AUC50 (ug*h/mL)	ED50 Dose (mg/kg)	Cmax/Cmin (nM)	Cave (nM) (95% CI)	Daily Time ≥ JAK1/3 IC50 (hr)
SC Pump				44 (12-76)	
BID PO	0.675	6.0	326/7	90 (19-160)	12
BID PO Repeat	0.854	12.8	394/10	115 (77-151)	13
QD PO	0.994	33.5	1140/0.03	128 (0-295)	8.5
QD PO Repeat	2.03	40.5	2140/0.2	272 (0-583)	11

（出典：報告書番号 CP-690550_150736, Table 1）

図8 トファシチニブをCIA マウスにQD（経口）投与したときの投与量と血漿中トファシチニブ濃度（Cave）



マウスCIAモデルにおいてトファシチニブを経口投与したときの血漿中トファシチニブ濃度とマウス全血(mWB)での JAK1/3 IC₅₀ (42±12 nmol/L) と mWB JAK2 IC₅₀ (4379±655 nmol/L) の比較(mean±SEM)。

(出典：報告書番号 CP-690550/██████████_150736, Figure 6)

5) ラット AIA モデルにおける予防的および治療的投与試験（報告書番号 CP-690,550/██████████/100214, CP-690,550/██████████/102743）

AIA ラットを用いた用量反応性試験を実施し、関節炎発症前にトファシチニブを投与した場合の有効用量を確認した（報告書番号 CP-690,550/██████████/100214）。免疫処置後の試験 11～21 日に 0.06～60 mg/kg BID または 0.06～18.5 mg/kg QD でトファシチニブを経口投与したところ、投与 10 日後の後肢足蹠容積が用量依存的に減少し（表 6）、その ED₅₀ は 0.06 mg/kg BID 未満および 0.66 mg/kg QD であった。また、そのときの AUC₀₋₂₄ はそれぞれ 0.162 μg·h/mL 未満および 0.395 μg·h/mL であった。6.17 mg/kg QD 投与により、足蹠腫脹は対照と比較して 79%もの顕著な低下を示した。末梢血好中球数（PBNC）は投与 10 日後に用量依存的に減少し、ED₅₀（溶媒対照と比較して PBNC が 50%減少する用量）は 1.7 mg/kg BID および 16.7 mg/kg QD であった。また、血漿中 IL-6 および IL-17 ならびに血漿中α2-マクログロブリン（急性期反応蛋白）も投与 7～10 日後に用量依存的に低下（6.17 mg/kg QD 以上の用量で 50%を超える低下）した（表 6）。しかし、後肢足蹠関節炎の発症を完全に抑制する用量のトファシチニブを投与しても、PBNC は無処置動物で認められたレベル以下には低下しなかった。また、トファシチニブ投与により、投与スケジュールに関係なく血漿コレステロール値が用量依存的に上昇した（ED₅₀：0.97 mg/kg BID；1.40 mg/kg QD）。

AIA 関節炎モデルを用いて別の用量反応性試験を実施し、関節炎発症後にトファシチニブを投与したときの効果を検討した（報告書番号 CP-690,550/██████████/102743）。免疫処置後の試験 14～21 日にトファシチニブを 0.02～18.5 mg/kg BID または 0.06～18.5 mg/kg QD もしくは隔日（QOD）で経口投与したところ、投与 7 日後に後肢足蹠容積が用量依存的に減少した（表 7）。ED₅₀ は 0.15 mg/kg BID および 6.3 mg/kg QD であり、そのときの AUC₀₋₂₄ はそれぞれ 1.27 μg·h/mL および 1.95 μg·h/mL であった。QOD 投与での ED₅₀ は 7.1 mg/kg であり、QD 投与とほぼ同等の値を示した。トファシチニブの BID または QD 投与により、投与 7 日後に PBNC が用量依存的に減少し（ED₅₀：2.0 mg/kg BID；11.1 mg/kg QD；>30 mg/kg QOD）、またいずれの投与スケジュールにおいても投与 7 日後には血漿コレステロール値が用量依存的に上昇した（ED₅₀：0.74 mg/kg BID；

0.89 mg/kg QD; 16.60 mg/kg QOD) (表 8)。AIA ラットにおけるトファシチニブ投与による PBNC 減少および血漿コレステロール値上昇は、無処置動物のレベルを超えない範囲であった。

表 6 ラット AIA モデルの足蹠容積, 血漿中サイトカイン, 末梢血好中球数, 血漿コレステロールに対するトファシチニブの作用

	用量 (mg/kg)	足蹠容積 (%Control)	IL-6 (%Control)	IL-17 (%Control)	α 2-Macrogloblin (%Control)
1 日 2 回投与	0.06	46			
	0.62	23			
	6.17	4			
	18.51	-1			
	1	18			
	3	7			
	10	-3			
	30	2			
	60	-2			
1 日 1 回投与	0.06	90	99	106	103
	0.62	38	64	126	71
	1.85	41	95	88	62
	6.17	21	22	29	11
	18.51	14	32	38	12
	用量 (mg/kg)	PBNC		血漿コレステロール	
		(%Control)	ED ₅₀ ±SEM (mg/kg)	(%Control)	ED ₅₀ ±SEM (mg/kg)
1 日 2 回投与	0.06			-5	0.97±2.21
	0.62			24	
	6.17			96	
	18.51			133	
	1	61	1.72±0.33		
	3	37			
	10	22			
	30	-2			
	60	-1			
1 日 1 回投与	0.06	96	16.7±5.1	2	1.40±0.58
	0.62	105		43	
	1.85	88		43	
	6.17	63		89	
	18.51	52		80	

免疫処置後の試験 11~21 日に 0.06~60 mg/kg BID または 0.06~18.5 mg/kg QD でトファシチニブを経口投与し、後肢足蹠容積, 末梢血好中球数 (PBNC), 血漿中 IL-6, IL-17, 血漿中 α 2-マクログロブリンおよび血漿コレステロールを測定した。

(出典: 報告書番号 CP-690,550/100214, Table 1, 4, 5, 6)

表 7 ラット AIA モデルの足蹠容積に対するトファシチニブの作用

	投与量 (mg/kg)	足蹠容積 (%Control)	ED ₅₀ ±SEM (mg/kg)
1日2回投与	0.02	56	0.15±0.08
	0.06	60	
	0.62	48	
	1.85	33	
	6.17	27	
	18.51	13	
1日1回投与	0.06	111	6.3±1.8
	0.62	87	
	1.85	68	
	6.17	48	
	18.51	35	
隔日投与 (1回目)	0.06	102	11.0±10.5
	0.18	80	
	0.62	65	
	1.85	65	
	6.17	42	
	18.51	59	
隔日投与 (2回目)	0.06	71	3.1±1.2
	0.18	79	
	0.62	62	
	1.85	62	
	6.17	41	
	18.51	33	

免疫処置後の試験 14~21 日にトファシチニブを 0.02~18.5 mg/kg BID または 0.06~18.5 mg/kg QD もしくは隔日 (QOD) で経口投与し、後肢足蹠容積を測定した。(出典: 報告書番号 CP-690,550/102743, Table 1, 2)

表 8 ラット AIA モデルの末梢血好中球数および血漿コレステロールに対するトファシチニブの作用

	投与量 (mg/kg)	PBNC		血漿コレステロール	
		(%Control)	ED ₅₀ ±SEM (mg/kg)	(%Control)	ED ₅₀ ±SEM (mg/kg)
1日2回投与	0.02	133	2.0±0.7	9	0.74±0.19
	0.06	114		10	
	0.62	85		41	
	1.85	54		77	
	6.17	11		84	
	18.51	-2		84	
1日1回投与	0.06	98	11.1±2.0	24	0.89±0.33
	0.62	106		48	
	1.85	83		58	
	6.17	69		60	
	18.51	35		88	
隔日投与	0.06	110	>30	3	16.60±3.13
	0.18	96		32	
	0.62	96		-7	
	1.85	121		11	
	6.17	109		15	
	18.51	96		55	

免疫処置後の試験 14~21 日にトファシチニブを 0.02~18.5 mg/kg BID, 0.06~18.5 mg/kg QD もしくは隔日 (QOD) で経口投与し、PBNC および血漿コレステロールを測定した。(出典: 報告書番号 CP-690,550/102743, Table 4, 5)

- 6) ラット AIA モデルにおける病理組織学的検査、免疫組織化学的検査および転写遺伝子に関する試験（報告書番号 CP-690,550/[REDACTED]/141740, CP-690,550/[REDACTED]/160531, CP-690,550/[REDACTED]/112613)

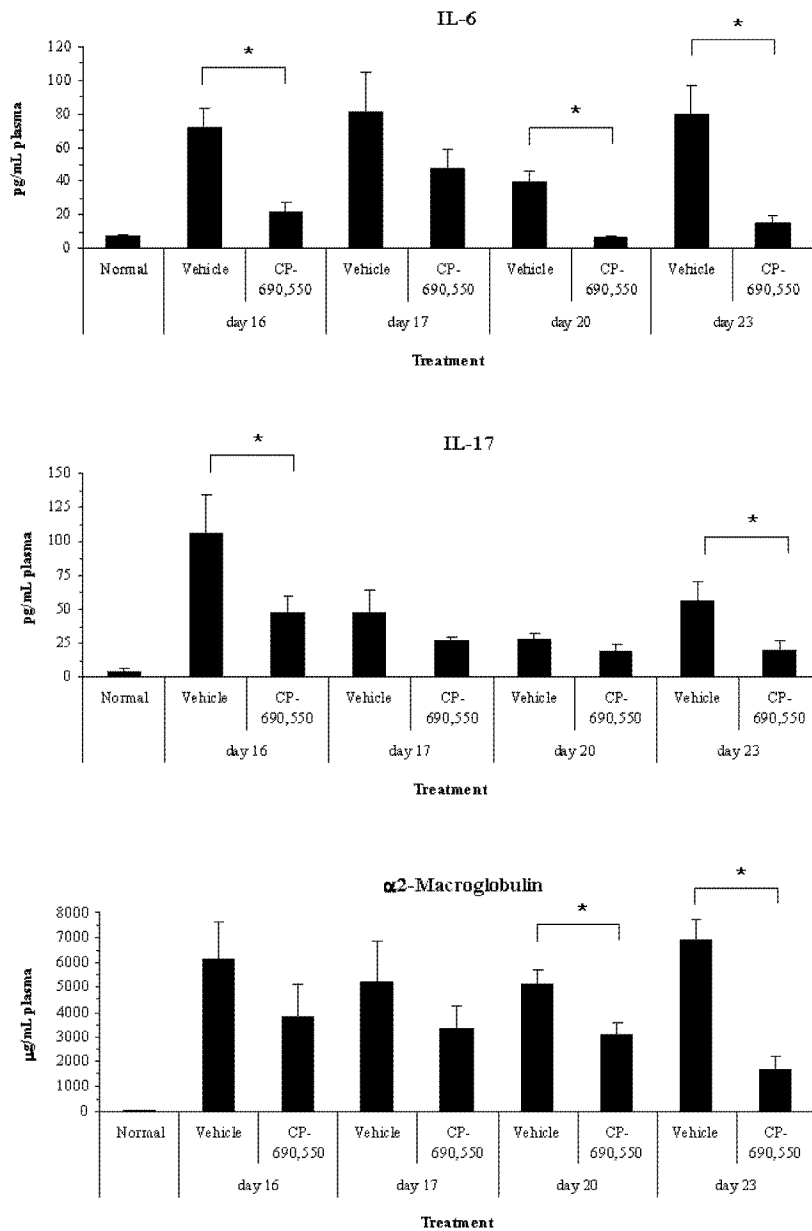
トファシチニブに関連する作用を分子レベルでさらに明らかにすることを目的として、AIA ラットの免疫処置後の試験 16~22 日に、トファシチニブ (6.2 mg/kg QD) を 7 日間経口投与し、試験 20 および 23 日に足蹠容積を測定した (報告書番号 CP-690,550/[REDACTED]/141740)。また、試験 16 および 20 日の投与 4 時間後、試験 22 日の投与 28 時間後 (試験 23 日) および試験 16 日の投与 24 時間後 (試験 17 日) の後肢足蹠組織中および血漿中における炎症性サイトカインおよび mRNA 量を測定した。その結果、IL-6 および IL-17 の血漿中濃度は試験 16 日 (投与初日) の投与 4 時間後に有意に低下したが、投与 24 時間後 (試験 17 日のトラフ) では低下がみられたものの有意差は認められなかった (図 9)。また、試験 20 および 23 日 (投与 4 および 7 日後) に足蹠浮腫の有意な縮小が認められ (図 10)、試験 23 日 (投与 7 日後) の IL-6、IL-17 および α 2-マクログロブリンの血漿中濃度は、溶媒と比較して有意に低下した。

