

**オルミエント錠 4 m g**

**オルミエント錠 2 m g**

## **2.4 非臨床試験の概括評価**

**日本イーライリリー株式会社**

## 目次

2.4	非臨床試験の概括評価	2
2.4.1	非臨床試験計画概略	2
2.4.1.1	動物の選択理由	2
2.4.1.2	用量設定根拠	3
2.4.1.3	投与経路の選択理由	3
2.4.1.4	非臨床評価における懸案事項	3
2.4.1.4.1	イヌで見られた毛包虫症及びそれに対する薬物治療	3
2.4.1.4.2	ラットで見られた心筋症の悪化	4
2.4.1.5	バリシチニブの物理的・化学的及び薬剤学的特性	4
2.4.2	薬理試験	5
2.4.2.1	効力を裏付ける試験	5
2.4.2.2	安全性薬理試験	6
2.4.3	薬物動態試験	7
2.4.4	毒性試験	7
2.4.5	総括及び結論	11
2.4.5.1	特記すべき安全性評価上の留意点	12
2.4.5.1.1	免疫系への影響	12
2.4.5.1.2	生殖発生毒性	12
2.4.5.1.2.1	受胎能への影響	12
2.4.5.1.2.2	胚・胎児発生への影響	12
2.4.5.2	結論	13
2.4.6	参考文献	14

## 略語一覧

ATP	アデノシン三リン酸
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
CaMK	カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ
CIA	コラーゲン誘発関節炎
C <sub>max</sub>	最高血漿中濃度
EBV	Epstein-Barr ウイルス
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GM-CSF	顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC <sub>50</sub>	50%阻害濃度
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IL	インターロイキン
IFN	インターフェロン
JAK	ヤヌスキナーゼ
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析
LOAEL	最小毒性量
MTD	最大耐量
NK	ナチュラルキラー
NOAEL	無毒性量
NOEL	無影響量
PK	薬物動態
RA	関節リウマチ
STAT	シグナル伝達兼転写活性化因子
TK	トキシコキネティクス
TYK	チロシンキナーゼ

## 2.4 非臨床試験の概括評価

バリシチニブ (LY3009104 又は INCB028050 と称す) はヤヌスキナーゼ (JAK) に対する選択的な低分子阻害薬であり、成人関節リウマチ (RA) 患者に対する治療薬として開発中である。バリシチニブは JAK1 及び JAK2 に選択性を示し、JAK3 やチロシンキナーゼ 2 (TYK2) に対する効力は低い (Fridman et al. 2010)。プロテインチロシンキナーゼである JAK ファミリー (JAK1、JAK2、JAK3 及び TYK2) は、サイトカインや増殖因子がそれらの受容体に結合した後の重要なシグナル伝達を担う。RA を含む様々な慢性炎症疾患において、サイトカインや増殖因子の異常産生が認められる。インターロイキン 6 (IL-6) 及びインターフェロン $\gamma$ といった RA の発症に関与する炎症性サイトカインのシグナルの多くが、JAK/シグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT) 経路により伝達される。JAK/STAT シグナル伝達を阻害すると、RA に関連する複数のサイトカイン経路が阻害され、炎症、細胞の活性化、免疫細胞の増殖が抑制されることが示されている (Kremer et al. 2009; O'Shea and Plenge 2012)。

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

バリシチニブの非臨床試験は、RA 患者への長期経口投与時の有効性及び安全性を裏付けることを目的として計画し、その時点における最新の国際的規制ガイドラインに準じて実施した。非臨床試験は Incyte 社の研究施設、あるいは Incyte 社又はイーライリリー・アンド・カンパニーが委託した試験受託施設 ( ) などで実施した (副次的薬理試験の 1 試験のみイーライリリー・アンド・カンパニーで実施)。

バリシチニブの効力を裏付ける試験として、*in vitro* における JAK ファミリーに対する選択性を検討した酵素活性阻害試験、リン酸化 JAK 及びリン酸化 STAT レベルを測定する細胞を用いた試験、並びにマウス、ラットの関節炎モデルを用いた *in vivo* 試験を実施した。また、毒性試験で使用した動物において、吸収、分布、代謝及び排泄について検討した。

