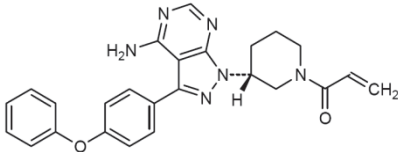
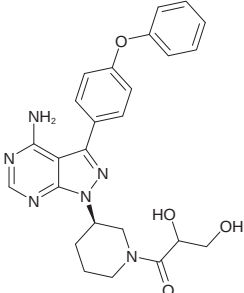


目次

2.4.1	非臨床試験計画概略	4
2.4.1.1	薬理試験	4
2.4.1.2	薬物動態試験	5
2.4.1.3	毒性試験	6
2.4.1.4	非臨床試験での代謝物の評価	7
2.4.2	薬理試験	9
2.4.2.1	効力を裏付ける試験	9
2.4.2.2	副次的薬理試験	16
2.4.2.3	安全性薬理試験	16
2.4.2.4	薬力学的薬物相互作用試験	18
2.4.3	薬物動態試験	19
2.4.3.1	分析法	19
2.4.3.2	吸収	19
2.4.3.3	組織分布	22
2.4.3.4	血漿たん白結合及び血球移行	22
2.4.3.5	共有結合	23
2.4.3.6	代謝	25
2.4.3.7	排泄	29
2.4.3.8	薬物動態学的薬物相互作用の可能性	29
2.4.3.9	動物及びヒトの曝露量比較	31
2.4.4	毒性試験	34
2.4.4.1	単回投与毒性	34
2.4.4.2	反復投与毒性	34
2.4.4.3	遺伝毒性	39
2.4.4.4	生殖発生毒性	39
2.4.4.5	光毒性	40
2.4.4.6	免疫毒性	41
2.4.4.7	不純物の安全性評価	41
2.4.4.8	動物とヒトとの比較	45
2.4.5	総括及び結論	48
2.4.5.1	本剤の特徴	48
2.4.6	参考文献	51

略号一覧表

略号又は略称	化学名又は一般名	構造式	由来
イブルチニブ (PCI-32765, JNJ-54179060)	1-{{(3R)-3-[4-Amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]piperidin-1-yl}prop-2-en-1-one		主薬
PCI-45227 (JNJ-54243761)	ジヒドロジオール体 (M37)		代謝物

略号又は略称	名称及び内容
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve)
AUC _∞	0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinite time)
AUC _{last}	0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last quantifiable time)
AUC _t	0 時間から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve from time zero to time t)
BCR	B 細胞受容体 (B cell receptor)
BCRP	乳癌耐性たん白質 (breast cancer resistance protein)
BLNK	B 細胞リンカーたん白 (B cell linker protein)
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ (Bruton's tyrosine kinase)
CCL	CC ケモカインリガンド (CC chemokine ligand)
CLL	慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia)
C _{max}	最高血漿中濃度 (maximum plasma concentration)
CXCL	CXC ケモカインリガンド (CXC chemokine ligand)
CpG	シトシン-リン酸-グアノシン (cytosine-phosphate-guanosine)
CYP	チトクローム P450 (cytochrome P450)
d	日 (day)
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma)
ECG	心電図 (electrocardiogram)
F	絶対的バイオアベイラビリティ (absolute bioavailability)
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (Good Laboratory Practice)
h	時間 (hour)
HED	ヒト等価用量 (human equivalent dose)
HEK	ヒト胎児腎細胞 (human embryonic kidney)
hERG	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子 (human ether-a-go-go related gene)
HSA	ヒト血清アルブミン (human serum albumin)
IC ₅₀	50%阻害濃度 (50% inhibitory concentration)
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization)
Ig	免疫グロブリン (immunoglobulin)
KLH	keyhole limpet hemocyanin

略号又は略称	名称及び内容
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
MCL	マントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma)
MDR1-MDCK 細胞	P-糖たん白質を発現させた MDCK 細胞 (P-glycoprotein transfected MDCK cell)
MTD	最大耐量 (maximum tolerated dose)
MTDL	最小毒性量 (minimum toxic dose level)
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸 (還元型) [nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)]
NLC	ナース細胞 (Nurse-like cell)
NOAEL	無毒性量 (no-observed-adverse-effect level)
NOEL	無影響量 (no-observed-effect level)
OAT	有機アニオントランスポーター (organic anion transporter)
OATP	有機アニオン輸送ポリペプチド (organic anion transporting polypeptide)
OCT	有機カチオントランスポーター (organic cation transporter)
OECD	経済協力開発機構 (Organization for Economic Cooperation and Development)
PBMC	末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells)
PBPK	生理学的薬物速度論 [physiologically-based pharmacokinetic(s)]
P-gp	P-糖たん白質 (P-glycoprotein)
PLC γ	ホスホリパーゼ C γ (phospholipase C gamma)
(Q)SAR	(定量的) 構造活性相関 [(quantitative) structure-activity relationship]
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー (quantitative whole-body autoradiography)
SCID	重症複合型免疫不全 (severe combined immunodeficiency)
SLL	小リンパ球性リンパ腫 (small lymphocytic lymphoma)
SLS	ラウリル硫酸ナトリウム (Sodium lauryl sulfate)
Syk	脾臓チロシンキナーゼ (spleen tyrosine kinase)
$t_{1/2}$	消失半減期 (elimination half-life)
TCR	T 細胞受容体 (T cell receptor)
TK	トキシコキネティクス (toxicokinetics)
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間 (time to reach the maximum plasma concentration)
VCAM-1	血管細胞接着分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
WBC	白血球 (white blood cell)

2.4.1 非臨床試験計画概略

正常 B 細胞及びほとんどの B 細胞性腫瘍の分化及び維持は、B 細胞受容体 (BCR) からのシグナル伝達により調節されており^{1)・2)}、このシグナル伝達経路において細胞質中に存在するブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) は非常に重要な役割を果たしている^{3)・4)}。さらに、BTK は B 細胞の遊走、走化性及び接着に必要なケモカイン受容体シグナル伝達経路の重要な因子でもある。

イブルチニブ (PCI-32765, JNJ-54179060) は BTK に対する強力な阻害作用を示す。BTK の活性部位に存在する 481 位システイン残基 (Cys-481) と共有結合する⁵⁾ ことにより、1 日 1 回の経口投与で BTK 酵素活性を持続的に阻害する。

BTK 阻害薬は、BCR 及びケモカイン受容体からのシグナル伝達の亢進を起因とする B 細胞性腫瘍の新しい治療法として期待出来る。イブルチニブは、共有結合を形成する BTK 阻害薬として最初に臨床試験が行われた薬剤であり、再発又は難治性の慢性リンパ性白血病 (CLL) /小リンパ球性リンパ腫 (SLL) を含む B 細胞性腫瘍の患者の治療を目的としている。CLL/SLL は進行癌であり、治療方法の選択肢が限られていることから、イブルチニブの非臨床評価は日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) S9 ガイドラインに従って実施した。

イブルチニブ (図 2.4.1-1) は 1 つのキラル中心を持つ R-エナンチオマーであり、分子量は 440.5 (遊離塩基) である。S-エナンチオマー (PCI-32769) の BTK に対する阻害活性はイブルチニブの約 1/3.6 であった。臨床試験用製剤は粉末を充填したゼラチンカプセルである。非臨床試験は、申請予定の適応症 (再発又は難治性の CLL/SLL) に対する投与経路 (経口投与) 及び用法・用量 (1 日 1 回、420 mg/日) に準じて実施した。

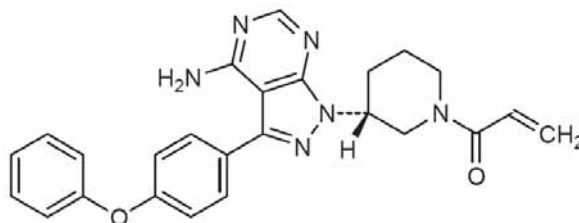


図 2.4.1-1 イブルチニブの化学構造

2.4.1.1 薬理試験

イブルチニブの効力を裏付ける試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した。*In vitro* 試験では、作用機序としてキナーゼ阻害作用、BCR シグナル伝達経路に対する阻害作用、B 細胞活性化に対する阻害作用、BTK 活性部位への結合、B 細胞性リンパ腫細胞の増殖阻害作用 [初代培養 CLL 患者由来細胞、マントル細胞リンパ腫 (MCL) 患者由来細胞株及びびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) 由来細胞株]、並びに BCR 及びケモカイン刺激による細胞接着及び遊走に対する阻害作用 (初代培養 CLL 患者由来細胞及び MCL 患者由来細胞株) を検討した。また、イブルチニブの S-エナンチオマー及び主要代謝物の BTK 阻害活性を測定した。*In vivo* 試験では、作用機序として脾細胞における BTK 活性部位への結合及び抗腫瘍効果を検討した。副次的薬理試験では、各種機能分子に対する結合親和性及び腫瘍以外のモデル (B 細胞、好塩基球又は肥満細胞が関与) に対する作用を検討した。安全性薬理試験は中枢神経系、心血管系及び呼吸系への影響を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。

安全性薬理試験及び毒性試験では、ヒトの代謝経路と類似していることから、げっ歯類としてラット、非げっ歯類としてイヌを用いた。さらに、マウス及びラットの脾細胞、並びにイヌのリンパ節及び末梢血単核球では BTK が発現していることが知られているため、効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験にはこれら動物種を用いた。

イブルチニブのヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子 (hERG) チャネル電流に及ぼす影響は ICH S7B ガイドラインに準拠し、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) 下で実施した。イブルチニブの中樞神経系及び呼吸系に及ぼす影響はラット、心血管系に及ぼす影響はイヌを用い、ICH S7A ガイドラインに準拠して GLP 下で実施した。ラット及びイヌにおける最高用量は、ヒト等価用量 (HED) に相当する 24 及び 81 mg/kg を用いた。ラットでは雄性に比べて雌性で曝露量が高くなる傾向がみられたことから、中樞神経系及び呼吸系への影響は雌性ラットを用いて検討した。

2.4.1.2 薬物動態試験

2.4.1.2.1 吸収

イブルチニブの細胞膜透過性は、Caco-2 細胞及び P-糖たん白質 (P-gp) を発現させた MDCK 細胞 (MDR1-MDCK 細胞) 単層膜を用いて *in vitro* で評価した。単回投与時の薬物動態は、マウス、ラット及びイヌにイブルチニブを経口又は静脈内投与して検討した。また、マウス及びラットではイブルチニブを腹腔内又は皮下投与したときの薬物動態も検討した。さらに、主要な毒性試験 (一般毒性試験、胚・胎児発生に関する試験及び免疫毒性試験) において、イブルチニブのトキシコキネティクス (TK) を ICH S3A ガイドラインに準拠して検討した。

2.4.1.2.2 分布、代謝及び排泄

分布、代謝及び排泄を評価する初期の試験では R 及び S-エナンチオマーのラセミ混合物の ^{14}C 標識体 (^{14}C -イブルチニブ) を使用し、以降の試験では単独エナンチオマーの ^{14}C -イブルチニブ (R-エナンチオマー) を使用した。

イブルチニブの組織分布は、有色ラットに ^{14}C -イブルチニブを投与して、定量的全身オートラジオグラフィー (QWBA) 法で検討した。また、マウス、ラット、イヌ及びヒトにおけるイブルチニブの血漿たん白結合及び血球移行を *in vitro* で評価した。さらに、ラット及びヒト由来の様々なたん白試料 (*in vitro*)、並びにラット、イヌ及びヒトの血漿 (*in vivo*) との共有結合形成能を評価した。

In vivo でのイブルチニブの代謝及び排泄は、無処置又は胆管カニュレーションしたラット、若しくはイヌにおいて検討した。ヒトでの代謝及び排泄については、 ^{14}C -イブルチニブを単回経口投与した臨床試験成績が得られている。また、イブルチニブを健康男性被験者に単回経口投与したとき、又は血液がん患者に反復経口投与したときの血漿試料を分析し、ヒト血漿中主要代謝物を同定し、その存在量を推定した。さらに、 ^{14}C -イブルチニブの *in vitro* 代謝を、肝ミクロソーム (ラット、ウサギ、イヌ、サル及びヒト)、肝細胞 (ラット、ウサギ、イヌ及びヒト) 及びヒトチトクローム P450 (CYP) 発現系を用いて検討した。イブルチニブの代謝に関与する CYP 分子種は、ヒト CYP 発現系及びヒト肝ミクロソームを用いて検討した。

2.4.1.2.3 薬物動態学的薬物相互作用

イブルチニブによる薬物相互作用の可能性を評価するために、ヒト CYP 阻害及び誘導能、並びに P-gp 及び有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) の基質となるかについて *in vitro* で検討した。また、トランスポーター発現細胞又は反転膜小胞を用いて、イブルチニブによる P-gp、乳癌耐性たん白質 (BCRP)、有機アニオントランスポーター (OAT) 1, OAT3, 有機カチオントランスポーター (OCT) 2, OATP1B1 及び OATP1B3 阻害能を評価した。さらに、イブルチニブがワルファリンのたん白結合に影響を及ぼす可能性について、ヒト血漿を用いて検討した。

2.4.1.3 毒性試験

ラット及びイヌを用いた単回投与及び主たる反復投与毒性試験、ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験は GLP に準拠して行った。イブルチニブの主たる TK 評価についても GLP に準拠して実施した。なお、主な毒性試験は経済協力開発機構 (OECD) 加盟国で実施した。

ICH S9 ガイドラインに従い、イブルチニブの光毒性は、紫外吸収スペクトル、光安定性及び動物の組織分布の評価、並びに *in vitro* 光毒性試験によって評価した。また、ICH S8 ガイドラインに従い、イブルチニブの免疫毒性は、ラット及びイヌを用いた 4 及び 13 週間反復投与毒性試験における免疫系器官の重量及び病理組織学的検査に基づいて評価した。さらに、特定の免疫系細胞集団に及ぼす影響を評価するために、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験の一部として白血球 (WBC) のイムノフェノタイピングを実施し、また、ラットを用いた 4 週間免疫毒性試験を実施した。

ICH S9 ガイドラインに従い、イブルチニブの製造販売承認申請に必要な一般毒性試験の投与期間は 3 カ月間 (13 週間) で十分であると判断した。経口投与後の局所刺激性はラット及びイヌを用いた一般毒性試験の一部として評価した。ICH S2(R1) ガイドラインに従い、マウス骨髄小核試験は、マウスの急性毒性に明らかな性差がみられなかったことから雄性のみを用いて実施した。ラットを用いて胚・胎児発生に関する試験を実施し、胚・胎児の致死作用及び形態異常 (催奇形性) を観察した。なお、ICH S9 ガイドラインでは、第一の動物種において胚・胎児致死作用又は催奇形性が陽性の場合、第二の動物種での試験は通常必要とされないとしている。さらに、ICH S9 ガイドラインに従い、がん原性試験、雌雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は実施しなかった。イブルチニブは成人の患者に使用することから幼若動物を用いた試験は実施していない。

2.4.1.3.1 単回及び反復投与毒性試験

イブルチニブの非臨床毒性試験は ICH S9 ガイドラインに従って実施し、経口投与したときのイブルチニブの毒性を評価した。急性毒性試験はマウス、ラット及びイヌを用いて実施したが、本試験では致死性を評価指標とはしていない。反復投与毒性試験はラット及びイヌを用いて実施し、標的器官及び組織を特定し、無毒性量 (NOAEL) を求め、毒性の発現時期、重篤度及び用量依存性を評価した。また、最長 13 週間までの反復投与毒性試験において毒性の回復性を評価

した。なお、一般毒性試験では、イブルチニブの毒性学的特性の評価に必要な最低限の動物数を使用した。

2.4.1.3.2 遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類細胞を用いる染色体異常試験及びマウス骨髄細胞を用いる小核試験は、ICH S2(R1) ガイドラインに従って、健康成人被験者を対象とした臨床薬理試験実施の可能性を検討する目的で実施した。また、経口投与によるラット胚・胎児発生に関する試験は、ICH S5(R2) ガイドライン及び ICH S9 ガイドラインに従って実施した。

2.4.1.3.3 原薬及び製剤中の不純物の安全性確認

不純物 不純物B*、不純物E*、不純物H*、不純物D* 及び 不純物C* の安全性確認は、以下のとおり、*in silico*、*in vitro* 及び *in vivo* 試験によって行った。

不純物B* 及び 不純物E* については、ラット及びイヌを用いた4週間の一般毒性試験において安全性確認がなされた。さらに、5種類の不純物（不純物B*、不純物E*、不純物H*、不純物D* 及び 不純物C*）をイブルチニブに添加してラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験を実施し、安全性を確認した。

細菌による変異原性は、不純物B* 及び 不純物E* については細菌を用いる復帰突然変異試験によって評価し、不純物H*、不純物D* 及び 不純物C* については専門的な経験に基づくルールベース（Derek Nexus, ver. [REDACTED]）及び統計ベース（MultiCASE – [REDACTED]）によるコンピュータを用いた（定量的）構造活性相関 [(Q)SAR] によって評価した。不純物D* 及び 不純物C* については、これらの不純物をイブルチニブに添加して細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。さらに、5種類の不純物（不純物B*、不純物E*、不純物H*、不純物D* 及び 不純物C*）を添加したイブルチニブを用いて *in vivo* マウス小核試験を実施し、遺伝毒性を評価した。

また、不純物A* の安全性確認については、不純物A* をイブルチニブに添加して、ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験及び細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、小核誘発性についてはイブルチニブのマウス小核試験の結果に基づき評価した。

上記のように、原薬及び製剤の安全性確認に加え、実際に混在する又は混在すると考えられる、計22種の不純物を特定し、不純物の潜在変異原性について Derek Nexus (ver. [REDACTED]) を用いたコンピュータによる毒性評価を行い、その検証として 不純物F* 及び 不純物G* については細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

2.4.1.4 非臨床試験での代謝物の評価

イブルチニブの主要代謝物〔総薬物関連物質の血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）の10%を超える、又は反復投与により10%程度となる代謝物〕として M21（末端フェニル基水酸化体の硫酸抱合体）、M23（アミド加水分解体）、M25（ピペリジン環の酸化的開環及びカルボン酸への酸化体）、M34（ピペリジン環の酸化的開環及び第一級アルコールへの還元体）及び PCI-45227（M37、ジヒドロジオール体代謝物）が認められた。

PCI-45227 (M37) の BTK に対する阻害活性は、イブルチニブの約 1/15 であった。PCI-45227 (M37) は、イブルチニブのアクリロイル基 (BTK の活性部位の Cys-481 との共有結合形成に関与) の酸化及び加水分解により生成することから、その BTK に対する結合は可逆的であると考えられる。PCI-45227 (M37) はイブルチニブに比べて低いものの薬理活性を有し、また血漿中で比較的多く存在し、開発早期にヒト主要代謝物である可能性が考えられたことから、Baillie ら⁶⁾ の提言に従って代謝物の非臨床試験を実施した。

In vitro 試験において PCI-45227 (M37) の hERG チャンネル電流に及ぼす影響を検討した。また、PCI-45227 (M37) の細胞膜透過性は、Caco-2 細胞及び MDR1-MDCK 細胞単層膜を用いて *in vitro* で評価した。さらに、ラットに PCI-45227 (M37) を静脈内投与したときの薬物動態も検討した。