足蹠組織中では、IL-6 濃度が投与初日 4 時間後に溶媒対照と比較して有意に低下したが、投与 24 時間後 (試験 17 日のトラフ) では低下が認められたものの有意差は認められなかった (図 11)。試験 23 日 (投与 7 日後) には、炎症誘発性サイトカインの IL-6、MCP-1、RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)、Gro/KC および MIP-1 α の足蹠組織中濃度が溶媒対照と比較して有意に低下した。AIA ラットで低下したレプチンおよび VEGF (vascular endothelial growth factor) はトファシチニブ投与によって回復した。

同様のスケジュールで AIA ラットにトファシチニブ (6.2 mg/kg QD) を 7 日間経口投与後、病理組織学的検査および免疫組織化学的検査を実施した試験 (報告書番号 CP-690,550/[REDACTED]/160531) では、試験 23 日 (投与 7 日後) のラット関節の炎症および破骨細胞による骨吸収が統計学的に有意に減少し、ED-1 (CD68) 陽性細胞および CD3 陽性細胞が有意に減少した (図 12)。トファシチニブは、試験に用いた用量ではパンス形成および軟骨破壊に影響しなかった。

さらに、同様のスケジュールで AIA ラットにトファシチニブ (6.2 mg/kg QD) を 7 日間経口投与後に転写遺伝子を検索した試験 (報告書番号 CP-690,550/[REDACTED]/112613) では、IL-6 mRNA および STAT1 応答遺伝子群は、トファシチニブ投与開始 4 時間後に統計学的に有意な低下を示したが、24 時間後 (2 回目の投与前) には顕著な差はみられなかった。トファシチニブ投与群のマクロファージ、B 細胞、T 細胞および破骨細胞に関連する遺伝子群は投与 7 日に有意に低下した。NK 細胞関連遺伝子は、投与開始 4 時間後から急速かつ強力に抑制され、その抑制は試験終了時まで持続した。

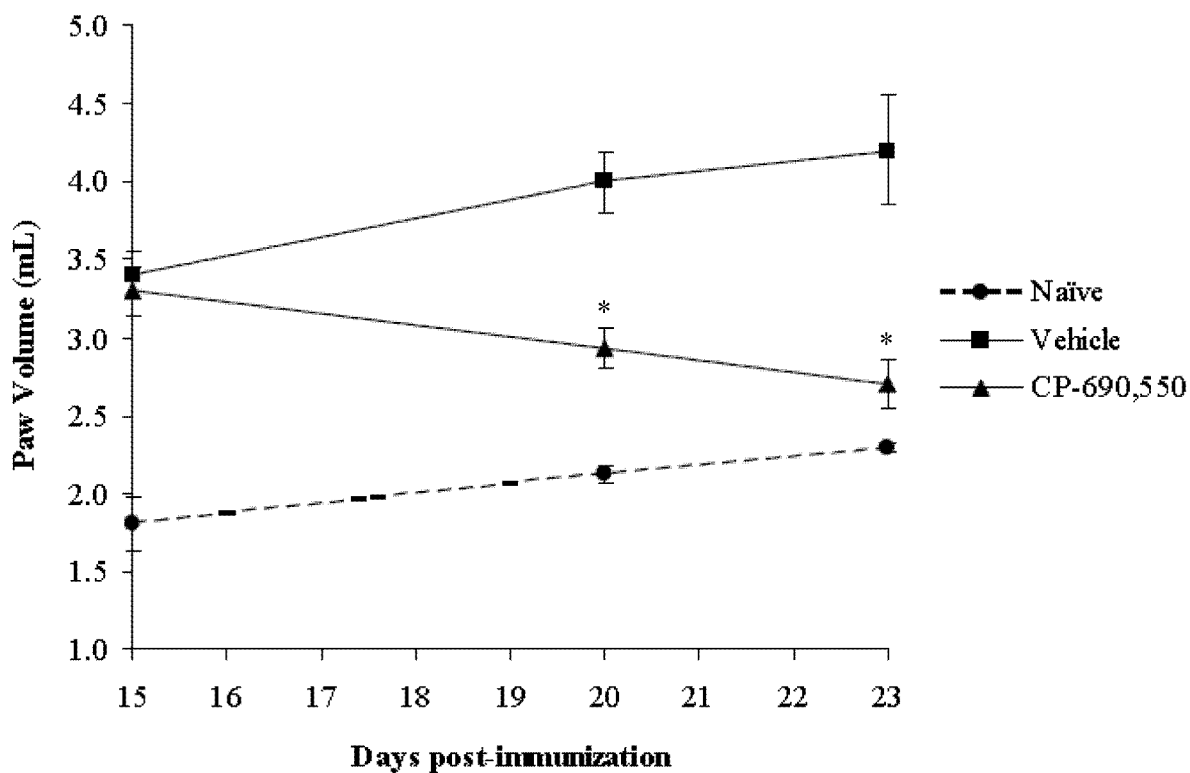
図9 ラット AIA モデルにおける血漿中 IL-6, IL-17 および A2M に対するトファシチニブの作用



AIA ラットの免疫処置後の試験 16~22 日にトファシチニブ (6.2 mg/kg QD) を 7 日間経口投与し、試験 16 および 20 日の投与 4 時間後、試験 22 日の投与 28 時間後 (試験 23 日) および試験 16 日の投与 24 時間後 (試験 17 日) の血漿中における炎症性サイトカインおよび A2M 量を測定した。* $p \leq 0.05$ (t-test, 対照群との比較)

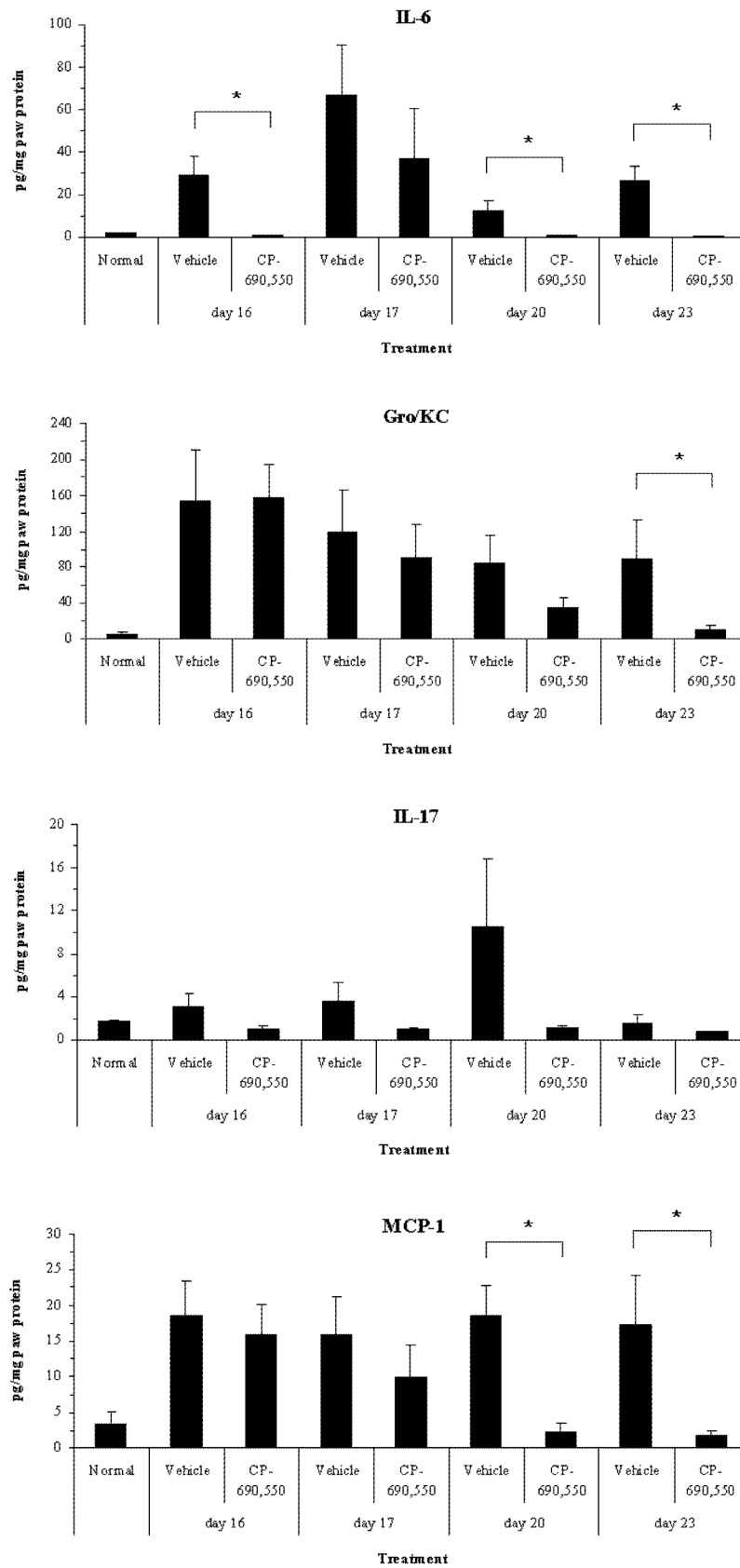
(出典: 報告書番号 CP-690,550/141740, Figure 2)

