目次

2.6.1 緒言 3

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
BCR	B 細胞受容体（B cell receptor）
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton’s tyrosine kinase）
CLL	慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia）
IC_{50}	50％阻害濃度（50% inhibitory concentration）
PLCγ	ホスホリパーゼ C γ（phospholipase C gamma）

2.6.1 緒言

イブルチニブ（PCI-32765，JNJ-54179060）はブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）に対する強力な阻害作用を有する経口投与可能な薬剤である。イブルチニブのアクリロイル基は，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 の酵素活性を持続的に阻害する[1)]。このため，イブルチニブは血漿中からの消失が速やかであるにも関わらず，経口投与による BTK 活性部位の占有は，動物で最大 24 時間，ヒトで 24 時間以上持続する。

イブルチニブ（図 2.6.1-1）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。

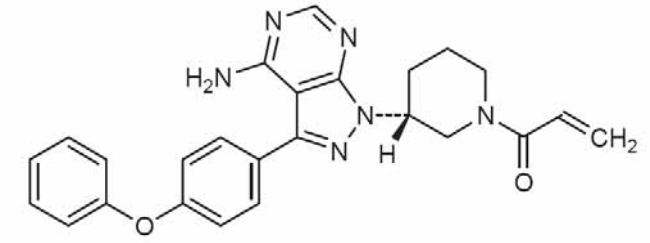


図 2.6.1-1 イブルチニブの化学構造

PCI-45227（M37）は，非臨床試験で用いた動物及びヒトの血漿中で認められた主要代謝物（ジヒドロジオール体）であり，BTK 阻害活性はイブルチニブの約 1/15 である。PCI-45227（M37）は，イブルチニブのアクリロイル基のエポキシ化及びそれに続く加水分解により生成されることから，BTK と共有結合せず，BTK に対する阻害作用は可逆的であると考えられる。

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いる[2)，3)]。B 細胞表面に存在する BCR 及びケモカイン受容体からのシグナル伝達経路において細胞質中に存在する BTK は非常に重要な役割を果たしている[4)，5)]。B 細胞の遊走，走化性及び接着には，BCR 及びケモカイン受容体からのシグナル伝達経路の活性化が必要である。BTK に対するイブルチニブの 50%阻害濃度（IC_{50}）は 0.39 nmol/L である。ヒト B 細胞性リンパ腫由来細胞株において，イブルチニブは BTK の自己及びトランス自己リン酸化，ホスホリパーゼ C γ（PLCγ）のリン酸化を阻害した。マウス慢性リンパ性白血病（CLL）の養子移入モデル及びヒト B 細胞性腫瘍患者由来細胞株の異種移植マウスモデルにおいて，イブルチニブの経口投与による抗腫瘍効果が認められた。

BTK 阻害薬は，BCR 及びケモカイン受容体の活性化により引き起こされる，白血病及び B 細胞性リンパ腫に対する新しい治療方法である。本剤は，イブルチニブ 140 mg を含有する経口投与用の硬ゼラチンカプセル剤であり，米国では 2014 年 7 月に「chronic lymphocytic leukemia (CLL) who have received at least one prior therapy」及び「chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion」の適応で，欧州では 2014 年 10 月に「treatment of adult patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) who have received at least one prior therapy, or in first line in the presence of 17p deletion or TP53 mutation in patients unsuitable for chemo-immunotherapy」の効能・効果で承認された。

本邦での本剤の医薬品製造販売承認申請における効能・効果（案）及び用法・用量（案）は，以下のとおりとした。

【効能・効果（案）】
再発又は難治性の慢性リンパ性白血病/小リンパ球性リンパ腫
【用法・用量（案）】
通常、成人にはイブルチニブとして 420 mg を 1 日 1 回経口投与する。

2.6.1.1 参考文献

1） 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.

2） Rui L, Schmitz R, Ceribelli M and Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. Nat Immunol. 2011;12:933-40.

3） Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Seele AJ and Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011;118:4313-20.

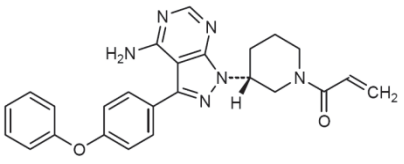
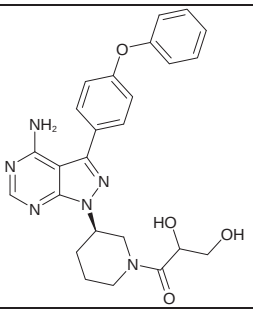
4） Wiestner A. Targeting B-Cell receptor signaling for anticancer therapy: the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib induces impressive responses in B-cell malignancies. J Clin Oncol. 2013;31:128-30.

5） Buggy JJ and Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. Int Rev Immunol. 2012;31:119-32.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.3 副次的薬理試験 31
2.6.2.4 安全性薬理試験 35
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 37
2.6.2.6 考察及び結論 39
2.6.2.7 図表 46
2.6.2.8 参考文献 46
2.6.3 薬理試験概要表 1

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-{(3*R*)-3-[4-Amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1*H*-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
ABC	活性化 B 細胞様（activated B-cell-like）
ATP	アデノシン 3 リン酸（adenosine triphosphate）
BCR	B 細胞受容体（B cell receptor）
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton’s tyrosine kinase）
CARD	カスパーゼリクルートドメイン（Caspase recruitment domain）
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）
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（diffuse large B-cell lymphoma）
DNP	ジニトロフェノール（dinitrophenol）
EC_{50}	50%有効濃度（50% effective concentration）
ECG	心電図（electrocardiogram）
FL	濾胞性リンパ腫（follicular lymphoma）
FOB	機能観察総合評価法（functional observation battery）
GCB	胚中心 B 細胞様（germinal center B-cell-like）
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）
Ig	免疫グロブリン（immunoglobulin）
IC_{50}	50%阻害濃度（50% inhibitory concentration）
MCL	マントル細胞リンパ腫（mantle cell lymphoma）
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）
PBMC	末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells）
PD	進行（progressive disease）
PE	フィコエリスリン（phycoerythrin）
PLCγ	ホスホリパーゼ C γ（phospholipase C gamma）
PMA	ホルボールエステル（phorbol myristate acetate）
PR	部分奏効（partial response）

略号又は略称	名称及び内容
SCID	重症複合型免疫不全（severe combined immunodeficiency）
SD	安定（stable disease）
SD	標準偏差（standard deviation）
SE	標準誤差（standard error）
SLL	小リンパ球性リンパ腫（small lymphocytic lymphoma）
TCR	T 細胞受容体（T cell receptor）
VCAM-1	血管細胞接着分子-1（vascular cell adhesion molecule-1）

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

イブルチニブ（PCI-32765，JNJ-54179060）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，B 細胞受容体（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，ブルトン型チロシンキナーゼ（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，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を検討した。また，イブルチニブの *S*-エナンチオマーである PCI-32769 及び主要代謝物である PCI-45227（ジヒドロジオール体，M37），M23，M25 及び M34 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。副次的薬理試験として，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。

安全性薬理試験において，イブルチニブ及び PCI-45227（M37）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て GLP 下で実施した。また，イブルチニブの中枢神経系，呼吸系及び心血管系に対する影響は，ICH S7A ガイドラインに準拠して GLP 下で実施した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

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いる[1)]。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，BCR からのシグナル伝達により調節されており[2)，3)]，このシグナル伝達経路において BTK は非常に重要な役割を果たしている[4)，5)]。

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[6)，7)] により活性化される。さらに，アダプターたん白である BLNK（B 細胞リンカーたん白）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[8)]。BTK はホスホリパーゼ Cγ（PLCγ）2 をリン酸化によって活性化し[9)]，引き続いてカルシウム流入，MAP キナーゼ，Akt，及び NF-κB が活性化される（図 2.6.2-1）。

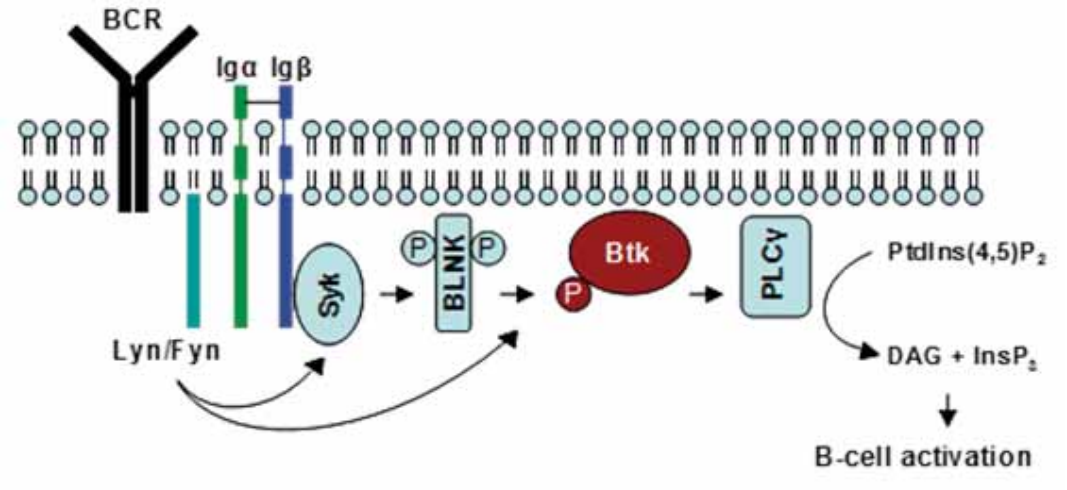


図 2.6.2-1 抗原結合による BCR 活性化に応答した BTK の活性化

$PtdIns(4,5)P_2$；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，$InsP_3$；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 2.6.2-2）[10),11),12)]。

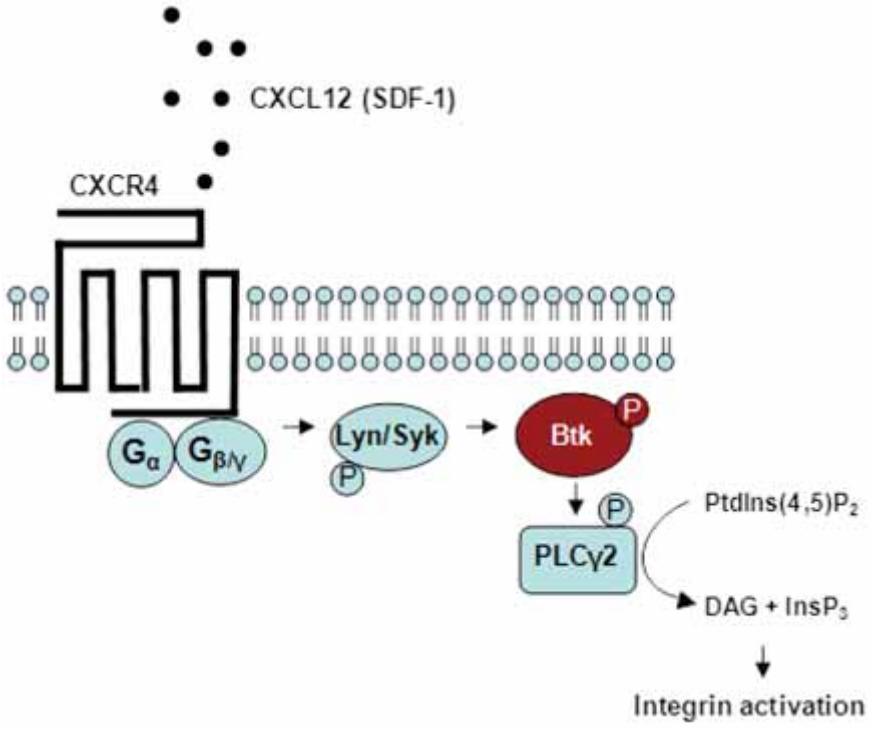


図 2.6.2-2 ケモカイン結合による CXCR4 活性化に応答した BTK の活性化

SDF-1；stromal cell-derived factor 1，$PtdIns(4,5)P_2$；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，$InsP_3$；イノシトール-1，4，5-三リン酸

イブルチニブは経口投与可能な BTK の強力な阻害薬である。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[13)]，BTK 酵素活性を持続的に阻害す

る。このため，イブルチニブは血漿中からの消失が速やかであるにも関わらず，経口投与によるBTK 活性部位の占有は，動物で最大 24 時間，ヒトで 24 時間以上持続する。

2.6.2.1.1.1 作用機序

BTK に対するイブルチニブの 50%阻害濃度（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イブルチニブの阻害作用は，BTK より低かった。

濾胞性リンパ腫（FL）由来細胞株 DOHH2 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，PLCγ1 のリン酸化に対するイブルチニブの IC_{50} 値は 20 nmol/L であった。CD19 陽性正常 B 細胞又はヒト初代培養マントル細胞リンパ腫（MCL）由来細胞において，イブルチニブは 100 nmol/L で BTK の自己及びトランス自己リン酸化を完全に阻害し，PLCγ2 のリン酸化も阻害した。

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来 CD20 陽性 B 細胞の BCR 刺激による活性化を，イブルチニブは 10 nmol/L で完全に阻害した。一方，T 細胞に対しては 10,000 nmol/L で阻害作用を示し，イブルチニブは B 細胞の活性化を選択的に阻害した。ヒト PBMC において，イブルチニブは 200 nmol/L で BTK 活性部位の約 90%を占有し，CD69 発現量を約 50%抑制した。

イブルチニブは，500 及び 1,000 nmol/L の濃度でナース細胞（NLC）と共培養したヒト初代培養慢性リンパ性白血病（CLL）細胞の増殖（^3H 標識チミジンの取り込み量）をそれぞれ 33%及び 69%阻害した。ヒトびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）由来細胞株である OCI-LY10 及び TMD8（活性化 B 細胞様［ABC］サブタイプ）の細胞増殖に対するイブルチニブの 50%有効濃度（EC_{50}）値は 1～2 nmol/L であった。ヒト MCL 由来細胞株である Mino 細胞の増殖に対するイブルチニブの IC_{50} 値は 100 nmol/L 以上であった。イブルチニブ曝露下での継代培養の結果生じたイブルチニブ耐性 Mino 細胞では，イブルチニブの IC_{50} 値が 1,000 nmol/L 以上に上昇し，曝露終了後 16 日目までイブルチニブに対する耐性が維持された。

イブルチニブは，BCR 及びケモカインの刺激による CLL 細胞の接着並びに遊走を 1,000 nmol/L で阻害し，BCR 又はケモカイン（CXCL12 及び CXCL13）刺激による MCL 由来細胞の接着を 100 nmol/L で有意に阻害した。さらに，イブルチニブは，ケモカイン（CXCL12 及び CXCL13）刺激による MCL 由来細胞の遊走を濃度依存的に阻害した。

マウスにイブルチニブを経口投与すると，10 mg/kg 以上で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，3～5 mg/kg で部分的な占有が脾細胞において認められた。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。イヌでは，イブルチニブ 2.5 mg/kg 以上の経口投与 4 及び 24 時間後に PBMC の BTK 活性部位は完全に占有された。

イブルチニブの *S*-エナンチオマーである PCI-32769，実験動物種（ラット，ウサギ及びイヌ）及びヒトの主要代謝物である PCI-45227（M37），並びにその他のヒト血漿中主要代謝物である M23，M25 及び M34 の BTK に対する阻害作用は，それぞれイブルチニブの阻害作用の約 1/3.6，1/15，1/80，1/2,000，1/200 であった。PCI-45227（M37）及び M23 の阻害作用は可逆的であり，M25 及び M34 はイブルチニブと同様に BTK 活性部位のシステイン残基に共有結合して BTK を不可逆的に阻害する可能性が考えられる。

2.6.2.1.1.2 抗腫瘍効果

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）の投与 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。

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（鼠径部，腸間膜，腋窩，頚部及び下顎）組織中に浸潤したヒト CD19 陽性 Mino 細胞数が低下した。

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 細胞）。

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（PR；partial response），3 例で安定（SD；stable disease）であった。

2.6.2.1.2 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 IC_{50} 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，イブルチニブは血清中二本鎖 DNA 抗体産生及び腎疾患の発症を抑制した。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

hERG チャネル電流に対するイブルチニブ及び主要代謝物である PCI-45227（M37）の IC_{50} 値は，それぞれ 970 nmol/L（427 ng/mL）及び 9,600 nmol/L（4,555 ng/mL）であった。

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，心血管系に及ぼす影響を評価した。RR 間隔の延長，心拍数減少及び血圧上昇が 24 及び 150 mg/kg の用量で認められた。さらに，PR 間隔の延長及び QTcV 間隔の短縮が 150 mg/kg の用量で認められた。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。無麻酔イヌを用いた心血管系におけるイブルチニブの無影響量（NOEL）は 1.5 mg/kg と判断した。24 mg/kg の用量で認められた血圧，心拍数及び RR 間隔の変化の最大値は比較的小さく，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無毒性量（NOAEL）は 24 mg/kg と判断した。

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，中枢神経系及び呼吸系へ及ぼす影響を評価した。いずれの系においても，イブルチニブは 150 mg/kg まで投与に関連した影響を及ぼさなかった。

2.6.2.1.4 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。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 作用機序

2.6.2.2.1.1 キナーゼ阻害作用

(1) 各種キナーゼに対する阻害作用

【評価資料 4.2.1.1.1, 4.2.1.1.2】

イブルチニブによるキナーゼ阻害作用の選択性プロファイルは，442 種のヒトキナーゼを用いたスクリーニング，BTK を含む 76 種のキナーゼに対する阻害活性の測定により検討した。さらに，イブルチニブの *S*-エナンチオマーである PCI-32769 の BTK 阻害活性についても検討した。

イブルチニブのキナーゼ阻害活性は，イブルチニブ（3,000 nmol/L）存在下，活性部位への競合的結合試験であるファージディスプレイ法を用いた Ambit kinome-scan[14)] にて実施した。

結果を図 2.6.2-3 に示す。赤丸はイブルチニブにより阻害されたキナーゼを表し，赤丸のサイズは阻害活性の強さを示している。検討したキナーゼのうち 156 種に対し，イブルチニブの IC_{99} 値は 3,000 nmol/L 未満であった。

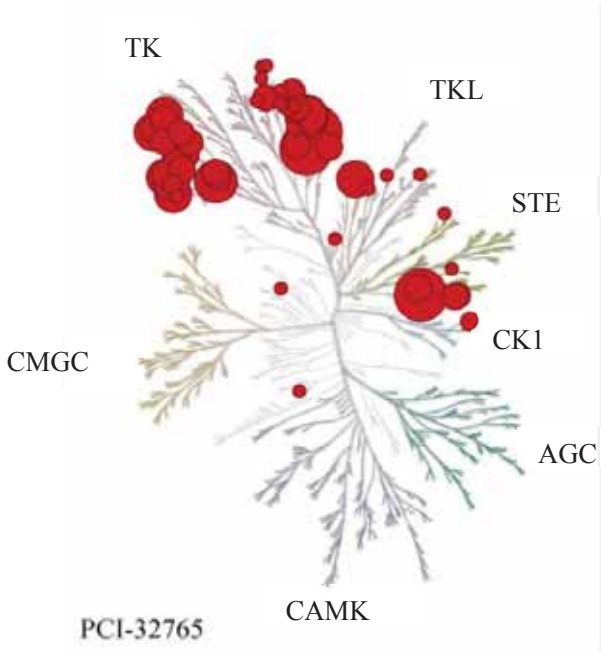


図 2.6.2-3 Ambit Kinome-Scan を用いたイブルチニブの各種キナーゼに対する阻害作用の検討

AGC；プロテインキナーゼ A，G 及び C を含むファミリー，CAMK；カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ，CK1；カゼインキナーゼ 1，CMGC；CDK，MAPK，GSK3 及び CLK を含むファミリー，STE；酵母 Sterile 7，11 及び 20 キナーゼのホモログ，TK；チロシンキナーゼ，TKL；チロシンキナーゼ様

Ambit kinome-scan での結果を確認するため，BTK を含む 76 種のキナーゼに対するイブルチニブの阻害活性を検討した。各種キナーゼに基質，イブルチニブ及び[^{33}P]-ATP を添加し，基質に取り込まれた ^{33}P 量を測定して IC_{50} 値を算出した。