ラット及びイヌ 13 週間反復投与毒性試験、胚・胎児発生に関する試験、免疫毒性試験及び不純物のマウス小核試験では、PCI-45227 (M37) の血漿中濃度をバリデートされた液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いて測定し、動物及びヒトでの曝露量比較を行った。

一方、M23、M25 及び M34 の BTK に対する阻害活性は、イブルチニブのそれぞれ約 1/80、1/2000 及び 1/200 であった。M23 はアクリロイル基を有さず、BTK に対する結合は可逆的であると考えられる。また、M25 及び M34 はアクリロイル基を有し、理論上 BTK と不可逆的に結合する可能性が考えられるものの、薬理活性は低く、臨床使用時には効果に寄与する濃度には達しないと考えられる。なお、M21 については代謝物標品が入手できなかったことから、*in vitro* 試験での評価は実施しなかった。

限定的な情報ではあるものの、M21、M23、M25 及び M34 に関しても、曝露量データが ¹⁴C-イブルチニブをラット、イヌ及びヒトに単回経口投与したマスバランス試験で得られていることから、動物及びヒトでの曝露量比較を行った。

¹⁴C-イブルチニブ (R-エナンチオマー) をラット肝 S9 とインキュベーションすると、主要な第 I 相代謝物である M25 及び PCI-45227 (M37) が生成し、また下流代謝物である M17 及び M29 が認められたことから M34 の生成が推察される【2.6.5.10 (4.2.2.4.2) 参照】。このことから、*in vitro* の遺伝毒性試験では、これら 3 種の第 I 相主要代謝物の曝露が得られるよう、代謝活性化系として Aroclor で誘導したラット肝 S9 を添加した。

In vitro 試験において、ヒト血漿中主要代謝物 [M23、M25、M34 及び PCI-45227 (M37)] の血漿たん白結合、ヒト CYP 分子種に対する阻害能、Caco-2 細胞及び MDR1-MDCK 細胞単層膜を用いた細胞膜透過性 [PCI-45227 (M37) のみ]、トランスポーター発現細胞又は反転膜小胞を用いた P-gp、BCRP、OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1 及び OATP1B3 阻害能、並びにヒト肝細胞を用いた CYP 誘導能 [PCI-45227 (M37) のみ] を評価した。また、P-gp 及び OATP [PCI-45227 (M37) のみ] の基質となるかについても検討した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 作用機序

2.4.2.1.1.1 B 細胞における BTK の役割

BTK は非受容体型チロシンキナーゼの Tec キナーゼファミリーに属する細胞質酵素で、T 細胞及び形質細胞以外の造血系細胞で発現しており⁷⁾、BCR からのシグナル伝達経路において、重要な役割を果たしている^{3)、4)}。正常及び腫瘍性の B 細胞における BCR のシグナル伝達は、抗原（又は外因性の抗 IgM 抗体）が細胞表面の IgM 受容体を刺激することで開始される。BTK は、抗原の結合による BCR 活性化に応答して細胞膜近傍へ移動し、上流の Src キナーゼファミリーの Lyn 及び Fyn^{8)、9)} により活性化される。さらに、アダプタータンパクである BLNK（B 細胞リンカータンパク）上に集まった Syk（脾臓チロシンキナーゼ）によっても活性化される¹⁰⁾。BTK はホスホリパーゼ C γ (PLC γ) 2 をリン酸化によって活性化し¹¹⁾、引き続いてカルシウム流入、MAP キナーゼ、Akt 及び NF- κ B の活性化が起こり、最終的に B 細胞が活性化する（図 2.4.2-1）。

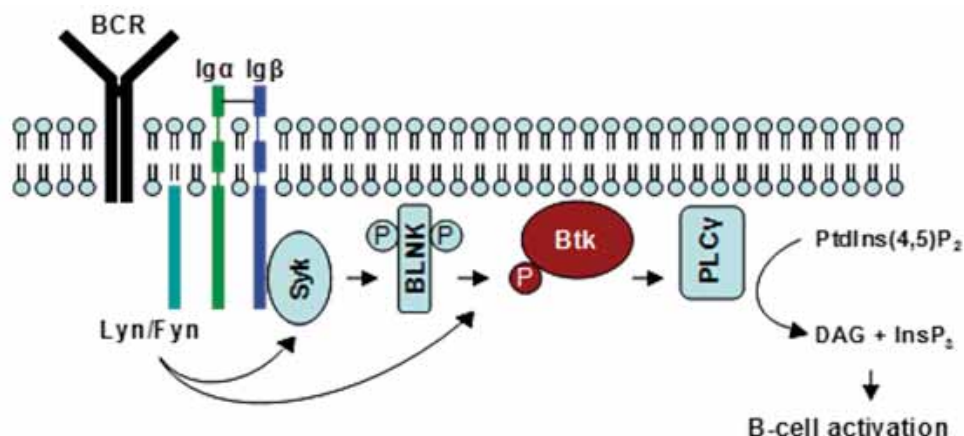


図 2.4.2-1 抗原結合による BCR 活性化に応答した BTK の活性化

PtdIns(4,5)P₂；ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸，DAG；ジアセチルグリセロール，InsP₃；イノシトール-1, 4, 5-三リン酸

BTK は、BCR からのシグナル伝達に加え、B 細胞の遊走と組織へのホーミングに重要な役割を果たしているケモカイン受容体（CXCR4 及び CXCR5 等）のシグナル伝達にも関与している（図 2.4.2-2）^{12)、13)、14)}。

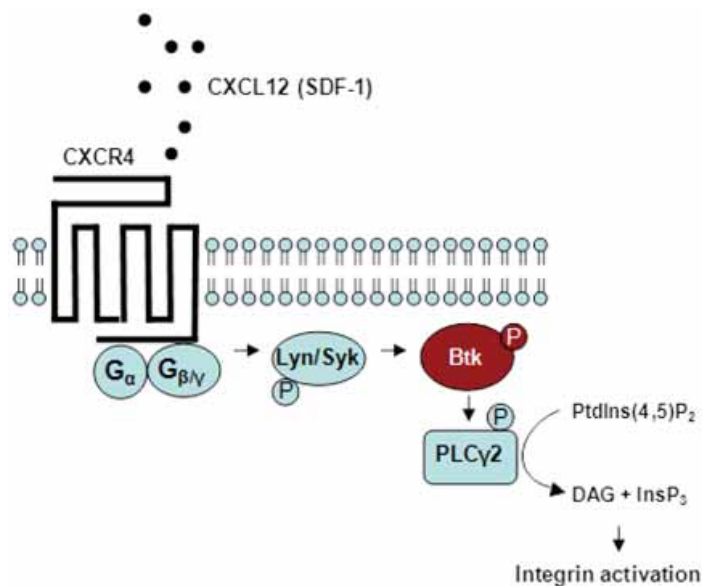


図 2.4.2-2 ケモカイン結合による CXCR4 活性化にตอบสนองした BTK の活性化

SDF-1 ; stromal cell-derived factor 1, PtdIns(4,5)P₂ ; ホスファチジルイノシトール-4, 5-ニリン酸, DAG ; ジアセチルグリセロール, InsP₃ ; イノシトール-1, 4, 5-三リン酸

BTK を欠損する pre-B 細胞では, *in vivo* でのリンパ組織へのホーミングと同様の現象と考えられるケモカイン CXCL12 及び CXCL13 によるインテグリンを介した接着及び遊走が起こらない¹⁴⁾。BTK は, インテグリンを介する接着及び遊走の制御において中心的な役割を担っていることから, リンパ系組織の微小環境への B 細胞遊走及びホーミングを制御することを目的とした治療の標的分子として期待される。

2.4.2.1.1.2 MCL に対する作用

ヒト MCL 由来細胞株 (Mino, MAVER-1, Rec-1, Jeko-1) 及び初代培養ヒト MCL 細胞は, BCR からのシグナル伝達に参与している細胞表面 IgM 及び BTK を発現しており, MCL 由来細胞株でみられる恒常的な BTK の自己リン酸化はイブルチニブにより阻害されることが報告されている¹⁵⁾。Mino 細胞を用いた検討において, BCR の活性化又はケモカイン受容体刺激は, BTK の自己リン酸化, トランス自己リン酸化及び PLCγ2 のリン酸化, 並びに下流のシグナル伝達たん白である Akt 及び JNK のリン酸化を引き起こすが, イブルチニブはこれらのリン酸化を抑制し, Mino 細胞の増殖を 100 nmol/L 以上の 50%阻害濃度 (IC₅₀) 値で抑制した【2.6.2.2.1 参照】。イブルチニブが増殖抑制作用を示した Mino 及び JVM-2 細胞は Erk が恒常的にリン酸化されており, このリン酸化はイブルチニブにより完全に抑制された¹⁵⁾。検討されたすべての MCL 由来細胞株において, 抗 IgM 抗体による刺激は走化性ケモカイン CCL3 及び CCL4 の分泌を促進し, イブルチニブはこの分泌を阻害した¹⁵⁾。さらに, NF-κB の標的として知られる TNFα 及び IL-6 などの他のサイトカインの分泌も抗 IgM 抗体刺激により誘導され, イブルチニブは, ほとんどの MCL 細胞株においてこれらサイトカインの分泌を阻害した¹⁵⁾。BCR の活性化又はケモカイン受容体刺激による MCL 由来細胞株の細胞基質への接着を, イブルチニブは 100 nmol/L の濃度で阻害し, さらに, イブルチニブは 0.1 nmol/L の低濃度でケモカイン受容体刺激による遊走を阻害した【2.6.2.2.1.5 (2) 参照】。

2.4.2.1.1.3 CLL に対する作用

CLL における BCR からのシグナル伝達は、微小環境での抗原結合による活性化及び自己凝集による恒常的活性化によって引き起こされる^{16), 17)}。イブルチニブの臨床効果はリンパ節腫脹や臓器肥大の速やかな消失が特徴であり、組織に局在する CLL 細胞が循環血液中に移行することによる一過性の末梢血リンパ球数の増加を伴う¹⁸⁾。この結果から、CLL におけるイブルチニブの作用機序には微小環境における相互作用が不可欠な要素であると考えられる。

In vitro において、イブルチニブは CLL 細胞のアポトーシスを軽度誘導し（100～10000 nmol/L）、可溶性因子（BAFF, IL-6, IL-4 及び TNF- α ）、フィブロネクチンとの結合及び間質細胞との接触といった微小環境から CLL 細胞に伝えられる生存シグナルを阻害した（10000 nmol/L）¹⁹⁾。さらに、イブルチニブは、シトシン-リン酸-グアノシン（CpG）が誘導する CLL 細胞の増殖を 100 nmol/L で完全に抑制した¹⁹⁾。

単球由来のナース細胞（NLC）との共培養又は抗 IgM 抗体刺激による CLL 細胞の生存、³H 標識チミジン取り込み及び BCR シグナル依存性のケモカイン（CCL3 及び CCL4）分泌は、イブルチニブ（500 又は 1000 nmol/L）により有意に阻害された【4.2.1.1.4 参照】。イブルチニブを投与した CLL 患者の血漿中においても、CCL3 及び CCL4 の濃度は低下していた【4.2.1.1.4 参照】。さらにイブルチニブ（1000 nmol/L）は B 細胞性 CLL 患者から分離した初代培養 CLL 細胞において、抗 IgM 抗体刺激又はケモカイン（CXCL12, CXCL13 及び CCL19）刺激によるインテグリンを介したフィブロネクチン及び血管細胞接着分子-1（VCAM-1）への接着、並びにケモカイン刺激による遊走を有意に抑制した【2.6.2.2.1.5 (1) 参照】。ヒト CLL に類似した特徴を有するマウス CLL 由来のクローン細胞株（TCL1-192）を養子移入したモデルにおいて、イブルチニブ 25 mg/kg/日の飲水投与により末梢血 CLL 細胞数は一過性に増加後、顕著に減少した。また、イブルチニブを投与したマウスの肝臓及び脾臓は有意に小さく、CLL 細胞の浸潤が顕著に減少していた【2.6.2.2.2.1 参照】。

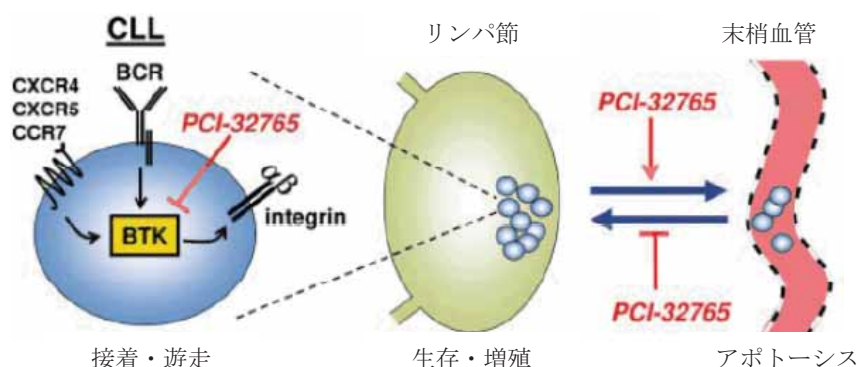


図 2.4.2-3 CLL におけるイブルチニブ（PCI-32765）の推定される作用機序

イブルチニブは、疾患モデル及びヒト CLL 患者において BTK 活性を阻害することにより、CLL 細胞の生存場所であるリンパ節及び骨髄の微小環境において、BCR 及びケモカイン刺激によるインテグリンを介した腫瘍細胞の接着を阻害する（図 2.4.2-3）。これにより、腫瘍細胞が生存するリンパ節及び骨髄などの組織から循環血液への CLL 細胞の離脱を導くとともに、ケモカ

インを介するこれら組織への CLL 細胞のホーミング（集積）を阻害し、腫瘍が退縮すると考えられる。

2.4.2.1.1.4 キナーゼ阻害プロファイル及び可能性のある副作用

BTK に対するイブルチニブの IC_{50} 値は 0.39 nmol/L であった【2.6.2.2.1.1 参照】。イブルチニブは、BTK 以外の幾つかのキナーゼを可逆的又は不可逆的に阻害することが示唆され、BTK の Cys-481 と類似した位置にシステイン残基を有するキナーゼは、イブルチニブにより不可逆的に阻害されると考えられる。イブルチニブは経口投与後に血漿中から速やかに消失する。イブルチニブにより可逆的に阻害されるキナーゼは、イブルチニブの解離速度が速く【4.2.1.1.3 参照】、血漿中イブルチニブ濃度の低下に伴って阻害作用が速やかに消失すると想定され、不可逆的に阻害されるキナーゼに比べ、ヒトに投与したときに有害事象の原因になる可能性は低いと考えられる。

一方、キナーゼたん白は血漿中からの消失が遅く、キナーゼたん白に結合したイブルチニブは非結合型イブルチニブよりも血漿中に長く残存するため、イブルチニブによる不可逆的な阻害作用は持続すると予想される。その中でも ErbB4/HER4, Blk, Bmx/Etk, Txk 及び Tec は、イブルチニブによる阻害作用が強かったことから、治療用量及び最大曝露時にこれらキナーゼの阻害に起因する有害事象の発現が懸念される。BTK 以外のキナーゼに対する阻害で想定される有害事象について、事項で述べる。可逆的又は不可逆的に阻害されるキナーゼに対するイブルチニブの阻害作用（ IC_{50} 中央値）と、イブルチニブを投与した CLL/SLL 患者の血漿中非結合型イブルチニブ濃度との比較を表 2.4.2-1 に示す。

表 2.4.2-1 可逆的又は不可逆的に阻害されるキナーゼに対するイブルチニブの阻害作用と血漿中非結合型イブルチニブ濃度の比較

	Kinase	Median IC_{50} ^a (nmol/L)	Median C_{max} (unbound) / Median kinase IC_{50} ^b
Irreversibly Inhibited	BTK	0.39	16.7
	ErbB4/HER4	0.64	10.2
	Blk	0.94	6.91
	Bmx/Etk	1.10	5.91
	Txk	2.87	2.26
	Tec	5.49	1.18
	EGFR	7.80	0.83
	Itk	11.7	0.56
	ErbB2/HER2	21.6	0.30
Reversibly Inhibited	JAK3	21.9	0.30
	Fgr	2.86	2.27
	Lck	3.49	1.86
	Yes/YES1	3.94	1.65
	Csk	6.17	1.05
	Brk	10.1	0.64
	Hck	17.0	0.38

^a 【2.6.2.2.1.1 参照】

^b 外国人 CLL/SLL 患者にイブルチニブ 420 mg/日を反復経口投与したときの定常状態でのイブルチニブの最高血漿中濃度（ C_{max} ）中央値は 106 ng/mL であり、その非結合型濃度は 2.9 ng/mL（6.5 nmol/L）と推定される。

(1) ErbB4/HER4

イブルチニブは、BTKに対する作用と同程度の IC₅₀ 値で ErbB4/HER4 を阻害する。ErbB4/HER4 阻害に関連する有害事象として悪心、下痢、嘔吐、発疹及び全身性／末梢性浮腫が報告されている¹⁹⁾。非臨床試験では、ラット及びイヌで一貫して投与に関連した軟便及び／又は下痢が認められた【2.6.6.1.2 参照】。なお、イブルチニブを投与した患者で下痢、悪心及び発疹が認められた【2.7.4.2.1.2 参照】。

(2) Blk

Blk は、B 細胞で発現している Src ファミリーキナーゼの 1 種であり、BCR 刺激により活性化されるが、B 細胞の機能における具体的な役割はまだ解明されていない。Blk ノックアウトマウスは正常な発達と機能を示し、B 細胞の T 細胞依存性及び非依存性抗原に対する液性免疫反応に変化はみられず、不活性型又は欠損型 Blk を過剰発現する細胞における B 細胞の分化、抗体産生及び BCR 依存性の増殖も正常であった²¹⁾。これらの所見は、B 細胞の分化と免疫反応における Blk の機能的冗長性 (redundancy) と一致している²¹⁾。しかし、恒常的に活性化 Blk を発現するトランスジェニックマウスはリンパ腫を発症する傾向を示した²²⁾。

(3) Bmx

Bmx は造血系細胞の他に内皮及び上皮細胞で発現している。膀胱癌の進行時に、腫瘍組織における Bmx の発現が増加することが報告されている²³⁾。さらに、Bmx は細胞遊走及び血管新生に関与すると考えられている²⁴⁾、²⁵⁾、²⁶⁾。イブルチニブは治療用量で Bmx を不可逆的に阻害する可能性が高いが、Bmx を阻害することによる影響は不明である。

(4) Txk

Txk は CD4 陽性 T 細胞で発現しているが、Txk 欠損マウスは野生型マウスと類似した T 細胞集団を構成しており、このマウスの CD4 陽性 T 細胞は正常な T 細胞受容体 (TCR) 刺激カルシウム流入を示したことから²⁷⁾、Txk 欠損マウスの T 細胞に異常は認められないと考えられる。Txk 選択的キナーゼ阻害剤に関する非臨床の安全性の成績は報告されていない。

(5) Tec

Tec は、造血及びリンパ球シグナル伝達において重要な機能をもつと考えられており、T 及び B 細胞、造血細胞及び肝臓で発現している²⁸⁾、²⁹⁾、³⁰⁾。Tec 欠損マウスは正常に発達し免疫系に大きな変化はみられないが、Tec/BTK 二重欠損マウスでは B 細胞分化が B220 及び CD43 陽性のプロ B 細胞期で阻害され、末梢血 B 細胞、特に分化した IgM^{lo}IgD^{hi} B 細胞数の著しい減少が認められた³¹⁾。ラット 13 週間反復経口投与毒性試験においてイブルチニブ 100 又は 300 mg/kg の経口投与は、血清中グロブリンの軽微な減少 (20%未満) を伴った血清アルブミン及び総たん白の減少が認められた【2.6.6.3.4 参照】。