図 10 ラット AIA モデルにおける足蹠容積に対するトファシチニブの作用



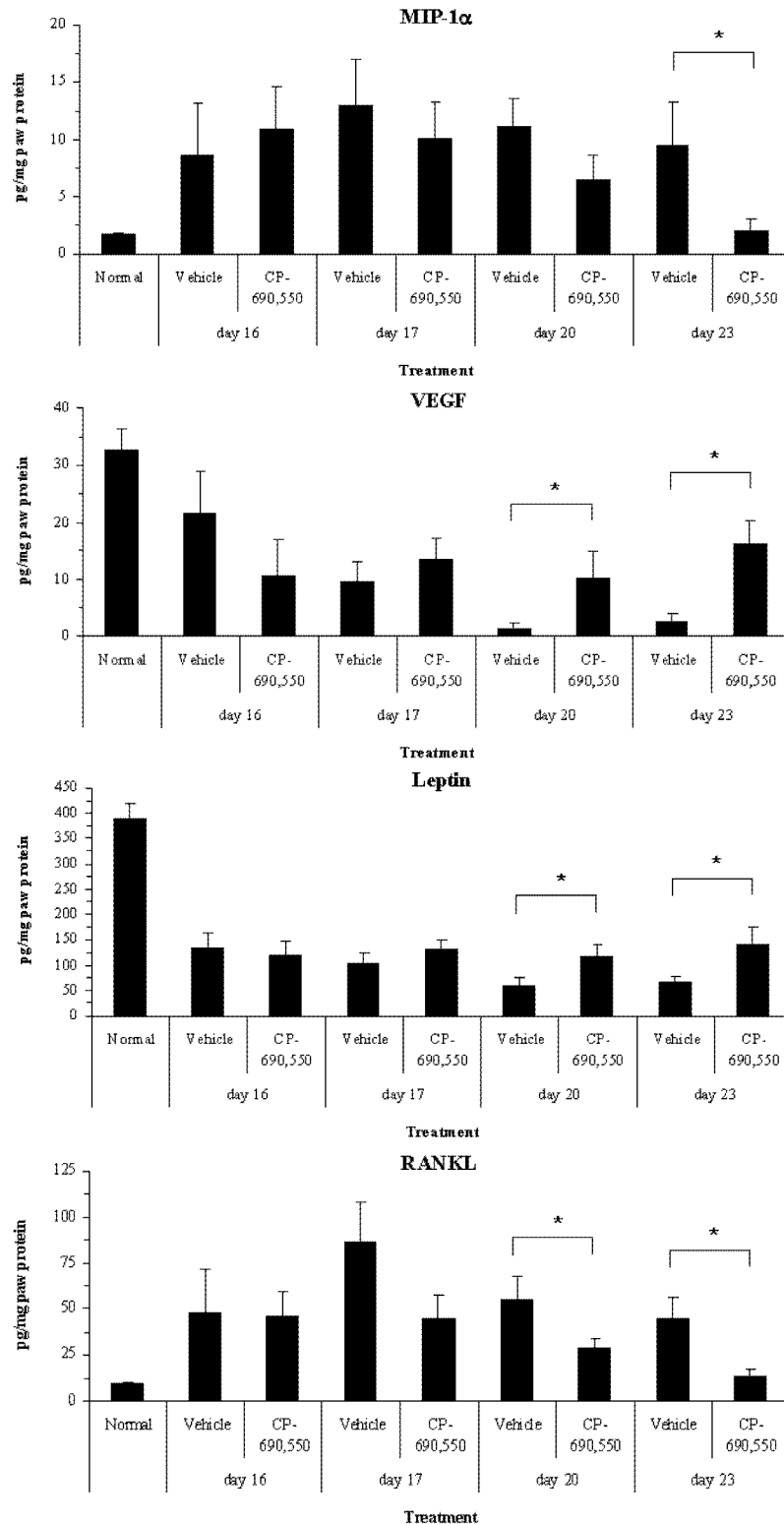
AIA ラットの免疫処置後の試験 16~22 日にトファシチニブを 7 日間経口投与し、試験 20 および 23 日に足蹠容積を評価した。データは mean±SEM で示す。* $p < 0.002$ (出典：報告書番号 CP-690,550-141740, Figure 1)

図 11 ラットAIAモデルにおける後肢足蹠組織中炎症性サイトカインに対するトファシチニブの作用



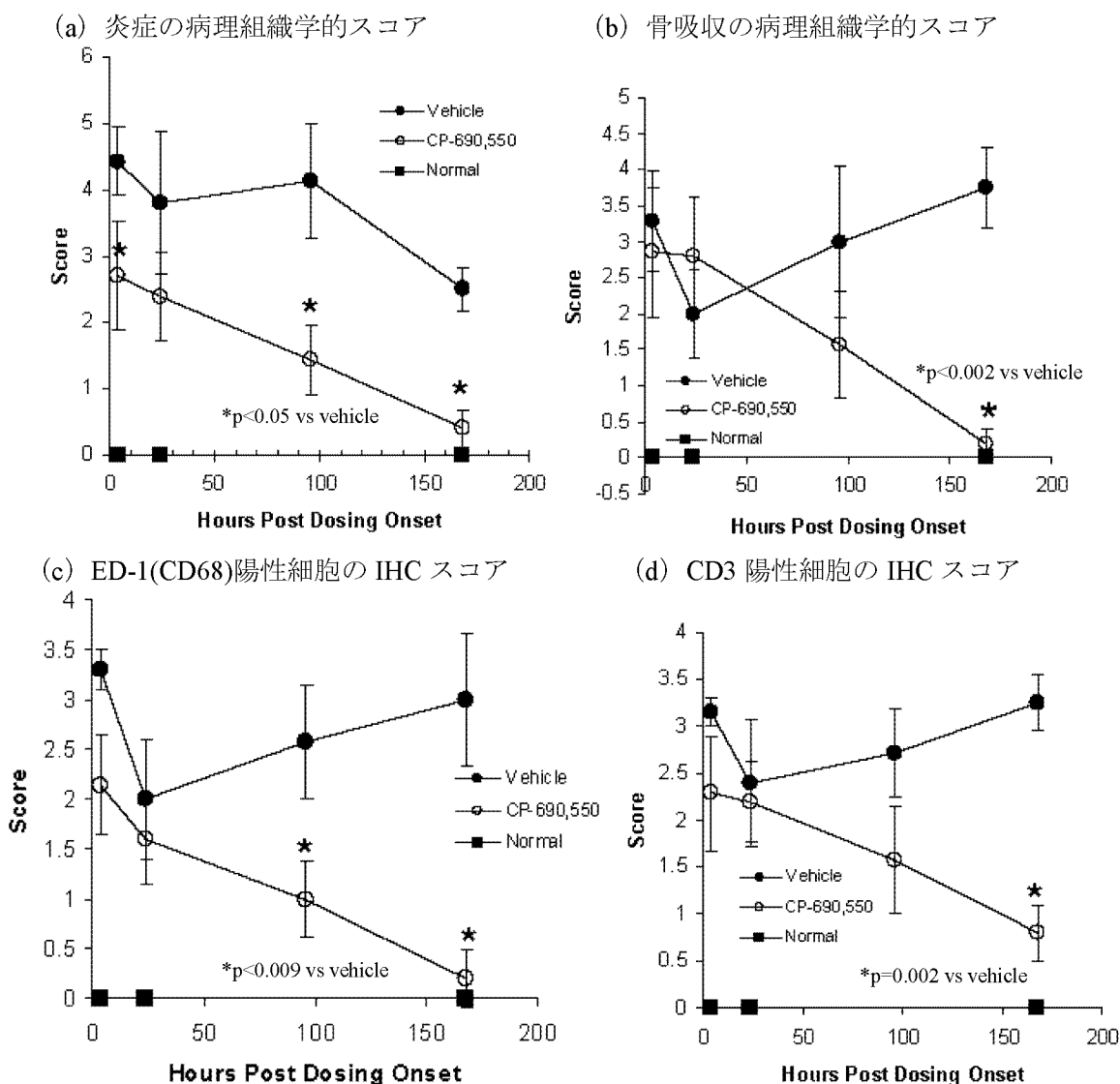
(出典：報告書番号 CP-690,550/141740, Figure 3)

図 11 ラット AIA モデルにおける後肢足蹠組織中炎症性サイトカインに対するトファシチニブの作用 (続き)



AIA ラットの免疫処置後の試験 16~22 日にトファシチニブ (6.2 mg/kg QD) を 7 日間経口投与し、試験 16 および 20 日の投与 4 時間後、試験 22 日の投与 28 時間後 (試験 23 日) および試験 16 日の投与 24 時間後 (試験 17 日) の後肢足蹠組織中における炎症性サイトカイン量を測定した。* $p \leq 0.05$ (t-test, 対照群との比較) (出典: 報告書番号 CP-690,550/141740, Figure 3)

図 12 ラット AIA モデルにおける炎症スコアに対するトファシチニブの作用



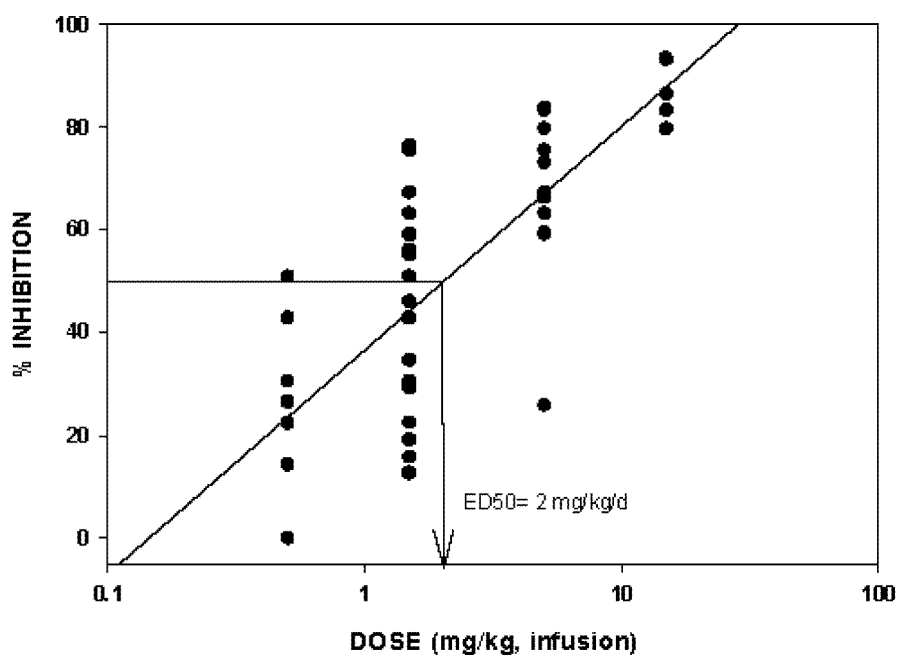
AIA ラットの免疫処置後の試験 16~22 日にトファシチニブ (6.2 mg/kg QD) を 7 日間経口投与し、試験 16 および 20 日の投与 4 時間後、試験 22 日の投与 28 時間後 (試験 23 日) および試験 16 日の投与 24 時間後 (試験 17 日) の試料を用いて病理組織学的検査および免疫組織学的検査を行った。統計的有意差が認められた際の p 値は図中に示す。(ANOVA, 対照群との比較)。データは mean±SEM で示す。IHC: 免疫組織化学的検査 (出典: 報告書番号 CP-690,550-160531, Figure 1~4)

(3) マウスにおける遅延型過敏症に関する試験 (報告書 [Immunology Discovery Biology Report]) Effect of CP-690,550 in Murine Delayed-Type Hypersensitivity Model)

感作 T 細胞媒介性の短期炎症モデル^{参考文献11)}におけるトファシチニブの *in vivo* 効果を検討した。感作開始 2 日前に、トファシチニブまたは溶媒を含有する浸透圧ミニポンプを C57BL/6 マウスに挿入し、トファシチニブまたは溶媒を持続投与した。マウスにヒツジ赤血球を静脈内投与して感作し、その 5 日後に同抗原を足蹠に再度注射した。接種 24 時間後に足蹠の腫脹を評価した。トファシチニブは抗原誘発性の足蹠腫脹を用量依存的に抑制した (Cave = 6 ng/mL 未満~101 ng/mL)。最高用量の 15 mg/kg/日では抑制が最大となり、腫脹は溶媒対照と比較して 86.2%抑制された (図 13)。ED₅₀ は 2 mg/kg/日と算出され、ED₅₀ での血清 Cave は約 12 ng/mL であった。本マウスモデルでは、抗原感作および抗原惹起の期間にトファシチニブを持続投与することにより遅延型

過敏症が抑制された。

図 13 マウス遅延型過敏症モデルに対するトファシチニブの作用



マウスにヒツジ赤血球を静脈内投与して感作し、その5日後に同抗原を足蹠に再度注射して24時間後に足蹠の腫脹を評価した。トファシチニブは浸透圧ミニポンプを用いて感作2日前より持続投与した。各データポイントは1例のデータを示す。

(出典：[Immunology Discovery Biology Report] Effect of CP-690,550 in Murine Delayed-Type Hypersensitivity Model)

(4) カニクイザルにおける血中リンパ球サブセットに関する *in vivo* 試験 (報告書 [Immunology Discovery Biology Report] In Vivo Activity of CP-690,550: Effects on Circulating Cynomolgus Monkey Lymphocyte Subsets)