BTK 阻害に対するイブルチニブの IC_{50} 中央値は 0.39 nmol/L であった（表 2.6.2-1）。BTK と比較したイブルチニブの選択性が 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。

表 2.6.2-1 各種キナーゼに対するイブルチニブの阻害作用

キナーゼ [a]	IC_{50} 中央値 (nmol/L)	試験数	選択性 [b]	キナーゼ [a]	IC_{50} 中央値 (nmol/L)	試験数	選択性 [b]
BTK*	0.39	7	1.0	PAK1	3737	1	9582
ErbB4/HER4*	0.64	2	1.6	mTor/FRAP1	4253	1	10905
Blk*	0.94	2	2.4	TRKB	4472	1	11467
Bmx/Etk*	1.10	2	2.8	MEK2	5003	1	12828
Fgr	2.86	2	7.3	MEKK3	5133	1	13162
Txk*	2.87	1	7.4	Fms	5149	2	13203
Lck	3.49	4	9.0	TRKA	5595	1	14346
Yes/YES1	3.94	2	10	Fer	5635	2	14449
Tec*	5.49	1	14	NEK2	12630	1	32385
Csk	6.17	2	16	CAMK1a	18950	1	48590
EGFR*	7.80	6	20	AKT1	>20000	1	>51282
Brk	10.10	2	26	AMPK(A1/B1/G1)	>20000	1	>51282
Itk*	11.70	3	30	Axl	>20000	1	>51282
Hck	16.98	2	44	c-Met	>20000	1	>51282
ErbB2/HER2*	21.57	2	55	Cdk1/cyclin B	>20000	1	>51282
JAK3*	21.90	3	56	ERK1	>20000	1	>51282
Frk	29.24	1	75	ERK2/MAPK1	>20000	1	>51282
Lyn	40.72	3	104	Fak/PTK2	>20000	1	>51282
FLT3	85.14	2	218	GSK3a	>20000	1	>51282
Abl	86.12	1	221	GSK3b	>20000	1	>51282
Fyn	89.63	2	230	IGF1R	>20000	1	>51282
Ret	114.1	2	293	IRAK1	>20000	1	>51282
RIPK2	151.6	1	389	IRAK4	>20000	1	>51282
c-Src	262.6	3	673	JAK1	>20000	1	>51282
FGFR1	378.8	1	971	JAK2	>20000	1	>51282
PDGFRa	396.9	2	1018	JNK1	>20000	1	>51282
BRAF	826.5	1	2119	MEK1	>20000	1	>51282
c-Kit	960.0	1	2462	P38a/MAPK14	>20000	1	>51282
ABL1	983.7	1	2522	p70S6K/RPS6KB1	>20000	1	>51282
PDGFRb	1095	1	2808	Pka	>20000	1	>51282
FLT1/VEGFR1	1173	1	3008	PKCa	>20000	1	>51282
TIE2/Tek	1283	1	3290	PKCb1	>20000	1	>51282
Kdr/VEGFR2	1593	2	4083	PKCd	>20000	1	>51282
ABL2/Arg	1593	1	4085	PKCtheta	>20000	1	>51282
MEKK2	1609	1	4126	PLK1	>20000	1	>51282
RAF1	1859	1	4767	Syk	>20000	1	>51282
Aurora A	3016	1	7733	TYK2	>20000	1	>51282
PI3Kα	3166	2	8119	ZAP70	>20000	1	>51282

[a] *標識キナーゼは，イブルチニブと共有結合する可能性のあるシステイン残基を活性部位に持つ
[b] BTK 阻害作用に対する選択性

イブルチニブの *S*-エナンチオマーである PCI-32769 の BTK 阻害活性を同様に測定したところ，イブルチニブの IC_{50} 値が 0.36 nmol/L であったのに対し，PCI-32769 の IC_{50} 値は約 3.6 倍の 1.31 nmol/L であった【4.2.1.1.2】。

(2) BTK 活性に対する不可逆的阻害作用

【評価資料 4.2.1.1.3】

BTK 活性に対するイブルチニブの阻害様式を検討した。

イブルチニブと BTK をプレインキュベーション後，スピンカラムを用いて非結合型イブルチニブを除去し，基質及び ATP を添加することにより BTK 活性を測定した。

非結合型イブルチニブの除去後も BTK 活性は回復しなかったことから，イブルチニブは共有結合により BTK を不可逆的に阻害することが示唆された。

2.6.2.2.1.2 BCR シグナル伝達経路に対する阻害作用

【評価資料 4.2.1.1.1，参考資料 4.2.1.1.4】

BCR からのシグナルが活性化されると，上流キナーゼの Lyn/Fyn 又は Syk により BTK が活性化される。活性化 BTK は自己リン酸化及び基質である PLCγ をリン酸化し，さらに，下流キナーゼである Akt，Erk 及び JNK のリン酸化を誘導する。BTK によるシグナル伝達経路の活性化に対するイブルチニブの作用を，FL 由来細胞株である DOHH2 細胞，MCL 由来細胞株である Mino 細胞，初代培養 MCL 細胞及び正常ヒト B 細胞を用いて検討した。DOHH2 細胞における PLCγ のアイソフォームは PLCγ1，それ以外の細胞では PLCγ2 が発現しているため，それぞれの PLCγ アイソフォームのリン酸化を検出した。

DOHH2 細胞にイブルチニブ（0，0.64，3.2，16，80，400 及び 2,000 nmol/L）を添加後，抗 IgG F(ab')2 抗体で BCR を活性化し，PLCγ1 及び Erk のリン酸化を検出した。

イブルチニブは DOHH2 細胞における PLCγ1 及び Erk のリン酸化を阻害し，その IC_{50} 値は，それぞれ 20 及び 15 nmol/L であった（図 2.6.2-4）。

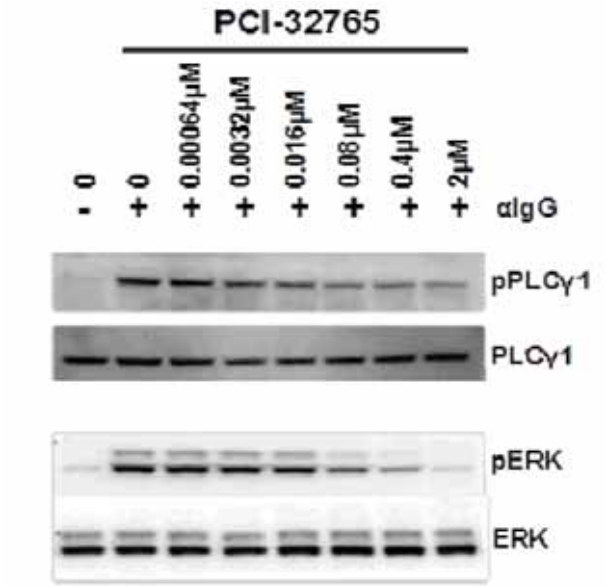


図 2.6.2-4 DOHH2 細胞における PLCγ1 及び Erk リン酸化に対する
イブルチニブの阻害作用

PCI-32765；イブルチニブ，αIgG；抗 IgG F(ab')2 抗体，pPLCγ1；リン酸化 PLCγ1，pERK；リン酸化 Erk

Mino 細胞，CD19 陽性正常 B 細胞又は初代培養 MCL 細胞にイブルチニブ（0，10，100 及び 1,000 nmol/L）を添加後，抗 IgM 抗体による BCR の活性化及び CXC ケモカインリガンド（CXCL）12 又は 13 によるケモカイン受容体の活性化を介した BTK のリン酸化を検出した。BTK による直接作用として BTK の自己リン酸化（223 位チロシン），トランス自己リン酸化[1]（551 位チロシン）及び PLCγ2（759 及び 1217 位チロシン）のリン酸化を検出した。BTK 活性化に伴う下流シグナルへの伝達作用として，Akt（473 位セリン），Erk（203 位スレオニン，204 位チロシン）及び JNK（183 位スレオニン，185 位チロシン）のリン酸化を検出した。

イブルチニブは，Mino 細胞における BCR 又はケモカイン受容体活性化による BTK の自己及びトランス自己リン酸化，並びに PLCγ2 のリン酸化を阻害した（図 2.6.2-5A）。さらに，BTK による下流シグナルへの伝達をイブルチニブが阻害することにより，Akt 及び JNK のリン酸化も阻害された（図 2.6.2-5A）。CD19 陽性正常 B 細胞又は初代培養 MCL 細胞において，イブルチニブは 100 nmol/L で BTK の自己及びトランス自己リン酸化を完全に阻害し，PLCγ2 のリン酸化も阻害した（図 2.6.2-5B）。

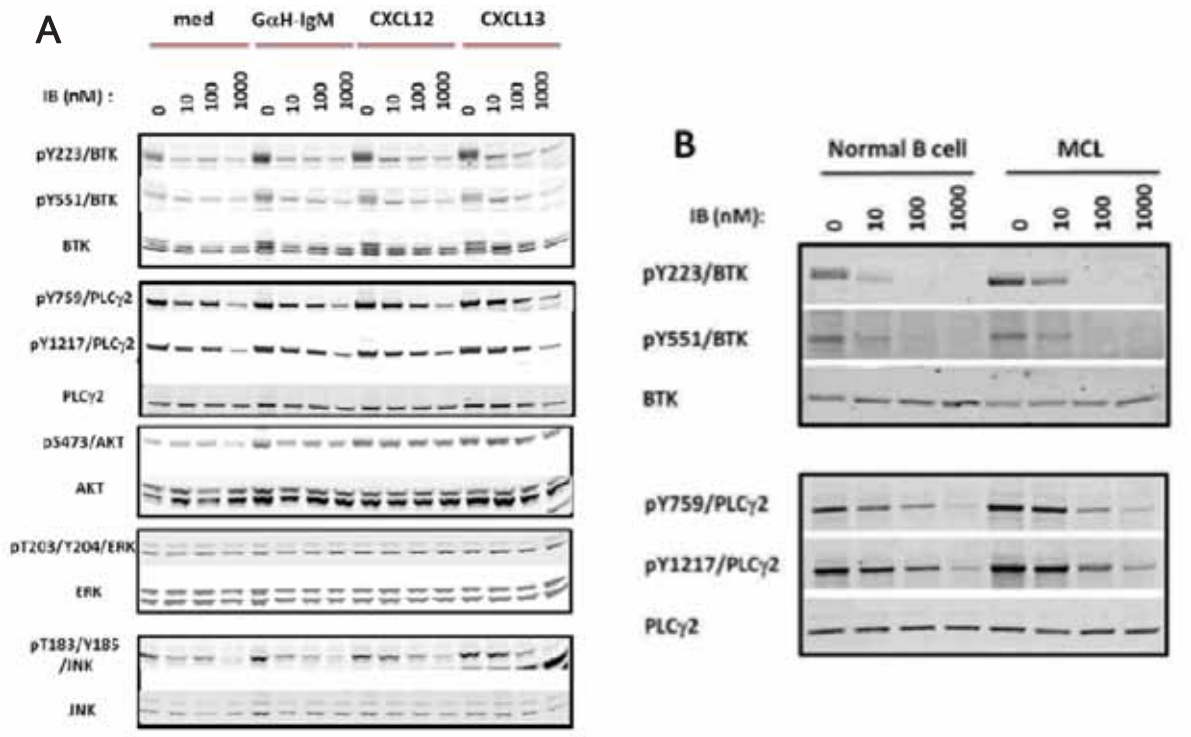


図 2.6.2-5 MCL 細胞及びヒト正常 B 細胞における BTK 自己リン酸化及び下流キナーゼリン酸化に対するイブルチニブの阻害作用

A：Mino 細胞株での検討，B；CD19 陽性正常 B 細胞又は初代培養 MCL 細胞での検討
med；溶媒対照，GαH-IgM；抗ヒト IgM ヤギ F(ab')2 抗体刺激，IB；イブルチニブ

[1]二量体の一方が もう一方をリン酸化すること

2.6.2.2.1.3 B 細胞活性化に対する阻害作用

【評価資料 4.2.1.1.1】

(1) 選択的及び不可逆的 B 細胞活性化阻害作用

B 細胞活性化に対するイブルチニブの阻害作用及びその選択性を検討した。

ヒト PBMC より採取した CD20 陽性 B 細胞及び CD3 陽性 T 細胞にイブルチニブ（0，1，10，100，1,000 及び 10,000 nmol/L）を添加後，抗 IgM 抗体で BCR 又は T 細胞受容体（TCR）を刺激し，活性化の指標である CD69 発現量をフローサイトメトリー法で検出した。さらに，イブルチニブによる活性化阻害作用の可逆性について検討するため，イブルチニブ添加 1 時間後に溶媒で洗浄し，同様に CD69 発現量を測定した。

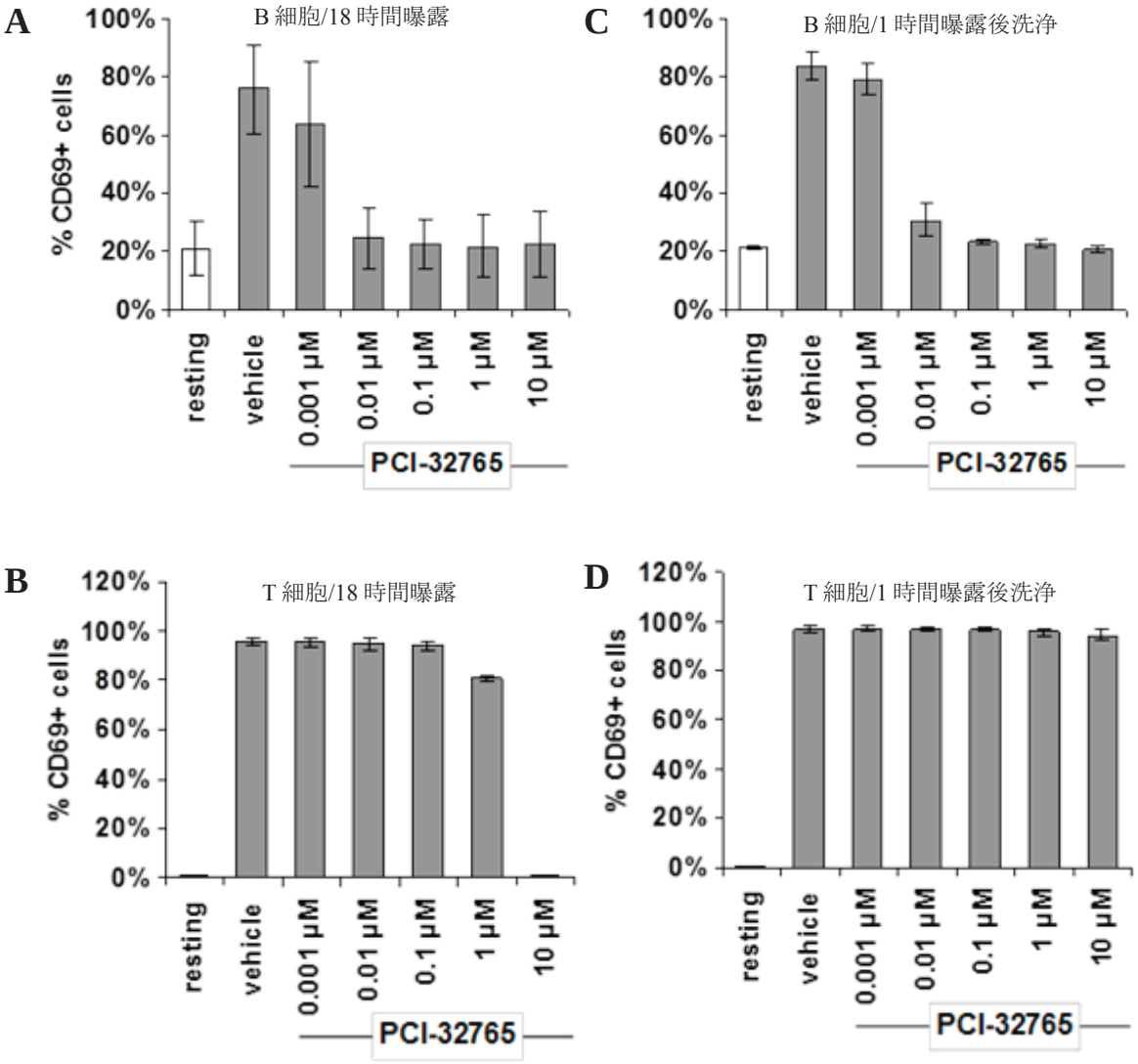


図 2.6.2-6 ヒト B 及び T 細胞活性化に対するイブルチニブの阻害作用

A；イブルチニブを 18 時間曝露（B 細胞），B；イブルチニブを 18 時間曝露（T 細胞）
C；イブルチニブを 1 時間曝露後に洗浄（B 細胞），D；イブルチニブを 1 時間曝露後に洗浄（T 細胞）
resting；未刺激，vehicle；溶媒対照，PCI-32765；イブルチニブ
平均値±標準偏差，2 例以上のドナーより B 及び T 細胞を採取し，2 例以上の試験結果をまとめた。

イブルチニブは 10 nmol/L で B 細胞の活性化を完全に阻害した（図 2.6.2-6A）。一方，T 細胞に対しては 10,000 nmol/L で阻害作用を示し，イブルチニブの阻害作用は B 細胞に対して選択的であった（図 2.6.2-6B）。さらに，洗浄により T 細胞活性化に対する阻害作用は回復したものの，B 細胞活性化の阻害作用は維持されており，イブルチニブによる B 細胞活性化阻害作用が不可逆的であることが示された（図 2.6.2-6C，D）。なお，イブルチニブを 10,000 nmol/L まで 18 時間曝露しても，イブルチニブは B 細胞及び T 細胞に対して細胞毒性を示さなかった。

以上のことから，高濃度のイブルチニブは，BTK 以外のキナーゼ阻害を介して TCR シグナル伝達に対する可逆的な作用を示す可能性があるものの，臨床曝露量である 6.5 nmol/L（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非結合型 C_{max} 中央値）でのイブルチニブは，TCR に比べて BCR シグナルの阻害に高い選択性を示し，不可逆的に B 細胞活性化を阻害することが示唆される。

(2) BTK 活性部位の占有

イブルチニブによる BTK 活性部位の占有を，蛍光標識プローブを用いて検討した。

プローブはイブルチニブに蛍光標識を導入して作成した。蛍光標識プローブは，イブルチニブのアクリロイル基と BTK 活性部位のシステイン残基との結合能を維持しているが，プローブと BTK との結合はイブルチニブとの共有結合によって阻害されるため，蛍光標識プローブを用いることでイブルチニブの BTK 占有率を間接的に測定することが可能となる。以降の BTK 活性部位の占有に関する試験にはこの蛍光標識プローブを用いた。BTK を発現する DOHH2 細胞又は発現しない Jurkat 細胞（ヒト急性 T 細胞性白血病由来細胞株）とイブルチニブをプレインキュベーションした後に蛍光標識プローブを添加し，細胞溶解液を電気泳動後，BTK に対する蛍光標識プローブの結合を検出した。

DOHH2 細胞において，蛍光標識プローブは BTK 活性部位に結合したが，その結合はイブルチニブとのプレインキュベーションにより完全に阻害された（図 2.6.2-7）。一方，Jurkat 細胞では蛍光標識プローブの結合はみられなかった。イブルチニブは BTK 活性部位に特異的に結合して占有することが示された。