2.4.2.1.1.5 BTK 活性部位への結合

マウスでは、イブルチニブを経口投与後の脾細胞及び腫瘍異種移植モデルの腫瘍組織において、BTK 活性部位の完全な占有が 10 mg/kg 以上において認められ、3.13～5.0 mg/kg の用量では脾細胞において部分的な占有が認められた。ラットでは、イブルチニブ 6 mg/kg 経口投与後の脾細胞での BTK 活性部位占有率は約 90%であった（図 2.4.2-4）。自然発症非ホジキンリンパ腫を有するイヌでは、イブルチニブ 2.5 mg/kg 以上で経口投与 4 及び 24 時間後に、末梢血単核細胞（PBMC）の BTK 活性部位が完全に占有された。

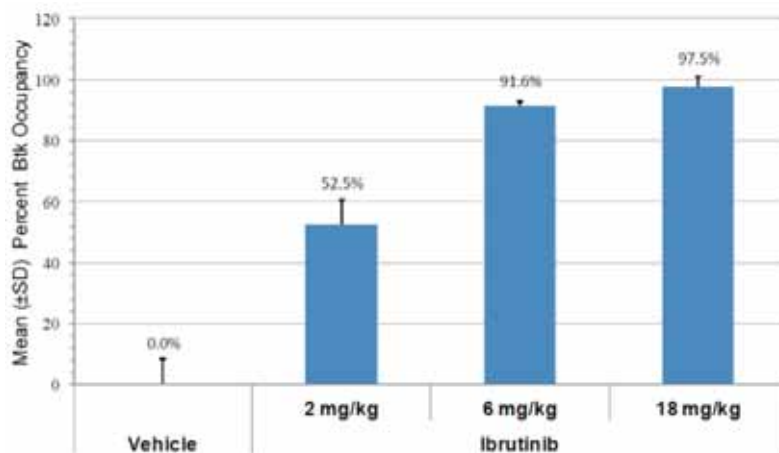


図 2.4.2-4 ラット脾細胞におけるイブルチニブによる BTK 活性部位の占有
n=4, 蛍光プローブ標識バンドの蛍光強度をイメージングにより定量し、平均値±標準偏差で表した。

2.4.2.1.2 抗腫瘍効果

イブルチニブの経口投与により、CLL（TCL1-192 細胞），MCL（Mino 細胞），DLBCL（OCI-LY10 及び TMD8 細胞）由来細胞株を移植した各種マウスモデルにおいて、2.5～3.0 mg/kg/日で部分的な、12～25 mg/kg/日で最大の抗腫瘍効果を示した（表 2.4.2-2）。

TCL1-192 細胞を養子移入した CLL マウスモデルにおいて、イブルチニブ（2.5 及び 25 mg/kg/日、養子移入 3 週間後より投与開始）の投与 1 週間後から末梢血 CLL 細胞数が対照群より低下し、25 mg/kg/日投与群では投与 2 週間後でも維持されていた。さらに、経時的変化を詳細に検討した試験では、イブルチニブ（2.5 及び 25 mg/kg/日、養子移入 2 週間後より投与開始）は投与 4 日目に末梢血 CLL 細胞数が一過性に増加したが、投与 7 日目に対照群と同程度まで回復し、投与 14～25 日目では、25 mg/kg/日投与群で対照群より低下した。同様に、リンパ節腫脹の速やかな退縮を伴う初期の末梢血中リンパ球増加は、イブルチニブを投与した CLL 患者でも一貫してみられた¹⁸⁾。この反応パターンは、リンパ節及び骨髄におけるインテグリンを介する接着がイブルチニブにより阻害され、その結果、これらの組織から末梢血への離脱が起こるという機序と一致している。

MCL 異種移植マウスモデルにおいて、Mino 細胞の移植後にイブルチニブを 70 日間投与（12 mg/kg/日、混餌）したところ、骨髄、PBMC 及びリンパ節（単径部、腸間膜、腋窩、頸部及び下顎）組織中に浸潤したヒト CD19 陽性 Mino 細胞数が減少した。総リンパ節における減少は統計学的に有意であった。

DLBCL 異種移植マウスモデルにおいて、OCI-LY10 又は TMD8 細胞を移植したマウスにイブルチニブを投与したところ、腫瘍増殖を有意に抑制した。イブルチニブ 3 及び 12 mg/kg/日投与群の腫瘍体積比（T/C 比；投与群腫瘍体積 / 対照群腫瘍体積）は、投与 39 日目にそれぞれ 0.51 及び 0.34 であった（OCI-LY10）。

自然発症非ホジキンリンパ腫を有するイヌにおいて、イブルチニブ（2.5～20 mg/kg/日）は、8 例中 3 例で部分奏効、3 例で安定であった。2.5 mg/kg/日以上用量では、イヌの PBMC における BTK 活性部位は完全に占有されていた。

表 2.4.2-2 ヒト腫瘍細胞移入/移植モデルにおけるイブルチニブの抗腫瘍効果

マウス 系統	細胞名	用量 (mg/kg/日)	投与 期間	測定項目	所見	資料番号
CB17 SCID	TCL1-192 (CLL)	0, 2.5, 25	16 日	末梢血 CLL 細胞数	25 mg/kg/日の投与 2 週間後も低下を維持	4.2.1.1.4
CB17 SCID	Mino (MCL)	0, 12	70 日	PBMC 及び組織中 ヒト CD19 陽性 Mino 細胞数	PBMC 及び組織中ヒト CD19 陽性 Mino 細胞数 低下	4.2.1.1.14
SCID	OCI-LY10 (DLBCL)	0, 3, 12	39 日	腫瘍体積	用量依存性に腫瘍体積 減少	4.2.1.1.15
SCID	TMD8 (DLBCL)	0, 3, 12	18 日	腫瘍体積	用量依存性に腫瘍体積 減少	4.2.1.1.16

SCID；重症複合型免疫不全

低分子量のキナーゼ阻害剤のような標的療法では、薬剤耐性獲得の機序として標的キナーゼの遺伝的変異が関与する³²⁾。

イブルチニブに対する耐性を獲得した 6 例の CLL 患者からベースライン時及び再発時に採取した CLL 細胞に対し、全エクソーム配列解析を実施した結果、5 例でイブルチニブの結合部位である BTK のシステイン残基がセリンへ置換されていた。同定された変異の機能解析から、C481S 変異を有する BTK に対するイブルチニブの阻害作用は可逆的であった。不可逆的な BTK 阻害剤であるイブルチニブに対する耐性は、イブルチニブの結合部位に生じるシステイン残基の変異と関連していると考えられる。さらに、2 例の CLL 患者の PLCγ2 に異なる 3 種の変異が認められ、このうち R665W 及び L845F 変異は、自律的な BCR シグナル伝達経路の活性化をもたらす機能獲得変異の可能性がある。BTK シグナル伝達経路の直下に位置する PLCγ2 に 2 種の変異が認められたことから、イブルチニブの CLL に対する作用には、BCR からのシグナル伝達経路が重要であることが示唆される³³⁾。

イブルチニブに対する耐性を獲得した MCL 患者からの腫瘍細胞の入手は限られており、MCL におけるイブルチニブ耐性に関する検討は、Mino 細胞のような MCL 由来細胞株を用いた *in vitro* 試験で検討されている。低濃度から漸増させたイブルチニブ存在下での継代培養により、イブルチニブ耐性株が出現する可能性がある【4.2.1.1.1 参照】。この耐性細胞では、Erk のリン酸化が亢進し、Mek 阻害剤に対する感受性が高くなった。これは Raf-Mek 経路を介したシグナル伝達の亢進が示唆されたが、これら機序の臨床的意義は不明である。

2.4.2.2 副次的薬理試験

67種類の各種機能分子（受容体，トランスポーター及びチャネル）へのイブルチニブの結合親和性を *in vitro* で評価した結果，ほとんどの機能分子に結合親和性を示さなかった。最も強い結合親和性を示したドパミントランスポーターにおける，リガンド結合に対するイブルチニブの IC₅₀ 値は 484 nmol/L（213 ng/mL）であった。

さらに，ヒト好塩基球の脱顆粒に対するイブルチニブの作用及び腫瘍以外の疾患モデル（マウス関節炎，マウス受動皮膚アナフィラキシー及びマウス腎炎）におけるイブルチニブの作用を検討した。

コラーゲン及びモノクローナル抗体誘発関節炎モデルにおいて，イブルチニブは関節炎スコアを有意に低下させ，関節炎発症後の投与においてもイブルチニブによる治療効果が確認された。

肥満細胞の関与するマウス受動皮膚アナフィラキシーモデルにおいて，イブルチニブの経口投与は皮膚のアナフィラキシー反応をほぼ完全に抑制した。

マウスループス腎炎モデルにおいて，イブルチニブの経口投与は血清中二本鎖 DNA 抗体産生及び腎疾患の発症を有意に抑制した。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 *In vitro* 試験

イブルチニブ及びジヒドロジオール体代謝物 PCI-45227（M37）が心筋の急速活性型遅延整流カリウム電流に影響を及ぼす可能性を，hERG カリウムチャネルを発現するヒト胎児腎細胞（HEK）293 細胞を用いて評価した。イブルチニブの hERG チャネル電流に対する阻害作用の IC₅₀ 値は 970 nmol/L（427 ng/mL）であった【2.6.2.4.2 参照】。この濃度は，外国人 CLL 患者にイブルチニブ 420 mg/日を反復経口投与したときの定常状態での非結合型イブルチニブの C_{max} 平均値（3.56 ng/mL）の 120 倍である（表 2.4.2-3）。PCI-45227（M37）の hERG チャネル電流に対する阻害作用の IC₅₀ 値は 9600 nmol/L（4555 ng/mL）であった【2.6.2.4.4 参照】。この濃度は，外国人 CLL 患者にイブルチニブ 420 mg/日を反復経口投与したときの定常状態における非結合型 PCI-45227 の C_{max} 平均値（11.0 ng/mL）の 415 倍である（表 2.4.2-3）。これら *in vitro* の hERG カリウムチャネルでの検討より得られた安全域からは，イブルチニブ及び PCI-45227 がヒトにおける心室再分極過程に有害な影響を及ぼす可能性が低いと予測される³⁴⁾。

表 2.4.2-3 hERG チャネル電流に対するイブルチニブ及び PCI-45227 の作用の
ヒトに対する曝露量比

化合物	hERG IC ₅₀ (nmol/L)	hERG IC ₅₀ (ng/mL)	臨床用量 (mg/日)	定常状態 C _{max} (ng/mL)		曝露量比 ^b
				総濃度 ^a	非結合型濃度	
イブルチニブ	970	427	420	132	3.56 ^c	120
PCI-45227	9600	4555	420	122	11.0 ^d	415

^a外国人 CLL 患者にイブルチニブを投与した臨床試験（PCYC-1102-CA）における定常状態でのイブルチニブ又は PCI-45227 平均 C_{max}（47 例）

^bhERG チャネル電流に対する IC₅₀ 値のヒト血漿中非結合型イブルチニブ又は PCI-45227 濃度に対する比より算出

^c血漿中非結合型イブルチニブ濃度の平均値は，ヒト血漿たん白結合率（97.3%）に基づいて算出【M2.6.4.9.2】

^d血漿中非結合型 PCI-45227 濃度の平均値は，ヒト血漿たん白結合率（91.0%）に基づいて算出【M2.6.4.9.2】

2.4.2.3.2 *In vivo* 試験

2.4.2.3.2.1 中枢神経系及び呼吸系

イブルチニブの中枢神経系及び呼吸系へ及ぼす影響は、ラットにイブルチニブ（0, 2.5, 40 及び 150 mg/kg）を単回経口投与して評価した。いずれの系についても、イブルチニブ投与に関連した影響は認められず、ラットの中枢神経系及び呼吸系に対する無影響量（NOEL）は 150 mg/kg（HED = 24 mg/kg）と判断した。ラットに 150 mg/kg を経口投与した時のイブルチニブ及び PCI-45227 の推定 C_{max} 値とヒトでの C_{max} 値を比較して算出した曝露量比を表 2.4.2-4 及び表 2.4.2-5 に示す。

2.4.2.3.2.2 心血管系

イブルチニブが心血管系に影響を及ぼす可能性を、テレメトリーを装着した無麻酔イヌにイブルチニブ（0, 1.5, 24 及び 150 mg/kg）を単回経口投与して評価した。

24 及び 150 mg/kg の用量で RR 間隔の延長、心拍数減少及び血圧上昇が認められ、150 mg/kg の用量で PR 間隔の延長及び QTcV 間隔の短縮が認められた。いずれの用量においても QTc 間隔の延長は認められなかった。イヌにおけるイブルチニブの NOEL は 1.5 mg/kg と判断し、24 mg/kg の用量で認められた RR 間隔、心拍数及び血圧の変化の最大値は 30%未満であり有害作用とは考えられなかったため、心血管系におけるイブルチニブの NOAEL は 24 mg/kg と判断した。

イヌに 24 mg/kg を経口投与した時のイブルチニブ及び PCI-45227 の推定 C_{max} 値とヒト C_{max} 値に対する曝露量比を表 2.4.2-4 及び表 2.4.2-5 に示す。

イヌ 4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験においても、イブルチニブ投与に関連した QTc 間隔の変化は認められておらず、また、これまで臨床試験においてイブルチニブ投与による心電図（ECG）波形の変化及び QTc 間隔の延長は報告されていない。

表 2.4.2-4 安全性薬理試験におけるイブルチニブ推定 C_{max} 値のヒトに対する曝露量比

試験系	動物種	性	NOEL/NOAEL (mg/kg)	推定 C_{max} (ng/mL)	曝露量比 ^a
中枢神経系	ラット	雌性	150 ^b	2940 ^c	22.3
呼吸系	ラット	雌性	150 ^b	2940 ^c	22.3
心血管系	イヌ	雄性	24 ^d	949 ^e	7.2

^a 非臨床安全性薬理試験の NOEL/NOAEL における推定 C_{max} 値のヒトでの C_{max} 値に対する比を算出。ヒトでの C_{max} 値は外国人 CLL 患者にイブルチニブ 420 mg/日を経口投与したときの定常状態での平均 C_{max} （132 ng/mL）を参照（PCYC-1102-CA 試験）

^b ラットにおける NOEL

^c ラット 4 週間反復経口投与毒性試験の雌性ラット 150 mg/kg/日投与群の投与 1 日目における C_{max} 【2.6.5.4.A】

^d イヌにおける NOAEL

^e イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験の雄性イヌ 24 mg/kg/日投与群の投与 1 日目における C_{max} 【2.6.5.4.B】

表 2.4.2-5 安全性薬理試験における PCI-45227 (M37) 推定 C_{max} 値の
ヒトに対する曝露量比

試験系	動物種	性	NOEL/NOAEL (mg/kg)	C _{max} /用量 (ng/mL)	推定 C _{max} (ng/mL)	曝露量比 ^a
中枢神経系	ラット	雌性	150 ^b	6.40 ^c	960	7.9
呼吸系	ラット	雌性	150 ^b	6.40 ^c	960	7.9
心血管系	イヌ	雄性	24 ^d	2.49 ^e	59.8	0.49

^a 非臨床安全性薬理試験の NOEL/NOAEL における推定 C_{max} 値のヒトでの C_{max} 値に対する比を算出。ヒトでの C_{max} 値は外国人 CLL 患者にイブルチニブ 420 mg/日を経口投与したときの定常状態での平均 C_{max} (122 ng/mL) を参照 (PCYC-1102-CA 試験)。

^b ラットにおける NOEL

^c ラット 13 週間反復経口投与毒性試験の雌性ラット 100 mg/kg/日投与群の投与 1 日目における C_{max} 値 (640 ng/mL) 【2.6.5.4.A】を用量で除して算出。

^d イヌにおける NOAEL

^e イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験の雄性イヌ 30 mg/kg/日投与群の投与 1 日目における C_{max} 値 (74.7 ng/mL) 【2.6.5.4.B】を用量で除して算出。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

8 種 (DB, Granta-519, DHL-4, DLCL2, Ly19, DOHH2, RAMOS 及び Jurkat 細胞) のヒトリ
ンパ腫由来細胞株にイブルチニブ単独, 又は 4 種の細胞増殖阻害薬 (フルダラビン, ドキソルビ
シン, ビンクリスチン又はデキサメタゾン) のいずれかを併用し, 併用による作用を評価した。

デキサメタゾンとの併用は, DLCL2 及び DHL-4 で相乗効果, Romas 及び DOHH2 で相加効果,
Ly19 で軽度の拮抗効果を示した。一方, フルダラビン, ドキソルビシン又はビンクリスチンと
の併用は Ly19 で軽度の拮抗効果を示したものの, それ以外の細胞株では併用による影響はみら
れなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

GLP 適合の TK 試験における血漿試料の分析には、米国食品医薬品局の生体試料分析法ガイダンス^{注1}に従ってバリデートされた LC-MS/MS 法を用いた。また、非 GLP の非臨床薬物動態試験では、事前に設定した基準を満たした頑健な LC-MS/MS 法 (qualified research method) を用いた。

非臨床薬物動態試験に用いたイブルチニブの ^{14}C 標識体 (^{14}C -イブルチニブ) は、*R* 及び *S*-エナンチオマーのラセミ混合物 (報告書内では ^{14}C -PCI-31523 と表記) 又は単独の *R*-エナンチオマーとして合成された (図 2.4.3-1)。

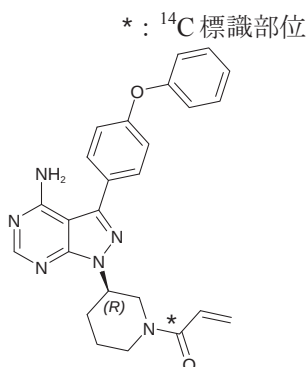


図 2.4.3-1 ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) の化学構造式

2.4.3.2 吸収

Caco-2 細胞及び MDR1-MDCK 細胞単層膜を用いた *in vitro* 試験において、イブルチニブの細胞膜透過性は吸収及び排出の双方向に高く、また P-gp の基質ではないことが示された。実際、ラット、イヌ及びヒトに ^{14}C -イブルチニブを溶液として単回経口投与したマスバランス試験において、未変化体の糞中排泄はわずかであり、投与と放射能のほとんどは酸化代謝物として排泄された。腸内細菌叢による代謝は主に還元反応であることが知られている³⁵⁾ が、糞中に還元された代謝物はほとんど認められなかったことから、経口投与されたイブルチニブは腸内細菌叢による代謝をほとんど受けず、ほぼ完全に吸収された後、消化管及び肝臓による代謝を受けることが示唆された。

マウス、ラット及びイヌにイブルチニブを単回経口投与したときの吸収は速やかで、製剤及び給餌条件によらず最高血漿中濃度到達時間 ($t_{\max}$) は、げっ歯類で 0.08～2.5 時間、イヌで 0.50～4.0 時間であった。ラット及びイヌにイブルチニブを水性懸濁液又は粉末充填カプセル製剤として単回経口投与したとき、全身曝露量の個体間変動は大きく、絶対的バイオアベイラビリティ (F) は 3.8～24.7% であった。イヌに溶液として単回経口投与したときの曝露量は、懸濁液又はカプセル製剤として投与したときに比べて高値であった。