カニクイザル 20 匹 (雌雄各 10 匹) にトファシチニブを経口投与し、血中リンパ球数が変化するか否かを検討した。ベースラインの NK 細胞数に基づいて、溶媒、トファシチニブ 10、50 または 200 mg/kg/日 (3.3、16.7 または 66.7 mg/kg を 7 時間間隔で 3 回投与) の投与群に各 5 匹の動物を割り付けた。初回投与後 4、22、168 (7 日) および 336 (14 日) 時間に FACS 解析を実施した。また、PK 解析用の血液を初回投与後 0.5、1、2.75、4、13.5 および 22 時間に採取した。

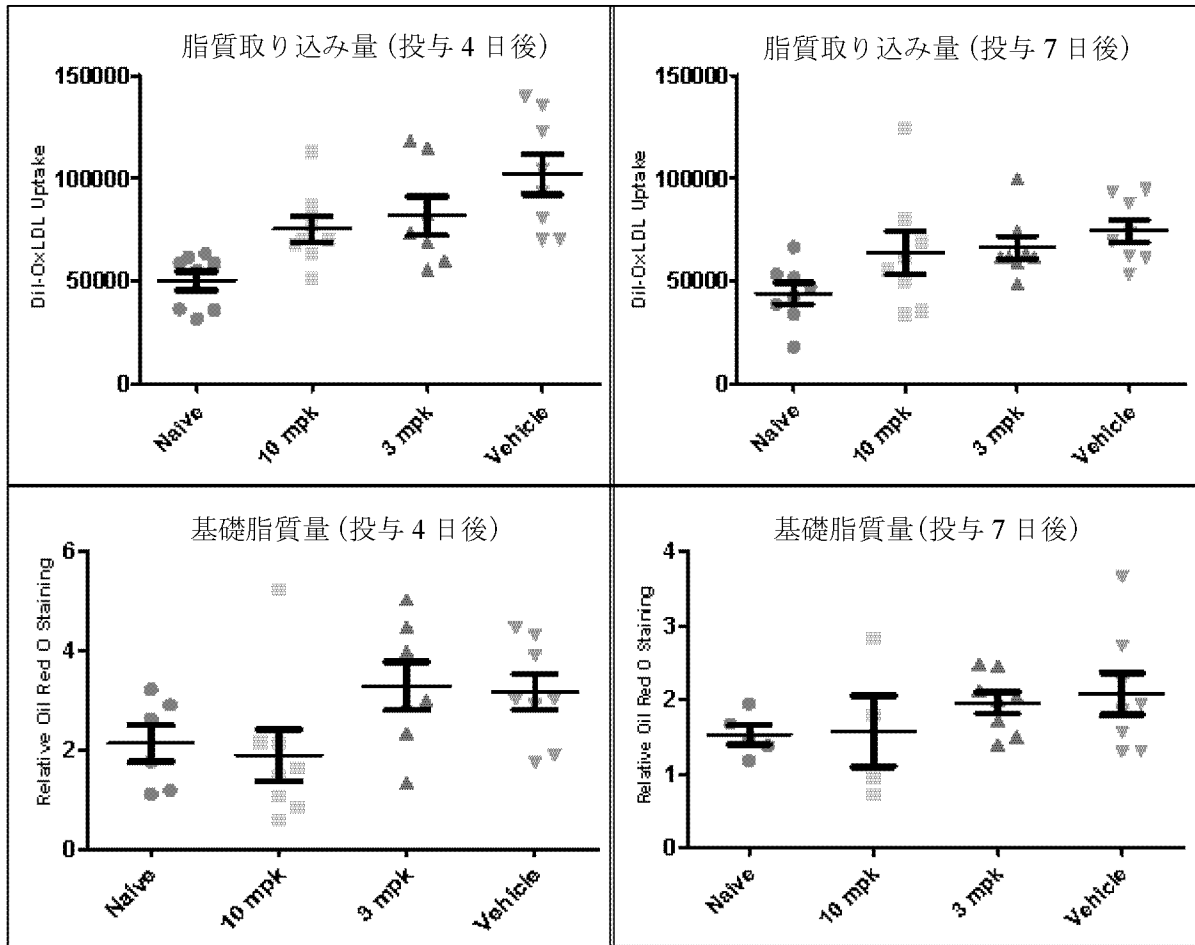
トファシチニブの血漿中濃度は用量依存的に増加した。投与 6 日前に採取した検体中の細胞数は、投与 13 日前の細胞数と比較してほとんど変化しなかった。トファシチニブまたは溶媒の初回投与 4 時間後に、本薬投与に関係なく全例において、総白血球が、好中球優位の一過性かつ顕著な増加を示した。このような影響は「ストレス応答」と一致していることから、強制経口投与時の処置に関連した変化と考えられた。トファシチニブ投与群では、投与 2 週間後まで CD16 陽性および CD3 陰性 (NK) 細胞の有意な減少はみられなかった。他の T リンパ球および B リンパ球のサブセットに変化は認められなかった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

(1) ラット AIA モデルにおける腹腔マクロファージの脂質に関する試験（報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /155854）

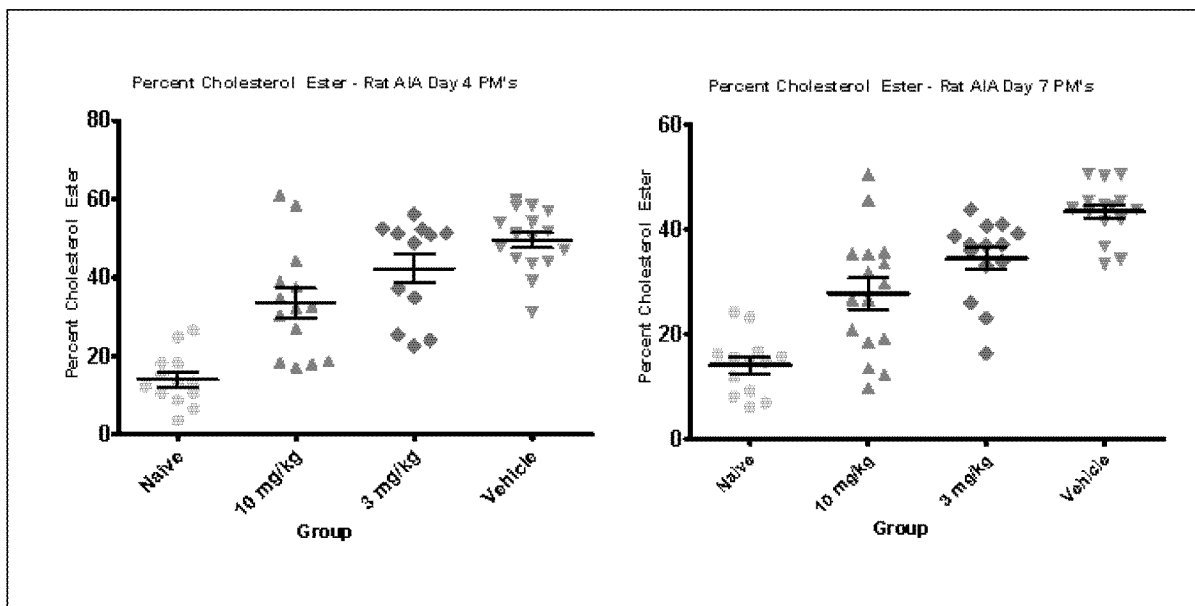
臨床試験において RA 患者にトファシチニブを投与すると用量依存的な血漿コレステロール値の上昇がみられ、ラット AIA モデルにおいても血漿コレステロール値の上昇がみられたことから、脂質調節に対するトファシチニブの作用機序の検索を目的として、AIA ラットの免疫処置後の試験 16～23 日にトファシチニブ（3 mg/kg または 10 mg/kg BID）または溶媒を 8 日間経口投与し、試験 17, 20 および 23 日（投与 1, 4 および 7 日後）の 1 回目の投与 4 時間後（C_{max} 付近）で腹腔マクロファージを採取した。その結果、溶媒を投与した AIA ラットの腹腔マクロファージは、無処置ラットと比べて投与 4～7 日後に有意に高い脂質量を示した。また、溶媒対照と比較して、トファシチニブ（10 mg/kg）投与により、投与 4 および 7 日後の基礎脂質量が低下した（図 14）。3 mg/kg 投与群でも、投与 7 日後に脂質量の低下が認められたが、有意な変化ではなかった。単離した腹腔マクロファージに脂質負荷した場合も、溶媒投与群では無処置群およびトファシチニブ投与群と比べて脂質の取り込み量が増加した（図 14）。マクロファージ内のコレステロールエステル量はトファシチニブ投与により用量依存的に低下した（図 15）。転写プロファイリングから、トファシチニブ投与により腹腔マクロファージの取り込み受容体および両方向性トランスポーターが軽度に変化することが明らかとなったが、これらは有意な変化ではなかった。

図 14 ラット AIA モデルの腹腔マクロファージでの脂質の取り込み量および基礎脂質量



AIA ラットの免疫処置後の試験 16~23 日にトファシチニブ (3 mg/kg または 10 mg/kg BID) または溶媒を 8 日間経口投与し、試験 17, 20 および 23 日 (投与 1, 4 および 7 日後) の 1 回目の投与 4 時間後 (Cmax 付近) で腹腔マクロファージを採取して脂質の取り込み量および基礎脂質量を評価した。データは mean±SEM で示し、各データポイントは 1 例のデータを示す。
(出典: 報告書番号 CP-690,550/155854, Figure 1)

図 15 ラット AIA モデルの腹腔マクロファージでのコレステロールエステル量



AIA ラットの免疫処置後の試験 16~23 日にトファシチニブ (3 mg/kg または 10 mg/kg BID) または溶媒を 8 日間経口投与し、試験 17, 20 および 23 日 (投与 1, 4 および 7 日後) の 1 回目の投与 4 時間後 (Cmax 付近) で腹腔マクロファージを採取してコレステロールエステル量を評価した。データは投与 4 および 7 日後のラット AIA モデルの腹腔マクロファージ (PM) から得られた総コレステロール値に対するコレステロールエステル量を示す。データは mean±SEM で示す。

(出典: 報告書番号 CP-690,550/ [REDACTED] /155854, Figure 2)