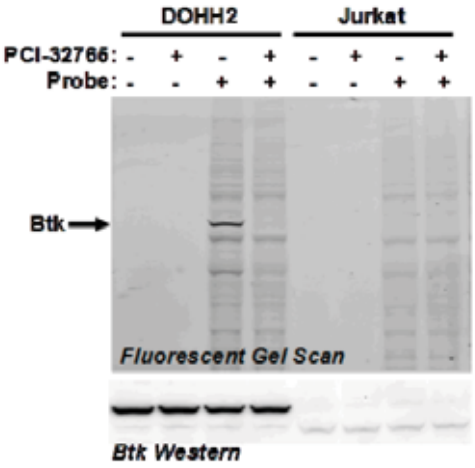


図 2.6.2-7 DOHH2 細胞又は Jurkat 細胞における蛍光標識プローブの
BTK 活性部位への結合に対するイブルチニブの阻害作用

PCI-32765；イブルチニブ，Probe；蛍光標識プローブ

イブルチニブによる BTK 活性部位の占有と B 細胞活性化阻害作用の相関性を検討した。

ヒト全血にイブルチニブ（0，12.5，25，100，200，400 及び 800 nmol/L）を添加して 1 時間インキュベーションした後，PBMC を採取した。さらに，PBMC に蛍光標識プローブを添加し，蛍光強度を検出することによりイブルチニブによる BTK 活性部位の占有率を測定した。また，残りの PBMC を用いて，抗 IgM 抗体による BCR の刺激後，フローサイトメトリーで CD69 発現量を検出することにより B 細胞活性化に対するイブルチニブの阻害作用を測定した。

イブルチニブは 200 nmol/L で BTK 活性部位の約 90%を占有し，CD69 発現量を約 50%抑制した（図 2.6.2-8）。イブルチニブによる BTK 活性部位の占有率と B 細胞活性化阻害作用との間には，良好な相関性がみられた。

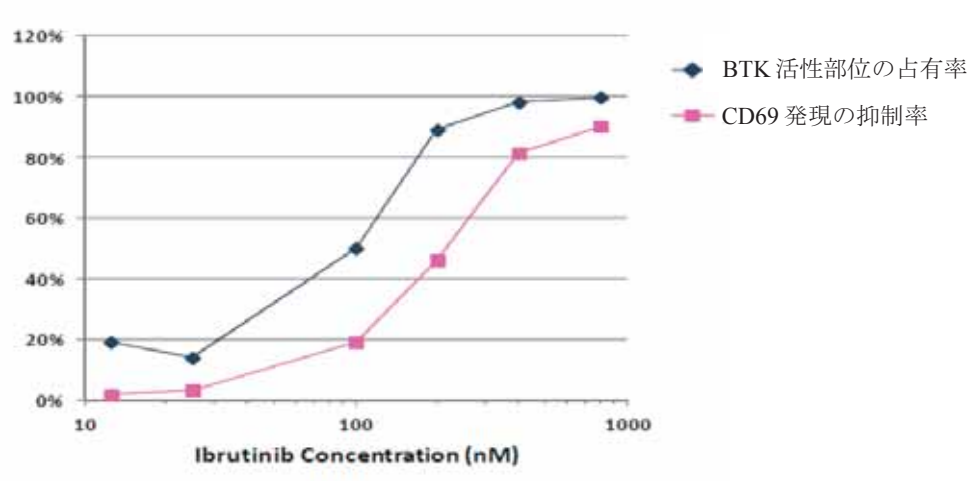


図 2.6.2-8 イブルチニブによる BTK 活性部位の占有と B 細胞活性化阻害作用の相関性

2.6.2.2.1.4　B 細胞性リンパ腫細胞の増殖に対する阻害作用

(1) ヒト初代培養慢性リンパ性白血病（CLL）細胞

【参考資料 4.2.1.1.4】

CLL 細胞の増殖に対するイブルチニブの阻害作用を，ヒト初代培養 CLL 細胞を用いて検討した。

B 細胞性 CLL 患者の PBMC から分離した初代培養 CLL 細胞を単球由来の NLC と 14 日間以上共培養した後，イブルチニブ（500 及び 1,000 nmol/L）存在下で 24 又は 48 時間インキュベーションし，^{3}H 標識チミジンの取り込み量を測定した。チミジンは各測定の 16 時間前に添加した。

イブルチニブは，^{3}H 標識チミジンの取り込み量を濃度依存的に低下させた（図 2.6.2-9）。24 時間のインキュベーションにおいて，対照群（4926 ± 540 cpm）と比較してイブルチニブ 500 nmol/L で 3884 ± 593 cpm（21%減少，p = 0.0004），1,000 nmol/L で 2154 ± 397 cpm（56%減少，p < 0.0001）の統計学的に有意な低下を示した。さらに，48 時間のインキュベーションでも同様に，対照群（5474 ± 434 cpm）と比較してイブルチニブ 500 nmol/L で 3693 ± 501 cpm（33%減少，p = 0.0007），1,000 nmol/L で 1702 ± 370 cpm（69%減少，p < 0.0001）の統計学的に有意な低下を示した。

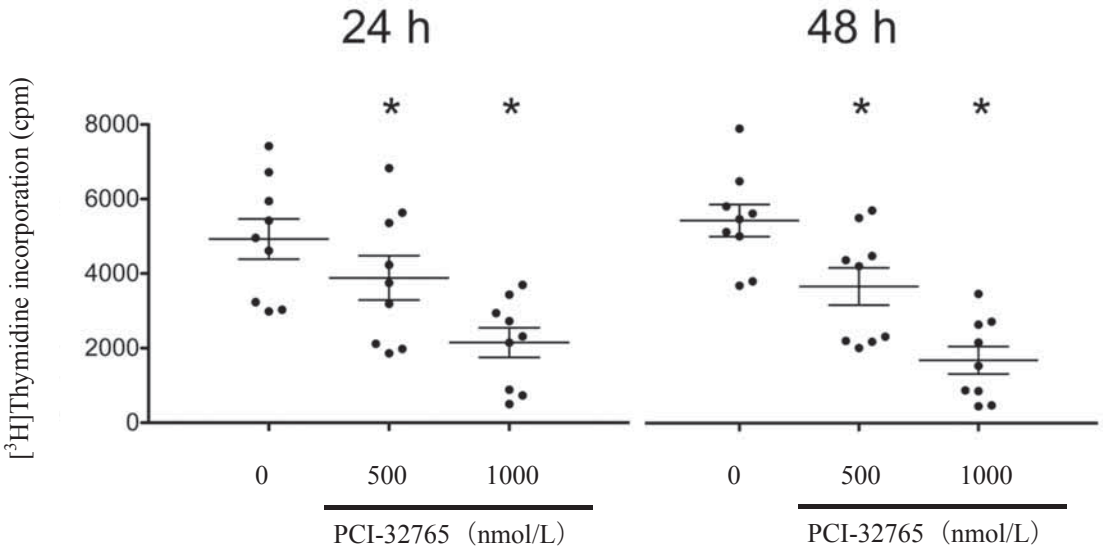


図 2.6.2-9 慢性リンパ性白血病（CLL）細胞の増殖に対するイブルチニブの作用

PCI-32765；イブルチニブ，例数；CLL 患者 9 例，平均値±標準誤差（*p ≤ 0.05）

(2) ヒトびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）細胞株

【評価資料 4.2.1.1.1】

非ホジキンリンパ腫の中で最も多い DLBCL は，遺伝子発現様式により胚中心 B 細胞様（GCB）又は ABC DLBCL にサブタイプ分類される。正常胚中心 B 細胞由来の GCB DLBCL は標準治療により予後が良好であるのに対し，胚中心後 B 細胞由来の ABC DLBCL は予後不良である。ABC DLBCL は抗アポトーシス因子である NF-κB のシグナル伝達が恒常的に活性化している。ABC DLBCL のうち約 10%は，癌遺伝子であるカスパーゼリクルートドメイン（CARD）11 の変異が NF-κB の活性化の原因と考えられている。一方，野生型 CARD11 を有する ABC DLBCL では，生存に必要なレベルの NF-κB の維持に BCR の継続的な活性化が寄与していることが示唆されて

いる。実際，BTK を含む BCR シグナル伝達系分子のノックダウンにより細胞死に至ることから，野生型 CARD11 を有する ABC DLBCL では，BTK が細胞の生存に重要な因子であることが示唆される[15)]。

ABC DLBCL 細胞の増殖に対するイブルチニブの阻害作用を，ヒト ABC DLBCL 由来細胞株である OCI-LY10（野生型 CARD11），TMD8（野生型 CARD11）及び OCI-LY3（変異型 CARD11）を用いて検討した。さらに，イブルチニブによる阻害作用の可逆性及び BTK 活性部位の占有についても検討した。

各種ヒト DLBCL 由来細胞株にイブルチニブ（0.001～100,000 nmol/L）を添加し，インキュベーション後に生細胞数を測定した。阻害作用の可逆性に関する検討では，OCI-LY10 にイブルチニブ（0.01～100,000 nmol/L）を添加して 1 時間インキュベーション後に細胞を洗浄し，同様に生細胞数を測定した。BTK 活性部位の占有に関する検討では，各 DLBCL 由来細胞株にイブルチニブ（0.1～1,000 nmol/L）及び蛍光標識プローブを添加し，細胞溶解液を電気泳動後，BTK への蛍光標識プローブの結合を検出した。

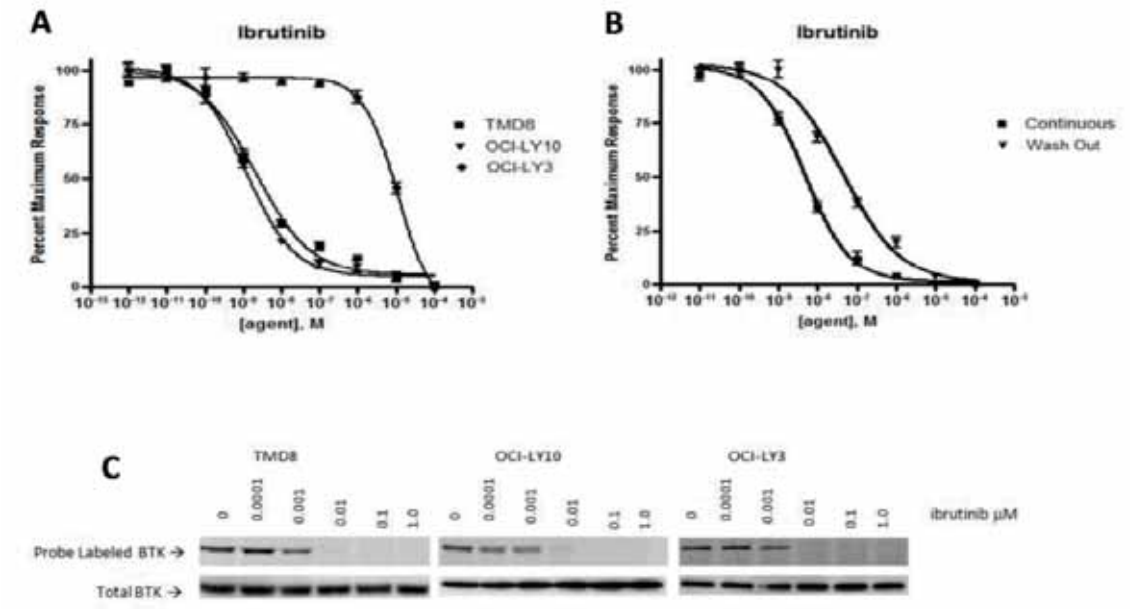


図 2.6.2-10 ABC DLBCL 細胞株の増殖及び BTK 活性部位占有に対するイブルチニブの作用

A；各種ヒト ABC DLBCL 由来細胞株における細胞増殖阻害作用，OCI-LY10（▼，野生型 CARD11，EC_{50}=2 nmol/L），TMD8（■，野生型 CARD11，EC_{50}=1 nmol/L），OCI-LY3（●，変異型 CARD11，EC_{50}=12,000 nmol/L），イブルチニブ適用濃度（10^{-12}～10^{-4} mol/L），n=3（平均値±標準偏差）

B；OCI-LY10 における不可逆的増殖阻害作用（■；洗浄せず，▼；洗浄），イブルチニブ適用濃度（10^{-11}～10^{-4} mol/L），n=3（平均値±標準偏差）

C；各種ヒト ABC DLBCL 由来細胞株における BTK 活性部位への占有作用

OCI-LY10 及び TMD8 の増殖阻害に対するイブルチニブの EC_{50} 値は，それぞれ 2 及び 1 nmol/L であったが，OCI-LY3 の増殖阻害に対する EC_{50} 値は 12,000 nmol/L であった（図 2.6.2-10A）。イブルチニブは洗浄後も 50 nmol/L の EC_{50} 値で OCI-LY10 の増殖阻害作用を維持し，BTK 活性に対する検討結果【2.6.2.2.1.1(2)参照】と同様に，増殖阻害作用も不可逆的であることが示唆された（図 2.6.2-10B）。さらに，検討した 3 種すべての細胞株において，イブルチニブは BTK 活性部位への蛍光標識プローブの結合を阻害し（EC_{50} = 1～2 nmol/L），野生型 CARD11 を有する OCI-

LY10 及び TMD8 においては，細胞増殖を阻害するのと同程度の濃度で BTK 活性部位を占有することが示唆された（図 2.6.2-10C）。

(3) ヒト MCL 細胞株

【評価資料 4.2.1.1.1】

MCL 細胞の増殖に対するイブルチニブの阻害作用を，各種ヒト MCL 由来細胞株（Mino，JVM-2，Rec-1，Jeko-1，Granta-519 及び Maver-1 細胞）を用いて検討した。さらに，Mino 細胞を用いてイブルチニブに対する耐性の獲得を検討した。

各種ヒト MCL 由来細胞株にイブルチニブ（10～10,000 nmol/L）を添加し，3 日間のインキュベーション後に，細胞増殖の相対的変化を観察した。

イブルチニブは Mino 及び JVM-2 細胞に対してそれぞれ 156 及び 625 nmol/L を上回る IC_{50} 値で，Rec-1，Jeko-1 及び Granta-519 細胞に対して 10,000 nmol/L を上回る IC_{50} 値で増殖阻害作用を示し，Maver-1 細胞に対しては増殖阻害作用を示さなかった（図 2.6.2-11）。イブルチニブは Mino 細胞に対して最も強い増殖阻害作用を示した。

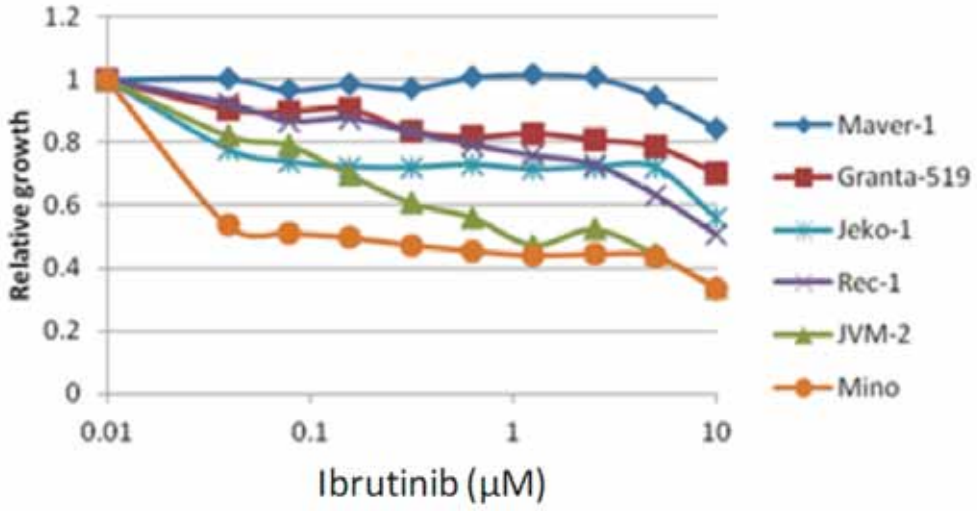


図 2.6.2-11 ヒト MCL 由来細胞株の増殖に対するイブルチニブの作用

イブルチニブ耐性 Mino 細胞は，Mino 細胞にイブルチニブを低濃度から漸増して曝露し，継代培養することにより得た。イブルチニブに対する耐性獲得の機序を検討するため，BTK の発現及び活性部位への蛍光標識プローブの結合，抗 IgM 抗体による BCR 活性化以降のシグナル分子のリン酸化を測定した。

継代培養によりイブルチニブに対する耐性を獲得した Mino 細胞は，1,000 nmol/L 以上のイブルチニブ存在下でも増殖が可能であった。曝露終了 16 日後においても同様に，1,000 nmol/L 以上のイブルチニブ存在下で Mino 細胞の増殖が認められた。イブルチニブ耐性 Mino 細胞における BTK の発現は正常であり，BTK 活性部位への直接的な蛍光標識プローブの不可逆的結合にも変化はみられなかった。さらに，DNA 配列解析の結果，イブルチニブ耐性 Mino 細胞の BTK に変異はみられず，活性部位のシステイン残基も維持されていた。イブルチニブ耐性細胞では，抗 IgM 抗体刺激による BTK のリン酸化がみられなかったが，正常細胞と比べて BTK の下流シグナ

ルである Erk のリン酸化は亢進していた。この亢進した Erk のリン酸化は，Erk の上流シグナルである Mek の阻害剤により抑制された。

2.6.2.2.1.5 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

微小環境における腫瘍性 B 細胞と間質細胞の相互作用は，種々の B 細胞性腫瘍の進行において重要な役割を果たす。リンパ組織における B 細胞のホーミング，接着及び遊走は，BCR シグナル伝達やケモカイン受容体（CXCR4 等）と接着分子（インテグリン）の相互作用によって制御されている。

(1) ヒト初代培養 CLL 細胞

【参考資料 4.2.1.1.5】

BCR 活性化，並びにケモカイン刺激による B 細胞の接着及び遊走に対するイブルチニブの阻害作用を，B 細胞性 CLL 患者から分離したヒト初代培養 CLL 細胞又はバーキットリンパ腫由来細胞株（Namalwa）を用いて検討した。

CLL 細胞又は Namalwa 細胞をイブルチニブ（1,000 nmol/L）存在下で，抗 IgM 抗体，ホルボールエステル（PMA）又は各種ケモカイン（CXCL12，CXCL13 及び CCL19）で刺激し，PLCγ2，Akt 及び Erk のリン酸化，フィブロネクチン及び血管細胞接着分子-1（VCAM-1）に対する接着，並びにケモカインに対する遊走を測定した。

イブルチニブは，抗 IgM 抗体刺激による PLCγ2 の 759 位チロシン及び Erk のリン酸化，並びにインテグリン $\alpha_4\beta_1$ を介することが知られているフィブロネクチン及び VCAM-1 への CLL 細胞の接着を阻害した（図 2.6.2-12）。

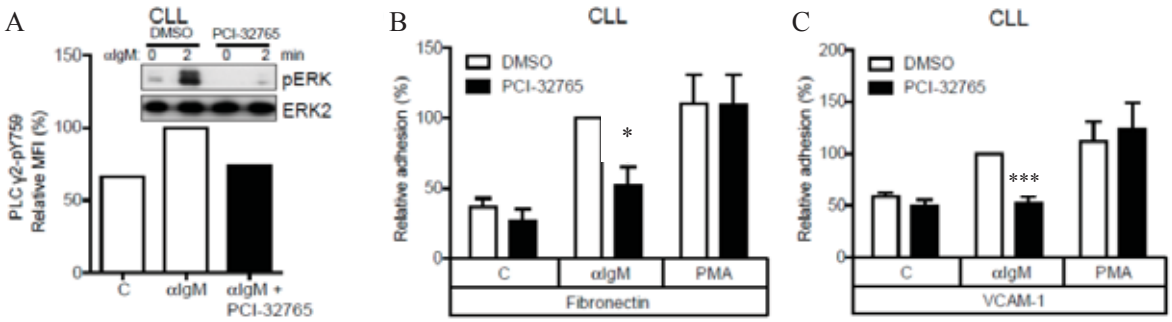


図 2.6.2-12 ヒト初代培養 CLL 細胞における BCR 活性化による シグナル伝達及び接着に対するイブルチニブの作用

A；抗 IgM 抗体刺激後の PLCγ2 759 位チロシン及び Erk のリン酸化（CLL 患者 1 例）
B；抗 IgM 抗体又は PMA 刺激後のフィブロネクチン（10 μg/mL）コートプレートへの接着（CLL 患者 5 例）
C；抗 IgM 抗体又は PMA 刺激後の VCAM-1（500 ng/mL）コートプレートへの接着（CLL 患者 6 例）
MFI；平均蛍光強度，C；非刺激対照群，αIgM；抗 IgM 抗体，PCI-32765；イブルチニブ，DMSO；ジメチルスルホキシド
細胞接着率は，イブルチニブ非存在下における抗 IgM 抗体又は PMA 刺激細胞の接着率を 100%として算出し，各患者 3 試験の結果を平均値±標準誤差で示した。
*p<0.05，***p<0.001（対応のない両側 Student's T 検定）