注1 : Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001

マウス、ラット及びイヌにイブルチニブを単回静脈内投与したとき、全身クリアランスはマウスで 6.24 L/h/kg, ラットで 2.23~2.92 L/h/kg, イヌで 1.92~2.43 L/h/kg であった。また、各動物種において中枢コンパートメントの分布容積は 0.531~3.88 L/kg, 定常状態における分布容積は 1.89~5.76 L/kg であった。

ラットにイブルチニブを単回静脈内投与したときの 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC_{∞}) の PCI-45227 (M37) /未変化体比は、単回経口投与時に比べ極めて低く、PCI-45227 (M37) の多くが初回通過効果により生成したことが示唆された。一方、ラットにイブルチニブを単回経口投与したとき、循環血漿中イブルチニブの AUC_{∞} は門脈血漿中イブルチニブの AUC_{∞} より約 60% 低値であった。また、静脈内投与時の循環血漿中イブルチニブの AUC_{∞} と比較して、経口投与時の門脈血漿中イブルチニブの AUC_{∞} (用量で標準化) は約 1/2 であった。これらのことから、ラットのイブルチニブ代謝には消化管及び肝臓の両方が関与していることが示唆された。門脈血漿中 PCI-45227 (M37) の曝露量は、循環血漿中 PCI-45227 (M37) の曝露量と同程度であったことから、PCI-45227 (M37) の生成には、消化管での代謝が大きく関与する可能性が考えられる。以上の点から、イブルチニブ経口投与時に認められた低い F は、不完全な溶解（懸濁液及びカプセル製剤投与の場合）並びに消化管及び肝臓における高度な初回通過効果に起因すると考えられる。

マウス、ラット及びイヌにイブルチニブを単回経口投与したときの薬物動態パラメータを表 2.4.3-1 に示す。

表 2.4.3-1 実験動物にイブルチニブを単回経口投与したときの薬物動態パラメータ

Species	Study Reference	Feeding Condition	Gender	Dose (mg/kg)	Formulation /Dosage Form	Ibrutinib Powder Form	N	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC _∞ (ng·h/mL)	t _{1/2} ^(a) (h)	F ^(b) (%)
Mouse	【4.2.2.2.4】	Non-fasted	F	3.31	A ^(c) /Suspension	Non-micronized	3/time point	44.5	0.083	41.5	1.71	7.8 ⁽ⁱ⁾
			F	14.2	A ^(c) /Suspension	Non-micronized	3/time point	474	0.333	573	3.10	25.2 ⁽ⁱ⁾
Mouse ^(k)	【4.2.1.2.7】	Non-fasted	M	12.5	A ^(c) /Suspension	Non-micronized	3/time point	280	0.083	360	ND	18.0 ⁽ⁱ⁾
Rat	【4.2.2.2.6】	Fasted	M	10	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	3	489±462	0.333±0.000	795±568	4.65±2.57	22.8
			M	30	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	3	429±258	0.333±0.000	1190±690	1.53±0.34	11.4
Rat	【4.2.2.2.7】	Fasted/ Non-fasted ^(m)	F	10	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	3	363±90	0.389±0.529	808±221	1.20±0.15	18.0
			F	30	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	3	1020±450	1.0±0.0	3330±1060	0.980±0.22	24.7
Rat	【4.2.2.2.8】	Fasted	M	100	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	4	601±417	2.5±1.0	3870±2600	3.08±0.82	8.5 ⁽ⁱ⁾
		Non-fasted	M	100	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	4	672±147	1.5±1.0	5570±910	2.85±0.63	12.2 ⁽ⁱ⁾
Dog	【4.2.3.2.6】	Fasted	M	11 ^(l)	C ^(e) /Solution	NA	1	577	1.00	864	2.82	ND
			F	11 ^(l)	C ^(e) /Solution	NA	1	352	1.00	797	2.87	ND
			M	100	C ^(e) /Solution	NA	1	7620	1.00	27400	2.36	ND
			F	100	C ^(e) /Solution	NA	1	8290	1.00	40700	2.60	ND
			M	100	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	1	788	2.00	3630	2.47	ND
			F	100	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	1	1100	1.00	5050	1.58	ND
			M	200	A ^(c) /Suspension	Non-micronized	1	81.7	1.00	664	3.02	ND
			F	200	A ^(c) /Suspension	Non-micronized	1	160	2.00	670	2.63	ND
			M	200	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	1	834	4.00	5620	2.32	ND
			F	200	B ^(d) /Suspension	Non-micronized	1	880	1.00	2810	1.73	ND
Dog	【4.2.2.2.12】	Fasted	M	10	D ^(f) /Capsule	Micronized	4	94±87	1.88±1.55	289±229	ND	ND
			M	10	E ^(g) /Capsule	Non-micronized	4	56±45	1.13±0.63	175±77	ND	ND
			M	10	F ^(h) /Suspension	Micronized	2	114	0.50	399	ND	ND
Dog	【4.2.2.2.11】	Fasted	M	10	D ^(f) /Capsule	Micronized	4	137±144	1.25±0.50	363±310	6.38±4.13	6.9±6.2
			F	10	D ^(f) /Capsule	Micronized	4	126±55	1.00±0.0	427±111	4.35±0.48	10.5±3.7
		Non-fasted	M	10	D ^(f) /Capsule	Micronized	4	248±380	1.63±0.75	721±1117	3.63±1.76	14.4±22.8
			F	10	D ^(f) /Capsule	Micronized	4	55±52	1.13±0.63	156±87	3.27±3.21	3.8±2.3

Mouse: estimated from mean plasma concentration; Rat: mean±standard deviation; Dog: individual value, mean±standard deviation or mean

(a): Terminal half-life.

(b): Bioavailability (F) = dose-normalized AUC following oral administration divided by dose-normalized AUC following IV administration x 100.

(c): Formulation A was 1% methylcellulose / 0.4% Cremophor EL in water.

(d): Formulation B was 1% methylcellulose / 0.4% Cremophor EL / 0.1% SLS in water.

(e): Formulation C was 20% HP-β-CD in water.

(f): Prototype clinical formulation D was microcrystalline cellulose (■% - ■%), croscarmellose sodium (■%) and SLS (■% - ■%).

(g): Formulation E was similar to formulation D except using non-micronized ibrutinib.

(h): Formulation F was 0.5% methylcellulose, 0.4% Cremophor EL, 0.1% SLS and water.

(i): Based on dose-normalized AUC data calculated for IV dosed in female mice 【4.2.2.2.5】.

(j): Based on dose-normalized AUC data calculated for IV dosed in rats 【4.2.2.2.9】.

(k): Study was conducted in a male DBA/10IaHsd mouse established type II collagen arthritis model.

(l): Nominal dose was 10 mg/kg.

(m): Two out of three rats were fasted prior to dosing orally at 10 mg/kg. All the rats administered test formulation orally at 30 mg/kg were not fasted prior to dosing.

F = female; M = male; N = number of animals; NA = not applicable; ND = not determined

ラット又はイヌを用いた 4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験において、イブルチニブ及び PCI-45227 (M37) (13 週間投与試験でのみ測定) の曝露量は、おおむねイブルチニブ用量の増加とともに増加した (表 2.4.3-4, 表 2.4.3-5) が、顕著な個体間変動が認められた。また、反復経口投与時のイブルチニブの曝露量は、単回投与時に比べてわずかに増加した。ラットに 30 mg/kg 以上の用量を経口投与したとき、イブルチニブの曝露量は雌性の方が雄性より高値であった

[C_{max} : 最大 3 倍, 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{24}) : 最大 8 倍] が、イヌでは経口投与時の曝露量に顕著な性差は認められなかった。ラット及びイヌにおいて、定常状態の AUC の PCI-45227 (M37) /未変化体比は 0.14~1.00 であり、ラットでは 100 mg/kg 以上の用量で雄性の方が雌性より 2~3 倍高値であったが、イヌでは雌雄で同様であった。このようにラットで認められた性差は、雄性の方が雌性に比べて CYP3A2 活性が高い^{36), 37)} ことと関連している可能性が考えられる。

妊娠ラットにおけるイブルチニブの曝露量は、非妊娠雌性ラットと同様であった。

2.4.3.3 組織分布

雄性 Long Evans ラットに ^{14}C -イブルチニブ (ラセミ混合物) を単回経口投与した QWBA 試験、及び雄性 Lister Hooded ラットに ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与した QWBA 試験では同様の結果が得られた。最高組織内放射能濃度は、ほとんどの組織 (血漿を含む) において投与 1 時間後に認められ、大部分の組織では放射能濃度が血漿に比べて低く、各測定時点における放射能の分布パターンはおおむね同様であった。

放射能濃度は主に腎臓、肝臓、消化管及び膀胱壁などの排泄器官、並びに副腎で高かった。一方、眼及び一部の中樞神経系組織 (脳及び脊髄) での放射能濃度は低く、イブルチニブ由来物質は血液脳関門を通過しにくいことが示された。血液及び血漿からの放射能の消失は緩やかであり、投与 168 時間後においても低濃度の放射能が認められた。この時点でも定量可能な放射能が認められた組織は、排泄器官 (腎臓及び肝臓)、副腎、脾臓、脾臓及び有色皮膚等であり、これらの組織内での放射能濃度の減少は、血漿に比べ緩徐であったが、組織内放射能濃度はすべて、定量下限 (0.033 μg eq./g) をわずかに上回る程度であった。なお、有色及び白色皮膚で、放射能濃度に顕著な違いは認められず、その他の有色組織 (髄膜、ブドウ膜及び眼) においても顕著に高い放射能濃度は認められなかった。また、いずれの組織においても、長期間の放射能の残留は認められなかった。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験【2.4.4.4 参照】において、母動物毒性に由来しない胎児への影響が認められ、イブルチニブ又はその代謝物の胎盤通過が示唆された。

2.4.3.4 血漿たん白結合及び血球移行

各動物種 (マウス、ラット及びイヌ) 及びヒトの血漿において、イブルチニブの *in vitro* 血漿たん白結合率はいずれも高値であり、ヒトでは 97.3% であった。マウス及びラットではたん白結合に若干の濃度依存性が認められたものの、その他の種では認められなかった。また、肝機能正常被験者と比較して、重度肝機能障害被験者におけるイブルチニブのたん白結合率の低下はわずか (95.2%) であった。M23, M25, M34 及び PCI-45227 (M37) のヒト血漿たん白結合率はそれ

ぞれ 92.3, 74.5, 77.1 及び 91.0%であった。ヒト血漿中において、イブルチニブ及びその主要代謝物は主にヒト血清アルブミン (HSA) と結合し、 α_1 -酸性糖たん白質とも結合することが示された。PCI-45227 (M37) のヒト血漿たん白結合率は 91.0%であった。

In vitro 試験において、血液/血漿中放射能濃度比はマウスで 0.56~0.63, ラットで 0.60~0.89, イヌで 0.54~0.65, 及びヒトで 0.74~0.82 であった。

^{14}C -イブルチニブ (ラセミ混合物又は *R*-エナンチオマー) を投与した *in vivo* 試験において、ラットでは系統によらず、投与後の時間経過に伴う血液/血漿中放射能濃度比の上昇が認められ、Long Evans ラットに ^{14}C -イブルチニブ (ラセミ混合物) を単回経口投与したとき、血液/血漿中放射能濃度比は投与 4 時間後まで 1.0 未満であり、投与 168 時間後は 9.43 であった。血球画分の放射能の割合は、15.9 (投与 1 時間後) ~100% (投与 504 時間後) であった。同様の結果は Sprague-Dawley ラットでも得られた。イヌに ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、血液/血漿中放射能濃度比は、投与 1~48 時間後まで 0.66~0.71 の範囲であり、比較的一定であった。また、健康男性被験者に ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、投与 4 時間後 (これ以降の採血時点では評価できず) までの血液/血漿中放射能濃度比は 0.68~0.78 であり、時間依存性は不明確であった。

2.4.3.5 共有結合

^{14}C -イブルチニブはヒト BTK に対して、強力かつ不可逆的に結合した。オフターゲットのたん白質 (ヒト CYP, HSA, ラット及びヒトのヘモグロビン, 血漿及び肝ミクロソームたん白質, 並びにヒト肝 S9) に対する共有結合の程度は十分に小さく、標的たん白質である BTK に対する選択性が示された (表 2.4.3-2 及び表 2.4.3-3)。

ラット, イヌ及びヒトに ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、血漿及び血球画分中の総放射能 (共有結合放射能 + 非共有結合放射能) の消失は、共有結合放射能の消失に比べて速やかであった。 $C_{\max}$ を比較すると、ヒト血漿中の共有結合放射能は、総放射能の約 12% であった。

表 2.4.3-2 ¹⁴C-イブルチニブ（ラセミ混合物）の種々のたん白質に対する共有結合

Proteins	Species	Ibrutinib Concentration (μ M)	Incubation Time (h)	Covalent binding (pmol/mg protein)	Study Reference
BTK protein (50 μ g/mL)	Human	1	1	9604	【4.2.2.3.10】
		2	1	18330	
		2	4	21490	
Liver S9, - NADPH (2 mg/mL)	Human	1	1	210	
		2	1	510	
		2	4	540	
Plasma	Human	1	1	39	
Albumin (4 mg/mL)	Human	1	1	2	
Liver S9, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	218	【4.2.2.3.12】
Liver S9, - NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	189	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	328	
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	316	
CYP3A4, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	272	
CYP3A4, - NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	122	
CYP2D6, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	124	
CYP2D6, - NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	116	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Rat	10	1	279	
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Rat	10	1	160	
Hemoglobin (blood isolated), - NADPH (1 mg/mL)	Rat	10	1	194	
CYP2E1 (1 mg/mL)	Human	10	1	198	【4.2.2.3.13】
Hemoglobin, purified (1 mg/mL)	Rat	10	1	613	
Hemoglobin, purified (1 mg/mL)	Human	10	1	70	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	722	
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	376	
Plasma	Human	10	1	128	【4.2.2.3.14】
		10	4	408	
Plasma	Rat	10	1	68	
		10	4	679	
CYP2D6, high metabolizer (1 mg/mL)	Human	10	1	548	【4.2.2.3.15】
CYP2D6, medium metabolizer (1 mg/mL)	Human	10	1	274	
CYP2D6, low metabolizer (1 mg/mL)	Human	10	1	258	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	275	
Kidney S9 (1 mg/mL)	Rat	10	1	81	

表 2.4.3-3 ^{14}C -イブランチニブ (*R*-エナンチオマー) の種々のたん白質に対する共有結合

Proteins	Species	Ibuprofen Concentration (μM)	Incubation Time (h)	Covalent binding (pmol/mg protein)	Study Reference
BTK protein (1 mg/mL)	Human	2	1	18376	【4.2.2.3.16】
		2	4	11345	
Plasma (4 to 6 mg/mL)	Human	2	1	9	
		2	4	275	
Hemoglobin (1 mg/mL)	Human	2	1	None	
		2	4	51	
Albumin (1 mg/mL)	Human	2	1	2	
		2	4	57	
Hemoglobin (1 mg/mL)	Rat	2	1	114	
		2	4	95	
Liver S9, + NADPH (1 mg/mL)	Human	2	1	107	【4.2.2.3.17】
Liver S9, - NADPH (1 mg/mL)	Human	2	1	100	
Liver S9, + NADPH (1 mg/mL)	Rat	2	1	106	
Liver S9, - NADPH (1 mg/mL)	Rat	2	1	69	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Human	2	1	192	【4.2.2.3.18】
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Human	2	1	101	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	1201	
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Human	10	1	466	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Rat	2	1	186	
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Rat	2	1	50	
Liver microsomes, + NADPH (1 mg/mL)	Rat	10	1	1043	
Liver microsomes, - NADPH (1 mg/mL)	Rat	10	1	553	

2.4.3.6 代謝

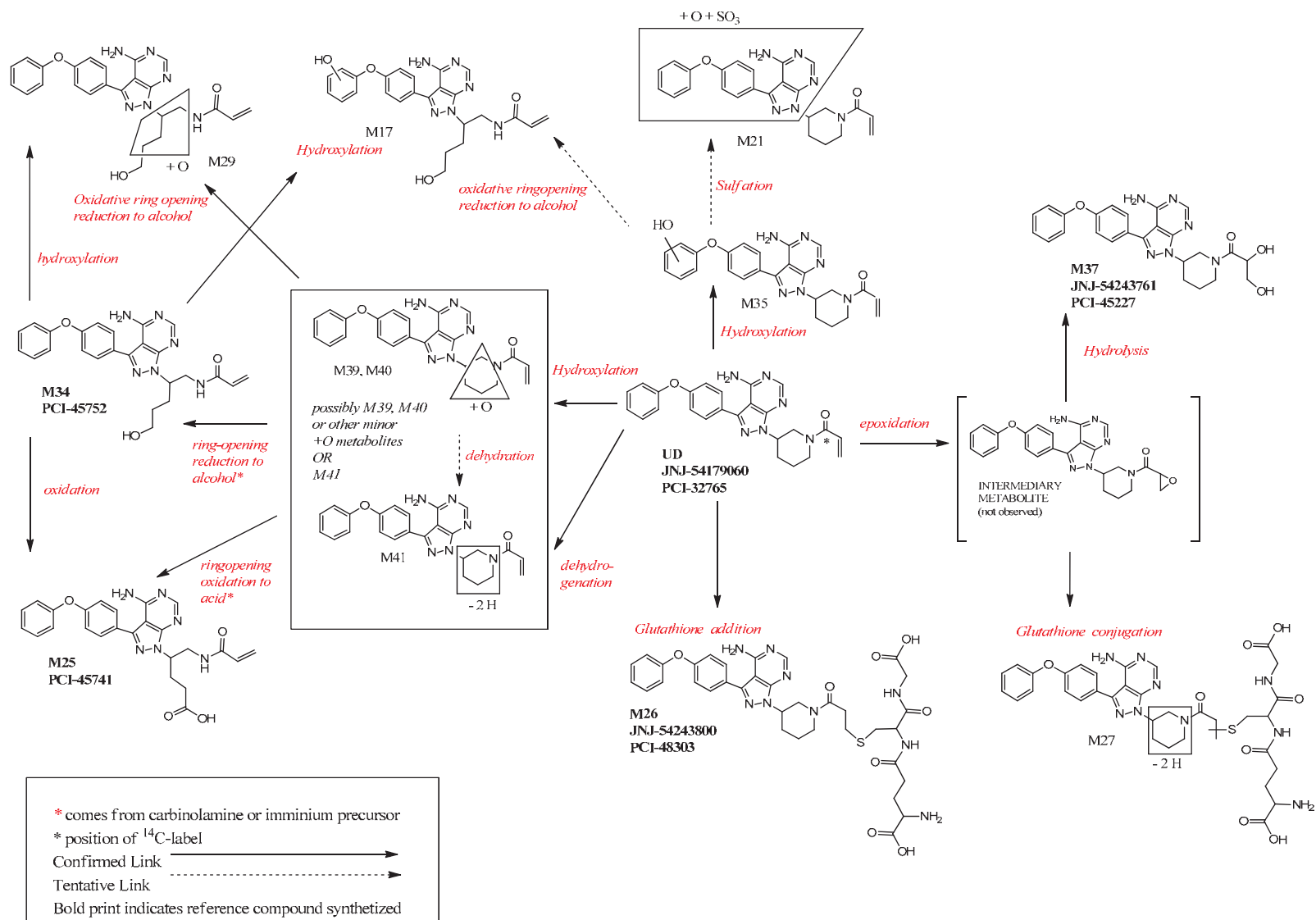
実験動物及びヒトにおけるイブランチニブの代謝を、*in vitro*（ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）及び *in vivo*（ラット、イヌ及びヒト）試験で比較した。実験動物種及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞における *in vitro* 代謝経路を図 2.4.3-2 に、*in vivo* 代謝経路（ヒト血漿中主要代謝物のみに簡略化）を図 2.4.3-3 に示す。すべてのヒト血漿中主要代謝物は、実験動物種（*in vitro* 又は *in vivo*）でも認められた。