安全性を評価する非臨床試験として、反復投与毒性試験 (最長 9 ヶ月間)、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び安全性薬理試験 (心血管系/呼吸系/中枢神経系に及ぼす影響の評価) を実施した。バリシチニブは免疫機能に影響を及ぼす薬剤であることから、免疫毒性に関連するパラメータ (血液学的検査値、免疫フェノタイプ検査、リンパ系器官重量及び組織学的所見) を精査した。単回投与毒性試験、用量設定のための予備試験、被験物質の品質特性評価及び非標準的パラメータの測定を除き、毒性試験及びトキシコキネティクス (TK) 試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) を遵守して実施した。

#### 2.4.1.1 動物の選択理由

非臨床試験には、免疫研究 (主にマウス及びラット) 及び安全性評価 (主にラット及びイヌ) に一般的に用いられる動物を用いた。ヒトの JAK に加えて、バリシチニブはこれらの動物の JAK に対しても阻害作用を示し、その効力はほぼ同等である (CTD 第 2.6.2.2.1.6 項)。代謝及び排泄データからも毒性試験に用いた動物種の妥当性が支持される。すなわち、マウス、ラット、イヌ、ヒトのいずれにおいても血漿中にはバリシチニブの未変化体が主に検出され、尿及び糞中には主に未変化体が排泄される。いずれの動物においても循環血中及び排泄物中の代謝物に大きな差は見られない。

### 2.4.1.2 用量設定根拠

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験においては広範囲な用量及び濃度を設定した。毒性試験における高用量は、試験動物に全身性の毒性変化を誘発するよう設定した。低用量は無影響量（NOEL）又は無毒性量（NOAEL）が得られるよう設定した。投与頻度は、臨床で予定されている投与頻度と同じ1日1回とした。

### 2.4.1.3 投与経路の選択理由

投与経路は、臨床で予定されている経口投与とした。一部の薬物動態試験ではバイオアベイラビリティを評価する目的で静脈内投与を用いた。

### 2.4.1.4 非臨床評価における懸案事項

一連の非臨床試験実施において以下の懸案事項が生じたが、これらは本剤の承認申請及び添付文書案を裏付ける非臨床試験パッケージにおいて問題とならないと考える。以下にその概要を述べる。

#### 2.4.1.4.1 イヌで見られた毛包虫症及びそれに対する薬物治療

イヌを用いた長期反復投与毒性試験（CTD第2.6.6.3.6項、2.6.6.3.7項）で持続的なJAK阻害及び免疫抑制に起因すると考えられる毛包虫症が発症したことから、バリシチニブに対する毒性学的評価はその影響を受けた。概して、毛包虫症の症状に回復性は見られず、投与の中断や安楽殺あるいは死亡に至る場合もあった。毛包虫症（ヒトでは発症しない）は、イヌの免疫系がイヌニキビダニの増殖を制御できない場合やイヌニキビダニへの感受性が亢進した場合に発症する（Ferrer et al. 2014）。

6ヵ月間反復投与毒性試験（CTD第2.6.6.3.6項）では、毛包虫症に伴う死亡率の増加及び炎症により、試験成績の解釈が困難となったため、9ヵ月間反復投与毒性試験（CTD第2.6.6.3.7項）では、毛包虫症の症状を緩和させる目的で、毛包虫症の予防薬及び治療薬を投与した。毛包虫症、細菌/真菌感染あるいは毛包虫症の疼痛/苦痛を軽減させるために施した治療薬の投与頻度は各群間で異なり、高用量群にはより多くの治療薬が投与された。高用量群では、症状を示した大部分のイヌに対して、イベルメクチンに加えて、抗生物質（エンロフロキサシン及びセファレキシン）、非ステロイド系抗炎症剤（エトドラク）などの疼痛緩和剤及びその他の支持治療薬を投与した。毛包虫症を発症したイヌに施した治療は個体毎で異なるため、明確な結論は下せないものの、イベルメクチン及び非ステロイド系抗炎症剤は主に胆管を介して排泄されること、エトドラクはイヌで消化管障害を示すことが知られており（Cayen et al. 1981; Scott et al. 1992; EtoGesic® 2004）、これらの治療薬が胆管の変化及び肝酵素上昇に関与した可能性がある。イヌの反復投与毒性試験で見られた肝臓の所見には、バリシチニブの免疫抑制作用、門脈領域の慢性炎症、並びに毛包虫症及びその症状の治療目的で使用した薬剤（特にイベルメクチン）の影響が、複合的に関与している可能性がある。