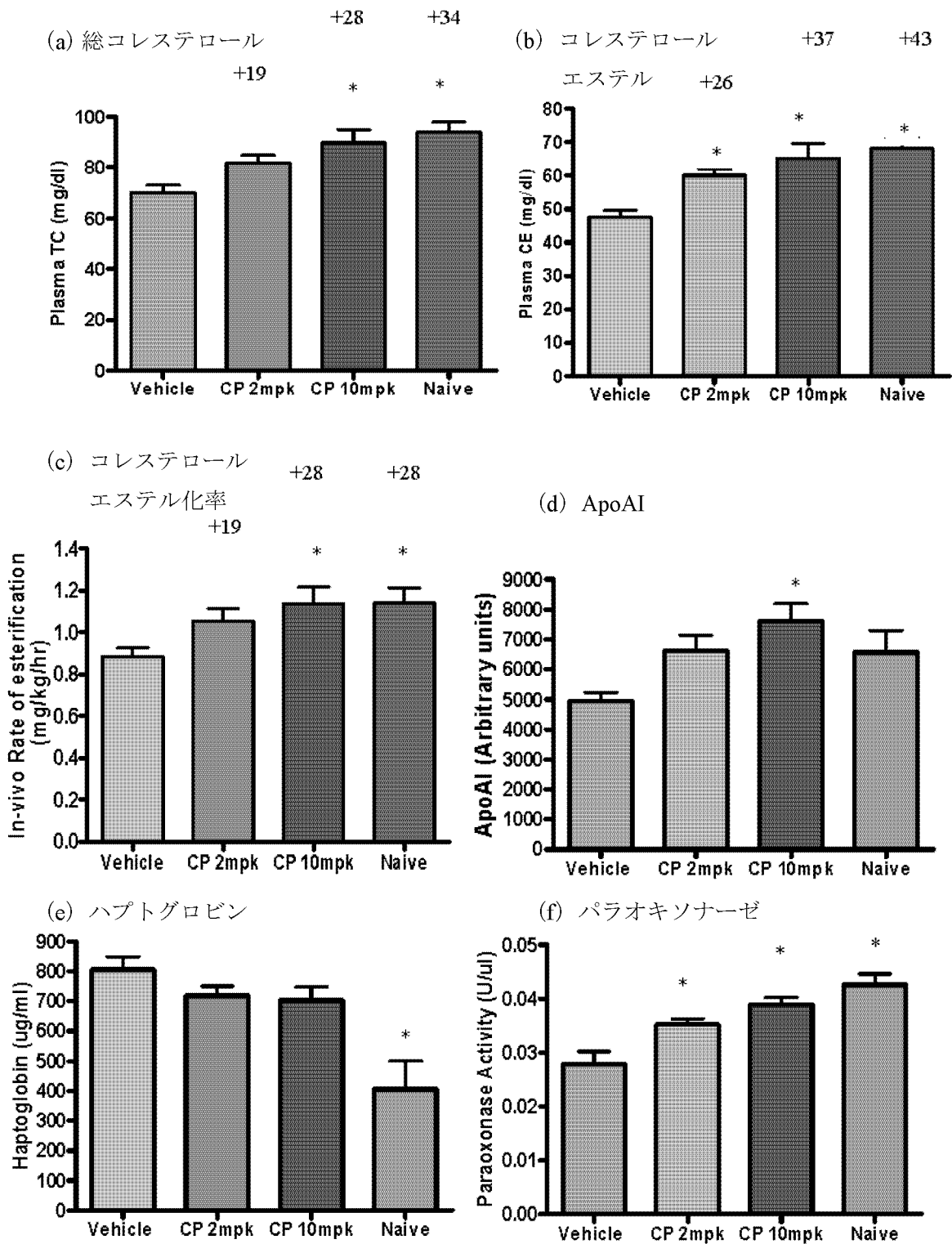
(2) ラット AIA モデルにおけるコレステロール合成および輸送に関する試験 (報告書番号 CP-690,550_ [REDACTED] _120754)

脂質量の変化をさらに検討するために、AIA ラットの免疫処置後の試験 7~18 日にトファシチニブ (2 mg/kg または 10 mg/kg BID) を 11 日間経口投与した。 ^{13}C コレステロールの静脈内持続投与および PK 測定のために、ラットにカニューレを施した。試験 14 日に、ラットに ^{13}C コレステロールを持続投与してコレステロール逆輸送を測定した。コレステロール合成についても評価するために、重水を試験 14 日に単回腹腔内ボーラス投与し、その後、飲料水に毎日加えた。その結果、AIA ラットにおける血漿中の総コレステロール (TC) およびコレステロールエステル (CE) およびコレステロールエステル化率は無処置ラットに比し有意に低下した (図 16)。また、AIA ラットの血漿中の HDLc, apoAI およびリン脂質 (PL) も無処置ラットに比し有意に低下したが、ハプトグロビン (コレステロールエステル化に負の影響を及ぼす急性期蛋白) は有意に上昇した (図 16 および図 17)。免疫処置後の試験 14 日 (投与 7 日後) には、トファシチニブ投与群では溶媒を投与した AIA ラットと比較して、血漿コレステロール値 (大部分は HDLc) および apoAI が用量依存的に上昇した。トファシチニブ (2 mg/kg および 10 mg/kg BID) 投与により、血漿中 CE はそれぞれ 26% および 37% 増加し、パラオキシナーゼ活性 (HDL 機能性のマーカー) も上昇した。さらに、トファシチニブ (2 mg/kg および 10 mg/kg) により、*in vivo* でのコレステロールエステル化率は、用量依存的にそれぞれ 19% および 28% 上昇し、無処置ラットと同程度のレベルとなった。中性ステロイドおよび胆汁酸としてのコレステロールの排出は AIA ラットでは変化がなかったが、トファシチニブ群では増加した。しかし、トファシチニブ投与は組織から血漿コ

ンパートメントへのコレステロール排出には影響しなかった。

以上のことから、コレステロール逆輸送が障害されている AIA ラットに対し、トファシチニブはエステル化率および糞中への排出を増加させることでコレステロールのクリアランスを増加させ、コレステロール逆輸送を増加させることが示された。

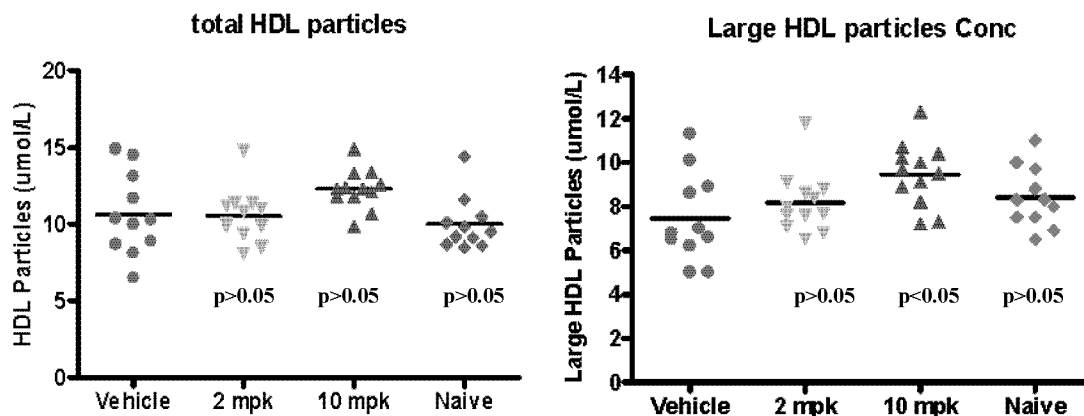
図 16 AIA 病態モデルおよびトファシチニブ投与による影響



AIA ラットの免疫処置後の試験 7~18 日にトファシチニブ (2 mg/kg または 10 mg/kg BID) を 11 日間経口投与し試験 14 日に、 ^{13}C コレステロールを静脈内持続投与してコレステロール逆輸送を測定した。* $p < 0.05$ (Dunnett's test 対照群との比較), データは mean+SEM で示した。

(出典: 報告書番号 CP-690,550 120754, Figure 3, 4, 7, 16, 19, 20)

図 17 AIA 病態モデルおよびトファシチニブ投与による HDL 粒子濃度への影響



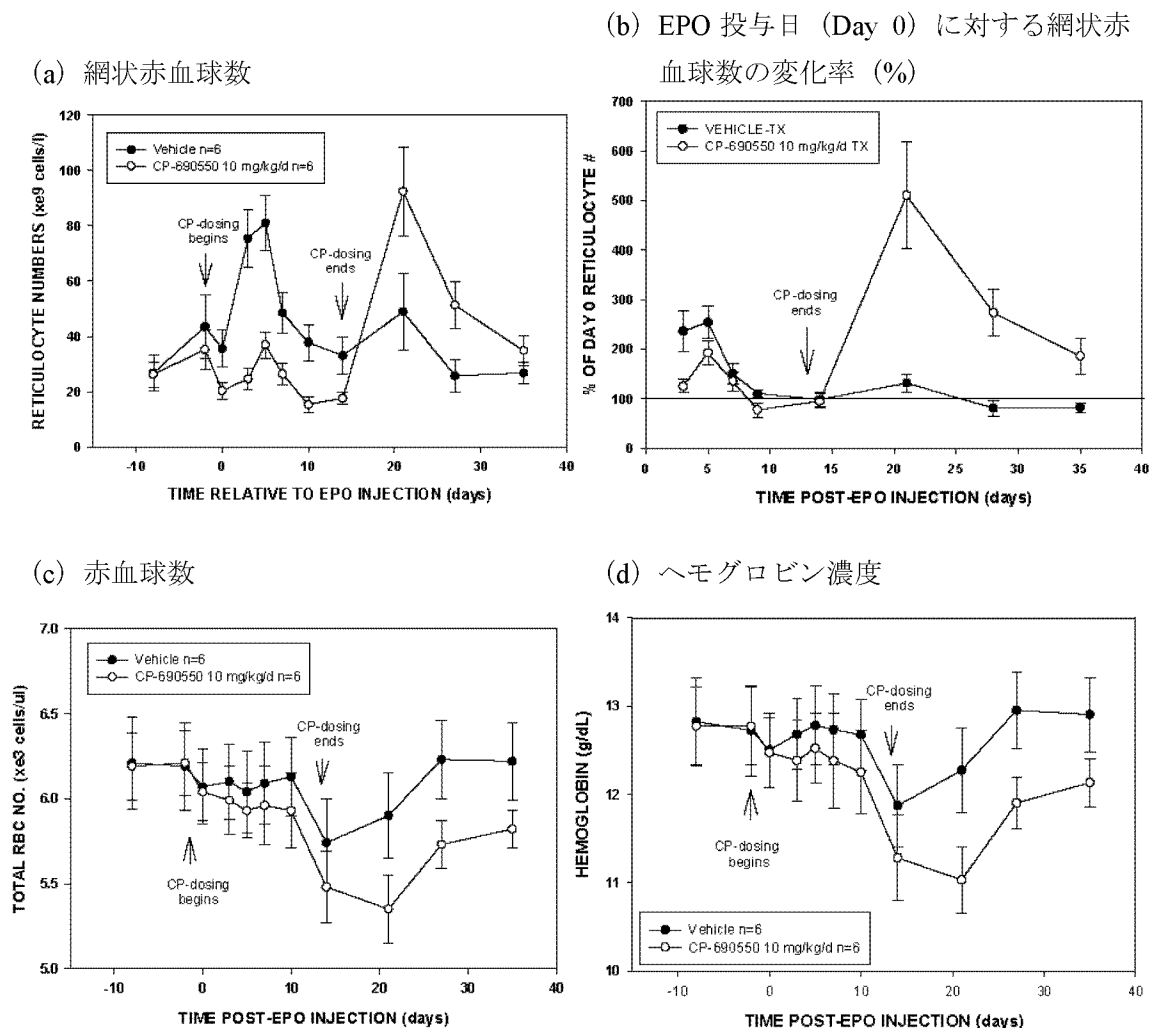
図中に対照群に対する p 値を示した (Dunnet's test) (出典: 報告書番号 CP-690,550-120754, Figure 17)

(3) 循環血中網状赤血球への影響 (報告書番号 NP-02-005)

エリスロポエチン (EPO) 投与条件下における血中網状赤血球に及ぼすトファシチニブの影響を検索するために、カニクイザルにトファシチニブ 5 mg/kg または溶媒を 1 日 2 回、16 日間経口投与した。トファシチニブを 2 日間投与後、EPO (100 U/kg) を単回皮下投与した。血液学的検査 (網状赤血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度) は、EPO 投与 35 日後まで行った。

トファシチニブを 2 日間投与後 (EPO 投与前) の網状赤血球数は、投与前値に比し 33% 減少したが、溶媒投与群ではほぼ同等 (110%) であった (図 18)。EPO 誘発性の網状赤血球数増加は、トファシチニブ投与により軽減した (EPO 投与 3 日後: トファシチニブ投与群 $125 \pm 13\%$ に対して溶媒投与群 $236 \pm 41\%$; EPO 投与 5 日後: トファシチニブ投与群 $192 \pm 24\%$ に対して溶媒投与群 $254 \pm 33\%$)。トファシチニブ投与群において、網状赤血球数の著しい増加 (EPO 投与前の値と比較して 510%) が投与終了後 1 週間以内に認められたが、試験終了までには回復した。EPO 投与は溶媒投与群のヘモグロビン濃度および赤血球数に影響を及ぼさなかったが、トファシチニブ投与群ではこれらのパラメータは減少し、この減少はトファシチニブ投与終了後最長 2 週まで認められた。トファシチニブ投与によるこの血液学的変化は、この曝露量 ($C_{max} = 382 \pm 314$ ng/mL ; $AUC_{0-24} = 2980 \pm 558$ ng·h/mL) での JAK2 を介するシグナル伝達阻害に起因する可能性がある。