In vitro 及び *in vivo* 試験ともに、ラット、イヌ及びヒトにおけるイブランチニブの代謝は顕著であり、計 41 種類の代謝物が認められた。ラット、イヌ及びヒトの *in vivo* 試験において、イブランチニブの主要な代謝経路は（1）末端フェニル基の水酸化（M35）、（2）ピペリジン環の酸化的開環及びそれに続く第一級アルコールへの還元（M34）又はカルボン酸への酸化（M25）、（3）アクリロイル基のエチレンのエポキシ化及びそれに続く加水分解によるジヒドロジオール体 [PCI-45227（M37）] の生成又はグルタチオン抱合（イヌのみ）であった。また、その他の代謝物のほとんどはこれらの主要経路の組合せ又は更に下流の二次的な代謝により生成した。ラット、イヌ及びヒトの *in vitro* 及び *in vivo* 代謝試験において代謝反応は類似していることから、ラット及びイヌは毒性評価に適切な動物種であると考えられる。

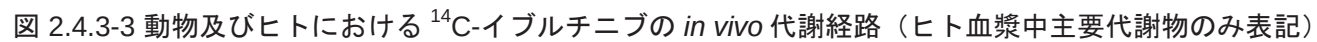
ヒトマスバランス試験で、健康男性被験者に ^{14}C -イブランチニブ (*R*-エナンチオマー) を 140 mg の用量で単回経口投与したとき、血液及び血漿中の主要成分は M21, M25, M34, PCI-45227 (M37) 及び未変化体であった。なお、M23 は ^{14}C 標識部位を有さないことから、ヒトマスバランス試験では存在量を評価できなかった。

ヒト血漿中主要代謝物を同定しその存在量を推定するために、イブルチニブを血液がん患者（PCYC-1111-CA 試験）に 420 mg/日の用量でカプセル製剤として反復経口投与したときの血漿試料を分析した。その結果、ヒト血漿中総薬物関連物質の AUC の 10%を超える、又は反復投与により 10%程度となる主要代謝物として、M21, M23, M25, M34 及び PCI-45227 (M37) が示唆された。

R-エナンチオマーのイブルチニブを経口投与したラット、イヌ及びヒトの血漿試料を用いて S-エナンチオマーの曝露量を測定したところ、単回及び反復投与後の C_{max} 及び AUC の S/R 比は低値であり、原薬中の S-エナンチオマーの割合と同程度であったことから、実験動物及びヒトの *in vivo* で、エナンチオマー間のキラル変換はほとんど起こらないことが示唆された。

図 2.4.3-2 *In vitro* 試験【4.2.2.4.2 参照】における ¹⁴C-イブラルチニブの推定代謝経路

2.4 非臨床試験の標括評価



2.4.3.7 排泄

ラットに ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、投与 96 時間後までに放射能は主に糞中 (約 90%) に排泄され、尿中への排泄はわずか (2%未満) であった。放射能の排泄経路及び排泄率に顕著な性差は認められなかった。また、 ^{14}C -イブルチニブ (ラセミ混合物) を単回静脈内投与したとき、投与 168 時間後までに投与放射能の 83.5%が糞中に排泄されたこと、及び胆管カニュレーションしたラットに ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、投与 24 時間後までに胆汁中に投与放射能の 47%が排泄されたことから、胆汁中排泄が ^{14}C -イブルチニブ由来放射能の主要な排泄経路であることが示された。

無処置ラットにおいて、未変化体は糞中から投与放射能の約 2%のみが検出され、尿中からは検出されなかった。胆汁中にも未変化体は認められず、代謝物は主に第 I 相代謝物のグルクロン酸及び硫酸抱合体であった。一方、無処置ラットの糞中代謝物は主に第 I 相代謝物であり、胆汁中に排泄された抱合体は腸内細菌叢による脱抱合を受けることが示された。胆管カニュレーションしたラットの糞中には多量の酸化代謝物が認められ、代謝物の消化管内への分泌が示唆された。

イヌに ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、投与 72 時間後までに放射能は主に糞中 (約 90%) に排泄され、尿中への排泄はわずか (約 3%) であった。未変化体は糞中から投与放射能の 2.66%のみが検出され、尿中からはほとんど (0.11%以下) 検出されなかった。

健康被験者でも同様の結果が認められ、 ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) を単回経口投与したとき、投与 96 時間後までに放射能は主に糞中 (80.6%) に排泄され、尿中への排泄は少なかった (7.8%)。ヒト糞中に排泄された未変化体は投与放射能の 0.77%であった【2.7.2.2.1.1 (1) 参照】。

以上のように、ラット、イヌ及びヒトに ^{14}C -イブルチニブを単回経口投与したとき、いずれの種においても、尿及び糞中に排泄された未変化体はわずか (投与放射能の 3%未満) であったことから、イブルチニブの消失はほぼ完全に代謝によるものであることが示された。

イブルチニブの乳汁中排泄を評価する試験は実施していない。しかし、イブルチニブは広範な組織に分布し、また log P 値が 3.97 であることから、乳汁中に排泄される可能性は否定できないと考えられる。

2.4.3.8 薬物動態学的薬物相互作用の可能性

In vitro において、イブルチニブはワルファリンの血漿たん白結合に影響を及ぼさなかった。

ヒト CYP 発現系及びヒト肝ミクロソームを用いた検討結果、並びに臨床試験においてイブルチニブの代謝はケトコナゾールにより阻害された【2.7.2.2.1.4 (1)参照】ことから、イブルチニブの代謝は主に CYP3A4 が関与し、CYP3A5 の関与の程度は小さく、CYP1A, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 又は CYP2D6 はほとんど関与しないことが示唆された。このことから、CYP3A4 の阻害剤又は誘導剤との併用投与は、イブルチニブの薬物動態に影響を及ぼす可能性が考えられる。

イブルチニブは CYP3A4/5 及び CYP2B6 を誘導せず、10 $\mu\text{mol/L}$ (4.4 $\mu\text{g/mL}$) までの名目濃度で濃度非依存的に CYP1A2 の mRNA を誘導したものの、活性には顕著な影響を及ぼさなかった。

一方、PCI-45227 (M37) は CYP1A2 を誘導せず、10 $\mu\text{mol/L}$ までの名目濃度で濃度非依存的に CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA を誘導したものの、活性には顕著な影響を及ぼさなかった。また、臨床試験においてイブルチニブ反復投与時の曝露量は単回投与時の曝露量から予測可能であることから【2.7.2.2.1.5 参照】、イブルチニブの臨床使用時に CYP3A 活性は顕著に変動しないことが示唆された。

臨床使用時の血漿中 C_{max} を考慮すると、イブルチニブ及びその主要代謝物による CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 及び CYP3A4/5 の阻害を介した臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。イブルチニブ経口投与後の消化管上部では一時的にイブルチニブ濃度が高くなることが考えられるが、生理学的薬物速度論 (PBPK) モデルを用いて、ミダゾラムを 1 mg の用量で経口投与したときの薬物動態に及ぼすイブルチニブによる CYP3A 阻害の影響を検討したところ、その程度は小さく、ミダゾラムの曝露量増加は 2 倍未満であると予測された。

イブルチニブ及び PCI-45227 (M37) は、*in vitro* において OATP1B1, OATP1B3 及び OATP2B1 の基質ではなかった。また、イブルチニブ及び M25 は P-gp の基質ではなかったが、M23, M34 及び PCI-45227 (M37) は P-gp の基質であった。

臨床使用時の血漿中 C_{max} を考慮すると、イブルチニブ及びその主要代謝物による OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, P-gp 及び BCRP 阻害を介した臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。また、PBPK による予測から、経口投与後の消化管細胞内の非結合型イブルチニブ濃度が P-gp 又は BCRP の IC_{50} 値を上回るのは、投与後 1.5 時間の回腸上部に至るまでのみであることが示唆され、イブルチニブによる消化管での P-gp 及び BCRP 阻害の影響は顕著ではないと考えられる。

2.4.3.9 動物及びヒトの曝露量比較

動物及びヒトでのイブルチニブ及び PCI-45227 (M37) の曝露量を比較した。また、限定的な情報ではあるものの、¹⁴C-イブルチニブをラット、イヌ及びヒトに単回経口投与したマスバランス試験において、M21, M23, M25 及び M34 の曝露量データが得られている。

2.4.3.9.1 イブルチニブ及び PCI-45227 (M37) の曝露量比較

ラット又はイヌを用いた毒性試験におけるイブルチニブ及び PCI-45227 (M37) の定常状態での曝露量 (C_{max} 及び AUC) を算出し (雌雄別に評価) , イブルチニブを 420 mg/日の用量で反復経口投与した海外臨床試験 (PCYC-1102-CA 試験) におけるイブルチニブ及び PCI-45227

(M37) の定常状態での曝露量 (男女併合) と比較^{注2}した (表 2.4.3-4 及び表 2.4.3-5) 。

13 週間反復経口投与毒性試験のデータに基づくと、イブルチニブの C_{max} の動物/ヒト比は、ラットで 4.7~30, イヌで 1.1~14, AUC の動物/ヒト比は、ラットで 3.6~76, イヌで 0.6~18 であった。動物での NOAEL 及び最小毒性量 (MTDL) におけるイブルチニブの動物/ヒト曝露量比はそれぞれ、2.4.4.2.4 及び 2.4.4.2.5.1 項で考察する。一方、PCI-45227 (M37) の C_{max} の動物/ヒト比は、ラットで 2.3~11, イヌで 0.3~1.3, AUC の動物/ヒト比は、ラットで 1.2~14, イヌで 0.1~1.2 であった。動物での MTDL における PCI-45227 (M37) の動物/ヒト曝露量比は 2.4.4.2.5.2 項で考察する。

ラット胚・胎児発生に関する試験のデータに基づくと、イブルチニブの C_{max} の動物/ヒト比は、3.5~20 であり、AUC の動物/ヒト比は 1.9~20 であった。一方、PCI-45227 (M37) の C_{max} の動物/ヒト比は 2.1~14 であり、AUC の動物/ヒト比は、1.0~9.6 であった。胚・胎児発生に関する試験の NOAEL 及び胚・胎児毒性がみられた用量におけるイブルチニブの動物/ヒト曝露量比は 2.4.4.4.1 項で考察する。

以上のように、毒性試験におけるイブルチニブ及び PCI-45227 (M37) の曝露量は、ヒト臨床使用時の曝露量を上回ることが確認された。

注2：日本人のCLL/SLLを含む再発性成熟B細胞性腫瘍患者にイブルチニブを420又は560 mg/日の用量で反復経口投与した臨床試験 (PCI-32765-JPN-101試験) において、イブルチニブ及びPCI-45227 (M37) の投与8日目の曝露量 [420 mg/日投与時 (n=8) のイブルチニブの C_{max} 及び0時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{last}) の平均値はそれぞれ78 ng/mL 及び383 ng·h/mLであり、PCI-45227 (M37) の C_{max} 及び AUC_{last} の平均値はそれぞれ81 ng/mL 及び653 ng·h/mLであった] はいずれも海外試験における曝露量と同程度であることから、海外臨床試験成績を比較に用いた。

表 2.4.3-4 非臨床毒性試験及び臨床試験におけるイブルチニブの曝露量の比較

Species/ Study	Dose Level (mg/kg/d)	Study Day ^(a)	C _{max} (ng/mL)		C _{max} Animal/human Exposure Ratio		AUC (ng·h/mL)		AUC Animal/human Exposure Ratio	
			M	F	M	F	M	F	M	F
Human	7.0 ^(b)	8	132 ^(c)		1		680 ^(c)		1	
Rat	2.5	25	50	70	0.4	0.5	140	180	0.2	0.3
4-wk toxicity	40		650	1700	4.9	13	2800	4000	4.1	5.9
	300M, 150F		2000	3130	15	24	24000	19000	35	28
Rat	30	78	618	1413	4.7	11	2480	19712	3.6	29
13-wk toxicity	100		666	1923	5.0	15	5506	20661	8.1	30
	300M, 175F		1847	3970	14	30	21732	51549	32	76
Rat	10	17 ^(d)	-	466	-	3.5	-	1278	-	1.9
Embryo/fetal development toxicity	40		-	1310	-	9.9	-	5348	-	7.9
	80		-	2627	-	20	-	13729	-	20
Dog	1.5	24	10	12	0.1	0.1	17	21	0.03	0.03
4-wk toxicity	24		682	911	5.2	6.9	1536	1853	2.3	2.7
	150		1481	2183	11	17	14079	15191	21	22
Dog	30	78	151	451	1.1	3.4	377	1683	0.6	2.5
13-wk toxicity	60 ^(e)		1115	842	8.4	6.4	3414	2211	5.0	3.3
	120 ^(e)		1859	1044	14	7.9	12195	6621	18	9.7

^a Day of blood specimen collection. First day of dosing designated study day 0 for nonclinical studies and study day 1 for clinical studies.

^b Weight-based dose assumes a 60 kg individual.

^c Data from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, C_{max}: n=47, AUC: n=45).

^d Animals were dosed on gestation days 6 through 17.

^e On study day 42 dose levels were reduced from 80 and 220 mg/kg/day to 60 and 120 mg/kg/day, respectively.

表 2.4.3-5 非臨床毒性試験及び臨床試験における PCI-45227 (M37) の曝露量の比較

Species/ Study	Dose Level (mg/kg/d)	Study Day ^(a)	C _{max} (ng/mL)		C _{max} Animal/human Exposure Ratio		AUC (ng·h/mL)		AUC Animal/human Exposure Ratio	
			M	F	M	F	M	F	M	F
Human	7.0 ^(b)	8	122 ^(c)		1		1248 ^(c)		1	
Rat	30	78	283	744	2.3	6.1	1536	12758	1.2	10
13-wk toxicity	100		405	736	3.3	6.0	3698	6872	3.0	5.5
	300M, 175F		1322	956	11	7.8	17547	13055	14	10
Rat	10	17 ^(d)	-	261	-	2.1	-	1203	-	1.0
Embryo/fetal development toxicity	40		-	726	-	6.0	-	5110	-	4.1
	80		-	1665	-	14	-	12027	-	9.6
Dog	30	78	33.7	67.9	0.3	0.6	122	347	0.1	0.3
13-wk toxicity	60 ^(e)		122	102	1.0	0.8	768	352	0.6	0.3
	120 ^(e)		164	127	1.3	1.0	1488	1131	1.2	0.9

^a Day of blood specimen collection. First day of dosing designated study day 0 for nonclinical studies and study day 1 for clinical studies.

^b Weight-based dose assumes a 60 kg individual.

^c Data from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, C_{max}: n=47, AUC: n=45).

^d Animals were dosed on gestation days 6 through 17.

^e On study day 42 dose levels were reduced from 80 and 220 mg/kg/day to 60 and 120 mg/kg/day, respectively.

2.4.3.9.2 M21, M23, M25 及び M34 の曝露量比較

M21, M23, M25 及び M34 の曝露量については、 ^{14}C -イブルチニブ (*R*-エナンチオマー) をラット、イヌ及びヒトに単回経口投与したマスバランス試験の結果から評価した。なお、これらの試験において血漿中放射能濃度は概して低く、各代謝物が定量下限未満となることも多かったため、各動物種及びヒトの曝露量は、血漿中 $C_{\max}$ に基づいて比較した。

ラット、イヌ及びヒトのマスバランス試験におけるイブルチニブ及びその主要代謝物の曝露量を表 2.4.3-6 に示す。ヒトマスバランス試験は健康男性被験者を対象とし、イブルチニブを絶食下、治療用量より低い用量 (140 mg) で溶液として単回経口投与した (実際の臨床使用時にはイブルチニブ 420 mg をカプセルとして 1 日 1 回経口投与)。また、ラット及びイヌのマスバランス試験では、 ^{14}C -イブルチニブをそれぞれ 10 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与したが、この用量は 13 週間反復経口投与毒性試験での最低用量と同程度又はそれ以下であった。そのため、単回投与時の $C_{\max}$ が反復投与時の AUC を反映したものであると仮定し、毒性試験での最高用量 [175 (雌性ラット) ~300 (雄性ラット) 及び 120 mg/kg/日 (イヌ)] , 並びにヒト臨床用量 (420 mg) に外挿すると、毒性試験における M21, M25, M34 及び PCI-45227 (M37) の曝露量は、少なくともラット又はイヌのいずれかでヒト臨床使用時の曝露量を上回ると考えられる。なお、M23 に関しては、毒性試験での曝露量がヒト臨床使用時の曝露量を上回るかについて、現時点では結論付けられなかった。

表 2.4.3-6 ラット、イヌ及びヒトのマスバランス試験における
イブルチニブ及びその主要代謝物の血漿中 $C_{\max}$ (ng eq./mL) ^a

Species	Rat		Dog	Human	
Study reference	【4.2.2.4.8】		【4.2.2.4.11】	【4.2.2.4.12】	
Dose	10 mg/kg		30 mg/kg	140 mg	
Matrix	Plasma		Plasma	Plasma	Blood
Gender	M	F	M	M	M
M21	26.7	24.4	412	102 ^c	87.0 ^c
M23	0.23	0.55	-	^d	^d
M25	-	-	83.7	68.1	48.9
M34	54.9 ^b	78.5 ^b	1214 ^e	47.7 ^e	37.0 ^e
PCI-45227 (M37)	154	150	429	41.9	38.7
Ibrutinib (parent)	253	414	1725	33.5	20.4

^a maximal value observed

^b co-elution with M35

^c co-elution with M20 and M24

^d M23 was observed using mass spectrometry (without quantification)

^e co-elution with M31 and M35

-: not observed

2.4.4 毒性試験

単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，胚・胎児発生に関する試験，光毒性試験及び免疫毒性試験を実施し，イブルチニブの毒性を評価した。

In vivo 試験では，主な投与経路を強制経口投与とし，水性懸濁液を用いて検討した。投与量は体重 1 kg あたりのイブルチニブ（有効成分）の重量（mg）で示す。毒性試験の詳細を毒性試験の概要文【2.6.6 参照】及び毒性試験概要表【2.6.7 参照】に要約する。

2.4.4.1 単回投与毒性

イブルチニブの強制経口投与における最大非致死量は，マウスでは雌雄ともに 2000 mg/kg（HED = 160 mg/kg），ラットでは雌性で 400 mg/kg（HED = 64 mg/kg）及び雄性で 1000 mg/kg（HED = 160 mg/kg）であった（表 2.4.4-1）。イヌの経口投与における最大耐量（MTD）は，最高用量の 200 mg/kg（HED = 108 mg/kg）であった。臨床用量の 420 mg は，ヒトの体重を 60 kg として換算すると，7.0 mg/kg となる。

表 2.4.4-1 イブルチニブの経口投与による急性毒性

Species	Gender	Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)		Minimum Lethal Dose (mg/kg)		CTD No
		Actual	HED ^a	Actual	HED ^a	
Mouse ^b	M and F	2000	160	>2000	>160	[4.2.3.1.1]
Rat	F	400	64	1000	160	[4.2.3.1.2]
	M	1000	160	2000	320	
Dog	M and F	200	108	>200	>108	[4.2.3.1.4]

^a Human equivalent dose; conversion factors: mouse = 0.08, rat = 0.16, dog = 0.54.