一方，BTK 下流シグナルのプロテインキナーゼ C を直接活性化する PMA で CLL 細胞を刺激したところ，イブルチニブは PMA 刺激 CLL 細胞のフィブロネクチン及び VCAM-1 への接着を

阻害しなかった（図 2.6.2-12B，C）。さらに，Namalwa 細胞を用いたシグナル伝達の検討において，イブルチニブは BTK の下流シグナルである Erk と Akt のケモカイン（CXCL12）刺激によるリン酸化を阻害したが（図 2.6.2-13B），抗 IgM 抗体又は CXCL12 刺激による BTK のリン酸化は阻害せず（図 2.6.2-13A），上流シグナル（Lyn/Syk）による BTK のリン酸化には影響しなかった。イブルチニブは，ケモカイン（CXCL12，CXCL13 及び CCL19）刺激した CLL 細胞の VCAM-1 への接着及び遊走を阻害した（図 2.6.2-13C，D）。

イブルチニブは BCR 活性化及びケモカイン刺激による接着及び遊走を阻害し，その阻害作用は BTK に特異的であることが示唆された。

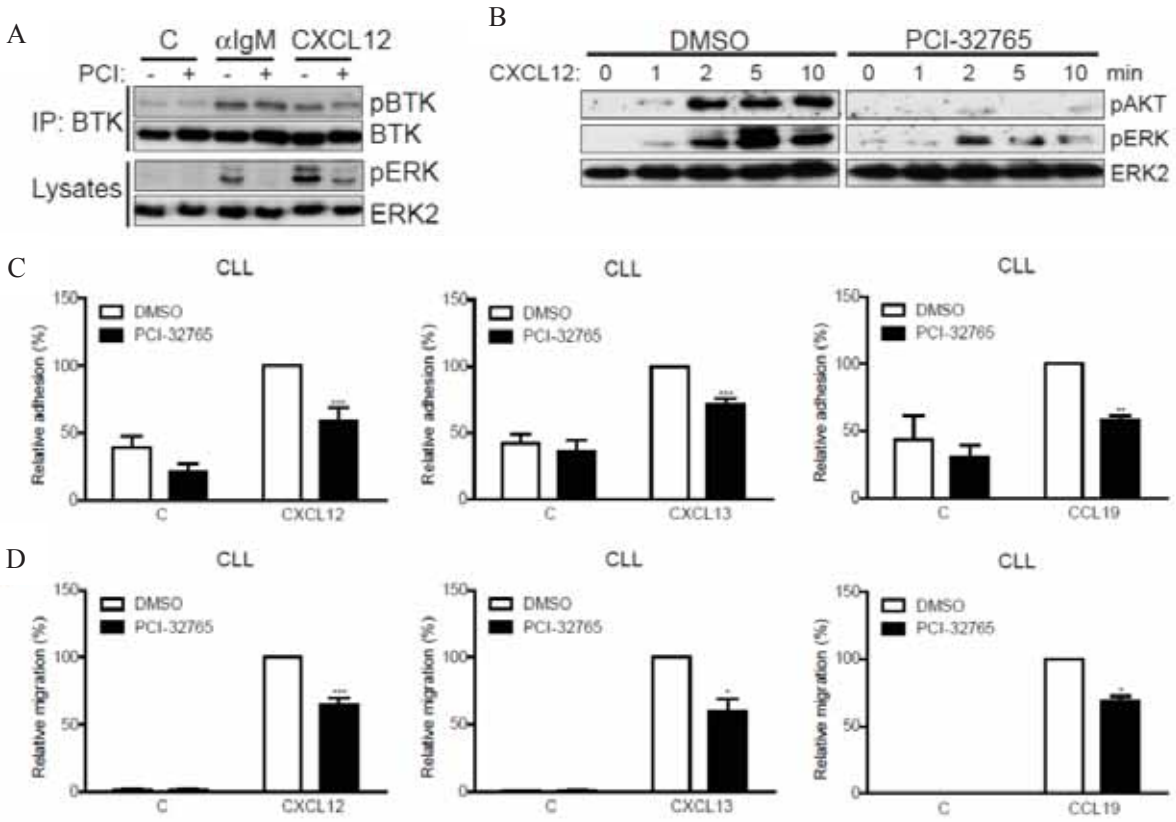


図 2.6.2-13 ヒト B 細胞における BCR 活性化又はケモカイン刺激によるシグナル伝達，接着及び遊走に対するイブルチニブの作用

A，B；ヒトバーキットリンパ腫由来 B 細胞（Namalwa）における抗 IgM 抗体又は CXCL12 刺激後の BTK（A），Erk 及び Akt（B）のリン酸化
C；各ケモカイン存在下における VCAM-1 コートプレートへの CLL 細胞の接着（CXCL12；7 例，CXCL13；5 例，CCL19；3 例）
D；VCAM-1 コート遊走プレートにおける各ケモカインに対する遊走（CXCL12；6 例，CXCL13；4 例，CCL19；3 例）
IP；免疫沈降物，C；非刺激対照群，αIgM；抗 IgM 抗体，PCI 又は PCI-32765；イブルチニブ，DMSO；ジメチルスルホキシド
細胞接着率は，イブルチニブ非存在下におけるケモカイン刺激細胞の接着率を 100%として算出し，各患者 3 試験の結果を平均値±標準誤差で示した。細胞遊走率は，イブルチニブ非存在下におけるケモカイン刺激細胞の遊走率を 100%として算出し，各患者 3 試験の結果を平均値±標準誤差で示した。
*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001（対応のない両側 Student's T 検定）

(2) ヒト MCL 細胞株

【評価資料 4.2.1.1.1】

BCR 活性化及びケモカイン刺激による MCL 細胞の接着及び遊走に対するイブルチニブの阻害作用を，ヒト MCL 由来細胞株を用いて検討した。

MCL 細胞株（Jeko1，HBL2，Mino 及び JVM-1）をイブルチニブ存在下（接着試験；100 nmol/L，遊走試験；0.1～1,000 nmol/L）で抗 IgM 抗体，PMA 又は各種ケモカイン（CXCL12 及び CXCL13）で刺激し，フィブロネクチン及び VCAM-1 に対する接着，並びにケモカインに対する遊走を測定した。

イブルチニブは，抗 IgM 抗体刺激による Jeko1 及び HBL2 細胞のフィブロネクチン及び VCAM-1 への接着を有意に阻害（50～70%）した（図 2.6.2-14）。一方，PMA 刺激によるこれら接着をイブルチニブは阻害しなかったことから，イブルチニブによる BCR 活性化を介した接着は BTK に特異的であることが示唆された。さらに，イブルチニブは，ケモカイン刺激による Mino 及び Jeko1 細胞のフィブロネクチン及び VCAM-1 への接着を有意に阻害した（図 2.6.2-15）。

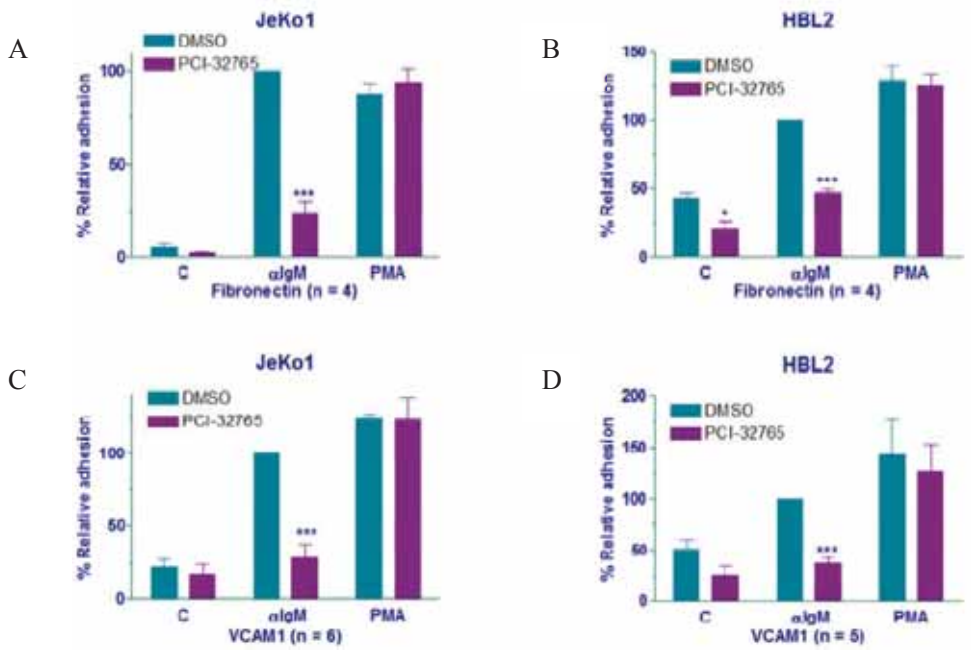


図 2.6.2-14 ヒト MCL 細胞における BCR 刺激による接着に対するイブルチニブの作用

A，B；Jeko1（A）及び HBL2（B）における抗 IgM 抗体又は PMA 刺激後のフィブロネクチンへの接着（n=4）
C，D；Jeko1（C）及び HBL2（D）における抗 IgM 抗体又は PMA 刺激後の VCAM-1 への接着（n=5 又は 6）
C；非刺激対照群，αIgM；抗 IgM 抗体，PCI-32765；イブルチニブ
細胞接着率は，イブルチニブ非存在下における抗 IgM 抗体刺激細胞の接着を 100%として算出し，各患者 3 試験の結果を平均値±標準誤差で示した。
*p<0.05，***p<0.001（対応のある Student's T 検定）

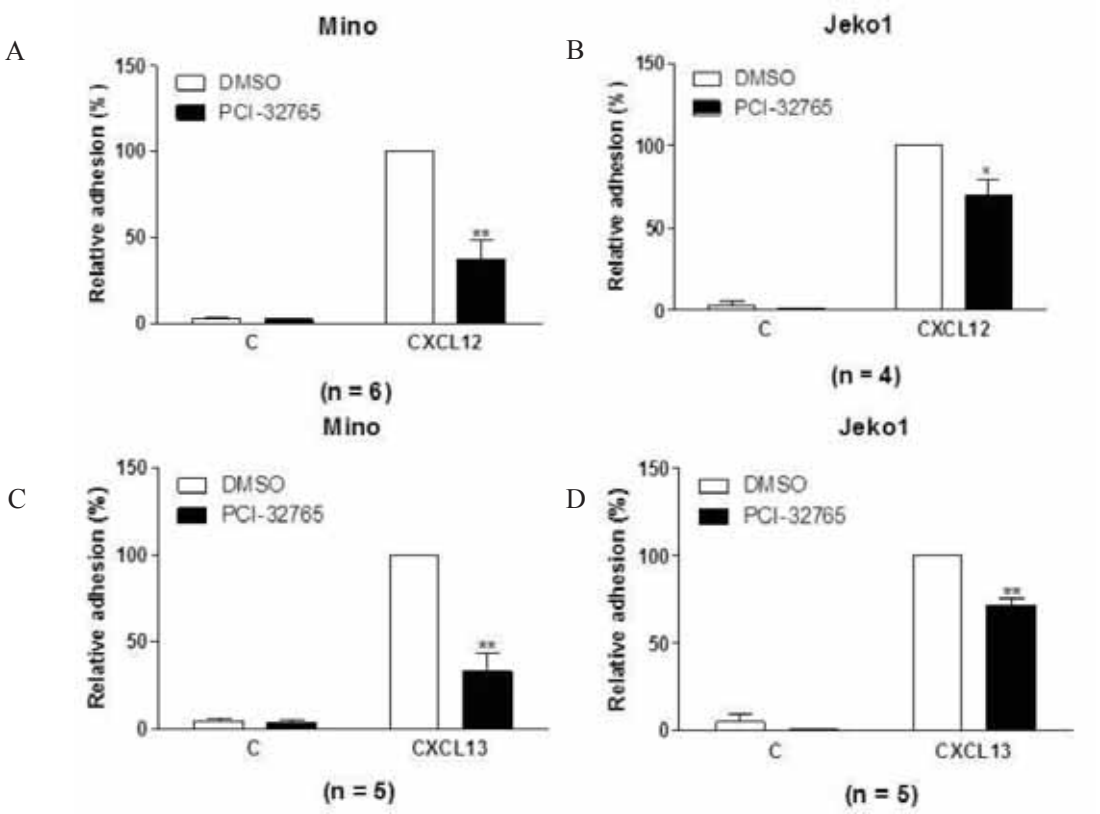


図 2.6.2-15 ヒト MCL 細胞におけるケモカイン刺激による接着に対するイブルチニブの作用

A，B；Mino（A）及び Jeko1（B）における CXCL12 刺激後のフィブロネクチンへの接着（n=4 又は 6）
C，D；Mino（C）及び Jeko1（D）における CXCL13 刺激後の VCAM-1 への接着（n=5）
PCI-32765；イブルチニブ，DMSO；ジメチルスルホキシド，C；非刺激対照群
細胞接着率は，イブルチニブ非存在下におけるケモカイン刺激細胞の接着を 100%として算出し，各患者 3 試験の結果を平均値±標準誤差で示した。
*p<0.05，**p<0.01（対応のある Student's T 検定）

イブルチニブは，ケモカイン（CXCL12 及び CXCL13）刺激による Mino 細胞の遊走を濃度依存的に阻害した（図 2.6.2-16）。CXCL12 刺激による遊走において，イブルチニブは Mino，JeKo1 及び JVM-1 細胞に対し，それぞれ 0.1，0.1 及び 10 nmol/L 以上で有意に阻害作用を示した（図 2.6.2-16A，図 2.6.2-17）。

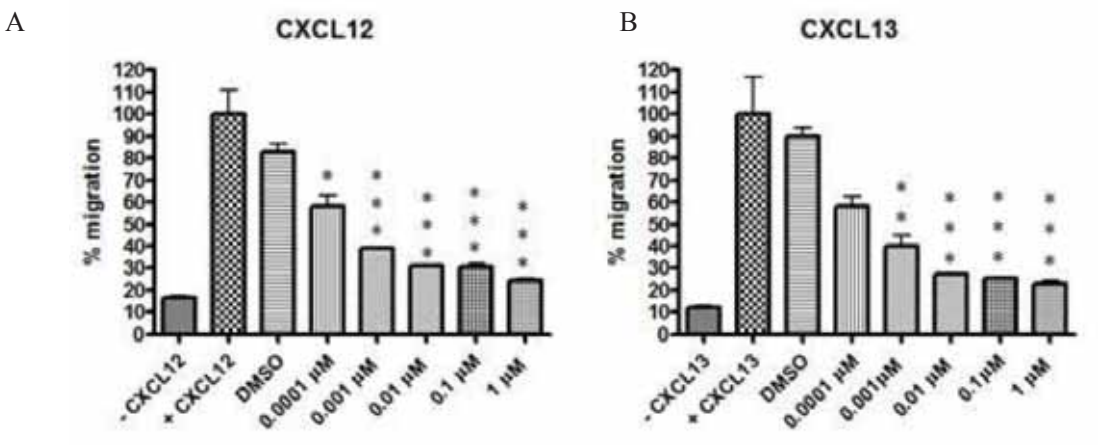


図 2.6.2-16 ケモカイン刺激による Mino 細胞の遊走に対する濃度依存的なイブルチニブの作用

Mino 細胞における CXCL12 刺激（A）及び CXCL13 刺激（B）による遊走
DMSO；ジメチルスルホキシド，イブルチニブ（0.0001～1 µmol/L），n=3
細胞遊走率は，イブルチニブ非存在下におけるケモカイン刺激細胞の遊走率を 100%として算出し，平均値±標準偏差で示した。 *p<0.05，**p<0.01，***p<0.001（一元配置分散分析）

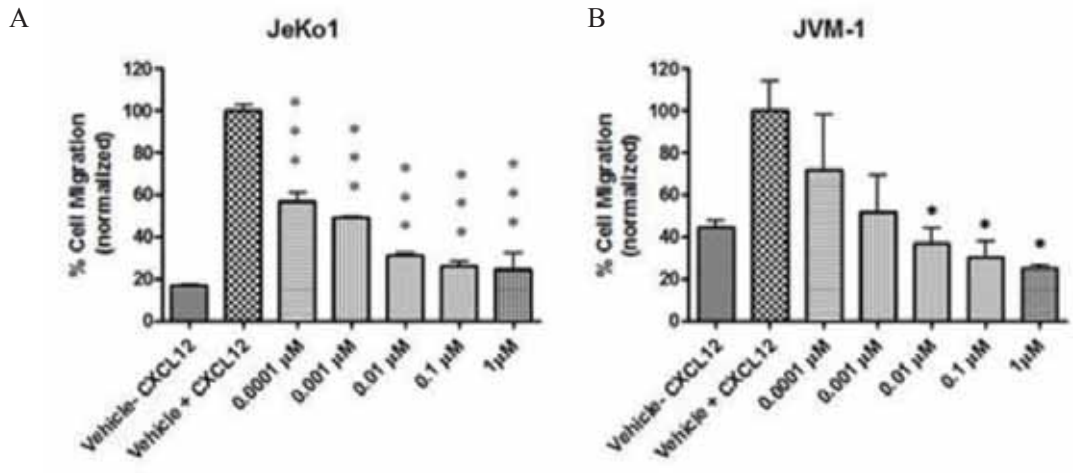


図 2.6.2-17 CXCL12 刺激による MCL 細胞の遊走に対する濃度依存的なイブルチニブの作用

Jeko1 細胞（A）又は JVM-1 細胞（B）における CXCL12 刺激による遊走
細胞遊走率はイブルチニブ非存在下での CXCL12 刺激による遊走細胞数を 100%として算出し，平均値±標準偏差で示した。n=3，*p<0.05， ***p<0.001（一元配置分散分析）

2.6.2.2.1.6 *In vivo* における BTK 活性部位への結合

(1) マウス脾細胞における BTK 活性部位への結合

【評価資料 4.2.1.1.6，4.2.1.1.7，4.2.1.1.8，4.2.1.1.9，4.2.1.1.10】

In vivo における BTK 活性部位のイブルチニブによる占有について，投与経路，投与量，投与後の経過時間及び投与期間が与える影響を，マウスを用いて検討した。検討には BTK 活性部位に特異的に結合する蛍光標識プローブを用い，活性部位占有率を間接的に測定した。

投与経路が与える影響を検討した試験【4.2.1.1.6】では，雌性 BALB/c マウス（各群 3 例）にイブルチニブ（0，5，50 mg/kg）を静脈内，腹腔内及び経口投与し，投与 2 時間後に脾臓を摘出して脾細胞を調製した。凍結融解により細胞膜を破壊した脾細胞に蛍光標識プローブを添加し，細胞溶解液を電気泳動後，BTK に対する蛍光標識プローブの結合（活性部位占有率）を検出した。

5 mg/kg の静脈内及び腹腔内投与群でイブルチニブにより BTK 活性部位が完全に占有され，経口投与群では部分的な占有が認められた。50 mg/kg 投与群では，すべての投与経路において完全に占有された。

投与後経過時間が与える影響を検討した試験【4.2.1.1.7】では，雌性 BALB/c マウス（各群 2 例）にイブルチニブ（0，50 mg/kg）を静脈内，皮下及び経口投与し，投与 1，3，5，7 及び 24 時間後に脾臓を摘出した。活性部位占有率は上記の試験と同様の方法で測定した。

50 mg/kg 投与群では，すべての投与経路において投与 1～7 時間後にイブルチニブにより BTK 活性部位が完全に占有された。投与 24 時間後ではすべての投与経路で部分的な占有が認められた。

投与量が与える影響を検討した試験【4.2.1.1.8】では，雌性 BALB/c マウス（各群 2 例）にイブルチニブ（0，0.1，0.5，1，2.5，5，10 及び 30 mg/kg）を経口又は皮下投与し，投与 3 時間後に脾臓を摘出した。活性部位占有率は上記の試験と同様の方法で測定した。