図 18 エリスロポエチン投与が誘発する循環血中網状赤血球数，赤血球数およびヘモグロビン濃度に対するトファシチニブの作用（カニクイザル）



カニクイザルにトファシチニブ 5 mg/kg または溶媒を 1 日 2 回、16 日間経口投与し、トファシチニブ 2 日間投与後、EPO (100 U/kg) を単回皮下投与した。EPO 投与 35 日後まで血液学的検査（網状赤血球数，赤血球数，ヘモグロビン濃度）を行った。

（出典：報告書番号 NP-02-005, Figure 4~7）

(4) 受容体，イオンチャネル，酵素およびトランスポーターへの影響（報告書番号 7570532, 7571347）

の広範囲なリガンドプロファイルを用い、受容体，イオンチャネル，酵素およびトランスポーターに対するトファシチニブ (10 μ M [3124 ng/mL]) の影響を *in vitro* で検索した。有意な阻害 (>50%) が認められた場合には、 K_i 値または IC_{50} 値を算出した。その結果、トファシチニブは MT3 (ML2) 受容体への結合阻害 (>50%) および VEGFR1, CaMK2 α および LynA キナーゼの酵素活性阻害を示すことが明らかになった。MT3 (ML2) 受容体に対する K_i 値は 5.2 μ M (1624 ng/mL; RA 患者 (10 mg BID) での非結合型 C_{max} 75 ng/mL^{注1)} の約 22 倍) であった。VEGFR1, CaMK2 α および LynA キナーゼの酵素に対する IC_{50} 値は、それぞれ 3.7, 12 および 2.3 μ M (1156,

注1) 2.7.2.3.3.4.1(2) RA 患者における反復投与時の PK 比較 (国内 A3921039 試験) において、 C_{max} =122.96 ng/mL に非結合型分率 (fu) 0.61 を乗じて算出。

3749 および 719 ng/mL) であった。これらの酵素に対する曝露量の安全域は、RA 患者 (10 mg BID) での非結合型 C_{max} 75 ng/mL と比較すると、それぞれ 15、50 および 10 倍であった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

トファシチニブが中枢神経系、心血管系および呼吸系さらに胃腸管および腎臓の機能に及ぼす影響を詳細に評価するため、中枢神経系、心血管系および呼吸系のコアバッテリー試験に加え、腎臓系および胃腸管系についての試験を実施した（概要表 2.6.3.4）。ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャンネルに関する *in vitro* 試験を除いては、ICH S7A ガイドラインが施行される（2001年7月）以前に GLP 非適用で実施した。また、*in vivo* 試験では、臨床適用経路である経口投与で実施した。

(1) 心血管系

1) *In vitro* 試験

(a) hERG 電流に対する作用（報告書番号 110106.QHJ[11GR018]；概要表 2.6.3.4）

心血管系に及ぼすトファシチニブの影響を評価するために、HEK293 細胞に安定発現させた hERG カリウムチャンネルに及ぼす影響を測定したところ、トファシチニブは、10, 30 および 100 μM (3124, 9372 および 31240 ng/mL) の濃度で hERG 電流振幅をそれぞれ 0.8, 3.6 および 17.8% 阻害した。その IC_{50} は 100 μM (31240 ng/mL) 超であると考えられ、この濃度は RA 患者 (10 mg BID) での非結合型 C_{max} 75 ng/mL の約 417 倍であった。

(b) 摘出イヌ心臓プルキンエ線維の活動電位に対する作用（報告書番号 CP690550-10/CG/001/00；概要表 2.6.3.4）

0.1, 1 および 10 μM (31.2, 312 および 3124 ng/mL) の濃度で、摘出イヌプルキンエ線維の心筋活動電位に及ぼすトファシチニブの影響を評価した。その結果、50% および 90% 再分極時の活動電位持続時間 (APD_{50} および APD_{90})、静止膜電位 (RMP)、活動電位振幅 (APA) および最大脱分極速度 (V_{max}) に対して有意な影響を示さなかった。

(c) 摘出ラット大動脈に対する作用（参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550；概要表 2.6.3.4）

KCl およびノルエピネフリンで誘発したラット大動脈の収縮に対し、0.1~100 μM (31.2~31240 ng/mL) の用量のトファシチニブを添加したところ、1~100 μM (312~31240 ng/mL) で濃度依存的に弛緩作用を示した。

(d) 摘出モルモット右心房に対する作用（参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550；概要表 2.6.3.4）

自然拍動しているモルモット右心房の拍動回数に対して、トファシチニブは 0.1~100 μM (31.2~31240 ng/mL) で影響を示さなかった。

2) *In vivo* 試験（報告書番号 745-03432, 参考資料 11GR001, General Pharmacology Evaluation

of CP-690,550 ; 概要表 2.6.3.4)

雄性 Sprague-Dawley ラットにトファシチニブを 10 および 100 mg/kg で単回経口投与し投与後 120 分まで血圧を記録した心肺機能試験において、100 mg/kg で平均動脈圧が 37 mmHg 低下し、心拍数が約 100 bpm (beats per minute) 増加した (参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550)。この心血管系への影響は交感神経系のトーンが変化することで生じた可能性が考えられた。そこで、心血管系へのトファシチニブの影響をさらに検索する目的で、雌性 Sprague-Dawley ラットにトファシチニブを 10, 30 および 75 mg/kg/日 で 5 日間連日経口投与した。その結果、10 mg/kg 以上で試験 1, 3 または 5 日の投与 0~2 時間後に用量依存的な収縮期血圧、拡張期血圧および平均血圧の低下 (-5~-17 mmHg) が認められた。また、投与 1 または 5 日の投与 0~2 時間後に一過性の心拍数の増加 (+30~+67 bpm) および投与期間中に体温低下 (最大 -0.37°C) がみられた。30 および 75 mg/kg では試験 1 または 5 日の投与 8~12 時間後に心拍数の減少 (-27~-39 bpm) もみられた。動物の活動性に変化は無かった。10 mg/kg/日での非結合型 Cmax は 2176 ng/mL であり、その曝露量比は RA 患者 (10 mg BID) での非結合型 Cmax (75 ng/mL) の約 29 倍であった (報告書番号 11GR001)。

雄性カニクイザルにおける *in vivo* での心血管系評価では、トファシチニブ 100 および 300 mg/kg の用量をクロスオーバー試験デザインで投与した。300 mg/kg の投与 2~3 時間後には、統計学的に有意な心拍数増加がみられた。この一過性の軽度な心拍数増加は投与 3 時間後で最大となり、対照値を約 43% 上回る増加を示した。血圧および心電図には影響は認められなかった。300 mg/kg での非結合型 Cmax は 2152 ng/mL であり、その曝露量比は RA 患者 (10 mg BID) での非結合型 Cmax (75 ng/mL) の約 29 倍であった。(報告書番号 745-03432)。

(2) 呼吸系 (参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550 ; 概要表 2.6.3.4)

心肺機能試験において、雄性 Sprague-Dawley ラットにトファシチニブを 10 および 100 mg/kg で単回経口投与し投与 120 分後まで 20 分毎に採取した動脈血の pH, PO₂ および PCO₂ を測定したところ、10 mg/kg 投与ではこれら血液ガスおよび pH に変化はみられなかったが、100 mg/kg 投与では動脈血の PO₂ の上昇がみられた。

(3) 中枢神経系 (参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550 ; 概要表 2.6.3.4)

雄性 CD-1 マウスにトファシチニブを 3.2~1000 mg/kg の用量で単回経口投与し、神経系に及ぼす影響を評価した。マウスを一般症状および行動観察 (Irwin 変法) または自発運動試験に供し、トファシチニブ投与群の結果を溶媒投与群で得られた結果と比較した。その結果、行動への影響は 32 mg/kg までみられなかった。100 mg/kg 以上の用量 (非結合型 Cmax : >3216 ng/mL, RA 患者 (10 mg BID) での非結合型 Cmax (75 ng/mL) の約 43 倍以上の曝露量比) では、本薬と関連のある多くの中枢神経系行動変化が観察された。すなわち、100 mg/kg では、自発運動の減少、背弯~伏臥姿勢、後肢開脚、閉眼回数の増加、発声がみられた。320 mg/kg では、自発運動の減少、背弯~伏臥姿勢、発声、筋攣縮、後肢開脚、痙攣発作 (軽度)、体の張り、つまみ反射、角膜反射および探索行動の低下、眼瞼下垂、拘束に対するもがき反応の低下、呼吸数低下、振戦、正向反射の

消失ならびに死亡がみられた。1000 mg/kg では、320 mg/kg でみられた所見がより重症化した。

(4) 痙攣に対する作用（参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550；概要表 2.6.3.4）

雄性 CD-1 マウスにトファシチニブを 3.2, 10 および 32 mg/kg の用量で単回経口投与し、30 分後にペンチレンテトラゾール (PTZ, 85 mg/kg) を腹腔内投与した。PTZ 投与後 30 分間、筋攣縮、ミオクローヌス、強直性伸展を観察し、溶媒対照群とトファシチニブ投与群の痙攣の発現の差を評価したところ、PTZ で誘発される筋攣縮、ミオクローヌスおよび強直性伸展の発現頻度はトファシチニブ投与群と溶媒対照群とで有意な差はみられなかった。

(5) 腎臓系（参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550；概要表 2.6.3.4）

雄性 Sprague-Dawley ラットにトファシチニブを 3, 10 および 100 mg/kg の用量で単回経口投与し、腎臓系に及ぼす影響を評価した。3 または 10 mg/kg では尿量および電解質排泄に影響がなかったが、100 mg/kg（非結合型 Cmax : 7336 ng/mL；RA 患者（10 mg BID）での非結合型 Cmax（75 ng/mL）の 98 倍の安全域）では、カリウム排泄が 104% (p<0.05) 増加し、塩素排泄 (-77%) および尿量 (-32%) が減少傾向を示した。

(6) 胃腸管系（参考資料 General Pharmacology Evaluation of CP-690,550；概要表 2.6.3.4）

雄性 Sprague-Dawley ラットにトファシチニブを 10, 30 および 100 mg/kg の用量で単回経口投与後、放射活性マーカーを投与し、胃内容排出および胃腸管輸送への影響を評価したところ、30 mg/kg 以上の用量でラットの胃内容排出が阻害（68%まで低下）され、腸運動性も低下（放射活性マーカーの分布の平均幾何学的中心が 79%まで低下）した。14 日間のラット試験の成績から、30 mg/kg での非結合型 Cmax および非結合型 AUC₀₋₂₄ はそれぞれ 3511 ng/mL および 12070 ng·h/mL であり^{注1)}、その曝露量比は RA 患者（10 mg BID）での非結合型 Cmax（75 ng/mL）および非結合型 AUC₀₋₂₄（666 ng·h/mL）^{注2)} のそれぞれ約 47 倍および約 18 倍であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察および結論

チロシンキナーゼの JAK ファミリーは、リンパ球の活性化、増殖、生存および機能に重要な I 型および II 型サイトカイン受容体からのシグナル伝達を媒介する。JAK 阻害により、複数のサイトカインのシグナル伝達が同時に遮断されることで、免疫および炎症性反応が抑制される。