^b Non-GLP study.

F = female; M = male

2.4.4.2 反復投与毒性

2.4.4.2.1 ラット

ラットにイブルチニブを 0，12，36 及び 120 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，14 日間強制経口投与した。病理組織学的検査では主な所見として，全投薬群で脾臓に腺房萎縮が認められた。その重症度及び発現率は用量依存的に増加し，36 及び 120 mg/kg/日投与群における脾臓の変化は有害作用であると考えられた。本試験における NOAEL は 12 mg/kg/日（HED = 1.92 mg/kg/日）と判断された。

ラットにイブルチニブを 0，2.5，40，150（雌性）及び 300（雄性）mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，4 週間強制経口投与した。投与期間中に，高用量群（300 mg/kg/日）では雄性 15 例中 1 例に死亡が認められた。この途中死亡例は本薬投与に関連するものと考えられた。一般状態観察では，300/150 mg/kg/日投与群で軟便及びこれに関連した体表の着色が認められた。剖検では，300/150 mg/kg/日投与群で下顎リンパ節の腫大が認められた。病理組織学的検査では，300/150 mg/kg/日投与群で，下顎リンパ節に過形成，脾臓にリンパ球枯渇，胸腺に単細胞壊死（アポトーシス），前胃に扁平上皮過形成，皮膚に炎症性変化及び肝臓に軽微な肝細胞壊死が認められた。4 週間の休薬後に高用量群の雄性 1 例で軽微な肝細胞壊死が認められたが，それ以外の病理組織学的変化は

完全に回復した。40 mg/kg/日投与群の雌性 1 例に単一肝葉で肝細胞壊死がみられたことから、報告書最終化の時点では NOAEL は 2.5 mg/kg/日 (HED = 0.4 mg/kg/日) と判断された。その後、この単一肝葉壊死は偶発的な変化であり、肝葉の捻転によって生じたもの³⁸⁾と考えられたことから、科学的に妥当な NOAEL は 40 mg/kg/日 (HED = 6.4 mg/kg/日) であると判断された。

ラットにイブルチニブを 0, 30, 100 及び 300 (雄性) /175 (雌性) mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、13 週間強制経口投与した。これらの用量は、ラットで約 90% の BTK 活性部位占有率がみられる用量 (6 mg/kg) のそれぞれ 5, 17 及び 50/29 倍である。試験期間中に、雄性の高用量群 (300 mg/kg/日) では 20 例中 7 例及び雌性の高用量群 (175 mg/kg/日) では 20 例中 1 例に死亡又は切迫屠殺が認められた。一般状態観察では、100 及び 300/175 mg/kg/日投与群で、軟便、顔面発赤、口又は前肢周囲に赤色物質が認められた。病理組織学的検査では主な毒性所見として、100 又は 300/175 mg/kg/日投与群で、骨に軽微から軽度の菲薄、脾臓に中等度の腺房萎縮、リンパ節、脾臓及び胸腺に中等度から重度のリンパ球枯渇、腸に潰瘍を伴う炎症、並びに前胃に潰瘍を伴う萎縮が認められた。これらの標的器官でみられた病理組織学的変化は、6 週間の休薬により部分的又は完全に回復した。本試験における NOAEL は 30 mg/kg/日 (HED = 4.8 mg/kg/日) と判断された。NOAEL の試験 78 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は、雄性で 2480 ng·h/mL, 雌性で 19712 ng·h/mL であり、C_{max} は雄性で 618 ng/mL, 雌性で 1413 ng/mL であった。ラット及びヒトの曝露量比較を C_{max} については表 2.4.4-3, AUC については表 2.4.4-4 に示す。

2.4.4.2.2 イヌ

イヌにイブルチニブを 0, 4, 12 及び 40 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、14 日間強制経口投与した。一般状態観察では 12 及び 40 mg/kg/日投与群で軟便が認められた。病理組織学的検査では 4 及び 12 mg/kg/日投与群の雄性、並びに 40 mg/kg/日投与群の雌雄に軽微な肝細胞のグリコーゲンの増加がみられたが、重篤な毒性所見は認められなかった。本試験では明らかな毒性が認められなかったことから、NOAEL は 40 mg/kg/日 (HED = 21.6 mg/kg/日) と判断された。

イヌにイブルチニブを 0, 1.5, 24 及び 150 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、4 週間強制経口投与した。一般状態観察では、高用量群 (150 mg/kg/日) で軟便、便退色及び下痢が認められたが、休薬初期に消失した。眼科学的検査では、150 mg/kg/日投与群で 10 例中 3 例に、軽度の角膜ジストロフィー/混濁 (片側性及び両側性) が認められた。これら 3 例を回復群に供したが、試験 51 日 (休薬後 23 日) にも軽度から中等度の片側性の角膜ジストロフィー/混濁が認められた。これらの病変は角膜脂質代謝障害に起因してイヌで自然発生的にみられる変化であるが³⁹⁾、イブルチニブとの関連性を否定することはできなかった。病理組織学的検査では、150 mg/kg/日投与群で数例の腸に軽微から軽度の炎症が認められ、4 週間の休薬後では高用量群の雄性 2 例中 1 例の腸に軽微な炎症が認められた。試験報告書最終化の時点では、24 mg/kg/日投与群の 1 例に軽微な腎梗塞の病理組織学的所見がみられたことから、NOAEL は 1.5 mg/kg/日 (HED = 0.81 mg/kg/日) と判断された。しかしながら、この所見は 13 週間反復投与毒性試験では再現されず、また、これは若年のビーグル犬で一般的にみられる自然発生病変 (間質性炎症) と同様であることから、本試験における科学的に妥当な NOAEL は 24 mg/kg/日 (HED = 13.0 mg/kg/日) と判断された。

13 週間反復投与毒性試験では、イヌにイブルチニブを 0, 30, 80 及び 220 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、強制経口投与を開始したが、80 及び 220 mg/kg/日投与群の数例に一般状態の悪化がみら

れたため、投与 6 週後に中間用量を 80 mg/kg/日から 60 mg/kg/日、高用量を 220 mg/kg/日から 120 mg/kg/日に減量し、投与終了時（試験 91 又は 92 日）まで経口投与した。30、60 及び 120 mg/kg/日の用量は、イヌで 100%の BTK 活性部位占有率がみられる最小用量（2.5 mg/kg）のそれぞれ 12、24 及び 48 倍である。220 mg/kg/日投与群では本薬投与に関連し、腸炎を原因とする一般状態の悪化がみられたことから雄性 6 例中 1 例を投与 5 週に切迫屠殺した。一般状態観察では、80/60 及び 220/120 mg/kg/日投与群で、糞便異常（軟便及び下痢等）及び嘔吐が認められた。眼科学的検査では、イヌ 4 週間反復投与毒性試験と同様に、220/120 mg/kg/日投与群の 1 例に軽度な角膜ジストロフィーが認められた。病理組織学的検査では、80/60 又は 220/120 mg/kg/日投与群で、急性腸炎、パイエル板のリンパ球枯渇及び胃の平滑筋変性が認められた。これらの病理組織学的所見は、13 週間の休薬により完全に回復した。本試験における NOAEL は 30 mg/kg/日（HED = 16.2 mg/kg/日）と判断された。NOAEL の試験 78 日におけるイブルチニブの AUC_{last} は、雄性で 377 ng·h/mL 及び雌性で 1683 ng·h/mL であり、 C_{max} は雄性で 151 ng/mL 及び雌性で 451 ng/mL であった。イヌ及びヒトの曝露量比較を C_{max} については表 2.4.4-3、AUC については表 2.4.4-4 に示す。

2.4.4.2.3 TK

ラット及びイヌを用いた 4 及び 13 週間反復投与毒性試験におけるイブルチニブの定常状態の C_{max} 及び AUC_{last} を毒性試験の概要文【表 2.6.6-9 参照】に、PCI-45227 (M37) の定常状態の C_{max} 及び AUC_{last} を毒性試験の概要文【表 2.6.6-10 参照】に示す。

2.4.4.2.4 NOAEL における動物及びヒトの曝露量比

ラット及びイヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験の NOAEL（30 mg/kg/日）と臨床用量とを比較した。比較にあたり、NOAEL を HED に変換し、ヒトの体重を 60 kg と仮定して体重あたりの臨床用量を算出した。HED に基づく安全域を表 2.4.4-2 に示す。ラット及びイヌの NOAEL に基づく臨床用量（420 mg/日）に対する安全域は、それぞれ 0.69 及び 2.3 であった。

表 2.4.4-2 HED に基づく臨床用量 420 mg/日に対する安全域

NOAEL in Rats ^a (mg/kg/d)	NOAEL in Dogs ^a (mg/kg/d)	HED for NOAEL in Rats ^b (mg/kg/d)	HED for NOAEL in Dogs ^c (mg/kg/d)	Human Dose (mg/d mg/kg/d)	HED-Based Margin of Safety for Patients ^d	
					Rats	Dogs
30	30	4.8	16.2	420 7.0 ^e	0.69	2.3

^a Results from 13-week general toxicology studies.

^b Human equivalent dose based on a conversion factor of 0.16 for the rat.

^c Human equivalent dose based on a conversion factor of 0.54 for the dog.

^d HED/body-weight-based patient dose; margins were calculated using non-rounded values.

^e Body-weight-based dose assuming an 60 kg individual.

ラット及びイヌを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量と臨床試験における曝露量とを比較した。 C_{max} 及び AUC の曝露量比は、13 週間反復投与毒性試験の NOAEL における定常状態の曝露量（試験 78 日）と臨床試験における定常状態の曝露量（試験 8 日、男女併合）に基づいて算出した。イブルチニブの C_{max} 及び AUC の曝露量比をそれぞれ表 2.4.4-3 及び表 2.4.4-4 に示す。

420 mg/日の臨床用量における $C_{\max}$ の動物/ヒト比は、ラットの雄性及び雌性でそれぞれ 4.7 及び 10.7、イヌの雄性及び雌性でそれぞれ 1.1 及び 3.4 であった。

420 mg/日の臨床用量における AUC の動物/ヒト比は、ラットの雄性及び雌性でそれぞれ 3.6 及び 29、イヌの雄性及び雌性でそれぞれ 0.6 及び 2.5 であった。

表 2.4.4-3 イブルチニブの NOAEL と臨床用量 420 mg/日の $C_{\max}$ の曝露量比

Species	Steady-State $C_{\max}$ at NOAEL (ng/mL) ^a		Dose in Humans (mg/d)	$C_{\max}$ in Humans (ng/mL)	$C_{\max}$ Exposure Ratios at NOAEL (Animal/Human)			
	M	F			M Rats	F Rats	M Dogs	F Dogs
Rat	618	1413	420	132 ^b	4.7	10.7	1.1	3.4
Dog	151	451		78 ^c	7.9	18.1	1.9	5.8

^a NOAEL for rats and dogs in 13-week general toxicology studies was 30 mg/kg/day; mean exposures determined for study day 78.

^b Mean steady-state $C_{\max}$ from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=47).

^c Mean steady-state $C_{\max}$ from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

F = female; M = male

表 2.4.4-4 イブルチニブの NOAEL と臨床用量 420 mg/日の AUC の曝露量比

Species	Steady-State AUC _{last} at NOAEL (ng·h/mL) ^a		Dose in Humans (mg/d)	AUC ₂₄ in Humans (ng·h/mL)	AUC Exposure Ratios at NOAEL (Animal/Human)			
	M	F			M Rats	F Rats	M Dogs	F Dogs
Rat	2480	19712	420	680 ^b	3.6	29	0.6	2.5
Dog	377	1683		383 ^c	6.5	51	1.0	4.4

^a NOAEL for rats and dogs in 13-week general toxicology studies was 30 mg/kg/day; mean exposures determined for study day 78.

^b Mean steady-state AUC from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=45)

^c Mean steady-state AUC_{last} from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

F = female; M = male

2.4.4.2.5 MTDL における動物及びヒトの曝露量比

13 週間反復投与毒性試験における MTDL は、ラットでは脾臓及び骨の有害所見に基づき 100 mg/kg/日、イヌでは有害所見と考えられるパイエル板のリンパ球枯渇に基づき 60 mg/kg/日と判断された。

2.4.4.2.5.1 イブルチニブ

$C_{\max}$ 及び AUC の曝露量比は、13 週間反復投与毒性試験の MTDL の定常状態における曝露量（試験 78 日）と臨床試験における定常状態の曝露量（試験 8 日，男女併合）に基づいて算出した。イブルチニブの $C_{\max}$ 及び AUC の曝露量比をそれぞれ表 2.4.4-5 及び表 2.4.4-6 に示す。

420 mg/日の臨床用量における $C_{\max}$ の動物/ヒト比は、ラットの雄性及び雌性でそれぞれ 5.0 及び 15、イヌの雄性及び雌性でそれぞれ 8.4 及び 6.4 であった。420 mg/日の臨床用量における AUC の動物/ヒト比は、ラットの雄性及び雌性でそれぞれ 8.1 及び 30、イヌの雄性及び雌性でそれぞれ 5.0 及び 3.3 であった。

表 2.4.4-5 イブルチニブの MTDL と臨床用量 420 mg/日の $C_{\max}$ の曝露量比

Species	Steady-State $C_{\max}$ at MTDL (ng/mL) ^a		Dose in Humans (mg/d)	$C_{\max}$ in Humans (ng/mL)	$C_{\max}$ Exposure Ratios at MTDL (Animal/Human)			
	M	F			M Rats	F Rats	M Dogs	F Dogs
Rat	666	1923	420	132 ^b	5.0	15	8.4	6.4
Dog	1115	842		78 ^c	8.5	25	14	11

^a MTDL for rats and dogs in 13-week general toxicology studies was 100 and 60 mg/kg/day, respectively; mean exposures determined for study day 78.

^b Mean steady-state $C_{\max}$ from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=47)

^c Mean steady-state $C_{\max}$ from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

F = female; M = male

表 2.4.4-6 イブルチニブの MTDL と臨床用量 420 mg/日の AUC の曝露量比

Species	Steady-State AUC _{last} at MTDL (ng·h/mL) ^a		Dose in Humans (mg/d)	AUC ₂₄ in Humans (ng·h/mL)	AUC Exposure Ratios at MTDL (Animal/Human)			
	M	F			M Rats	F Rats	M Dogs	F Dogs
Rat	5506	20661	420	680 ^b	8.1	30	5.0	3.3
Dog	3414	2211		383 ^c	14	54	8.9	5.8

^a MTDL for rats and dogs in 13-week general toxicology studies was 100 and 60 mg/kg/day, respectively; exposures determined for study day 78.

^b Mean steady-state AUC from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=45)

^c Mean steady-state AUC_{last} from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

F = female; M = male

2.4.4.2.5.2 代謝物 PCI-45227 (M37)

代謝物 PCI-45227 (M37) の $C_{\max}$ 及び AUC の曝露量比は、13 週間反復投与毒性試験の MTDL の定常状態における曝露量（試験 78 日）と臨床試験における定常状態の曝露量に基づいて算出した。PCI-45227 (M37) の $C_{\max}$ 及び AUC の曝露量比をそれぞれ表 2.4.4-7 及び表 2.4.4-8 に示す。

420 mg/日の臨床用量における $C_{\max}$ の動物/ヒト比は、ラットの雄性及び雌性でそれぞれ 3.3 及び 6.0、イヌの雄性及び雌性でそれぞれ 1.0 及び 0.8 であった。420 mg/日の臨床用量における AUC の動物/ヒト比は、ラットの雄性及び雌性でそれぞれ 3.0 及び 5.5、イヌの雄性及び雌性でそれぞれ 0.6 及び 0.3 であった。

表 2.4.4-7 PCI-45227 (M37) の MTDL と臨床用量 420 mg/日の $C_{\max}$ の曝露量比

Species	Steady-State $C_{\max}$ at MTDL (ng/mL) ^a		Dose in Humans (mg/d)	$C_{\max}$ in Humans (ng/mL)	$C_{\max}$ Exposure Ratios at MTDL (Animal/Human)			
	M	F			M Rats	F Rats	M Dogs	F Dogs
Rat	405	736	420	122 ^b	3.3	6.0	1.0	0.8
Dog	122	102		81 ^c	5.0	9.1	1.5	1.3

^a MTDL for rats and dogs in 13-week general toxicology studies was 100 and 60 mg/kg/day, respectively; mean exposures determined for study day 78.

^b Mean steady-state $C_{\max}$ from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=47).

^c Mean steady-state $C_{\max}$ from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

F = female; M = male

表 2.4.4-8 PCI-45227 (M37) の MTDL と臨床用量 420 mg/日の AUC の曝露量比

Species	Steady-State AUC _{last} at MTDL (ng·h/mL) ^a		Dose in Humans (mg/d)	AUC ₂₄ in Humans (ng·h/mL)	AUC Exposure Ratios at MTDL (Animal/Human)			
	M	F			M Rats	F Rats	M Dogs	F Dogs
Rat	3698	6872	420	1248 ^b	3.0	5.5	0.6	0.3
Dog	768	352		653 ^c	5.7	11	1.2	0.5

^a MTDL for rats and dogs in 13-week general toxicology studies was 100 and 60 mg/kg/day, respectively; mean exposures determined for study day 78.

^b Mean steady-state AUC from clinical study PCYC-1102-CA in CLL subjects, Groups 1 and 4 pooled (420 mg/day, n=45)

^c Mean steady-state AUC_{last} from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLC Cohort (420 mg/day, n=8).