皮下投与では，1～30 mg/kg 投与群でイブルチニブにより BTK 活性部位が完全に占有された。経口投与では，10 及び 30 mg/kg 投与群の BTK 活性部位が完全に占有され，5 mg/kg 投与群で部分的な占有が認められた。

投与後経過時間及び投与量が与える影響を検討したフォローアップ試験【4.2.1.1.9】では，雄性 DBA1 マウス（各群 3 例）にイブルチニブ（0，3.125，12.5 及び 50 mg/kg）を経口投与し，投与 3，12 及び 24 時間後（50 mg/kg のみ 3 時間後）に脾臓を摘出した。活性部位占有率は上記の試験と同様の方法で測定した。

投与 3 時間後で比較すると，イブルチニブは用量依存的に活性部位を占有した。3.125 mg/kg 投与群では，投与 24 時間後までイブルチニブによる部分的な占有が認められた。12.5 mg/kg 投与群では，投与 3 及び 12 時間後まで BTK 活性部位が完全に占有され，投与 24 時間後では部分的な占有が認められた。

投与期間が与える影響を検討した試験【4.2.1.1.10】では，雌性 BALB/c マウス（各群 3 又は 6 例）にイブルチニブ（0，3.7，7.6，14.3 及び 30 mg/kg/日）を 7 日間反復飲水投与し，8 日目に脾臓を摘出した。活性部位占有率は上記の試験と同様の方法で測定した。

3.7 及び 7.6 mg/kg/日投与群ではイブルチニブにより BTK 活性部位の約 50%が占有され，14.3 及び 30 mg/kg/日投与群では約 70～75%の占有が認められた。

(2) ラット脾細胞における BTK 活性部位への結合

【評価資料 4.2.1.1.11】

雌性ラット（各群 4 例）にイブルチニブ（0，2，6，18 mg/kg）を経口投与し，投与 4 時間後に脾臓を摘出した。BTK に対する蛍光標識プローブの結合は上記試験と同様の方法で測定した。

イブルチニブを投与したすべての群で，イブルチニブにより BTK 活性部位が用量依存的に占有され，6 mg/kg 投与群では約 90%の占有が認められた（図 2.6.2-18）。

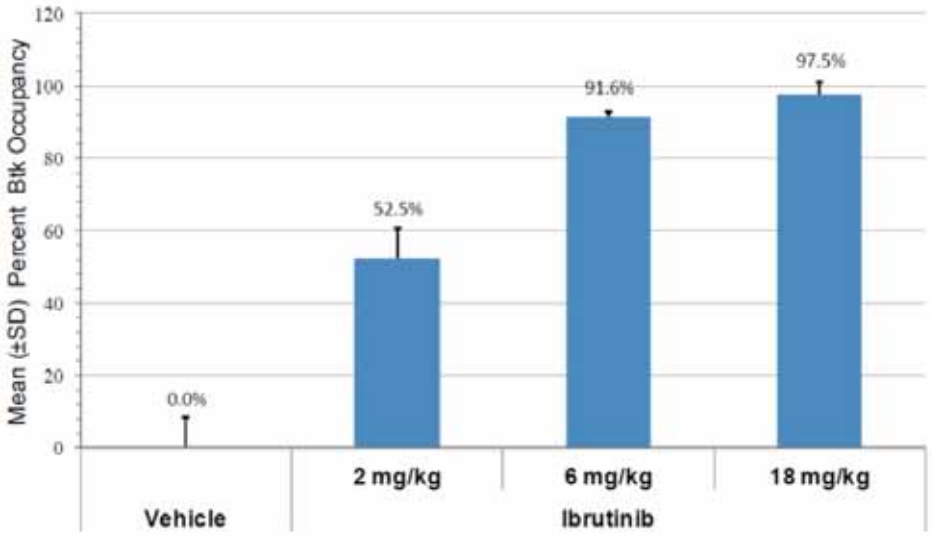


図 2.6.2-18 ラット脾細胞におけるイブルチニブによる BTK 活性部位の占有

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。

(3) ヒト B 細胞性腫瘍異種移植マウスの腫瘍組織における BTK 活性部位への結合

【評価資料 4.2.1.1.12】

FL 由来細胞株（DOHH2）を CB17 重症複合型免疫不全（SCID）マウスに異種移植したモデルの腫瘍組織における，BTK 活性部位へのイブルチニブの結合を検討した。

DOHH2 細胞を雌性 CB17 SCID マウスの皮下に移植 16 日後，イブルチニブ（0，2.5，10，100 mg/kg）を経口投与した。投与の 2 又は 17 時間（それぞれ各群 5 又は 3 例）後に腫瘍組織を採取した後，上記試験と同様に活性部位占有率を測定した。

2.5 mg/kg 投与群では，イブルチニブによる腫瘍組織の BTK 活性部位の占有はみられなかった。10 及び 100 mg/kg 投与群では，投与 2 時間後でイブルチニブにより完全に占有され，投与 17 時間後でも部分的な占有が認められた。

2.6.2.2.1.7 反復経口投与による BTK 発現への影響

【評価資料 4.2.1.1.13】

脾臓由来 B 細胞における BTK 発現量に対し，イブルチニブの反復投与及び休薬の与える影響を検討するとともに，BTK 活性部位への結合についても検討した。

雌性 BALB/c マウス（各群 3 例）にイブルチニブを 1 日 2 回（0 及び 50 mg/kg/日），3 又は 7 日間反復経口投与し，最終投与 3 時間後に脾臓を摘出して脾細胞を調製した。さらに，同様の投与方法で 7 日間反復経口投与し，休薬 1 日後に脾臓を摘出した。フローサイトメトリーにて脾細胞から B 細胞表面マーカーである B220 に陽性の B 細胞を分画した後，この細胞における BTK 発現量をフローサイトメトリーで測定した。また，BTK に対する蛍光標識プローブの結合量を同様に測定した。

B220 陽性 B 細胞における BTK 発現量は，3 及び 7 日間の反復投与によりそれぞれ 24.6%及び 18.3%減少し，3 及び 7 日目で発現の低下に大きな違いは見られなかった。さらに，休薬 1 日後も BTK 発現の低下が同程度に持続していた。また，50 mg/kg/日の 3 及び 7 日間反復経口投与では，イブルチニブにより BTK 活性部位は完全に占有された。

2.6.2.2.2 抗腫瘍効果

2.6.2.2.2.1 CLL モデル

【参考資料 4.2.1.1.4】

CLL に対するイブルチニブの抗腫瘍効果を，ヒト CLL に類似した特徴を有する Eμ TCL1 トランスジェニックマウスの養子移入モデルを用いて検討した。

Eμ TCL1 トランスジェニックマウス由来の CLL クローン細胞株である TCL1-192 細胞を CB17 SCID マウス（各群 3 又は 4 例）の腹腔に移入した。3 週間後に群分けし，イブルチニブ（0，0.016 及び 0.16 mg/mL）を 16 日間飲水投与した。飲水量及び体重で補正した平均イブルチニブ投与量は 0，2.5 及び 25 mg/kg/日であった。投与開始時，1 及び 2 週間後（それぞれ CLL 細胞移入 4 及び 5 週間後）に末梢血中の CLL 細胞数（B220 陽性かつ CD5 陽性リンパ球数）をフローサイトメトリーにて測定した。

投与 1 週間後の末梢血 CLL 細胞数は，2.5 及び 25 mg/kg/日投与群で溶媒対照群より低値を示し，投与 2 週間後においても，25 mg/kg/日投与群で溶媒対照群より低値であった（図 2.6.2-19 ）。投与 2 週間後（CLL 細胞移入 5 週間後）では，溶媒対照群及び 2.5 mg/kg/日投与群のマウスに嗜眠，円背位，立毛，脱毛及び体重減少が認められた。さらに，投与 16 日目の剖検時，これらのマウスで顕著なリンパ球増加，肝脾腫大及びリンパ節腫脹がみられた。これに対し，25 mg/kg/日投与群のマウスの一般症状に変化はみられず，肝臓及び脾臓のサイズ及び重量は統計学的に有意に小さく，CLL 細胞の浸潤は顕著に減少した。

投与後の経時的変化をより詳細に検討した試験では，TCL1-192 細胞を CB17 SCID マウスに移入 2 週間後よりイブルチニブ（0，2.5 及び 25 mg/kg/日）を投与し，末梢血 CLL 細胞数を測定した。2.5 及び 25 mg/kg/日投与群は投与 4 日目に末梢血 CLL 細胞数が一過性に増加したが（対照群と比較し，それぞれ平均で約 7 及び 10 倍），投与 7 日目には対照群と同程度まで回復した。投

与 14～25 日目では，25 mg/kg/日投与群の末梢血 CLL 細胞数は対照群より低下しており，イブルチニブによる CLL 細胞の生存の阻害が示された。

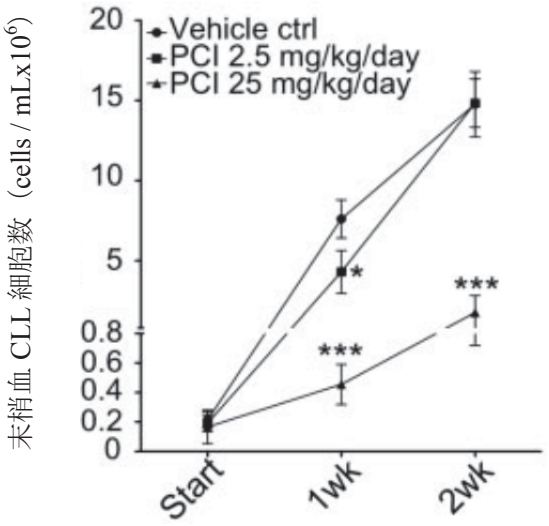


図 2.6.2-19 CLL 養子移入マウスにおける末梢血 CLL 細胞数に対するイブルチニブの作用

Vehicle ctrl；溶媒対照，PCI；イブルチニブ，Start；イブルチニブ投与開始
n=3 又は 4，平均値±標準偏差，*p<0.01，***p<0.0001（repeated measures ANOVA）

2.6.2.2.2.2 MCL モデル

【評価資料 4.2.1.1.14】

MCL に対するイブルチニブの抗腫瘍効果を，ヒト MCL 由来細胞株である Mino 細胞の異種移植マウスモデルを用いて検討した。

Mino 細胞は雌性 CB17 SCID マウスの静脈に移入した。組織への Mino 細胞の生着のため，Mino 細胞移入 24 時間前及び試験終了までの 1 週間毎に抗 IL-2 受容体 β モノクローナル抗体を腹腔内に投与し，ナチュラルキラー細胞を枯渇させた。細胞移入 1 日目に群分けし，イブルチニブ（0，12 mg/kg/日）を 70 日間混餌投与した。70 日目に採血後，脾臓，肝臓，骨髄及びリンパ節（鼠径部，腸間膜，腋窩，頚部及び下顎）を採取し，PBMC 及び各組織中のヒト CD19 陽性細胞数をフローサイトメトリーにて測定した。

試験期間中，対照群の 10 例中 5 例で一般状態の変化（両側性頚部腫瘤，努力呼吸，被毛粗剛及び/又は脊柱後弯）が認められたのに対し，イブルチニブ投与群では 10 例中 1 例のみで一般状態の変化（尾の基部付近の硬腫瘤）が認められた。イブルチニブ投与群は対照群と比べ，最終評価時（試験 56 日目）の平均白血球数が約 40%低下しており，イブルチニブ投与による抗腫瘍効果が示唆された。また，イブルチニブ投与群の総リンパ節重量は対照群より低値を示したが，統計学的有意差はなかった。骨髄，PBMC 及び総リンパ節組織中に浸潤したヒト CD19 陽性 Mino 細胞数は，対照群に比べてイブルチニブ投与群で減少しており，総リンパ節においては統計学的に有意な減少であった（図 2.6.2-20）。イブルチニブは脾臓中のヒト CD19 陽性 Mino 細胞数に影響を及ぼさなかった。

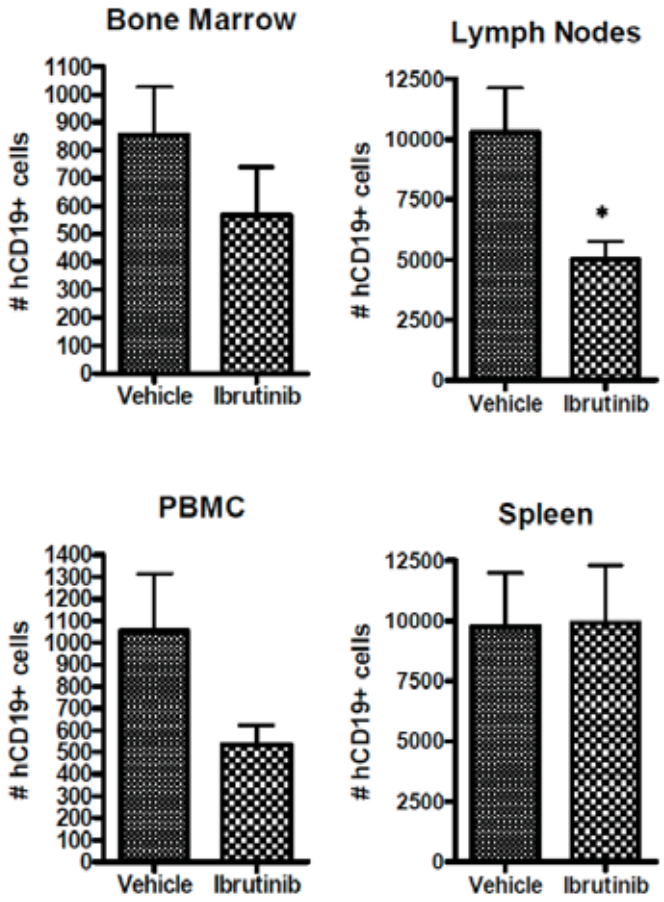


図 2.6.2-20 MCL 異種移植マウスモデルにおける各組織中のヒト CD19 陽性 Mino 細胞数に対するイブルチニブの作用

PBMC におけるヒト CD19 陽性 Mino 細胞数は，試料 100 µL 中の細胞数で表した。
n=10，平均値±標準誤差，*p<0.05（対応のない Student's T 検定）

2.6.2.2.2.3 DLBCL モデル

【評価資料 4.2.1.1.15，4.2.1.1.16】

DLBCL に対するイブルチニブの抗腫瘍効果を，ヒト DLBCL 由来細胞株である OCI-LY10 及び TMD8 細胞の異種移植マウスモデルを用いて検討した。

OCI-LY10 を雌性 SCID マウスの右大腿部皮下に移植し，移植 33 日後に群分けした（各群 10 例）。イブルチニブ（0，3 及び 12 mg/kg/日）は，5 日間連日経口投与後 2 日間休薬を 1 サイクルとして繰り返し，6 サイクル投与した。投与期間中，毎週 2～3 回の頻度で皮下移植部位の腫瘍体積を測定した。

イブルチニブは OCI-LY10 異種移植マウスモデルでの腫瘍増殖を有意に抑制した。3 及び 12 mg/kg/日投与群の腫瘍体積は，投与 10～39 日目で対照群より有意に減少した（図 2.6.2-21）。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 3 及び 12 mg/kg/日投与群でそれぞれ 0.51 及び 0.34 であった。

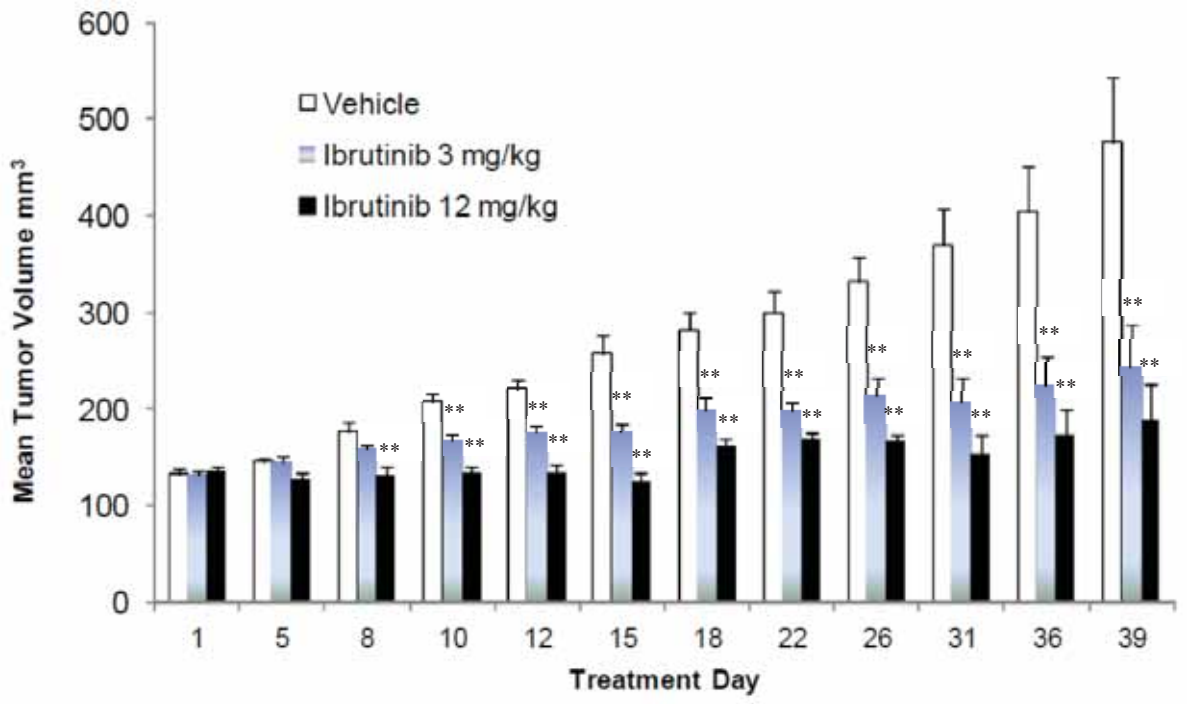


図 2.6.2-21 OCI-LY10 異種移植マウスモデルの腫瘍体積に対するイブルチニブの作用

n=10，平均値±標準偏差，**p < 0.01（One-way ANOVA 後に Dunnet's 検定）

TMD8 細胞を雌性 SCID マウスの右大腿部皮下に移植し，移植 26 日後，マウスを各群 7～8 例に群分けした。イブルチニブ（0，3 及び 12 mg/kg/日）は，5 日間連日経口投与後 2 日間休薬を 1 サイクルとして 2 回繰り返した後に，4 日間連日経口投与した。18 日間の観察期間中，毎週 2～3 回の頻度で皮下移植部位の腫瘍体積を測定した。

イブルチニブは TMD8 異種移植マウスモデルでの腫瘍増殖を有意に抑制した（図 2.6.2-22）。投与 4 日目の T/C 比は，3 及び 12 mg/kg/日投与群でそれぞれ 0.71 及び 0.6 であった。T/C 比が最も低下したのは投与 10 日目であり，3 及び 12 mg/kg/日投与群でそれぞれ 0.56 及び 0.36 であった。