#### 2.4.1.4.2 ラットで見られた心筋症の悪化

ラットを用いた6ヵ月間反復投与毒性試験（CTD第2.6.6.3.4項）において、バリシチニブの投与により、雄ラットで見られる加齢に伴う心筋症の悪化が認められた。心筋症はラットを用いた10日間反復投与毒性試験でも見られた。バリシチニブによる心筋症の悪化は、それがバリシチニブの直接作用か間接作用によるものかは明らかではない。JAK/STAT経路の活性化が心臓保護的に働くことが示されており（Kurdi and Booz 2007）、ラットでJAK/STAT経路を阻害すると加齢に伴う心筋症が悪化する可能性がある。また、免疫抑制作用による骨髄細胞の枯渇により赤血球数が減少し、心臓が虚血状態となり心筋症の発症が促進されたとする間接的な機序（Jokinen et al. 2011）も推察される。バリシチニブがラットの心筋症を悪化させた機序は明らかではないが、加齢に伴う心筋症はラットに特異的な所見でありヒトへの外挿性は低いことが示唆されている（Jokinen et al. 2011）。イヌあるいはマウスを用いた反復投与毒性試験では心毒性は見られず、イヌを用いた安全性薬理試験でも心電図を含む心機能評価への影響は見られなかった。このように心毒性はラット以外では見られず、曝露倍数も高いこと（予定臨床用量での曝露量の80倍以上）から、バリシチニブの投与によりヒトで心筋症が発症する可能性は低いと考えられる。

#### 2.4.1.5 バリシチニブの物理的・化学的及び薬剤学的特性

バリシチニブの化学名は{1-(Ethylsulfonyl)-3-[4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetid-3-yl}acetonitrileである（図2.4-1）。バリシチニブは、分子式がC<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S（分子量371.42）であり、白色～淡赤白色の粉末である。原薬の規格及びその妥当性は品質に関する概括資料（CTD第2.3.S.4項）に記載されている。

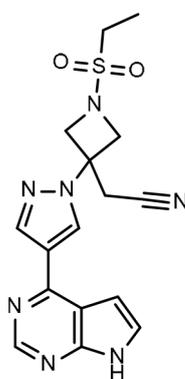


図 2.4-1 バリシチニブの化学構造式

当初、本剤はリン酸塩として開発されたため、すべての薬理試験、並びに大部分の薬物動態試験及び毒性試験はバリシチニブリン酸塩で実施された。その後、本剤は第II相臨床試験実施中に遊離塩基として開発されることとなったため、マウス及びラットを用いたTK試験を実施し、バリシチニブの遊離塩基とリン酸塩の曝露プロファイルを比較した（CTD第2.6.4.3.2.1項、2.6.4.3.2.2項）。その結果、曝露プロファイルはほぼ同等であったことから、以降に計画された非臨床試験にはバリシチニブの遊離塩基が供された。

バリシチニブ原薬中の不純物の毒性は、バリシチニブを用いた一連の毒性試験で評価した。毒性試験に供した原薬中の単一不純物濃度はいずれも █████%以下であった（概要表 2.6.7.4）。警告構造に基づく評価、in silico での変異原性予測及び細菌を用いる復帰突然変異試験により、変異原性不純物の評価を実施したところ、日常的に確認を要するような変異原性不純物あるいは分解物は見いだされなかった（CTD 第 3.2.S.3.2 項、3.2.S.3.2.4 項）。個々の不純物の規格は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）Q3A ガイドラインに基づき「█████%以下」に設定した。また、不純物の合計量の規格は、製造のばらつき、分析方法のばらつき及び毒性評価の結果を基に「█████%以下」に設定した。