関節リウマチ (RA) は慢性の持続痛、硬直および滑膜炎を呈し、機能低下および重大な合併症

注1) DM20-690550-001

注2) 2.7.2.3.3.4.1(2) RA 患者における反復投与時の PK 比較（国内 A3921039 試験）において、AUC₀₋₁₂=545.93 ng·h/mL を 2 倍し、非結合型分率 (fu) 0.61 を乗じて算出。

を伴う関節破壊に至る。RA の病因には、先天性および適応性の免疫調節不全が関与し、その進行および慢性化にはサイトカインの持続的分泌が重要な役割を担っている^{参考文献 1)}。TNF α を標的とする生物学的製剤の使用によっても、奏効を示す患者は3分の2に過ぎず^{参考文献 2)}、IL-6、IL-23、IL-17ならびに γ 鎖を有する受容体に結合するサイトカインであるIL-7、IL-15およびIL-21などを含むさらなるサイトカインを標的にした新規作用機序を有する薬物が有効な治療薬となり得る可能性が示唆されている^{参考文献 1)}。IL-6、IL-21、IL-23等、多種のサイトカインのシグナル伝達を媒介するヤヌスキナーゼ (JAK) に対する低分子阻害薬は、新規 RA 療法となり得ると考えられている。

トファシチニブは強力な JAK ファミリー阻害剤であり、ヒトキナーゼ群の中の JAK ファミリーに対して高い選択性を有する。トファシチニブは、酵素試験において JAK ファミリーのすべてのキナーゼに対して nmol/L レベルの阻害効力を示したが、細胞を用いたアッセイでは JAK2 よりも JAK1 および JAK3 に対してより強い作用を示した。すなわち、同一濃度では JAK2 が介在するシグナル伝達経路に対する阻害は JAK1/3 が介在するシグナル伝達経路に対する阻害よりも弱い。全血を用いたアッセイでも、トファシチニブは JAK2 による GM-CSF 依存的経路の活性化に対する阻害よりも、JAK1/3 による γ 鎖サイトカイン依存的活性化をより強力に阻害した。

マウス CIA モデルに関節炎発症前からトファシチニブを投与し、予防療法としての有用性を検討したところ、関節炎症状の発現頻度および重症度が有意に低下し、JAK-STAT リン酸化の評価では JAK1/3 と JAK1/2 の阻害と JAK2 の軽微な阻害が認められた。また、関節炎発症後にトファシチニブを投与したときの治療効果について評価したところ、トファシチニブの単回投与でも血漿中炎症性サイトカインの減少がみられ、連続投与により足蹠炎症の重症度スコアの低下、組織中および血漿中の炎症性サイトカインの減少、組織中および関節腔の炎症細胞浸潤、F4/80 陽性細胞 (成熟マクロファージ) 数および CD3 陽性 T 細胞数の減少、炎症を惹起した後肢では STAT1 応答遺伝子群、ナチュラルキラー (NK) 細胞関連遺伝子、マクロファージ、B 細胞、T 細胞および破骨細胞に関連する遺伝子の抑制がみられた。トファシチニブの薬物動態/薬力学 (PK/PD) モデルの成績から、CIA モデルにおける有効性は主として JAK1/3 の阻害によるものであって、JAK2 の阻害によるものではないこと、また、JAK1/3 の阻害によって炎症反応が効果的に調節されるので終日 JAK1/3 阻害濃度を維持する必要はないことが示唆された。

ラット AIA モデルに関節炎発症前にトファシチニブを連続経口投与し、有効用量を確認したところ、足蹠容積の減少に対する ED₅₀ は 0.06 mg/kg BID 未満および 0.66 mg/kg QD (AUC₀₋₂₄ はそれぞれ 0.23 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 未満および 0.38 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ (非結合型; 0.20 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 未満および 0.32 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) : 10 mg BID を日本人 RA 患者に投与した場合の推定値 666 ng $\cdot\text{h/mL}$ (非結合型) の 0.3 および 0.5 倍) であった。また、同モデルに疾患発症後にトファシチニブを投与したときの足蹠容積の減少に対する ED₅₀ は 0.15 mg/kg BID, 6.3 mg/kg QD, 7.1 mg/kg QOD (0.15 mg/kg BID および 6.3 mg/kg QD での AUC₀₋₂₄ はそれぞれ 1.27 および 1.95 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ (非結合型; 1.08 および 1.66 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) : 10 mg BID を日本人 RA 患者に投与した場合の推定値 666 ng $\cdot\text{h/mL}$ (非結合型) の 1.6 および 2.5 倍) であった。ラット AIA モデルに関節炎発症後にトファシチニブを投与したとき、血漿中および足蹠組織中の炎症性サイトカインまたは急性期反応蛋白は減少し、関節の炎症および破骨細胞による骨吸収は抑制され、ED-1 (CD68) 陽性細胞 (マクロファージ) 数および CD3 陽性細胞 (T

細胞)数が有意に減少した。また、IL-6, STAT1, マクロファージ, B 細胞, T 細胞, 破骨細胞, NK 細胞に関連する遺伝子が抑制された。

AIA ラットへのトファシチニブ投与により、血漿 apoAI, 血漿コレステロール値, コレステロールのエステル化率, コレステロールエステルおよび HDL 機能のマーカーであるパラオキシナーゼ活性が上昇した。また、この血漿コレステロールの上昇は、コレステロールエステル化の上昇によるもので、無処置ラットの値を超えることはなく、組織から血漿コンパートメントへの排出率への影響もなかった。このように、コレステロール逆輸送が障害されている AIA ラットに対し、トファシチニブはエステル化率および糞中への排出を増加させることでコレステロールのクリアランスを増加させ、コレステロール逆輸送を増加させることが示された。また、AIA ラットのマクロファージでは、トファシチニブ投与により脂質量とともにコレステロールエステル量も低下した。ヒトの臨床試験ではトファシチニブ投与により用量依存的に LDL および HDL コレステロールが上昇した (2.7.4 臨床的安全性参照)。

さまざまな JAK 依存性サイトカインの阻害に関する JAK の IC₅₀ に対するトファシチニブの曝露量に基づく、有効濃度では JAK1 および JAK3 依存性シグナル伝達を部分的にのみ阻害することが予想される。すなわち、トファシチニブは単一のサイトカイン経路の完全な阻害によってではなく、複数のサイトカイン経路 (γ鎖に結合するサイトカイン, I 型および II 型インターフェロン, IL-6 など) の部分的阻害によって有効性を示していると考えられる。

安全性薬理試験では、心血管系に関しては hERG カリウムチャンネルおよび摘出イヌプルキンエ線維の心筋活動電位に影響を与えなかったが、ラット *in vivo* 試験では血圧の低下、一過性の心拍数の増加、体温低下が、サル試験では心拍数の増加が認められた。呼吸系への影響はみられなかった。中枢神経系への影響をマウスを用いた一般症状および行動観察 (Irwin 変法) または自発運動試験で評価したところ、32 mg/kg までのトファシチニブ投与では行動に及ぼす影響はみられなかったが、100 mg/kg 以上の用量 (非結合型 C_{max} 3216 ng/mL 以上) では、多くの中枢神経系行動変化が観察された。ラットを用いて腎臓に対する影響を検討したところ、3 または 10 mg/kg では尿量および電解質排泄に影響がなかったが、100 mg/kg ではカリウム排泄が増加し、塩素排泄および尿量が減少傾向を示した。ラットにおいて胃内容排出は 30 mg/kg 以上の用量で阻害 (68%まで低下) され、同用量では腸運動性も低下した。なお、ヒトの臨床試験では心電図、血圧および中枢神経系について臨床的に問題となる異常はみられなかった。

マウスの心臓移植モデル、サルの腎臓移植モデルおよびげっ歯類関節炎モデルにおいても、トファシチニブの効果が認められているとの報告があり (参考文献 9), 10), 自己免疫および免疫調節不全の多くのモデルにおいてトファシチニブの効果が明らかにされている。

2.6.2.7 参考文献

- 1) Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008; 118(11): 3537-45.
- 2) Opar A. Kinase inhibitors attract attention as oral rheumatoid arthritis drugs. *Nature Rev.* 2010 Apr; 9: 257-8.
- 3) Walker JG, Smith MD. The JAK/STAT Pathway in Rheumatoid Arthritis. *J Rheum.* 2005; 32(9): 1650-3.
- 4) Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, et al. Mutation of JAK3 in a patient with SCID: essential role of JAK3 in lymphoid development. *Science.* 1995; 270: 797-800.
- 5) Thomis DC, Berg LJ. The role of JAK3 in lymphoid development, activation, and signaling. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9: 541-7.
- 6) Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 2007; 178: 2623-9.
- 7) O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, et al. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 2007; 44: 2497-506.
- 8) Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, et al. Expression of Jak3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65: 149-56.
- 9) Changelian PS, Flanagan ME, Ball DJ, et al. Prevention of organ allograft rejection by a specific janus kinase inhibitor. *Science.* 2003; 302: 875-8.
- 10) Milici AJ, Kudlacz EM, Audoly L, et al. Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(1): R14.
- 11) Yamada N, Sugasawa K. Pharmacologic modulation of delayed-type hypersensitivity in mice. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1996; 46: 884-6.

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Test Article: Tofacitinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Module 4
Primary Pharmacodynamics					
Potency Determination for CP-690,550 Inhibition of JAK1, 2, 3 and TyK2 Kinase Activity	In Vitro	In Vitro	PGRD	D08AI0333	4.2.1.1.1
Characterization of Mechanism of Inhibition of JAK1, 2, 3 and TyK2 Kinases by CP-690,550	In Vitro	In Vitro	PGRD	D08AI0334	4.2.1.1.2
Activity of CP-690,550 in Kinase Selectivity Panel Assays	In Vitro	In Vitro	PGRD [REDACTED]	CP-690550-[REDACTED]_083053	4.2.1.1.3
Effect of CP-690,550 on Interleukin-2 Dependent T-Cell Blast Proliferation	In Vitro	In Vitro	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.4
Effect of CP-690,550 in a Human Mixed Lymphocyte Response	In Vitro	In Vitro	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.5
Effect of CP-690,550 on GM-CSF Dependent HU03 Cell Proliferation	In Vitro	In Vitro	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.6
Effect of CP-690,550 in a Cynomolgus Mixed Lymphocyte Response	In Vitro	In Vitro	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.7
Effect of CP-690,550 in a Murine Mixed Lymphocyte Response	In Vitro	In Vitro	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.8
Effect of CP-690,550 on Human Foreskin Fibroblast Proliferation	In Vitro	In Vitro	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.9

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Test Article: Tofacitinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Module 4
Comparison of CP-690,550 on JAK3 and JAK2 Signaling in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Human Whole Blood	Human PBMCs and Whole blood	In Vitro	PGRD	D08AI0337	4.2.1.1.10
In Vitro Activity of CP-690,550: Effects on STAT Phosphorylation within Lymphocyte Subsets in Human Whole Blood	Human Whole Blood	In Vitro	PGRD	D08AI0338	4.2.1.1.11
In Vitro Activity of CP-690,550: Effects on Cytokine-Dependent STAT Phosphorylation with Leukocyte Populations in Human Whole Blood	Human Whole Blood	In Vitro	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 113015	4.2.1.1.12
In Vivo Potency and Selectivity of CP-690,550: Effects on STAT Phosphorylation within Lymphocyte Subsets in Mouse Whole Blood	DBA1 Mouse Whole Blood	Ex Vivo	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 153609	4.2.1.1.13
Effect of Oral Administration of CP-690,550 Dosed Prophylactically in Mouse Collagen-Induced Arthritis Model	Mouse CIA Model	SC infusion; Oral gavage	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 151443	4.2.1.1.14
Characterization of Inflammatory End Points After a Single Dose of CP-690,550 in Mouse Collagen-Induced Arthritis	Mouse CIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 141423	4.2.1.1.15
Therapeutic Efficacy , Assessed by Histopathology and Immunohistochemistry, of CP-690,550 in a Mouse Collagen-Induced Arthritis (CIA) Model	Mouse CIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 160243	4.2.1.1.16
Characterization of Mechanism of Action with CP-690,550 in Mouse Collagen-Induced Arthritis	Mouse CIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 165255	4.2.1.1.17
CP-690,550: Transcriptional Profiling in the Mouse Collagen Induced Model of Rheumatoid Arthritis	Mouse CIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 135046	4.2.1.1.18