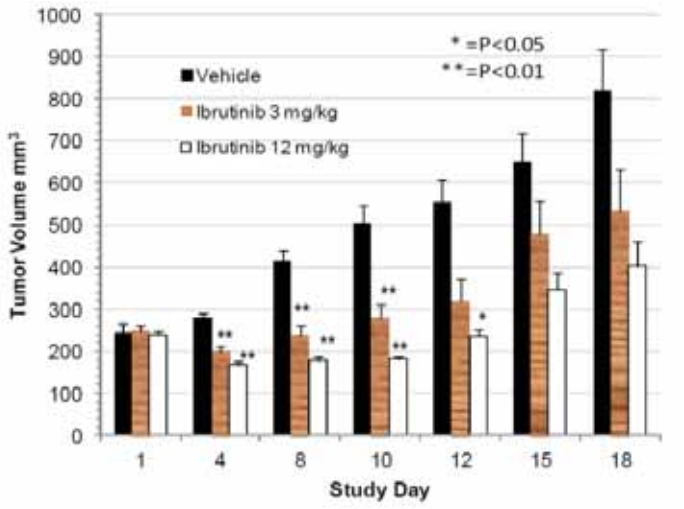


図 2.6.2-22 TMD8 異種移植マウスモデルの腫瘍体積に対するイブルチニブの作用

n=7～8，平均値±標準誤差，*p<0.05，**p<0.01（One-way ANOVA 後に Dunnet's 検定）

2.6.2.2.2.4 イヌ自然発症非ホジキンリンパ腫（コンパニオンドッグ）

【評価資料 4.2.1.1.17】

B 細胞性腫瘍に対するイブルチニブの抗腫瘍効果をイヌ自然発症非ホジキンリンパ腫で検討した。

試験は非盲検の単群で実施した。単クローン性 B 細胞性リンパ腫と診断されたイヌ（8 例）にイブルチニブをカプセルで 1 日 1 回，疾患の進行が確認されるまで経口投与した。試験に組み入れた前半の 4 例は約 20 mg/kg/日を反復投与した。後半の 4 例は 2.5 mg/kg/日より開始し，そのうち 3 例は 7 日目以降に 5 mg/kg/日へ増量した。治療効果は 4 週目まで毎週，その後は 2 週間毎に評価した。また，投与 4 及び 24 時間後の PBMC における BTK 活性部位の占有を測定した。

治療効果は試験に組み入れた 8 例のうち 3 例で部分奏効，3 例で安定と評価された（表 2.6.2-2）。また，2.5 又は 20 mg/kg/日投与群の PBMC は，投与 4 及び 24 時間後の BTK 活性部位が完全に占有されていた。

表 2.6.2-2 イヌ自然発症非ホジキンリンパ腫におけるイブルチニブの抗腫瘍効果

動物番号	組織分類	投与量（mg/kg/日）	治療効果	無増悪期間（日）	総腫瘍径低下率
A1	Not determined	20	SD	28	10%
A2	Not determined	20	PD	0	-
A3	Follicular large cell	20	SD	14	-
A4	Diffuse immunoblast	20	PR	35	77%
B1	Diffuse immunoblast	2.5 / 5	SD	21	-
B2	Follicular large cell	2.5 / 5	PR	70	31%
B3	Diffuse immunoblast	2.5	PD	0	-
B4	Follicular large cell	2.5 / 5	PR	63	62%

PR；partial response（部分奏効），SD；stable disease（安定），PD；progressive disease（進行）

2.6.2.2.3 代謝物に関する試験

【評価資料 4.2.1.1.18，4.2.1.1.19，4.2.1.1.20】

実験動物種及びヒトにおいて，イブルチニブは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り，ジヒドロジオール体の主要代謝物である PCI-45227（M37）を生成する【2.6.4.5 参照】。BTK 活性部位のシステイン残基への結合にはイブルチニブのアクリロイル基が寄与しているため，ジヒドロジオール体代謝物はイブルチニブと異なり，可逆的阻害作用を示すと考えられる。BTK に対する PCI-45227（M37）の IC_{50} 値は 6.16 nmol/L であり【4.2.1.1.18】，イブルチニブ（IC_{50} 値 = 0.39 nmol/L）の約 1/15 であった。また，EGFR 及び LcK のような他のキナーゼに対する PCI-45227（M37）の阻害作用は顕著に弱く［それぞれに対する PCI-45227（M37）の IC_{50} 値は 4,030 及び 461 nmol/L］，イブルチニブ（EGFR 及び LcK に対する IC_{50} 値はそれぞれ 7.80 及び 3.49 nmol/L）と比べて PCI-45227（M37）は，BTK により選択的であった。

その他のヒト血漿中主要代謝物である M23，M25 及び M34 の BTK に対する阻害作用を測定した。M23 の BTK に対する阻害作用は可逆的と考えられ，その IC_{50} 中央値は 33.11 nmol/L であり，イブルチニブの約 1/80 であった【4.2.1.1.19】。M25 及び M34 は BTK 活性部位のシステイン残基に共有結合して BTK を不可逆的に阻害する可能性があり，その IC_{50} 中央値はそれぞれ 898.5 及び 80.68 nmol/L で，イブルチニブの約 1/2,000 及び 1/200 であった【4.2.1.1.20】。なお，ヒト主要代

謝物の一つである M21（末端フェニル基水酸化体の硫酸抱合体）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。

2.6.2.3 副次的薬理試験

各種機能分子に対するイブルチニブの結合親和性に加え，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におけるイブルチニブの作用を検討した。

2.6.2.3.1 各種機能分子に対する結合試験

【評価資料 4.2.1.2.1，評価資料 4.2.1.2.2，評価資料 4.2.1.2.3】

67 種類の受容体，トランスポーター及びチャネルを用い，それらに特異的な放射標識リガンドの結合阻害作用を測定した。検討に用いた各種機能分子の一覧を表 2.6.2-3 にまとめた。

表 2.6.2-3 検討した各種機能分子の一覧

Adenosine A_1	Adenosine A_{2A}	Adenosine A_3	Adrenergic α_{1A}	Adrenergic α_{1B}
Adrenergic α_{1D}	Adrenergic α_{2A}	Adrenergic β_1	Adrenergic β_2	Androgen (Testosterone) AR
Bradykinin B_1	Bradykinin B_2	Calcium Channel L-Type, Benzothiazepine	Calcium Channel L-Type, Dihydropyridine	Calcium Channel N-Type
Dopamine D_1	Dopamine D_{2S}	Dopamine D_3	Dopamine $D_{4.2}$	Endothelin ET_A
Endothelin ET_B	Epidermal Growth Factor (EGF)	Estrogen ERα	$GABA_A$, Agonist Site	$GABA_A$, Benzodiazepine, Central
$GABA_{B1A}$	Glucocorticoid	Glutamate, Kainate	Glutamate, NMDA, Agonism	Glutamate, NMDA, Glycine
Glutamate, NMDA, Phencyclidine	Histamine H_1	Histamine H_2	Histamine H_3	Imidazoline I_2, Central
Interleukin IL-1	Leukotriene, Cysteinyl $CysLT_1$	Melatonin MT_1	Muscarinic M_1	Muscarinic M_2
Muscarinic M_3	Neuropeptide Y Y_1	Neuropeptide Y Y_2	Nicotinic Acetylcholine	Nicotinic Acetylcholine, Bungarotoxin-Sensitive, Neuromuscular
Opiate δ (OP1, DOP)	Opiate κ (OP2, KOP)	Opiate μ (OP3, MOP)	Phorbol Ester	Platelet Activating Factor (PAF)
Potassium Channel [K_{ATP}]	Potassium Channel HERG	Prostanoid EP_4	Purinergic P_{2X}	Purinergic P_{2Y}
Rolipram	Serotonin (5-Hydroxytrypta-mine) 5-HT_{1A}	Serotonin (5-Hydroxytrypta-mine) 5-HT_3	Sigma σ_1	Sigma σ_2
Sodium Channel, Site 2	Tachykinin NK_1	Thyroid Hormone	Transporter, Dopamine (DAT)	Transporter, GABA
Transporter, Norepinephrine (NET)	Transporter, Serotonin (5-Hydroxytrypta-mine) (SERT)			

各種キナーゼに対するイブルチニブの阻害作用は表 2.6.2-1 に示しており，BTK キナーゼ阻害作用の IC_{50} 値は 0.39 nmol/L であった。一方，イブルチニブ（10,000 nmol/L）はドパミントラン

スポーターを 92%，ナトリウムチャネル（site 2）を 57%，タキキニン NK_1 を 53%，アデノシン A_{2A} 受容体を 52%阻害した。残りの機能分子について，リガンド結合に対する有意な阻害作用はみられなかった（阻害率は 50%未満）。ドパミントランスポーターに対するイブルチニブの作用を詳細に検討したところ，リガンド結合阻害作用の IC_{50} 値は 484 nmol/L であり，BTK 阻害作用の 1,241 倍であった。

2.6.2.3.2 ヒト好塩基球の脱顆粒に対する作用

【参考資料 4.2.1.2.4】

活性化したヒト好塩基球からのメディエーターの分泌に対するイブルチニブの作用を検討した。

イブルチニブは，抗 IgE 抗体で活性化した好塩基球における CD63 抗原，ヒスタミン，ロイコトリエン C4 及びインターロイキン 4 の分泌を 3～6 nmol/L の IC_{50} 値で阻害した。

2.6.2.3.3 関節炎モデルに対する作用

2.6.2.3.3.1 コラーゲン誘発関節炎モデル

【評価資料 4.2.1.2.5，評価資料 4.2.1.2.6，評価資料 4.2.1.2.7】

関節炎に対するイブルチニブの治療効果及び予防効果を，マウス II 型コラーゲン誘発モデルを用いて検討した。

試験初日及び 21 日目に，フロインド完全アジュバントとともに II 型コラーゲンを雄性 DBA/1 OlaHsd マウスの尾根部に投与し，関節炎発症後（試験 21～35 日目）に群分けを行い（各群 4 又は 7 例），イブルチニブ（0，3.125，12.5 及び 50 mg/kg/日）を 10 日間反復経口投与した。陽性対照としてデキサメタゾン（0.2 mg/kg/日）を同様に投与した。

イブルチニブ 12.5 及び 50 mg/kg/日，並びにデキサメタゾン投与群は投与 2 日目より，イブルチニブ 3.125 mg/kg/日投与群では投与 3 日目より，対照群に比べて明らかな関節炎スコアの低下が認められ（図 2.6.2-23），イブルチニブによる関節炎の治療効果が示唆された。

確認のために実施した同様の試験においても，全投薬群で有意に関節炎スコアが低下し（図 2.6.2-24），足関節径を指標とした ED_{50} 値は 4.55 mg/kg であった。また，対照群と比べ，イブルチニブの全投薬群で血清中の抗 II 型コラーゲン自己抗体量が減少しており，B 細胞に対して作用していることが示された【4.2.1.2.5】。

さらに，イブルチニブ（0，1.56，3.125，6.25 及び 12.5 mg/kg/日）を 18 日間反復経口投与したフォローアップ試験において，イブルチニブは関節炎スコア及び病理組織学的変化を用量依存的に抑制した。各 ED_{50} 値は，試験に供した全肢に対して 2.57 mg/kg，投与開始時に関節炎を発症していた肢に対して 3.46 mg/kg（治療効果），投与開始時に関節炎を発症していない肢に対して 1.46 mg/kg（予防効果），病理組織学的所見に対して 1.61 mg/kg であった【4.2.1.2.6】。

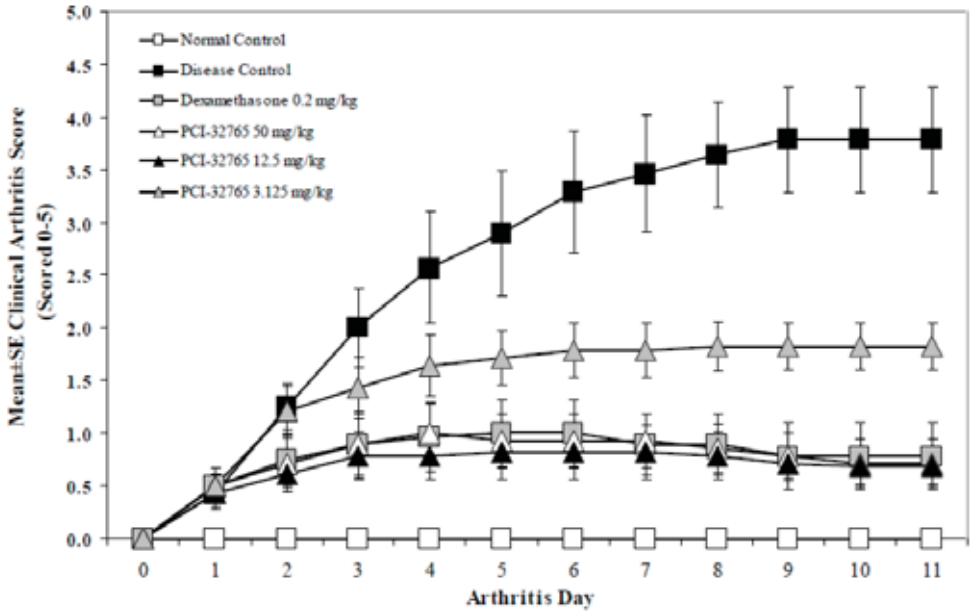


図 2.6.2-23 マウス II 型コラーゲン誘発関節炎におけるイブルチニブの作用（初回試験）

Normal control；未処置群，Disease control；関節炎発症対照群，PCI-32765；イブルチニブ
デキサメタゾン（投与 3～11 日目*），イブルチニブ 3.125 mg/kg/日（投与 7～11 日目*），
イブルチニブ 12.5 mg/kg/日（投与 2～11 日目*），イブルチニブ 50 mg/kg/日（投与 3～11 日目*）
n=4 又は 7，*p≤0.05：関節炎発症対照群に対して（Student's T 検定）

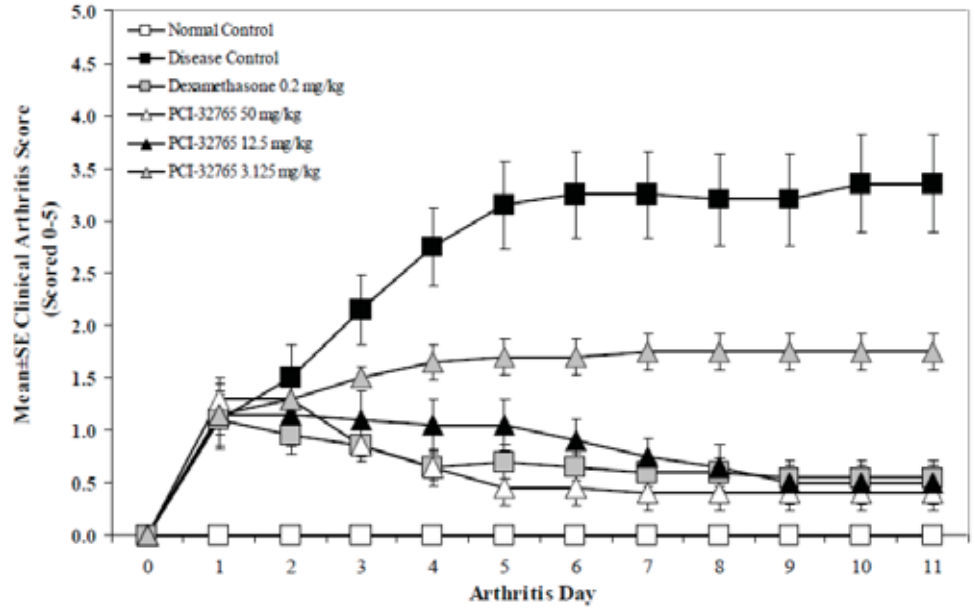


図 2.6.2-24 マウス II 型コラーゲン誘発関節炎モデルに対するイブルチニブの作用（確認試験）

Normal control；未処置群，Disease control；関節炎発症対照群，PCI-32765；イブルチニブ
デキサメタゾン（投与 3～11 日目*），イブルチニブ 3.125 mg/kg/日（投与 5～11 日目*），
イブルチニブ 12.5 mg/kg/日（投与 3～11 日目*），イブルチニブ 50 mg/kg/日（投与 3～11 日目*）
n=4 又は 5，*p≤0.05：関節炎発症対照群に対して（Student's T 検定）

イブルチニブの投与計画が治療効果に与える影響について，同様のマウス II 型コラーゲン誘発関節炎モデルを用いて検討した。

関節炎発症後，イブルチニブ（12.5 mg/kg）投与群を投与期間により 3 群（各群 4 又は 12 例）に分け，試験を開始した。それぞれ試験 1～3 日目，8～14 日目及び 1～14 日目に反復経口投与し，試験 15 日目まで関節炎スコアを観察した。対照群は溶媒を試験 1～14 日目まで投与した。

試験 1～3 日目にイブルチニブを投与した群では，投与 2 日目より関節炎スコアの低下がみられ，投与終了 5 日後（試験 8 日目）より関節炎スコアは上昇傾向を示したが，試験 2～15 日目の関節炎スコアは対照群と比べて統計学的有意に低かった。試験 8～14 日目にイブルチニブを投与した群では，試験 11 日目より関節炎スコアが統計学的有意に低下し，試験 15 日目では対照群のスコアより 42%低かった。試験 1～14 日目にイブルチニブを投与した群では，試験 2 日目より最終日まで統計学的有意な関節炎スコアの低下を示した。

以上の結果より，関節炎に対するイブルチニブの効果は投与後 2 日目で現れ，投与終了後 5 日目まで維持されることが示された【4.2.1.2.7】。

2.6.2.3.3.2 モノクローナル抗体誘発関節炎モデル

【評価資料 4.2.1.2.8】

関節炎で生じる炎症，軟骨破壊及び骨吸収に対するイブルチニブの作用を，マウスモノクローナル抗体誘発関節炎モデルを用いて検討した。

事前にモノクローナル抗体及びリポポリサッカライドを投与した雄性 DBA/1 マウスにイブルチニブ（0，3.125，6.25 及び 12.5 mg/kg/日，各群 10 例）を 14 日間反復経口投与した。

関節炎スコア及び全肢に膝関節を加えた 6 関節の平均病理組織学的スコアは，対照群と比べてイブルチニブの全投薬群で統計学的有意に低下した。

2.6.2.3.4 受動皮膚アナフィラキシーモデルに対する作用

【評価資料 4.2.1.2.9，評価資料 4.2.1.2.10】

皮膚アナフィラキシーに対するイブルチニブの作用を，抗ジニトロフェノール（DNP）IgE モノクローナル抗体の皮内投与により受動感作させたマウスを用いて検討した。

雌性 BALB/c マウスの耳介及び背部に抗 DNP-IgE モノクローナル抗体を皮内投与し，DNP に受動感作させた。感作 23 時間後にイブルチニブ（0，3.125，12.5 及び 50 mg/kg/日，各群 10 例）を経口投与し，投与 1 時間後にウシ血清アルブミン結合 DNP 及び 1%エバンスブルーを静脈内投与してアナフィラキシー反応を惹起した。惹起 30 分後にエバンスブルー色素の漏出量を測定した。

イブルチニブ 12.5 及び 50 mg/kg/日投与群は受動感作させたマウスの皮膚におけるアナフィラキシー反応を統計学的有意に抑制した【4.2.1.2.9】。

同様の試験でイブルチニブ（0，3.125，6.25，12.5 mg/kg/日，各群 10 例）の作用を検討したところ，イブルチニブ 6.25 及び 12.5 mg/kg/日投与群でのアナフィラキシー反応に対する抑制作用が確認された【4.2.1.2.10】。

2.6.2.3.5 ループス腎炎に対する作用

【評価資料 4.2.1.2.11】

ループス腎炎に対するイブルチニブの作用を，マウスのループス腎炎モデルを用いて検討した。

8 週齢雌性マウス（MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr/J）にイブルチニブ（0，3.125，12.5 及び 50 mg/kg/日，各群 12 例）を 12 週間反復経口投与した。

尿中たん白量（図 2.6.2-25）及び腎重量は，対照群と比べ，イブルチニブの全投薬群で統計学的有意に低下した。腎臓の病理組織学的所見の総スコアはイブルチニブ 12.5 及び 50 mg/kg/日投与群でそれぞれ 30%（$p < 0.05$）及び 34%（$p=0.06$）低下し，血清中二本鎖 DNA 抗体濃度は 12.5 及び 50 mg/kg/日投与群でそれぞれ 45 及び 36%の低下を示し，12.5 mg/kg/日投与群でみられたパラメータの低下は，いずれも有意であった。