## 2.4.2 薬理試験

### 2.4.2.1 効力を裏付ける試験

バリシチニブは、JAK1 及び JAK2 に対して選択的で、両キナーゼに対してほぼ等しい阻害作用を示した。一方、JAK3 又は TYK2 に対する阻害作用は軽度であった。バリシチニブの選択性は、セリン/スレオニンキナーゼ及びチロシンキナーゼ並びに細胞表面受容体を用いた評価により検討した。バリシチニブは、細胞を用いた試験においてサイトカインシグナル伝達を阻害することが確認されており、その 50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）値が明らかにされている。各種炎症性サイトカインに対するバリシチニブの阻害作用は、動物及びヒトの全血を用いた試験においても認められ、さらに、マウス及びラットの関節炎モデルにおいて有効性が示された。

主な試験成績を以下に要約し、詳細を CTD 第 2.6.2 項に示す。

- In vitro 酵素活性阻害試験で、JAK ファミリーに対するバリシチニブの阻害活性を評価した。生理学的な細胞内 ATP 濃度（1 mM）で、バリシチニブは、JAK1 及び JAK2 を選択的に阻害したが、JAK3 又は TYK2 に対する選択性は低かった。
- バリシチニブは、ヒト培養 T 細胞において、IL-2 刺激による JAK/STAT リン酸化を阻害した濃度とほぼ同じ濃度で IL-2 刺激によるヒト培養 T 細胞増殖を阻害した。
- 生理的に重要な免疫活性化物質である IL-2、IL-12、IL-23 及び IL-6 を用いた複数の細胞を用いた in vitro 試験において、JAK/STAT 経路を機能的に阻害することが確認された。
- 白血球サブpopulationにおいて、サイトカイン刺激による STAT リン酸化に対するバリシチニブ及びトファシチニブの阻害作用を比較したとき、バリシチニブに比較してトファシチニブは JAK1/3 複合体を介したサイトカインシグナル伝達 [ナチュラルキラー（NK）細胞機能に関与するサイトカインを含む] をより強力に阻害した。
  - バリシチニブ及びトファシチニブの IL-6、IL-10、インターフェロン（IFN） $\gamma$ 及び IFN $\alpha$ に対する IC<sub>50</sub> 値は同程度であった。
  - JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行う IL-4、IL-15 及び IL-21 に対する阻害作用はトファシチニブと比較してバリシチニブで弱かった。
- げっ歯類を用いた関節炎モデルにおいて、バリシチニブは、足蹠炎症の重症度及び組織学的重症度を用量依存的に抑制した。
  - マウスコラーゲン誘発関節炎（CIA）モデル（CTD 第 2.6.2.2.2 項）
    - ◆ 関節炎の進展には B 細胞及び T 細胞機能が関与するが、バリシチニブは適応性自

己免疫応答に関わるサイトカインのシグナル伝達を調節することにより本モデルにおいて有効性を示すと考えられた。

- マウス抗コラーゲン抗体誘発関節炎モデル (CTD 第 2.6.2.2.2.3 項)
  - ◆ バリシチニブは自己抗体産生の抑制、並びに白血球及び赤血球の減少を伴わず、足蹠炎症の重症度及び組織学的重症度を用量依存的に抑制した。
- ラットアジュバント関節炎モデル (CTD 第 2.6.2.2.2.4 項)
  - ◆ バリシチニブは全血中の STAT3 リン酸化を持続的に抑制することなく、アジュバント関節炎ラットにおいて関節の炎症を用量依存的に抑制した。
  - ◆ バリシチニブはリンパ節由来のサイトカイン mRNA レベルの上昇を抑制した。
- 副次的薬理試験において、各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対するバリシチニブによる結合阻害作用は認められなかった。
- 各種キナーゼに対する阻害作用を検討した試験において、バリシチニブは JAK1 及び JAK2 を強力に阻害した。
  - バリシチニブは JAK1 及び JAK2 に加えて、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK2d 及び CaMK2g) に対して中等度の結合親和性を示し、酵素阻害活性の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 170 nM ± 26 nM 及び 150 nM ± 53 nM であった。バリシチニブのカルモジュリン依存性プロテインキナーゼに対する阻害作用が臨床で影響を及ぼすか否かは明らかではない。バリシチニブは検討したその他の酵素活性に対して阻害作用を示さなかった。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の成績から、バリシチニブは強力かつ特異的な JAK1/JAK2 阻害剤であり、RA の治療に有効であると考えられる (臨床に関する概括評価 CTD 第 2.5.3 項)。