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Test Article: Tofacitinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Module 4
Preclinical Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of CP-690,550, a JAK Inhibitor, in the Mouse Collagen-Induced Arthritis Model; Relationship to Human Rheumatoid Arthritis	Mouse CIA Model	SC infusion; Oral gavage	PGRD	CP-690550_██████████_150736	4.2.1.1.19
Evaluation of Arthritis, Peripheral Blood Neutrophil Counts, Plasma Cholesterol, and Plasma Cytokines in the Rat Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) Model with Oral CP-690,550 Administration Initiated Prior to Disease Development	Rat AIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550_██████████_100214	4.2.1.1.20
Evaluation of Arthritis, Peripheral Blood Neutrophil Counts, Plasma Cholesterol, and Cytokines in the Rat Adjuvant Induced Arthritis (AIA) Model with Oral CP-690,550 Administration Following Arthritis Development	Rat AIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550_██████████_102743	4.2.1.1.21
Effects of CP-690,550 on Inflammatory End Points in Rat Adjuvant Arthritis Model	Rat AIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550_██████████_141740	4.2.1.1.22
Therapeutic Efficacy, Assessed by Histopathology and Immunohistochemistry, of CP-690,550 in a Rat Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) Model	Rat AIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550_██████████_160531	4.2.1.1.23
CP-690,550: Transcriptional Profiling in the Rat Adjuvant Induced Model of Rheumatoid Arthritis	Rat AIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550_██████████_112613	4.2.1.1.24

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Test Article: Tofacitinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Module 4
Effect of CP-690,550 in Murine Delayed-Type Hypersensitivity Model	Mouse/ C57BL/6	Osmotic minipump	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.25
In Vivo Activity of CP-690,550: Effects on Circulating Cynomolgus Monkey Lymphocyte Subsets	Cynomolgus Macaques	Oral gavage	PGRD	NA ^a	4.2.1.1.26
Secondary Pharmacodynamics					
Characterization of CP-690,550 Effects on Lipid Regulation in Rat Adjuvant Arthritis	Rat AIA Model	Oral gavage	PGRD	CP-690,550 [REDACTED] 155854	4.2.1.2.1
Evaluation of Pfizer compound CP-690,550 on In Vivo Reverse Cholesterol Transport (RCT) using Stable Isotopes in AIA Rats with Chronic Inflammation	Rat AIA Model	Oral gavage	[REDACTED]	CP-690,550 [REDACTED] 120754	4.2.1.2.2
Examination of the Effects of CP-690,550 on EPO-Induced Increases in Reticulocytes in Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus Macaques	Oral gavage	PGRD	NP-02-005	4.2.1.2.3
[REDACTED] Panel Screen Tier 0 Profile CP-690,550-10	60+ receptors, ion channels, transporters and enzymes	In vitro	[REDACTED]	7570532	4.2.1.2.4
[REDACTED] Panel Screen Tier 1 Profile CP-690,550-10	48 receptors and enzymes	In vitro	[REDACTED]	7571347	4.2.1.2.5
Safety Pharmacology					
hERG Patch Clamp	HEK-293 Cells	In vitro	PGRD	NA ^c	4.2.1.3.1
hERG Patch Clamp	HEK-293 Cells	In vitro	[REDACTED]	110106.QHJ (11GR018)	4.2.1.3.2
Cardiac Action Potential	Canine purkinje fibers	In vitro	PGRD	CP690550-10/CG/001/00	4.2.1.3.3
Central Nervous System	Mouse/CD-1	Oral gavage	PGRD	NA ^c	4.2.1.3.1
Pro/Anticonvulsive Activity	Mouse/CD-1	Oral gavage	PGRD	NA ^c	4.2.1.3.1
Cardiopulmonary	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	PGRD	NA ^c	4.2.1.3.1
Cardiovascular	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	PGRD	11GR001	4.2.1.3.4
Renal	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	PGRD	NA ^c	4.2.1.3.1

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Test Article: Tofacitinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Module 4
Gastrointestinal Transit	Rat/Sprague-Dawley	Oral gavage	PGRD	NA ^c	4.2.1.3.1
Cardiovascular	Monkey/Cynomolgus	Oral Gavage	PGRD	745-03432	4.2.1.3.5

Pharmacodynamic Drug Interactions

Studies not performed

AIA = Adjuvant-induced arthritis; CIA = Collagen-induced arthritis; EPO = Erythropoietin; GM-CSF = Granulocyte monocyte colony stimulating factor ; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether a-go-go-related gene; JAK = Janus kinase; PBMC = Peripheral blood mononuclear cells; PGRD = Pfizer Global Research & Development (Pfizer Worldwide Research & Development); STAT = Signal transducer and activator of transcription; TyK = Tyrosine kinase; SC = Subcutaneous; NA = Not applicable.

^aImmunology Discovery Biology Report

^b[REDACTED]

^cSome individual studies have study numbers/reports associated, however, all studies are included in one General Pharmacology report issued on [REDACTED] 20[REDACTED]

^d[REDACTED]

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Test Article: Tofacitinib

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentrations	Results	GLP Compliance	Study Number (Sponsor number)
hERG Patch Clamp	HEK-293 cells stably expressing hERG channels	10 μ M (3124 ng/mL)	Inhibits hERG current by 6.4% at 10 μ M.	No	NA ^a
hERG Patch Clamp	HEK-293 cells stably expressing hERG channels	10, 30, 100 μ M (3124, 9372, 31240 ng/mL)	Inhibits hERG current by 0.8% at 10 μ M, 3.6 % at 30 μ M, and 17.8% at 100 μ M vs 0.3% at 0 μ M (vehicle control) ^b IC ₅₀ estimated to be >100 μ M	Yes	110106.QHJ (11GR018)
Cardiac Action Potential	Canine purkinje fibers	0.1, 1, 10 μ M (31.2, 312, 3124 ng/mL)	No significant effect on resting membrane potential, action potential amplitude, maximal depolarization velocity, or action potential duration at any concentration tested.	Yes	CP690550-10/CG/001/00
Aorta relaxation	Isolated Rat Aorta	0.1, 1, 10, 100 μ M (31.2, 312, 3124, 31240 ng/mL)	% relaxation of KCl-induced contraction; 1 % at 0.1 μ M, 18 % at 1 μ M, 83 % at 10 μ M, 100 % at 100 μ M % relaxation of norepinephrine-induced contraction; 1 % at 0.1 μ M, 16 % at 1 μ M, 69 % at 10 μ M, 100 % at 100 μ M	No	NA ^a
Atria spontaneous beating	Isolated Guinea Pig Right Atria	0.1, 1, 10, 100 μ M (31.2, 312, 3124, 31240 ng/mL)	% change from control atrial rate; -10% at 0.1 μ M, -8 % at 1 μ M, -10 % at 10 μ M, -20 % at 100 μ M	No	NA ^a

GLP = Good Laboratory Practice; hERG = Human ether-^a-go-go-related gene; HEK = Human embryonic kidney; NA = Not applicable; IC₅₀ = 50% Inhibitory concentration.

^a Report title is General Pharmacology Evaluation of CP-690,550 (Reported by Jun Zhou, [REDACTED])

^b Results at each test concentration were compared to control.

090177e183e61aa1\Approved\Approved On: 20-Feb-2013 00:45

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Test Article: Tofacitinib

In Vivo								
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Cmax (ng/mL)	Results	GLP Compliance	Study Number
Central Nervous System	Mouse/CD-1	Oral Gavage	3.2-32	3 M	≤709	No noticeable effect	No	NA ^b
			100		4800	↓ in spontaneous locomotor activity, hunched to flattened posture, splayed hind limbs, ↑ eye closure, and vocalization		
			320		14900	↓ in spontaneous locomotor activity, hunched posture, flattened posture, vocalization, twitches upon movement, splayed hind limbs, and mild seizures; ↓ in body tone, toe pinch, tail pinch and corneal responses and exploratory behavior, ptosis, positional passivity; 1/3 mice showed ↓ in respiration, tremors, loss of righting reflex, and death.		
			1000		>14900	↑ in intensity of symptoms above + seizures and death		
Pro/ Anticonvulsive Activity	Mouse/ CD-1	Oral Gavage	3.2-32	20 M	≤709	No significant effect	No	NA ^b
Cardiopulmonary	Rat/Sprague-Dawley	Oral Gavage	10	4 M	971	No significant effect	No	NA ^b
			100		8630	↑ in arterial PO ₂ by about 10 mm Hg, ↓ in mean arterial pressure by 37 mm Hg and ↑ in heart rate by 100 bpm		
Renal	Rat/Sprague-Dawley	Oral Gavage	3-10	12 M	≤971	No significant effect	No	NA ^b
			100		8630	Potassium excretion elevated by 104%		

Cmax = Maximum (peak) observed drug concentration; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; NA = Not applicable; bpm = Beats per minute.

^a Single dose unless specified otherwise.

^b Report title is General Pharmacology Evaluation of CP-690,550 (Reported by Jun Zhou, [REDACTED])

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Test Article: Tofacitinib

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Cmax (ng/mL)	Results	GLP Compliance	Study Number
Gastrointestinal Transit	Rat/Sprague-Dawley	Oral Gavage	10	5-6 M	971	No significant effect	No	NA ^b
			30-100		≤8630	Inhibition in gastric emptying by 68%; ↓ in mean geometric center by 79%		
Cardiovascular	Monkey/Cynomolgus	Oral Gavage	100	4 M ^c	3000	Emesis in 1 of 4 monkeys	Yes	745-03432
			300		3310	Emesis, salivation, ↑ in heart rate at 2 to 3 hours post dose; no significant effect on blood pressure, cardiac rhythm and QT interval		
Cardiovascular Blood Pressure Systolic (SBP) Diastolic (DBP) Mean (MBP) Heart Rate (HR) Body Temperature (BT) Activity (ACT)	Rat/Sprague-Dawley	Oral Gavage 10 mL/kg	10 ^d 30 ^d 75 ^d	8F		≥10 mg/kg: Dose dependent ↓ in MBP, SBP, DBP (5 to 17 mmHg) at 0-2 hours postdose on Days 1, 3, and 5; Dose dependent ↑ in HR (+30 to 67 bpm) at 0-2 hours postdose on Days 1 and/or 5; ↓ in BT (up to -0.37 °C) at 8-12 hours postdose; no change in activity 30 and 75 mg/kg: ↓ in HR (27 to 39 bpm) at 8-12 hours postdose on Days 1 and 5.	No	11GR001
Toxicokinetics, 3F (Number/Group)								
Dose (mg/kg/day)			0	10	30	75		
Day 1								
Cmax ng/mL		NC ^e	2560	4760	5080			
AUC(0-24) ng•h/mL		NC ^e	9850	26900	43400			

Cmax = Maximum (peak) observed drug concentration; GLP = Good Laboratory Practice; M = Male; F = Female; NA = Not applicable; QT = Time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in the electrocardiogram; bpm = Beats per minute; NC = Not collected; AUC(0-24) = AUC from time 0 to 24 hours postdose.

^a Single dose unless specified otherwise.

^b Report title is General Pharmacology Evaluation of CP-690,550 (Reported by Jun Zhou, [REDACTED])

^c Randomized cross-over study design.

^d 5-day repeat-dose per dose group.

^e Samples not collected from control animals.