F = female; M = male

2.4.4.3 遺伝毒性

イブルチニブの復帰突然変異誘発性、染色体異常誘発性及びマウス骨髄小核誘発性を評価した結果、遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.4 生殖発生毒性

2.4.4.4.1 ラット胚・胎児発生に関する試験

妊娠ラットにイブルチニブを 0, 10, 40 及び 80 mg/kg/日の用量で妊娠 6～17 日（器官形成期）に強制経口投与し、妊娠 20 日に帝王切開して胚・胎児発生に対する影響を評価した。母動物に本薬投与に関連する明らかな影響は認められなかったことから、母動物に対する NOAEL は 80 mg/kg/日（HED = 12.8 mg/kg/日）と判断された。胎児では、40 及び 80 mg/kg/日投与群で平均体重の減少、80 mg/kg/日投与群で着床後胚損失率の増加、生存胎児数の減少、内臓奇形及び骨格変異が認められた。これらのことから、胚・胎児に対する NOAEL は 10 mg/kg/日（HED = 1.6 mg/kg/日）と判断された。本試験の結果に基づき、イブルチニブは催奇形性物質であると考えられた。

イブルチニブの曝露量比を表 2.4.4-9 に示す。NOAEL（10 mg/kg/日）及び臨床試験の 420 mg/日での曝露量に基づいて算出した C_{max} の動物/ヒト比は 3.5 であり、AUC の動物/ヒト比は 1.9 であった。胎児体重の減少がみられた MTDL の 40 mg/kg/日及び臨床試験の 420 mg/日での曝露量に基づいて算出した C_{max} の動物/ヒト比は 9.9 であり、AUC の動物/ヒト比は 7.9 であった（表中には示さず）。胎児奇形がみられた 80 mg/kg/日及び臨床試験の 420 mg/日での曝露量に基づいて算出した C_{max} の動物/ヒト比は 20 であり、AUC の動物/ヒト比は 20 であった。

PCI-45227 (M37) の曝露量比を表 2.4.4-10 に示す。NOAEL（10 mg/kg/日）及び臨床試験の 420 mg/日での曝露量に基づいて算出した PCI-45227 (M37) の AUC の動物/ヒト比は 1.0 であった。胎児体重の減少がみられた MTDL の 40 mg/kg/日及び臨床試験の 420 mg/日での曝露量に基づいて算出した AUC の動物/ヒト比は 4.1 であった（表中には示さず）。胎児奇形がみられた 80 mg/kg/日及び臨床試験の 420 mg/日での曝露量に基づいて算出した AUC の動物/ヒト比は 9.6 であった。

Embryo/Fetal Endpoint	Steady-State PK Parameter ^a		Dose in Humans (mg/d)	C _{max} in Humans (ng/mL)	AUC in Humans (ng·h/mL)	C _{max} and AUC Exposure Ratios (Animal/Human)			
	C _{max} (ng/mL)	AUC ₂₄ (ng·h/mL)				E/F NOAEL		Malformation	
						C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
E/F NOAEL ^b	466	1278	420	132 ^d	680 ^d	3.5	1.9	20	20
F Malformation ^c	2627	13729		78 ^e	383 ^e	6.0	3.3	34	36

^e Mean steady-state C_{max} or AUC_{last} from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

Embryo/Fetal Endpoint	Steady-State PK Parameter ^a		Dose in Humans (mg/d)	C _{max} in Humans (ng/mL)	AUC in Humans (ng·h/mL)	C _{max} and AUC Exposure Ratios (Animal/Human)			
	C _{max} (ng/mL)	AUC ₂₄ (ng·h/mL)				E/F NOAEL		Malformation	
						C _{max}	AUC	C _{max}	AUC
E/F NOAEL ^b	261	1203	420	122 ^d	1248 ^d	2.1	1.0	14	9.6
Malformation ^c	1665	12027		81 ^e	653 ^e	3.2	1.8	21	18

^e Mean steady-state C_{max} or AUC_{last} from clinical study PCI-32765-JPN-101 in subjects, Cohort 1 and CLL/SLL Cohort (420 mg/day, n=8).

40

表 2.4.4-11 最高濃度到達時間（1 時間）における組織対血漿中濃度

Tissue	Tissue:Plasma Ratio	Concentration ($\mu\text{g equivalents/g tissue}$) ^a
Eye (uveal tract)	0.40	0.562
Eye (whole eye)	0.10	0.134
Skin (pigmented)	0.45	0.635
Skin (non-pigmented)	0.33	0.462
Liver	4.10	5.76

^a At an oral dose of 10 mg/kg.

2.4.4.6 免疫毒性

ラット 13 週間反復投与試験 [0, 30, 175 (雌性) / 300 (雄性) mg/kg/日] において、試験約 11 週に末梢血を採血し、イムノフェノタイピングを実施して免疫毒性を評価した。300 mg/kg/日投与群の雄性、30 及び 175 mg/kg/日投与群の雌性では B 細胞の絶対数が減少した。30 mg/kg/日投与群の B 細胞数の変化は有害作用ではないと考えられた。以上のように、イムノフェノタイピングでは主に B 細胞に影響が認められたが、これは BCR シグナル伝達経路に対するイブルチニブの阻害作用による変化であると考えられた。

雌性ラットにイブルチニブを 0, 10, 30 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、28 又は 33 日間反復強制経口投与して免疫毒性を評価し、28 日間の休薬による所見の可逆性を評価した。抗原として keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用い、試験 14, 28 及び 56 日（回復期間）に静脈内投与した。10 mg/kg/日以上投与群では、用量依存的に抗 KLH IgM 及び IgG 反応の抑制、IgM 濃度の減少、並びに好中球数及び顆粒球系:赤芽球系細胞比の増加が認められた。さらに、100 mg/kg/日投与群では IgG 濃度、リンパ球数及び WBC 数の減少がみられ、病理組織学的検査で脾臓のリンパ球枯渇及び骨髄リンパ球の減少が認められた。これらの影響は、イブルチニブの薬理作用と関連した変化であり、休薬によって回復性を示すことから、免疫系又は免疫機能に対して有害作用を及ぼさないものと考えられた。

2.4.4.7 不純物の安全性評価

2.4.4.7.1 不純物の安全性確認

非臨床試験に用いた被験物質の不純物プロファイルを表 2.4.4-12 に示す。イブルチニブの原薬の申請規格案では、4 種類の不純物（不純物B*、不純物E*、不純物D* 及び 不純物C*）について ICH Q3A(R2) ガイドラインで定められた安全性確認が必要な閾値を上回る許容限度値を設定している。また、イブルチニブの製剤の申請規格案では、3 種類の不純物（不純物B*、不純物C* 及び 不純物D*）について ICH Q3B(R2) ガイドラインで定められた安全性確認が必要な閾値を上回る許容限度値を設定している【3.2.S.3.2 参照】。

安全性薬理試験及び 4 週間の一般毒性試験は、臨床試験開始前にロット番号 [REDACTED]（微粉化）の被験物質を用いて実施した。このロットには 不純物B* 及び 不純物E* がそれぞれ 2.2% 及び 1.3%含まれていた。

安全性確認のために、先に実施した毒性試験で用いた濃度よりも高濃度で 不純物B*（3.30% wt/wt）、不純物E*（1.29% wt/wt）、不純物H*（0.37% wt/wt）、不純物D*（0.95% wt/wt）及び

不純物C* (0.90% wt/wt) を添加したイブルチニブ (40 mg/kg/日) を用いて、ラット 4 週間反復経口投与毒性試験を実施した【2.6.6.8.2.1 参照】。不純物を添加及び非添加の投与群間で毒性プロファイルに明らかな差は認められなかった。

不純物B* 及び 不純物E* については、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した結果、変異原性は陰性であった。

不純物H* , 不純物D* 及び 不純物C* については、専門的な経験に基づくルールベース (Derek Nexus, ver. ■■■) 及び統計ベース (MultiCASE - ■■■) によるコンピュータを用いた(Q)SAR で潜在変異原性を評価した結果、これらの不純物に遺伝毒性に関わる警告構造は認められず、細菌による変異原性は陰性であると考えられた。不純物D* 及び 不純物C* については、これらの不純物 [不純物D* (1.03% wt/wt) 及び 不純物C* (0.96% wt/wt)] を添加したイブルチニブを用いて細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した結果、変異原性は陰性であった【2.6.6.8.2.2 参照】。

さらに、不純物B* , 不純物E* , 不純物H* , 不純物D* 及び 不純物C* については、上記ラット 4 週間反復投与毒性試験と同じ濃度を添加したイブルチニブを用いてマウス小核試験を実施した【2.6.6.8.2.3 参照】。なお、イブルチニブ及びその代謝物 PCI-45227 (M37) の曝露量は血漿中濃度分析により確認された。不純物を添加したイブルチニブの 2000 mg/kg の用量まで小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められず、小核試験は陰性であると判断された。

不純物B* , 不純物E* , 不純物H* , 不純物D* 及び 不純物C* の安全性が確認された濃度を表 2.4.4-13 に示す。

2.4.4.7.2 その他の品質に関する考察

in vitro 染色体異常試験では純度 97.3% のイブルチニブ [ロット番号: ■■■ (微粉化)] を用いて評価した。代謝活性化系の非存在下及び存在下において染色体異常がみられたため、フォローアップ試験として、純度 99.7% の臨床試験用のイブルチニブ (ロット番号: ■■■) を用いて実施した。フォローアップ試験は陰性であり、染色体異常誘発性は認められなかった。これらの結果から、ロット番号 ■■■ 中に含有される不純物が染色体異常誘発性に起因した可能性が考えられた。

ラット 13 週間反復経口投与毒性試験は、臨床試験用のロット (ロット番号: ■■■) にイブルチニブの 不純物A* を 2.09% 添加したイブルチニブ (ロット番号: ■■■) を用いて実施した。本試験では 不純物A* に起因する毒性所見は認められなかった。さらに、不純物A* を 2.19% 添加したイブルチニブを用いて細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した結果、変異原性は陰性であった【2.6.6.8.2.2 参照】。また、0.1% の 不純物A* を含有したイブルチニブを用いて 2000 mg/kg の用量 [不純物A* の含量: 2 mg/kg (HED = 0.16 mg/kg)] までマウス小核試験を実施した結果、臨床用量 (420 mg/日) 中の 不純物A* 含量 (原薬規格値 ■■% に基づいた換算値: ■■ mg/kg/日) を上回る用量まで小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められず、不純物A* の染色体異常誘発性は陰性であると判断された。

実際に混在する又は混在すると考えられる 22 種の不純物の変異原性について Derek Nexus (ver. ■■■) を用いてコンピュータによる毒性評価を行い、その検証として 不純物E* , 不純物F* 及び 不純物G* の細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。実際に混在する不純物は、出荷時

又は安定性試験実施中に測定値が ICH ガイドラインに規定された閾値以上の不純物である。混在する可能性のある不純物は、理論的にはイブルチニブの製造中又は保存中に生成する可能性があるが、申請市販用工程案により製造されるイブルチニブのバッチにおける測定値では、ICH ガイドラインに規定された閾値以上の値は認められていない。いずれの不純物も非変異原性に分類された。

表 2.4.4-12 非臨床試験に用いた被験物質中の不純物プロファイル

Description of Study	CTD No.	Lot No.	Specified Impurities (wt%)					不純物A* ^a (wt%)
			不純物H*	不純物B*	不純物E*	不純物D*	不純物C*	
4-week general toxicology in rats and dogs	[4.2.3.2.3, 4.2.3.2.8]	[redacted] ^b (micronized) Also referred to as [redacted]	< 0.05	2.2	1.3	< 0.05	< 0.05	0.1
Bacterial mutagenicity	[4.2.3.3.1.1]							
<i>In vitro</i> chromosome aberration	[4.2.3.3.1.2]							
<i>In vitro</i> chromosome aberration tests	[4.2.3.3.1.2, 4.2.3.3.1.3]	[redacted] ^b	< 0.05	< 0.05	0.08	0.15	< 0.05	0.3
13-week general toxicology in rats	[4.2.3.2.4]	[redacted] ^c	0.08	0.10	0.13	< 0.05	< 0.05	2.09
13-week general toxicology in dogs	[4.2.3.2.9]	[redacted] ^d	0.08	0.09	0.13	< 0.05	< 0.05	0.3
Embryo/fetal development in rats	[4.2.3.5.2.2]							
Immunotoxicity	[4.2.3.7.2.1]	[redacted]	< 0.05	0.60	0.24	0.09	< 0.05	0.3
Mouse micronucleus assay	[4.2.3.7.6.6]	[redacted] ^e	0.37	3.30	1.29	0.95	0.90	NA
4-week qualification study in rats	[4.2.3.7.6.1]							

^a 不純物A*
^b See Mod3/3.2.S.3.2/Tab4 for further details.
^c Derived from Lot [redacted]; fortified with 不純物A* .
^d See Mod3/3.2.S.3.2/Tab5 for further details.
^e Ibrutinib fortified with 不純物B* , 不純物E* , 不純物H* , 不純物D* and 不純物C* .
NA = not analyzed; wt = weight.

44

表 2.4.4-13 ラット反復投与毒性試験に基づき安全性が確認された原薬及び製剤中の不純物濃度

Impurity ID	Dose of PCI-32765 Administered in Rats (mg/kg/day) ^a	Individual Impurity Present in Fortified PCI-32765 (wt%)	Dose of Individual Impurity in Rats (mg/kg/day)	HED ^b of Individual Impurity at NOAEL (mg/kg/day)	Human Clinical Dose of PCI-32765 ^c (mg/kg/day)	Qualified Level of Impurity in DS/DP (wt%)
不純物H*	40	0.37	0.148	0.024	7	0.34
不純物B*	40	3.30	1.32	0.211	7	3.0
不純物E*	40	1.29	0.516	0.083	7	1.2
不純物D*	40	0.95	0.38	0.061	7	0.87
不純物C*	40	0.90	0.36	0.058	7	0.83

^a CTD No. 4.2.3.7.6.1
^b Human equivalent dose (HED) calculated using a conversion factor of 0.16 for rats.
^c Assuming an 60 kg average body weight and a dose of 420 mg.
DS = drug substance; DP = drug product; HED = human equivalent dose; wt = weight.

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.4.8 動物とヒトとの比較

2.4.4.8.1 実験動物における標的器官及び組織

ラット及びイヌを用いて、イブランチニブを1日1回経口投与し、13週間反復投与毒性試験を実施した。ラットでは標的器官における病理組織学的変化として、リンパ節、脾臓及び胸腺のリンパ球枯渇、前胃の浮腫及び扁平上皮萎縮、腸の炎症、膵臓の腺房萎縮、骨梁の減少を伴った骨皮質の菲薄化が認められた。同様な変化がラット4週間反復経口投与毒性試験においても認められた。なお、この試験では、腸、膵臓又は骨に毒性学的に有意な変化はみられず、肝臓及び下顎リンパ節に変化が認められた。さらに、ラット13週間反復経口投与毒性試験では、食道、胃、皮膚及び腔に扁平上皮萎縮が認められた。

イヌ4及び13週間反復経口投与毒性試験における主な標的器官は腸管（炎症）であった。さらに、イヌ13週間反復経口投与毒性試験では、病理組織学的変化としてパイエル板のリンパ球枯渇及び胃の平滑筋変性が認められた。ラット及びイヌともに、一般状態観察において、本薬投与に関連した影響として軟便又は下痢が認められた。ラットでは、鼻周囲の赤色物質がしばしば認められたが、これは鼻出血に関連した変化であると考えられた。イヌでは眼科学的検査において、4週間反復経口投与毒性試験で高用量群（150 mg/kg/日）の10例中3例、13週間反復経口投与毒性試験で高用量群（220/120 mg/kg/日）の1例に軽度から中等度の角膜ジストロフィー/混濁が認められた。角膜の変化は、投薬中及び休薬中ともに認められた。

複数の標的器官が特定されたが、その毒性のメカニズムは明らかでない。しかしながら、実験動物で標的器官に毒性がみられないイブランチニブの曝露量は、おおむね臨床における曝露量よりも高値又は同程度であった。

2.4.4.8.1.1 ラット及びイヌのリンパ器官（下顎リンパ節、脾臓及びパイエル板）

ラットにイブランチニブを40～300 mg/kg/日（HED = 6.4～48 mg/kg/日）の用量で4週間反復経口投与したところ、下顎リンパ節では形質細胞、リンパ球及び組織球の傍皮質及びリンパ洞への凝集及び浸潤に特徴づけられるリンパ濾胞過形成が認められた。この病理組織学的所見は、肉眼的には下顎リンパ節の腫大と関連していた。同様な変化は、ラット2及び13週間反復投与毒性試験では認められなかった。ラット4週間反復投与毒性試験では150～300 mg/kg/日（HED = 24～48 mg/kg/日）投与群、ラット4週間免疫毒性試験では雌性の100 mg/kg/日（HED = 16 mg/kg/日）投与群に脾臓のリンパ球枯渇が認められた。この所見と関連した変化として、免疫毒性試験では骨髄リンパ球の減少、IgM及びIgG濃度の減少、並びにリンパ球及びWBC数の減少が認められた。ラット13週間反復投与毒性試験では、雌性の175 mg/kg/日（HED = 28 mg/kg/日）投与群で脾臓の外套帯に軽微から重度のリンパ球枯渇、腋窩、下顎又は腸間膜のリンパ節皮質に軽微から中等度のリンパ球枯渇が認められた。脾臓の外套帯のリンパ球枯渇は、免疫フェノタイプングを評価した動物でみられたB細胞数の減少と関連した変化であった。B細胞に対する影響は、BCRシグナル伝達経路に対するイブランチニブの薬理作用に関連した変化であった【2.6.2.2参照】。イヌ13週間反復経口投与毒性試験では、60～220 mg/kg/日（HED = 32～119 mg/kg/日）の用量で、小腸又は大腸のパイエル板にリンパ球枯渇が認められた。変化の程度は軽微から軽度であり、パ

イエル板の胚中心及び外套帯のサイズ減少によって特徴づけられる。リンパ球枯渇はイブルチニブの薬理作用から予想された所見であり、休薬によって完全に回復した。

2.4.4.8.1.2 ラット及びイヌの消化管

ラット 4 週間反復投与毒性試験では、高用量（300 mg/kg/日）群の雄性で前胃に軽度の扁平上皮過形成が認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験では、175 mg/kg/日投与群の雌性で前胃に軽微から中等度の浮腫及び扁平上皮萎縮が認められた。これらの所見はいずれも、両性にみられた変化ではない、若しくは複数の試験で認められなかったことから、毒性学的な意義は明らかではなかった。ラット 13 週間反復投与毒性試験では、300/175 mg/kg/日（HED = 28～48 mg/kg/日）投与群で消化管に対する影響として、盲腸、結腸又は直腸に軽微から軽度の急性炎症が認められた。一般状態観察では投与期間を通じて、100～300 mg/kg/日（HED = 16～48 mg/kg/日）投与群で軟便及び肛門周囲に褐色物質の付着が認められた。

イヌ 4 週間反復投与毒性試験では、150 mg/kg/日（HED = 81 mg/kg/日）投与群の雄性 3 例中 2 例及び雌性 3 例中 1 例で、病理組織学的に腸粘膜に軽微から軽度の炎症が認められた。これらは、一般状態観察でみられた軟便及び下痢、並びに好中球数、単球数又は好酸球数の増加と関連した変化であった。イヌ 13 週間反復投与毒性試験では、試験 31 日に切迫屠殺した 220 mg/kg/日投与群の雄性 1 例に十二指腸潰瘍及び胃上皮のびらんに加えて、腸に急性炎症が認められた。220/120 mg/kg/日（HED = 65～119 mg/kg/日）投与群の雌性では胃に軽微から軽度の平滑筋変性が認められた。一般状態観察では、80/60 及び 220/120 mg/kg/日（HED = 32～119 mg/kg/日）投与群で、投与期間を通じて軟便、粘液便、下痢又は赤色物質を含む下痢が認められた。

ラット及びイヌの消化管でみられた一般状態及び病理組織学的変化は、休薬により完全に回復した。

2.4.4.8.1.3 ラットの脾臓

ラット 2 又は 13 週間反復投与毒性試験では、雌雄ともに脾臓に軽微から中等度の腺房萎縮が認められた。腺房萎縮は、線維化、褐色色素（ヘモジデリン）、チモーゲン顆粒減少を有する腺房の小型化及び混合性炎症細胞浸潤（主として好中球、リンパ球及び形質細胞であり、慢性炎症性細胞浸潤に一致）などを伴っていた。これらの病変は 12～300 mg/kg/日の用量で認められ、36～300 mg/kg/日（HED = 5.8～48 mg/kg/日）での変化が有害作用（中等度）であると考えられた。脾臓の腺房萎縮は雌性よりも雄性の方が顕著な変化であったが、13 週間反復投与毒性試験では 6 週間の休薬によって部分的に回復した。ラット 2 週間反復投与毒性試験では、血清アミラーゼ及びリパーゼ濃度を測定したが、変化は認められなかった。