#### 2.4.2.2 安全性薬理試験

安全性薬理試験において、血圧、自律神経活性、自発運動量及び呼吸数の変化が認められた。

- イヌにバリシチニブを高用量 (3 mg/kg) で投与した際に、軽度な心拍数の増加、及び一過性かつ軽度な血圧の低下 (収縮期圧、拡張期圧、脈圧及び平均動脈圧) が見られた (CTD 第 2.6.2.4.1.2 項)。
- ラットにバリシチニブを高用量 (100 mg/kg) で投与した際に、自律神経活性及び自発運動量が低下した (CTD 第 2.6.2.4.2 項)。
- ラットにバリシチニブを高用量 (100 mg/kg) で投与した際に、呼吸数の減少及び分時換気量の低下が見られた (CTD 第 2.6.2.4.3 項)。

これらの変化はいずれも予定臨床用量 (4 mg/日) での曝露量 [最高血漿中濃度 (C<sub>max</sub>) ] を 21~167 倍上回る曝露量で認められ、概して軽度であり、モニタリング可能な変化であった。ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子 (hERG) チャネル電流に対する IC<sub>50</sub> 値は予定臨床用量での C<sub>max</sub> の約 1400 倍であり、臨床試験においても QT 間隔に対する影響は認められていないこと (CTD 第 2.7.4.4.2 項) から、バリシチニブが hERG チャネル電流を阻害して QT 間隔を延長するリスクはほとんどないと考えられる。

### 2.4.3 薬物動態試験

バリシチニブの TK を評価するとともに、吸収、分布、代謝及び排泄の特徴を明らかにするため、CD-1 マウス、rasH2 マウス、Sprague-Dawley ラット、ニュージーランドホワイトウサギ及びビーグル犬を用いて、単回及び反復経口投与試験を実施した。

バリシチニブの開発中に、薬物動態 (PK) 及び TK 試験で得られた試料を分析した (CTD 第 2.6.4 項、表 2.6.4-2)。開発初期の非臨床試験の分析には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、開発後期には<sup>13</sup>C]安定同位体標識化合物を内部標準物質とした LC-MS/MS 法を用いた。主要な試験成績を以下に要約する (詳細は CTD 第 2.6.4 項を参照)。

- マウス、ラット及びイヌを用いた単回投与 PK 試験及びマウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた反復投与 TK 試験におけるバリシチニブの吸収は良好であり、用量増加に伴って曝露量は増加したが、一貫した用量比例性は認められなかった (CTD 第 2.6.4.3.1 項、2.6.4.3.3 項)。
- ラットにおいて、バリシチニブは広範な組織に分布し、メラニン含有組織に結合した (CTD 第 2.6.4.4.1 項)。
- バリシチニブはラットの胎盤を通過し、胎児組織に広範に分布した (CTD 第 2.6.4.4.4 項)。
- バリシチニブのマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿中での *in vitro* 蛋白結合率は 45%~56%であった (CTD 第 2.6.4.4.2 項)。
- [<sup>14</sup>C]-バリシチニブをマウス、ラット及びイヌに投与したとき、いずれの動物種においても代謝はほとんど見られなかった。血漿中には主に未変化体が認められ、尿及び糞中放射能の大部分は未変化体によるものであった (CTD 第 2.6.4.5.2 項)。
- ヒト血漿中にはバリシチニブの代謝物は認められなかった。しかし、ヒト尿中又は糞中に 4 種の微量 (投与量の 10%未満) 代謝物が同定された (CTD 第 2.7.2.3.1.6 項、JADG 試験)。ヒト尿中又は糞中に認められた微量代謝物は、マウス、ラット又はイヌの少なくとも 1 種類以上の生体試料 (血漿、尿、糞、胆汁) 中に認められたことから、バリシチニブの毒性評価に用いた動物種がヒトで認められた代謝物に曝露されたことが示され、これら微量代謝物の安全性が適切に評価されたことが確認された。
- 妊娠及び授乳ラットにおいて、<sup>14</sup>C]-バリシチニブは胎盤を通過し、血漿中に比較して乳汁中に高い放射能が認められた [血漿中と比較したときの乳汁中の AUC 及び C<sub>max</sub> はそれぞれ 39 倍及び 18 倍]。出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験においても、ラット出生児には乳汁を介したバリシチニブの曝露が確認され、母動物にバリシチニブを投与した 8 時間後の時点で、曝露量は母動物と同程度になった。