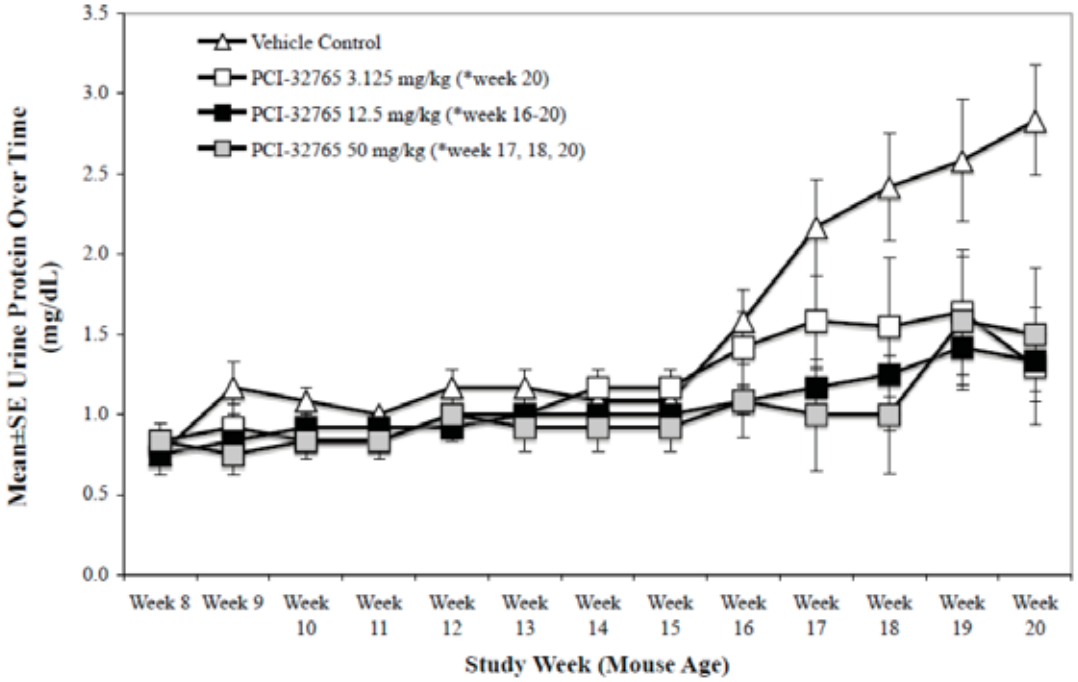


図 2.6.2-25 マウスループス腎炎における尿中たん白量に対するイブルチニブの作用

n=12，*p≤0.05：対照群に対して（Student's T 検定）

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.1】

ラットの機能観察総合評価法（FOB）の変法及び自発運動量の定性的評価において，イブルチニブの中枢神経系に及ぼす影響を検討した。

雌性ラットにイブルチニブ懸濁液（0，2.5，40 及び 150 mg/kg）を単回経口投与し，投与前，投与 0.5，1.5，2.5，5 及び 24 時間後に評価した。

全投薬群で観察期間中の死亡例はみられなかった。測定したいずれのパラメータに対しても，イブルチニブの投与による影響は認められなかった。これらの評価系において，陽性対照である

クロルプロマジン（20 mg/kg）は予想される薬理作用を示した。以上の結果から，中枢神経系における NOEL は，検討した最高用量である 150 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験：hERG チャネル電流に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.2】

hERG チャネル電流に対するイブルチニブの作用をホールセルパッチクランプ法で検討した。

対照群では hERG チャネル電流を 0.4%阻害したのに対し，イブルチニブ（300，1,000，3,000 及び 10,000 nmol/L）は，それぞれの濃度で 8.3，54.8，83.7 及び 93.8%（平均値）阻害し，その IC_{50} 値は 970 nmol/L（427 ng/mL）であった。また，試料分析の結果，すべての試験濃度においてイブルチニブ濃度の実測値は目標値の 100～104%であり，試験系の許容基準（名目値の±15.0%以内）を満たしていた。陽性対照であるテルフェナジン（60 nmol/L）は hERG チャネル電流を 86.8%阻害した。

2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験：無麻酔イヌでの検討

【評価資料 4.2.1.3.3】

無麻酔イヌを用いてイブルチニブの心血行動態及び心電図（ECG）に及ぼす影響を検討した。

雄性無麻酔イヌ（各群 4 例）にイブルチニブ懸濁液（0，1.5，24 及び 150 mg/kg）を単回経口投与し，心拍数（動脈圧波形より算出），血圧（収縮期，拡張期，脈圧及び平均動脈圧），体温及び ECG 波形（PR，QRS，RR，QT 及び QTcV 間隔[1]）を投与 2 時間前から 24 時間後までの 10 分ごとに各 1 分間測定した。

1.5 mg/kg 投与群ではイブルチニブの投与による影響はみられなかった。24 mg/kg 投与群では心拍数減少（投与 1～6 時間で平均 12%，投与 5 時間で最大低下 20%），脈圧上昇（投与 1～6 時間；平均 12 %）及び RR 間隔延長（投与 3～6 時間で延長，最大延長は投与 5 時間で 23%）が認められた。150 mg/kg 投与群では心拍数減少（投与 1～6 時間で平均 19%，投与 5 時間で最大低下 30%），収縮期及び拡張期血圧並びに平均動脈圧の軽度上昇（投与 1～6 時間；平均 3～5%），脈圧上昇（投与 1～6 時間；平均 6 %），PR 間隔延長（投与 1～10 時間で延長，最大延長は投与 2 及び 4 時間でそれぞれ 9 及び 8%），RR 間隔延長（投与 1～6 時間で平均 23%，最大延長は投与 5 時間で 35%）及び QTcV 間隔の短縮（投与 1～6 時間で短縮，最大短縮は投与 3 時間後に 14 ミリ秒）を示した。

無麻酔イヌを用いた心血管系における NOEL は，1.5 mg/kg と判断した。24 mg/kg 投与群でみられた変化の最大値（RR 間隔；23%延長，心拍数；20%減少，脈圧；15%上昇）は比較的小さく，有害作用とは判断しなかった。一方，150 mg/kg 投与群でみられた変化の最大値（RR 間隔；35%延長，QTcV 間隔；14 ミリ秒短縮，心拍数；30%減少）は大きいことから，本試験での NOAEL は 24 mg/kg と判断した。

[1] QTcV間隔はVan de Waterの補正による

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.4】

無麻酔ラットを用いてイブルチニブの呼吸系に及ぼす影響を体プレチスモグラフィーにより検討した。

雌性無麻酔ラット（各群 8 例）にイブルチニブ懸濁液（0，2.5，40 及び 150 mg/kg）を単回経口投与し，呼吸頻度，1 回換気量又は分時換気量を投与 1 時間以上前から 5 時間以上後まで測定した。

全投薬群で観察期間中の死亡例はみられず，測定したいずれのパラメータに対しても，イブルチニブの投与による影響は認められなかった。以上の結果から，呼吸系における NOEL は，検討した最高用量である 150 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.4 代謝物に関する安全性薬理試験

【評価資料 4.2.1.3.5】

ジヒドロジオール体代謝物である PCI-45227（M37）の hERG チャネル電流に対する作用をホールセルパッチクランプ法で検討した。

対照群では hERG チャネル電流を 0.4%阻害したのに対し，PCI-45227（M37）（3,000，10,000，30,000 及び 100,000 nmol/L）は，それぞれの濃度で 18.2，53.4，78.6 及び 94.1%（平均値）阻害し，その IC_{50} 値は 9,600 nmol/L（4,555 ng/mL）であった。また，試料分析の結果，すべての試験濃度において PCI-45227（M37）濃度の実測値は目標値の 96～107%であり，試験系の許容基準（名目値の±15.0%以内）を満たしていた。陽性対照であるテルフェナジン（60 nmol/L）は hERG チャネル電流を 79.5%阻害した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.5.1 リンパ腫由来細胞株における細胞増殖阻害薬との薬物相互作用

【評価資料 4.2.1.4.1】

イブルチニブと細胞増殖阻害薬との薬力学的薬物相互作用の可能性をヒトリンパ腫由来細胞株を用いて検討した。

8 種のヒトリンパ腫由来細胞株［DB，Granta-519，DHL-4，DLCL2，Ly19，DOHH2（B 細胞性リンパ腫），RAMOS（バーキットリンパ腫），及び Jurkat（T 細胞白血病）細胞］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）のいずれかを併用添加し，細胞の酸化還元状態により変動する蛍光強度の変化を測定した。イブルチニブは 0.1～10 μmol/L の濃度範囲内における 2 点の固定濃度で，細胞増殖阻害薬は漸増濃度で添加し，各群間の併用による作用を相乗，相加，又は拮抗に分類した。

デキサメタゾンとの併用は，DLCL2 及び DHL-4 細胞で相乗作用（図 2.6.2-26，図 2.6.2-27），RAMOS 及び DOHH2 細胞で相加作用，Ly19 で軽度の拮抗作用を示し，Jurkat，DB 及び Granta-519 細胞では，併用による影響はみられなかった。DLCL2 及び DHL-4 細胞でみられた相乗作用

は，イブルチニブ濃度が 1 よりも 2 μmol/L，デキサメタゾン濃度が 6.25 よりも 200 μmol/L と高濃度になるほど強かった。

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 細胞で軽度の拮抗作用を示したが，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。

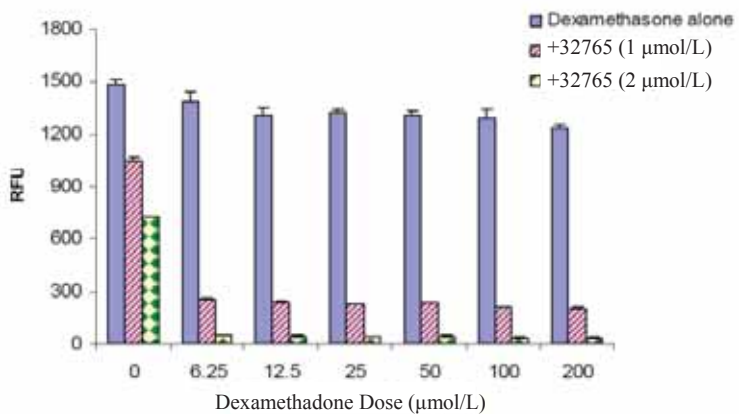


図 2.6.2-26 B 細胞性リンパ種由来細胞株 DLCL2 の細胞増殖における
イブルチニブとデキサメタゾンの併用作用

RFU；相対的蛍光強度（生細胞数を反映），32765；イブルチニブ，n=2，平均値±標準偏差

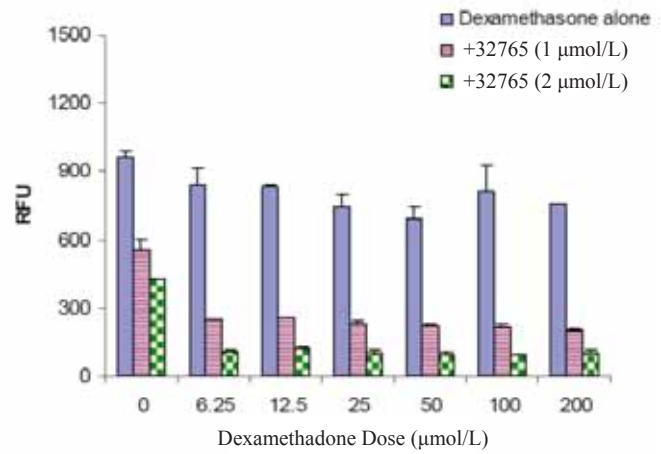


図 2.6.2-27 B 細胞性リンパ種由来細胞株 DHL-4 細胞における
イブルチニブとデキサメタゾン併用作用

RFU；相対的蛍光強度（生細胞数を反映），32765；イブルチニブ，n=2，平均値±標準偏差

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 臨床推奨用量及び曝露量

CLL/小リンパ球性リンパ腫（SLL）患者に対するイブルチニブの臨床推奨用量は 420 mg/日である。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}）の平均値は 132 ng/mL であり【PCYC-1102-CA 試験】，非結合型濃度は 3.56 ng/mL と推定される。

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）のイブルチニブの平均 C_{max} は 78 ng/mL，平均 AUC_{last} は 383 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。

2.6.2.6.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.6.2.1 BTK 及び各種キナーゼに対する阻害作用

イブルチニブは検討したキナーゼの中で BTK を最も強く阻害した（IC_{50} = 0.39 nmol/L）。イブルチニブは BTK 活性部位に存在するシステイン残基（Cys-481）と共有結合を形成することにより，BTK を不可逆的に阻害した。

イブルチニブは，活性部位にシステイン残基を持ち，イブルチニブと共有結合する可能性のある 10 種のキナーゼのうち 7 種に対し，イブルチニブは 15 nmol/L 未満の IC_{50} 値で阻害した［各 IC_{50} 値（nmol/L），ErbB4/HER4；0.64，Blk； 0.94，Bmx/Etk；1.10，Txk；2.87，Tec；5.49，EGFR；7.80，Itk；11.7］。さらに，イブルチニブは Src ファミリーキナーゼの Fgr，Lck 及び Yes/YES1（IC_{50} 値；2.86～3.94 nmol/L），並びに Csk 及び Brk も阻害したが（各 IC_{50} 値；6.17 及び 10.1 nmol/L），これらキナーゼは活性部位にイブルチニブが共有結合する可能性のあるシステイン残基を持たないことから，その阻害作用は可逆的と推測される。

(1) BTK 以外のキナーゼ阻害に対するリスク評価

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【2.7.2.2.1.2】。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[1]，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キナーゼ阻害作用は持続すると予想される。再発 B 細胞性リンパ腫患者を対象とした第 1 相臨床試験（PCYC-04753 試験）での

[1]酵素反応速度解析の結果，イブルチニブによる阻害作用が可逆的なLckはイブルチニブの解離速度が速い【4.2.1.1.3参照】

薬力学的検討においても，血漿中イブルチニブ濃度が速やかに低下するのに対し，イブルチニブによる PBMC での BTK 占有は 24 時間後も維持されていた（図 2.6.2-28）。

従って，イブルチニブにより不可逆的に阻害される可能性がある BTK 以外のキナーゼは，リスク評価の観点から重要性がより高い。

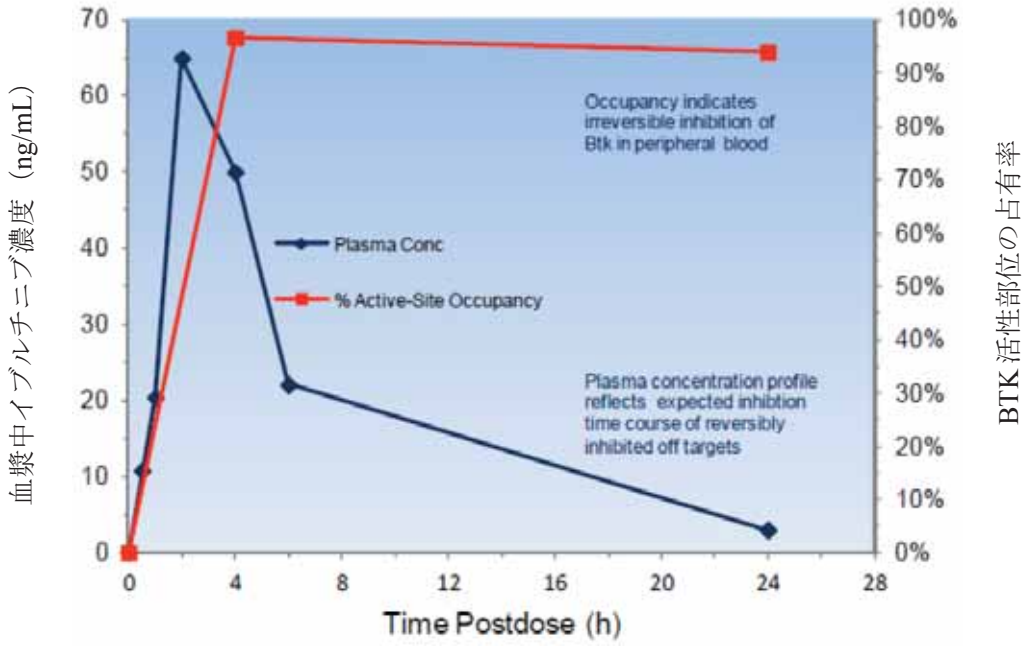


図 2.6.2-28 ヒト血漿中イブルチニブ濃度と BTK 活性部位占有率の経時的変化

PCYC-04753 試験における 2.5 mg/kg/日投与群での検討
BTK 活性部位占有率は PBMC における BTK 活性の不可逆的阻害作用を示す。

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非結合型イブルチニブ濃度の C_{max} 中央値は 6.5 nmol/L であり，これはイブルチニブによる BTK 阻害作用の IC_{50} 値（0.39 nmol/L）の約 17 倍となる。さらに，不可逆的に阻害される可能性のある BTK 以外のキナーゼに対する IC_{50} 値（0.64～21.9 nmol/L）の約 0.3～10.2 倍であった。このうち 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，以下に示す。

表 2.6.2-4 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
	JAK3	21.9	0.30
Reversibly Inhibited	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 表 2.6.2-1 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 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 に対する阻害作用と同程度の IC_{50} 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[16)]。

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[17)]。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[17)]。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[18)]。

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[19)]。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[20)，21)，22)]。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 TCR 刺激カルシウム流入を示したことから [23)]，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 [24)，25)，26)]。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，特に免疫グロブリン（Ig）$M^{lo}IgD^{hi}$ B 細胞数の著しい減少が認められた [27)]。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】。

2.6.2.6.2.2 *In vitro*；B 細胞に対する作用

DOHH2 細胞を用いたシグナル伝達経路に対する検討では，イブルチニブは，BTK の基質である PLCγ のリン酸化を 20 nmol/L の IC_{50} で阻害した（図 2.6.2-4）。

イブルチニブは，ヒト PBMC 由来 CD20 陽性 B 細胞において BCR を介した B 細胞の活性化を低濃度（IC_{50} < 10 nmol/L）で阻害したが，T 細胞の活性化には 1,000 nmol/L の濃度までほとんど影響を及ぼさなかった（図 2.6.2-6）。

イブルチニブ（200 nmol/L）で 1 時間処理したヒト全血から PBMC を単離して評価したところ，イブルチニブは BTK 活性部位の約 90%を占有し，CD69 発現量を指標とした B 細胞の活性化を約 50%抑制した（図 2.6.2-8）。

NLC と共培養したヒト初代培養 CLL 細胞において，イブルチニブは 500 及び 1,000 nmol/L（それぞれ，220 及び 440 ng/mL）で CLL 細胞の増殖を抑制した（図 2.6.2-9）。さらに，野生型 CARD11 を有する DLBCL 由来細胞株に対して 1 又は 2 nmol/L の IC_{50} 値で阻害し（図 2.6.2-10），MCL 由来細胞株の Mino 細胞に対しては 100 nmol/L 以上の IC_{50} 値で阻害した（図 2.6.2-11）。

細胞接着及び遊走に対するイブルチニブの作用を検討したところ，ヒト初代培養 CLL 細胞に対し，1,000 nmol/L で 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（図 2.6.2-12，図 2.6.2-13）。MCL 由来細胞株に対しても，100 nmol/L（44 ng/mL）で BCR 及びケモカイン受容体刺激による接着を阻害し（図 2.6.2-14，図 2.6.2-15），0.1 nmol/L の低濃度でケモカイン刺激による遊走を阻害した（図 2.6.2-16，図 2.6.2-17）。

ヒト MCL 由来細胞株である Mino 細胞は，イブルチニブ曝露下での継代培養後にイブルチニブに対する耐性を獲得した。この耐性細胞では，BCR 刺激後に BTK はリン酸化されず，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を示唆しているが，Mino 細胞において示された耐性機序の臨床的意義は不明である。

2.6.2.6.2.3 *In vivo*；BTK 活性部位への結合及び抗腫瘍効果

イブルチニブによる BTK 活性部位の占有率は，マウス及びラット並びにヒト腫瘍細胞異種移植マウスを用いて，投与経路，投与量，投与後の経過時間が与える影響を複数の試験で検討した。

イブルチニブを経口投与した BALB/c 又は DBA/1 マウスから摘出した脾細胞において，BTK 活性部位の完全な占有は概して 10 mg/kg 以上で認められ，3.13～5.0 mg/kg ではほとんどの試験で部分的占有が認められた。イブルチニブの経口投与 1 時間後より BTK の完全又は部分的な占有がみられ，投与 12 時間後まで維持された。投与 24 時間後では，BTK 活性部位がイブルチニブによって占有されていない BTK の増加が認められ，これは新たに BTK たん白が生成されたためと考えられる。