2.4.4.8.1.4 ラットの骨

ラット 13 週間反復投与毒性試験では、胸骨及び大腿骨の軽微から軽度の骨梁の減少を伴った骨皮質の菲薄化が認められた。これらの病変は、主として、100 及び 175 mg/kg/日（HED = 16 及び 28 mg/kg/日）投与群の雌性で認められた。骨の病理組織学的変化は、6 週間の休薬により回復した。

2.4.4.8.1.5 ラット及びイヌの血清たん白

ラット及びイヌにおいて、イブルチニブの1日1回経口投与により、高用量群では血清たん白濃度の軽度な減少が認められた。ラット4週間反復投与毒性試験において、高用量群（雄性 300 mg/kg/日、雌性 150 mg/kg/日）では雌雄でアルブミン、総たん白又はグロブリン濃度の減少が認められた。ラット13週間反復投与毒性試験において、中用量（100 mg/kg/日）及び高用量（300/175 mg/kg/日）の雌雄で、血清アルブミン、総たん白及びグロブリン濃度の軽度な減少が認められた。イヌ4週間反復投与毒性試験において、高用量群（150 mg/kg/日）の雌雄で、血清アルブミン、総たん白及びアルブミン/グロブリン比の顕著な減少が認められた。イヌ13週間反復投与毒性試験において、中用量（80/60 mg/kg/日）及び高用量群（220/120 mg/kg/日）の雌雄で、血清アルブミン濃度の減少が認められた。たん白質の喪失は、一般に、消化管炎症に続発してみられる変化である（たん白喪失性腸症）⁴⁰⁾。ラット及びイヌでは、一般状態観察で軟便及び下痢などの糞便異常がみられ、病理組織学的検査で腸管に炎症性変化が認められた。13週間反復投与毒性試験では、休薬により、炎症性変化の回復に一致して、血清たん白濃度の影響は完全に回復した。

2.4.4.8.2 ヒトにおいて観察された影響

臨床試験における安全性の要約を以下に示す。その詳細については Module 2.7.4、報告書については Module 5 に記載する。

再発性 B 細胞腫瘍患者を対象とした第 I 相臨床試験（PCYC-04753）では、イブルチニブは、7 日間の休薬期間を設定して 1.25～12.5 mg/kg の用量範囲で 28 日間（35 日サイクル）、及び休薬期間なしで 8.3 mg/kg 及び 560 mg の固定用量で 1 日 1 回の 35 日サイクルで投与された。本試験においては 2 例に用量制限毒性が認められ、1 例は 2.5 mg/kg の用量で休薬を要する Grade 2 の好中球数減少であり、もう 1 例は 8.3 mg/kg の用量で Grade 3 の過敏症であった。しかしながら、治験実施計画書に規定する用量増量中止基準を満たさず、イブルチニブの MTD には達しなかった。

1112 試験及び 1102 試験の 2 試験併合で発現割合が高かった有害事象は、胃腸障害（下痢、悪心、便秘及び嘔吐）及び感染症（上気道感染、副鼻腔炎及び肺炎）であった。その他によくみられる有害事象は疲労、発熱、末梢性浮腫及び咳嗽であった。また、血液及びリンパ系障害として貧血、好中球減少症及び血小板減少症がみられた。なお、臨床試験でみられた下痢は、ラット及びイヌの一般状態観察でみられた徴候と一致した変化であった。

非臨床試験結果に基づき、眼科学的検査が補助的な安全性のモニタリングとして、第 I 相臨床試験（PCYC-04753）及び第 Ib/II 相臨床試験（PCYC-1102-CA）に取り入れられた。眼科に関連した有害事象の頻度及び性質は、これらの疾患集団及び年齢群から予期できるものであった。PCYC-1112 試験では角膜に関連した有害事象はみられていないが、PCYC-1102 試験では角膜病変が 1 例（詳細は不明）、PCYC-04753 試験では角膜色素沈着、角膜炎及び潰瘍性角膜炎の 3 例が認められた。3 試験（PCYC-1102、PCYC-1112 及び PCYC-04753）を通して、角膜に関連した有害事象は 4 例であり、いずれも Grade は 1 又は 2 であり、イヌの角膜ジストロフィー/混濁との類似性を示唆するものではなかった。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 本剤の特徴

2.4.5.1.1 薬理試験結果から得られた本剤の特徴

- ・ イブルチニブは BTK の活性部位に存在する 481 位システイン残基 (Cys-481) と共有結合し、BTK 酵素活性を持続的に阻害する。イブルチニブの BTK に対する阻害活性の IC_{50} 値は 0.39 nmol/L であり、その阻害作用は不可逆的であった。
- ・ BTK 以外のキナーゼに対する阻害作用は BTK より弱く、BTK 阻害活性と比較した選択性が 20 倍以下のキナーゼは ErbB4/HER4, Blk, Bmx/Etk, Fgr, Txk, Lck, Yes/YES1, Tec, Csk 及び EGFR であった。BTK 以外の不可逆的に阻害されるキナーゼの中でも、ErbB4/HER4, Blk, Bmx/Etk, Txk 及び Tec はイブルチニブによる阻害作用が強かったことから、治療用量で影響を及ぼす可能性があると考えられる。
- ・ B 細胞性リンパ腫由来細胞を用いた BCR シグナル伝達経路に対する阻害作用の検討において、イブルチニブは BTK の自己及びトランス自己リン酸化、並びに PLC γ 2 のリン酸化を阻害した。
- ・ イブルチニブはヒト PBMC 由来 B 細胞の活性化を選択的に阻害し、200 nmol/L で PBMC の BTK 活性部位の約 90%を占有した。
- ・ イブルチニブは B 細胞性リンパ腫由来細胞 (NLC と共培養したヒト初代培養 CLL 細胞, DLBCL 由来細胞株, MCL 由来細胞株) の増殖を抑制した。
- ・ イブルチニブは、BCR 及びケモカイン受容体刺激による接着及び遊走を阻害した。
- ・ マウスにおいて、イブルチニブの 10 mg/kg 以上の経口投与により脾細胞及び腫瘍異種移植モデルの腫瘍組織における BTK 活性部位の完全な占有が認められた。
- ・ 養子移入 CLL マウスモデルにおいて、イブルチニブの投与初期に一過性の末梢血中リンパ球増加を示した後、末梢血中及び組織中リンパ球数が減少した。また、B 細胞性腫瘍 (MCL, DLBCL) マウスモデル及びイヌ自然発症非ホジキンリンパ腫モデルにおいて、イブルチニブは抗腫瘍効果を示した。
- ・ 各種機能分子に対するイブルチニブの結合親和性を検討したところ、ドパミントランスポーターに最も強い阻害作用を示した (IC_{50} 値は 484 nmol/L)。
- ・ イブルチニブ及びジヒドロジオール体代謝物 PCI-45227 (M37) の hERG チャネル電流に対する阻害作用の IC_{50} 値 (それぞれ、427 及び 4555 ng/mL) は、420 mg/日の用量を反復経口投与した患者の定常状態における非結合型の C_{max} の平均値のそれぞれ 120 及び 415 倍であり、ヒトにおける心室再分極過程に有害な影響を及ぼすリスクは低いことが示唆された。テレメトリーを装着したイヌにイブルチニブを経口投与したところ、24 mg/kg 以上で RR 間隔延長、心拍数減少及び血圧上昇が認められたが、変化の値は小さく有害作用とは考えられなかった。また、その時の推定されたイブルチニブの C_{max} は、420 mg/日の用量を反復

経口投与した患者の定常状態での C_{max} の平均値の 7.2 倍であり、適切な安全域があることが示唆された。これまで臨床試験において、イブルチニブ投与による ECG 波形の変化及び QTc 間隔延長はみられていない。

- ・ ラット及びイヌを用いた安全性薬理試験の結果、中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響の NOEL は 150 mg/kg、心血管系に及ぼす影響の NOAEL は 24 mg/kg であり、ヒトに対する曝露量比はそれぞれ 22.3 及び 7.2 倍であった。

2.4.5.1.2 薬物動態試験結果から得られた本剤の特徴

- ・ マウス、ラット及びイヌにイブルチニブを単回経口投与したとき、製剤又は給餌条件によらず吸収は速やかであった。ラット及びイヌに単回経口投与したときの F は 3.8%～24.7% であった。
- ・ ラットに ^{14}C -イブルチニブを単回経口投与したとき、放射能は広範な組織に分布し、腎臓、肝臓、消化管及び膀胱壁などの排泄器官、並びに副腎で高濃度であった。
- ・ マウス、ラット、イヌ及びヒトの血漿において、イブルチニブの *in vitro* 血漿たん白結合率はいずれも高値であり、ヒトでは 97.3% であった。
- ・ ^{14}C -イブルチニブは BTK に対して、強力かつ不可逆的に結合した。オフターゲットのたん白質に対する共有結合の程度は十分に小さく、標的たん白質である BTK に対する選択性が示された。
- ・ *In vitro* 及び *in vivo* 試験ともに、ラット、イヌ及びヒトにおけるイブルチニブの代謝は顕著であった。ラット、イヌ及びヒトのいずれにおいても、イブルチニブの主要な代謝経路は (1) 末端フェニル基の水酸化 (M35)、(2) ピペリジン環の酸化的開環及びそれに続く第一級アルコールへの還元 (M34) 又はカルボン酸への酸化 (M25)、(3) アクリロイル基のエチレンのエポキシ化及びそれに続く加水分解によるジヒドロジオール体 [PCI-45227 (M37)] の生成又はグルタチオン抱合 (イヌのみ) であった。また、その他の代謝物のほとんどはこれらの主要経路の組合せ又は更に下流の二次的な代謝により生成した。
- ・ ヒト血漿中主要代謝物として、M21、M23、M25、M34 及び PCI-45227 (M37) が示唆された。毒性試験におけるイブルチニブ及び PCI-45227 (M37) の曝露量は、ヒト臨床使用時の曝露量を上回ることが確認され、また限定的なデータではあるものの、M21、M25 及び M34 の曝露量も、少なくともラット又はイヌのいずれかでヒト臨床使用時の曝露量を上回ると考えられる。
- ・ イブルチニブの代謝は主に CYP3A4 が関与することが示唆された。
- ・ ラット、イヌ及びヒトのいずれにおいてもイブルチニブ及びその代謝物は主に糞中に排泄された。尿又は胆汁中に未変化体はほとんど又は全く排泄されず、糞中に排泄された未変化体もわずか (3%未満) であった。

- ・ 臨床使用時の血漿中 C_{max} を考慮すると、イブルチニブ及びその主要代謝物による CYP 及びトランスポーターの阻害を介した臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

2.4.5.1.3 毒性試験結果から得られた本剤の特徴

- ・ イブルチニブは、細胞毒性型抗がん剤とは明らかに異なる安全性プロファイルを有し、遺伝毒性もなく、長期の連日投与に適した薬剤である。
- ・ ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において、両種ともに、主な影響が消化管（炎症及び糞便異常）及びリンパ器官（リンパ球枯渇）に認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験で実施したイムノフェノタイピング及び別に実施した免疫毒性試験の結果、細胞数及び Ig 産生も含め、B 細胞が最も影響を受けており、これはイブルチニブの薬理作用による変化であると考えられた。ヒトにおけるイブルチニブの曝露量を大きく超える全身曝露量では、リンパ球枯渇がより顕著となった。イヌでは認められなかったが、ラットでは病理組織学的変化が脾臓（腺房萎縮）及び骨（菲薄化）に認められた。
- ・ 13 週間反復投与毒性試験における MTDL（ラット:100 mg/kg/日、イヌ:60 mg/kg/日）と臨床用量（420 mg/日）での比較では、イブルチニブの動物/ヒト曝露量比（AUC）はラットで 8.1（雄性）及び 30（雌性）、イヌで 5.0（雄性）及び 3.3（雌性）であり、十分な安全域があり临床上のリスクは限定的であることが示唆された。下痢又は軟便はイブルチニブに関連した臨床徴候であり、ラット、イヌ及びヒトで認められた。
- ・ ラットでは本薬投与に関連した胎児の低生存率及び催奇形性がみられ、この用量でのイブルチニブの AUC は臨床用量（420 mg/日）における曝露量と比較して 20 倍高値であった。これまでに投与を受けた CLL 患者集団は概して高齢であり（年齢中央値は 65 歳以上）、妊娠可能な女性が多数含まれることはないと思われる。
- ・ *In vitro* 光毒性試験に基づき、ヒトにおける光毒性のリスクは極めて低いものと考えられる。

以上のように、非臨床試験においてイブルチニブの薬理、薬物動態及び毒性学的特性を検討し、臨床使用時の結果との関連性を評価した結果、再発又は難治性の CLL/SLL へのイブルチニブの使用は有用であると考えられる。

2.4.6 参考文献

- 1) Rui L, Schmitz R, Ceribelli M and Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol.* 2011;12:933-40.
- 2) Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Seele AJ and Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118:4313-20.
- 3) Wiestner A. Targeting B-Cell receptor signaling for anticancer therapy: the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib induces impressive responses in B-cell malignancies. *J Clin Oncol.* 2013;31:128-30.
- 4) Buggy JJ and Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol.* 2012;31:119-32.
- 5) Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *Chem Med Chem.* 2007;2:58-61.
- 6) Baillie TA, Cayen MN, Fouda H, Gerson RJ, Green JD, Grossman SJ, et al. LA. Drug metabolites in safety testing. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;182(3):188-96.
- 7) Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol.* 1994;152:557-65.
- 8) Afar DE, Park H, Howell BW, Rawlings DJ, Cooper J and Witte ON. Regulation of BTK by Src family tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* 1996;16:3465-71.
- 9) Cheng G, Ye ZS and Baltimore D. Binding of Bruton's tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a Src homology 3 domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:8152-55.
- 10) Baba Y, Hashimoto S, Matsushita M, Watanabe D, Kishimoto T, Kurosaki T, et al. BLNK mediates Syk-dependent BTK activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:2582-6.
- 11) Humphries LA, Dangelmaier C, Sommer K, Kipp K, Kato RM, Griffith N, et al. Tec kinases mediate sustained calcium influx via site-specific tyrosine phosphorylation of the phospholipase C γ Src homology 2-Src homology 3 linker. *J Biol Chem.* 2004;279:37651-61.
- 12) Spaargaren M, Beuling EA, Rurup ML, Meijer HP, Klok MD, Middendorp S, et al. The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLC γ 2. *J Exp Med.* 2003;198:1539-50.
- 13) Ortolano S, Hwang IY, Han SB, Kehrl JH. Roles for phosphoinositide 3-kinases, Bruton's tyrosine kinase, and Jun kinases in B lymphocyte chemotaxis and homing. *Eur J Immunol.* 2006;36:1285-95.
- 14) de Gorter DJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase C γ 2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity.* 2007;26:93-104.

- 15) Ponader S, Balasubramanian S, Pham LV, Chen J, Tamayo AT, Wang M, et al. Activity of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 in mantle cell lymphoma (MCL) identifies Btk as a novel therapeutic target. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2011;118:3688.
- 16) Corcos D, Osborn MJ, Matheson LS. B-cell receptors and heavy chain diseases: guilty by association? *Blood*. 2011;117:6991-8.
- 17) Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117:563-74.
- 18) Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31:88-94.
- 19) Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011;117:6287-96.
- 20) Yang X, Huang Y, Crowson M, Li J, Maitland ML and Lussier YA. Kinase inhibition-related adverse events predicted from in vitro kinome and clinical trial data. *J Biomed Inform*. 2010;43:376-84.
- 21) Texido G, Su I-H, Mecklenbräuker I, Saijo K, Malek SN, Desiderio S, et al. The B-cell-specific src-family kinase Blk is dispensable for B-cell development and activation. *Mol Cell Biol*. 2000;20:1227-33.
- 22) Malek SN, Dordai DI, Reim J, Dintzis H and Desiderio S. Malignant transformation of early lymphoid progenitors in mice expressing an activated Blk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:7351-6.
- 23) Guo S, Sun F, Guo Z, Li W, Alfano A, Chen H, et al. Tyrosine kinase ETK/BMX is up-regulated in bladder cancer and predicts poor prognosis in patients with cystectomy. *PLoS One*. 2011;6:e17778.
- 24) Dai B, Kim O, Xie Y, Guo Z, Xu K, Wang B, et al. Tyrosine kinase Etk/BMX is up-regulated in human prostate cancer and its overexpression induces prostate intraepithelial neoplasia in mouse. *Cancer Res*. 2006;66:8058-64.
- 25) Jones D, Xu Z, Zhang H, He Y, Kluger MS, Chen H, et al. Functional analyses of the bone marrow kinase in the X chromosome in vascular endothelial growth factor-induced lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2553-61.
- 26) Pan S, An P, Zhang R, He X, Yin G and Min W. Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7512-23.

- 27) Sahu N, Venegas AM, Jankovic D, Mitzner W, Gomez-Rodriguez J, Cannons JL, et al. Selective expression rather than specific function of Txk and Itk regulate Th1 and Th2 responses. *J Immunol.* 2008;181:6125-31.
- 28) Mano H, Ishikawa F, Nishida J, Hirai H and Takaku F. A novel protein-tyrosine kinase, Tec, is preferentially expressed in liver. *Oncogene.* 1990;5:1781-6.
- 29) Mano H, Mano K, Tang B, Koehler M, Yi T, Gilbert DJ, et al. Expression of a novel form of Tec kinase in hematopoietic cells and mapping of the gene to chromosome 5 near Kit. *Oncogene.* 1993;8:417-24.
- 30) Kitanaka A, Mano H, Conley ME and Campana D. Expression and activation of the nonreceptor tyrosine kinase Tec in human B cells. *Blood.* 1998;91:940-8.
- 31) Ellmeier W, Jung S, Sunshine MJ, Hatam F, Xu Y, Baltimore D, et al. Severe B cell deficiency in mice lacking the Tec kinase family members Tec and Btk. *J Exp Med.* 2000;192:1611-24.
- 32) Garraway LA, Jänne PA. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov.* 2012;2:214-26.
- 33) Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med.* 2014;370:2286-94.
- 34) Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, et al. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res.* 2003;58:32-45.
- 35) Rowland IR. Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicol Pathol.* 1988;16(2):147-53.
- 36) Shimada M, Murayama N, Yamazoe Y, Hashimoto H, Ishikawa H, Kato R. Age- and sex-related alterations of microsomal drug- and testosterone-oxidizing cytochrome P450 in Sprague-Dawley strain-derived dwarf rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;275(2):972-7.
- 37) Johnson TN, Tanner MS, Tucker GT. A comparison of the ontogeny of enterocytic and hepatic cytochromes P450 3A in the rat. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(11):1601-10.
- 38) Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010;38 (7 Suppl):5S-81S.
- 39) Roth AM, Ekins MB, Waring GO 3rd, Gupta LM, Rosenblatt LS. Oval corneal opacities in beagles. III. Histochemical demonstration of stromal lipids without hyperlipidemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21:95-106.
- 40) Willard MD. Disorders of the intestinal tract. In: Nelson RW, Couto CG, editors. *Small Animal Internal Medicine* 2nd edition. St Louis: Mosby; 1998: p.453.