### 2.4.4 毒性試験

以下の毒性試験により、バリシチニブの毒性を評価した。

- マウス、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験
- マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験
- 一連の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験
- rasH2 マウス及びラットを用いたがん原性試験
- ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験

- その他の毒性試験（In vitro 光毒性試験、ex vivo 眼刺激性試験、ウサギを用いた皮膚刺激性試験）

マウス及びラットを用いた TK 試験から、バリシチニブリン酸塩（大部分の毒性試験で使用）及びバリシチニブ（遊離塩基；がん原性試験、ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験で使用）の曝露プロファイルがほぼ同等であることが示されている（CTD 第 2.6.4.3.2.1 項、2.6.4.3.2.2 項）。安全域は、蛋白結合率（CTD 第 2.6.4.4.2 項）を用いて、非結合体の曝露量に基づき算出した。

以下に毒性試験成績の概要を示す（詳細は CTD 第 2.6.6 項を参照）。

#### [単回及び反復投与毒性試験]

- マウス、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験（CTD 第 2.6.6.2 項）におけるバリシチニブの忍容性は良好であった。一般状態の変化として、皮膚の発赤及び瞬膜突出が見られた。
- ラットを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験（CTD 第 2.6.6.3.3 項）において、器官重量の減少を伴う脾臓及び胸腺のリンパ球全般の枯渇が 40 mg/kg 群で見られた。また、すべての系統の骨髄細胞（赤芽球系、骨髄球系、リンパ球系及び巨核球系細胞）の減少が 10 mg/kg 群（雌）及び 40 mg/kg 群（雌雄）の大腿骨及び胸骨の骨髄で観察され、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節の細胞充実性の低下も見られた。骨髄、リンパ系器官及び血液学的検査値（白血球の各分画及び網状赤血球の循環血中数の減少）で見られた影響はバリシチニブの薬理作用と一致し、最小毒性量（LOAEL）は 40 mg/kg、NOAEL は 10 mg/kg と考えられた。
- ラットを用いた 6 ヶ月間反復投与毒性試験（CTD 第 2.6.6.3.4 項）において、1 ヶ月間反復投与毒性試験よりも低用量でバリシチニブの免疫抑制作用が見られた。リンパ球数の減少に基づく NOAEL は 5 mg/kg であった。高用量（100 mg/kg）群の雄 7 例で、被験薬投与に関連した死亡が見られ、この用量は最大耐量（MTD）を超えていた（他の雌雄の死亡例は投与過誤と判断された）。これらの死亡例のほぼ全例で脾臓及び胸腺におけるリンパ球の枯渇が見られ、パイエル板、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節でのリンパ球枯渇並びに大腿骨及び胸骨の骨髄細胞の減少が認められた例もあった。心筋繊維の変性/壊死を伴う心筋の垂急性/慢性炎症を特徴とする心筋症の悪化、及びそれに伴う肝臓における血管周囲性の肝細胞壊死などの所見が見られ、これらが複合的に死亡に関与した可能性が示唆された。投与終了時まで生存した高用量 [100 mg/kg 又は 100/60 mg/kg（雌のみ試験中に 100 から 60 mg/kg に減量）] 群の雌雄のほとんどの例においても、脾臓、胸腺、腸間膜リンパ節及びパイエル板におけるリンパ球枯渇、大腿骨及び胸骨の骨髄細胞の減少が見られ、同用量は MTD を超えていると考えられた。また、腎尿細管内における微量の管腔内結晶が投与終了時の剖検（100 mg/kg 群の雄 1 例及び 100/60 mg/kg 群の雌 1 例）並びに回復期間終了時の剖検（100 mg/kg 群の雄 1 例）でそれぞれ認められた。結晶尿は MTD を超える用量（予定臨床用量での曝露量の 80 倍以上）でのみ認められ、2 年間のがん原性試験やイヌを用いた毒性試験では見られなかった。
  - バリシチニブ投与による心筋症の悪化が見られた。この影響はバリシチニブの直接作