ラットにおける同様の検討では，イブルチニブ 6 mg/kg の経口投与により BTK 活性部位はほぼ完全に（約 90%）占有された（図 2.6.2-18）。

FL 由来細胞株（DOHH2 細胞）を移植した SCID マウスにおいて，10 mg/kg 以上を投与した群の投与 2 時間後では，腫瘍組織の BTK 活性部位はイブルチニブにより完全に占有され，投与 17 時間後では新規の BTK たん白の生成によると考えられる占有率の低下がみられた。

イブルチニブは，CLL（TCL1-192 細胞），MCL（Mino 細胞）及び 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（図 2.6.2-19，図 2.6.2-20，図 2.6.2-21，図 2.6.2-22）。マウスで最大の抗腫瘍効果を示した用量では脾細胞における BTK 活性部位の完全な占有が認められ，部分的な抗腫瘍効果を示した用量では脾細胞における BTK 活性部位の部分的な占有が認められた。

TCL1 養子移入モデルを用いて投与後の経時変化を検討した試験において，TCL1-192 細胞を移入 2 週間後よりイブルチニブの投与を開始した場合，末梢血 CLL 細胞数は一過性に増加後，投与 7 日目に対照群と同程度まで回復し，さらに投与 14 日目以降では対照群より顕著に減少した。このモデルでは，イブルチニブを投与したマウスの肝臓及び脾臓のサイズ及び重量は有意に小さく，CLL 細胞の浸潤が顕著に減少していた。これらの *in vivo* で確認された抗腫瘍効果は，*in vitro* でのヒト初代培養 CLL 細胞と NLC との共培養系で示された増殖抑制作用の結果【2.6.2.2.1.4(1) 参照】と一致するものであり，イブルチニブが，1）CLL 細胞の遊走，並びに組織への保持又はホーミングの阻害，2）CLL 細胞の生存・増殖の抑制という 2 つの効果を有することを示している。

自然発症非ホジキンリンパ腫を有する 8 例のイヌ（コンパニオンドッグ）にイブルチニブ（2.5～20 mg/kg/日）を経口投与したところ，3 例で部分奏効，3 例で疾患安定であった（表 2.6.2-2）。2.5 mg/kg/日以上の用量では，イヌの PBMC における BTK 活性部位は完全に占有されていた。

2.6.2.6.3 副次的薬理試験

2.6.2.6.3.1 各種機能分子に対する結合試験

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，表 2.6.2-3）へのイブルチニブの結合親和性を *in vitro* で評価した。その結果，イブルチニブはほとんどの機能分子に結合

親和性を示さず，意図しない薬理作用が生じる可能性は低いことが示された。最も強い阻害作用を示したドパミントランスポーターに対する IC_{50} 値は 484 nmol/L（213 ng/mL）であり，イブルチニブによる BTK 阻害作用と比べるとその阻害作用は弱い。さらに，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非結合型イブルチニブの C_{max} 平均値は 3.56 ng/mL であり，ドパミントランスポーター阻害の IC_{50} 値はその 60 倍に相当するため，ドパミントランスポーターを含め意図しない薬理作用があったとしても大きな安全域がある。

2.6.2.6.3.2 ヒト好塩基球の脱顆粒に対する作用

BTK は，B 細胞において BCR 及びケモカイン受容体シグナル伝達の中心的役割を果たすとともに，単球及びマクロファージにおける FcγR シグナル伝達経路，肥満細胞及び好塩基球の FcεR シグナル伝達経路にも関係している [28)]。イブルチニブは抗 IgE 抗体で活性化したヒト好塩基球からのメディエーターの分泌を抑制した。

2.6.2.6.3.3 関節炎モデルに対する作用

マウスのコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて，最大の治療効果（関節炎スコアの低下）を示すイブルチニブの最小用量は 12.5 mg/kg/日（経口投与）であった（図 2.6.2-23，図 2.6.2-24）。マウス脾細胞を用いた BTK 活性部位の占有率の結果から，12.5 mg/kg/日は BTK 活性部位の完全な占有を示す用量である。このモデルにおけるイブルチニブの ED_{50} 値は，評価項目により 1.46～4.55 mg/kg/日の範囲であり，これはマウス脾細胞での BTK 活性部位を部分的に占有する用量範囲であった。イブルチニブの投与計画が治療効果に与える影響を検討した試験において，関節炎に対するイブルチニブの効果は 12.5 mg/kg/日投与群の 2 日目で現れ，投与終了後 5 日目まで維持した。さらに，3.125 mg/kg/日以上の投与群で血清中の抗Ⅱ型コラーゲン自己抗体量が減少しており，B 細胞に対して作用していることが示された。しかし，モノクローナル抗体誘発関節炎マウスモデルにおいてもイブルチニブは関節炎スコアを有意に低下させたことから，イブルチニブは B 細胞への作用を介して自己抗体を直接抑制する以外の機序でも関節炎の進行を阻害すると考えられる。

2.6.2.6.3.4 受動皮膚アナフィラキシーモデルに対する作用

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。

2.6.2.6.3.5 ループス腎炎に対する作用

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抑制した。12.5 mg/kg/日以上の投与群で抗二本鎖 DNA 抗体の血清中濃度が減少した。Kil らの報告では，BTK を過剰発現し全身性エリテマトーデス様自己免疫疾患を発症するトランスジェニックマウスで，イブルチニブ（25 mg/kg）の反復経口投与により脾臓の胚中心細胞及び形質細胞の数を減少することが示されている [29)]。

2.6.2.6.4 安全性薬理試験

2.6.2.6.4.1 心血管系に及ぼす影響

イブルチニブ及びジヒドロジオール体代謝物の PCI-45227（M37）が心筋の急速活性型遅延整流カリウム電流 I_{Kr} 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 を用いて評価した。hERG チャネル電流に対するイブルチニブの IC_{50} 値は 970 nmol/L（427 ng/mL）であった。この濃度は，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。同様に，代謝物 PCI-45227（M37）の IC_{50} 値は 9,600 nmol/L（4,555 ng/mL）であった。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 PCI-45227（M37）の C_{max} 平均値（11.0 ng/mL）の 415 倍である。

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，イブルチニブ及び PCI-45227（M37）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は低いと予測される [30)] 。

イブルチニブが心血管系に影響を及ぼす可能性を，無麻酔イヌにイブルチニブ［0，1.5，24 及び 150 mg/kg，ヒト等価用量（HED）[1]はそれぞれ，0.81，13 及び 81 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ことから，イヌにおけるイブルチニブ（経口投与）の NOEL は 1.5 mg/kg と判断した。24 mg/kg の用量で認められた血圧，心拍数及び RR 間隔の変化は有害作用とは考えられなかったため，心血管系に対するイブルチニブの NOAEL は 24 mg/kg と判断した。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 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なかった。

2.6.2.6.4.2 中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響

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，イブルチニブは 150 mg/kg（HED = 24 mg/kg）まで投与に関連した影響を及ぼさなかった。

2.6.2.6.4.3 安全性薬理試験の結論

hERG カリウムチャネルを発現する HEK293 細胞を用いた *in vitro* 試験の結果からは，イブルチニブ及び PCI-45227（M37）はヒトの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。イヌを用いて実施した *in vivo* 試験において，イブルチニブ 150 mg/kg は RR 間隔の延長，QTcV 間隔の短縮及び心拍数の減少を示したものの，いずれの用量においても QTc 間隔の延長は認められず，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なかった。イブルチニブはラットの中枢神経系及び呼吸系に影響を及ぼさなかった。

[1] ヒト等価用量［無毒性量 × 体表面積換算係数（ラット：0.16，イヌ：0.54）］

2.6.2.6.5 薬力学的薬物相互作用

複数の腫瘍細胞株において，デキサメタゾンとの併用はイブルチニブの細胞増殖抑制作用を相乗的又は相加的に増強させた。これらの結果から，血液腫瘍疾患の臨床治療におけるイブルチニブとデキサメタゾンの併用による効果が期待される。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1） 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.

2） Rui L, Schmitz R, Ceribelli M and Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. Nat Immunol. 2011;12:933-40.

3） Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Seele AJ and Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011;118:4313-20.

4） 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.

5） Buggy JJ and Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. Int Rev Immunol. 2012;31:119-32.

6） 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.

7） 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;91:8152-5.

8） 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.

9） 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 Cγ Src homology 2-Src homology 3 linker. J Biol Chem. 2004;279: 37651-61.

10） 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 PLCγ2. J Exp Med. 2003;198: 1539-50.

11） 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.

12） de Gorter DJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cγ2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. Immunity. 2007;26: 93-104.

13） 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.

14） Fabian MA, Biggs III WH, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al, A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. Nat Biotechnol. 2005;23: 329-36

15） Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. Nature. 2010;463:88-92.

16） Yang X, Huang Y, Crowson M, Li J, Maitland L and Lussier YA. Kinase inhibition-related adverse events predicted from in vitro kinome and clinical trial data. J Biomed Inform. 2010;43:376-84.

17） 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.

18） 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.

19） 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.

20） 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.

21） 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.

22） 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.

23） 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.

24） 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.

25） 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.

26） 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.

27） 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.

28） Chang BY, Huang MM, Francesco M, Chen J, Sokolove J, Magadala P, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. Arthritis Res Ther. 2011; 13:R115.

29） Kil LP, de Bruijn MJW, van Nimwegen M, Corneth OBJ, van Hamburg JP, Dingjan GM, et al. Btk levels set the threshold for B-cell activation and negative selection of autoreactive B cells in mice. Blood. 2012;119:3744-56.

30） 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.

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: Ibrutinib

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Biochemical and cellular pharmacodynamic studies	In vitro	In vitro	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-088-Z-X-BIO / 4.2.1.1.1
Inhibition of BTK by PCI-32769 in kinase assay	Human protein kinase	In vitro	No	[redacted], US	[redacted]-042-Hu-X-ENZ / 4.2.1.1.2
Kinase inhibition reversibility study	Human protein kinase	In vitro (0.02% Brij35, 1% DMSO)	No	[redacted], US	[redacted]-078-Hu-X-ENZ / 4.2.1.1.3
Inhibition of CLL cell survival	Primary CLL cell	In vitro	No	The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, US	Ponader S 2012 / 4.2.1.1.4
Inhibition of CLL cell signaling, adhesion and migration	Primary CLL cell	In vitro	No	University of Amsterdam, Netherland	de Rooij MFM 2012 / 4.2.1.1.5
Ex vivo labeling of splenocyte BTK active sites with fluorescent probe	BALB/c mouse	IV, IP, PO (20% HP-β-CD)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-114-M-IV-IP-PO-PDI / 4.2.1.1.6
Ex vivo labeling of splenocyte BTK active sites with fluorescent probe-time course	BALB/c mouse	IV, SC, PO (20% HP-β-CD)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-119-M-PO/IV/SC-PDI / 4.2.1.1.7
Ex vivo labeling of splenocyte BTK active sites with fluorescent probe-dose response	BALB/c mouse	SC, PO (20% HP-β-CD), PO (1% MC, 0.4% CrEL), PO (1% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-130-M-SC/PO-PDI / 4.2.1.1.8
Time course evaluation of BTK active site binding in mouse splenocytes	DBA/1OlaHsd mouse	PO (1% MC, 0.4% CrEL)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-082-M-PO-PDI / 4.2.1.1.9
Evaluation of BTK occupancy	BALB/c mouse	PO (1% HP-β-CD)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-091-M-PO-PDI / 4.2.1.1.10

(continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Evaluation of BTK active site occupancy-dose response in splenocytes	Sprague-Dawley rat	PO (0.5%MC, 0.1%SLS)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-098-R-PO-PDI / 4.2.1.1.11
Ex vivo labeling of BTK active sites in DOHH2 lymphoma xenograft tissue	CB17 SCID mouse	PO (1%MC, 0.4%CrEL)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-132-M-PO-PDI / 4.2.1.1.12
Evaluation of BTK down regulation	BALB/c mouse	PO (0.1% SLS, 0.5% MC, 0.4% CrEL)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-087-M-PO-PDI / 4.2.1.1.13
Evaluation of tumor growth inhibition in adoptive transfer TCL1 mouse model of CLL	CB17 SCID mouse	PO (1% HP-β-CD)	No	The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, US	Ponader S 2012 / 4.2.1.1.4
Efficacy study with mino mantle cell lymphoma tumor line	CB17 SCID mouse	PO (Medicated feed)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-035-M-PO-EFI / 4.2.1.1.14
Evaluation of tumor growth inhibition in OCI-LY10 lymphoma tumor bearing SCID mice	SCID mouse	PO (0.5% MC)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-089-M-PO-EFI / 4.2.1.1.15
Evaluation of tumor growth inhibition using TMD8 (DLBCL) bearing SCID mice	SCID mouse	PO (0.5% MC)	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-105-M-PO-EFI / 4.2.1.1.16
Preclinical evaluation in dogs with spontaneous non-Hodgkin lymphoma	various breeds, dog	PO (capsule)	No	[redacted], US	[redacted]-063-D-PO-EF / 4.2.1.1.17
Inhibition of BTK by PCI-45227 in kinase assay	Human protein kinase	In vitro	No	[redacted], US	[redacted]-047-Hu-X-ENZ / 4.2.1.1.18
Inhibition of BTK by PCI-7503 in kinase assay	Human protein kinase	In vitro	No	[redacted], US	[redacted]-135-Hu-X-ENZ / 4.2.1.1.19
Inhibition of BTK by PCI-45741 and PCI-45752 in kinase assay	Human protein kinase	In vitro	No	[redacted], US	[redacted]-120-Hu-X-ENZ / 4.2.1.1.20

(continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Off-target receptor binding assay	29 receptors	In vitro (1% DMSO)	No	[redacted], Taiwan	[redacted]-0383-V-X-RB / 4.2.1.2.1
Off-target receptor binding assay	38 receptors	In vitro (1% DMSO)	No	[redacted], Taiwan	[redacted]-074-Hu-X-RB / 4.2.1.2.2
IC_{50} determination with dopamine transporter (DAT)	Human recombinant CHO-K1 cells	In vitro (1% DMSO)	No	[redacted], Taiwan	[redacted]-028-Hu-X-RB / 4.2.1.2.3
Evaluation in human basophil degranulation	Human basophil	In vitro	No	Johns Hopkins University, US	MacGlashan D Jr 2011 / 4.2.1.2.4
Evaluation in a collagen-induced arthritis model-dose response	DBA/1OlaHsd mouse	PO	No	[redacted]., US	[redacted]-063-M-PO-EFI / 4.2.1.2.5
Evaluation in an established collagen type II arthritis model	DBA/1OlaHsd mouse	PO	No	[redacted]., US	[redacted]-040-M-PO-EF-2nd / 4.2.1.2.6
Evaluation in a collagen-induced arthritis model-dose scheduling	DBA/1OlaHsd mouse	PO (1% MC, 0.4% CrEL)	No	[redacted]., US	[redacted]-065-M-PO-EFI / 4.2.1.2.7
Monoclonal antibody induced arthritis	DBA/1 mouse	PO	No	[redacted]., US	[redacted]-038-M-PO-EF-2nd / 4.2.1.2.8
Evaluation in a passive cutaneous anaphylaxis model	BALB/c mouse	PO	No	[redacted], UK	[redacted]-066-M-PO-EF / 4.2.1.2.9
Evaluation in a passive cutaneous anaphylaxis model	BALB/c mouse	PO	No	[redacted], UK	[redacted]-039-M-PO-EF-2nd / 4.2.1.2.10
Evaluation in a lupus nephritis model	MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr/J mouse	PO	No	[redacted]., US	[redacted]-067-M-PO-EFI / 4.2.1.2.11

(continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: Ibrutinib

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/ Formulation)	GLP Compliance	Testing Facility	Study No. / Location in CTD
Safety Pharmacology					
Evaluation of effects on central nervous system	Sprague-Dawley rat	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	Yes	[redacted], US	[redacted]-024-R-PO-SP / 4.2.1.3.1
hERG potassium channel assay of ibrutinib	Human embryonic kidney cells	In vitro (0.3%DMSO)	Yes	[redacted], US	[redacted]-079-HEK-X-CT / 4.2.1.3.2
Evaluation of effects on cardiovascular system in conscious radiotelemetered dog	Beagle dog	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	Yes	[redacted], US	[redacted]-026-D-PO-SP / 4.2.1.3.3
Evaluation of effects on respiratory system	Sprague-Dawley rat	PO (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	Yes	[redacted], US	[redacted]-077-R-PO-SP / 4.2.1.3.4
hERG potassium channel assay of metabolite PCI-45227	Human embryonic kidney cells	In vitro (0.3%DMSO)	Yes	[redacted], US	[redacted]-015-HEK-X-CT / 4.2.1.3.5
Pharmacodynamic Drug Interactions					
In vitro pharmacodynamic interaction studies	8 lymphoma cell lines	In vitro	No	Pharmacyclics, Inc., US	[redacted]-080-V-X-PXI / 4.2.1.4.1

BTK = Bruton's tyrosine kinase; CHO = Chinese hamster ovary cell line; CrEL = Cremophor EL; HP-β-CD = hydroxypropyl-β-cyclodextrin; DMSO = dimethyl sulfoxide; hERG = human ether-a-go-go related gene; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; IP = intraperitoneal; IV = intravenous; MC = methylcellulose; PO = oral; SC = subcutaneous; SCID = severe combined immunodeficiency; SLS = sodium lauryl sulfate

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験の詳細は概要文中に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Ibrutinib

Organ Systems Evaluated	Species/Strain Sex/No. Per Group	Route (Vehicle/ Formulation)	Doses[a] or Concentrations	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study No./ Location in CTD
Central Nervous System	Rat/Sprague-Dawley F/6	PO, gavage (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 2.5, 40, and 150 mg/kg	No test article-related effects were seen at any dose. NOEL for CNS pharmacologic response following a single oral dose was 150 mg/kg.	Yes	[redacted]-024-R-PO-SP / 4.2.1.3.1
Cardiovascular (hERG assay with ibrutinib)	Human embryonic kidney cells n=3 cells/group	In vitro (0.3% DMSO)	0, 0.3, 1, 3, and 10 µmol/L	The IC_{50} for inhibitory effect of ibrutinib on hERG potassium current was 0.97 µmol/L (970 nmol/L). The positive control (60 nmol/L terfenadine) inhibited hERG potassium current by 86.8%.	Yes	[redacted]-079-HEK-X-CT / 4.2.1.3.2
Cardiovascular System	Dog/Beagle-telemetered M/4	PO, gavage (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 1.5, 24, and 150 mg/kg	≥ 24 mg/kg: Significant and dose-dependent prolongation of RR interval and lower heart rate. Significant increase in pulse pressure. 150 mg/kg: Prolongation of PR interval and shortening of QTcV. NOEL was 1.5 mg/kg.	Yes	[redacted]-026-D-PO-SP / 4.2.1.3.3
Respiratory System	Rat/Sprague-Dawley F/8	PO, gavage (0.5% MC, 0.4% CrEL, 0.1% SLS)	0, 2.5, 40, and 150 mg/kg	No test article-related effects were seen on respiratory frequency, tidal volume or minute volume at any dose. NOEL was 150 mg/kg.	Yes	[redacted]-077-R-PO-SP / 4.2.1.3.4
Cardiovascular (hERG assay with PCI-45227 metabolite)	Human embryonic kidney cells n=3 or 4 cells/group	In vitro (0.3% DMSO)	0, 3, 10, 30 and 100 µmol/L	The IC_{50} for inhibitory effect of PCI-45227 on hERG potassium current was 9.6 µmol/L (9600 nmol/L). The positive control (60 nmol/L terfenadine) inhibited hERG potassium current by 79.5%.	Yes	[redacted]-015-HEK-X-CT / 4.2.1.3.5

[a]Single dose unless specified otherwise
CNS = central nervous system; CHO = Chinese hamster ovary cell line; CrEL = Cremophor EL; DMSO = dimethyl sulfoxide; F = female; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene; IC_{50} = 50% inhibitory concentration; M = male; MC = methylcellulose; NOEL = no-observed-effect level; PO = oral; QTcV = heart rate-corrected QT interval; SLS = sodium lauryl sulfate

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験の詳細は概要文中に記載した。