用か間接作用によるものかは明らかではない。JAK/STAT 経路の活性化が心臓保護的に働くことが示されており (Kurdi and Booz 2007)、ラットで JAK/STAT 経路を阻害すると加齢に伴う心筋症が悪化する可能性がある。一方で、JAK/STAT 経路の選択的阻害剤が心筋虚血保護作用を示す治療剤となる可能性も示唆されている (Booz et al. 2002; Ananthakrishnan et al. 2005; Kurdi and Booz. 2007)。また、トファシチニブ (pan-JAK 阻害剤) 及びルキシソリチニブ (JAK1/JAK2 阻害剤) の毒性試験では心筋症は報告されていないが、ルキシソリチニブのラット 3 ヶ月間反復投与毒性試験では心臓の線維化が見られている。心筋症の発症初期に心筋の線維化が観察され、心臓の線維化は高齢ラットの背景病変である心筋症に関連している (Keenan et al. 1995)。ルキシソリチニブによる心筋線維化の発症作用機序に関しては、JAK/STAT 経路阻害による赤血球及びリンパ球の減少によるとの仮説がある。さらに、心筋症の悪化が見られた高い曝露量 (予定臨床用量での曝露量の 80 倍以上) ではバリシチニブの薬理的な選択性が消失し、JAK/STAT 経路以外のシグナル伝達経路が影響を受けて心筋症が悪化した可能性もある。バリシチニブはカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK2d 及び CaMK2g) に対して中等度の結合親和性を示す。CaMK2d の活性化は適応性心肥大の進行に関与すること (Awad et al. 2015) や CaMK2d の阻害は心不全の進行を抑制すること (Ling et al. 2009) が報告されているが、バリシチニブ投与による心筋症の悪化の機序を直接的に説明するものではない。

- イヌを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験 (CTD 第 2.6.6.3.5 項) において、循環血中の網状赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの軽度の減少が高用量群 (3 mg/kg) で見られ、リンパ節/脾臓/パイエル板/胸腺のリンパ球枯渇、並びに骨髄における軽度な細胞充実性の低下が同群の数例で観察された。両側性の強膜充血及び流涙が 3 mg/kg 群の雄 2 例で見られた。3 mg/kg 群の雌 1 例では回腸パイエル板の壊死性炎症巣及び腸間膜リンパ節における壊死性炎症が見られたことから、NOAEL は中高用量の 0.45 mg/kg と考えられた。
- イヌを用いた 6 ヶ月間反復投与毒性試験 (CTD 第 2.6.6.3.6 項) 及び 9 ヶ月間反復投与毒性試験 (CTD 第 2.6.6.3.7 項) においても、用量依存的な免疫抑制作用や免疫系への影響が見られた。6 ヶ月間反復投与毒性試験では 0 (溶媒)、0.25、1、5 及び 20 mg/kg の用量で投与を開始した。毛包虫症に伴う進行性かつ用量依存的な皮膚炎が試験開始後の 16 週目以降に見られ、18 週間の投与後、1/0.75 mg/kg (試験中に 1 から 0.75 mg/kg に減量) 群の雌 1 例及び 5/2.5 mg/kg (試験中に 5 から 2.5 mg/kg に減量) 以上の群の全例を安楽殺した。9 ヶ月間反復投与毒性試験では 0 (溶媒)、0.25、0.5、3 及び 9 mg/kg の用量で投与を開始したが、試験 51 日目に 9 mg/kg 群の投与を休止し、用量を 6 mg/kg に減量した上で、投与を再開した。6 ヶ月間反復投与毒性試験で見られたように、毛包虫症による広範な皮膚の炎症が発現したため、投与を中断した。下顎リンパ節などの皮膚の領域リンパ節にマクロファージの増加及び傍皮質リンパ球の減少が見られ、これに応じた反応性の所見が認められた。これらの所見を呈したリンパ節には毛包虫症ダニの横断面がしばしば見られた。腸間膜リンパ節にもリンパ芽球の増加を伴う反応性の所見が見られたが、休薬後の回復性が認められた。脾臓において、濾胞数の減少及び胚濾胞の小型化を特徴とするリンパ球枯渇が、投与終了時屠殺群の雌雄に見られた。その他、肺の気道及び血管周囲の散発的な炎症、大腿骨

及び胸骨の骨髄過形成（回復性試験群でも認められた）、様々な消化管部位における単核細胞を特徴とする軽度な炎症が見られた。高用量 [3 及び 9/6 mg/kg（試験中に 9 から 6 mg/kg に減量）] で肝毒性を示唆する所見が見られたが、同所見は予定臨床用量（4 mg/日）での曝露量の 8.4~20 倍の曝露量で見られた所見であり、また、毛包虫症の症状及び合併症を緩和させる目的で投与された薬剤による影響である可能性が考えられた（CTD 第 2.4.1.4.1 項）。

- バリシチニブをラット及びイヌに投与した際の免疫抑制作用（リンパ球及び好酸球の減少）及び血液学的パラメータへの影響には回復性が見られた。

#### [生殖発生毒性試験]

- 雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（CTD 第 2.6.6.6.1 項）において、最高用量（雄：50 mg/kg、雌：100 mg/kg）で受胎能の低下 [受精率（妊娠動物数/交配動物数）低下、受胎率（妊娠動物数/交尾動物数）低下、黄体数減少、着床数減少及び着床前胚死亡率増加] 並びに子宮内胚生存に対する有害作用が認められた。精子の運動能及び濃度並びに精子形態に影響は見られなかった。
- ラットあるいはウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（CTD 第 2.6.6.6.2 項）において、骨格奇形（四肢彎曲及び肋骨異常）及び骨格発生変異の発現頻度増加が見られた。
- ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（CTD 第 2.6.6.6.3 項）において、母動物の一般毒性はいずれの用量でも見られなかった。検討した最高用量（25 mg/kg）で、F<sub>1</sub> 世代全体（離乳前及び離乳後）を通して、生後生存率の低下、小型の F<sub>1</sub> 児の発現頻度増加、F<sub>1</sub> 児体重の低下及び体重増加量の減少が認められた。同群では前肢回転異常の発現頻度の増加が見られ、前肢/後肢の握力への影響も認められた。これらの影響は胚・胎児発生に関する試験で見られた骨格奇形（四肢彎曲及び肋骨異常）と一致する。中用量（5 mg/kg）の投与で見られた、持続的な離乳前体重の低下及び体重増加量の減少が F<sub>1</sub> 発達における用量制限毒性であった。いずれの用量においても、F<sub>1</sub> 生殖パラメータや F<sub>2</sub> 出生児生存率における毒性変化は認められなかった。イムノフェノタイピング検査において、生後 35 日に細胞傷害性 T 細胞の抑制が見られたが、生後 65 日では同抑制は見られなかった。

#### [遺伝毒性及びがん原性試験]

- 細菌を用いる復帰突然変異試験、in vitro 染色体異常試験及び in vivo ラット小核試験において、バリシチニブは遺伝毒性を示さなかった（CTD 第 2.6.6.4 項）。
- ラット及びマウスのがん原性試験におけるバリシチニブの忍容性は良好で、いずれの用量においても腫瘍の発現頻度の上昇は認められなかった [CTD 第 2.6.6.5 項、曝露量は予定臨床用量（4 mg/日）での曝露量の 68 倍以下]。ラットではバリシチニブの投与に伴って生存率が増加し、増殖性/腫瘍性病変の発現頻度が減少した。留意すべき点として、ラットにバリシチニブを 2 年間投与しても心筋症の発現頻度の増加や肝細胞の壊死は見られなかった。RA 患者が悪性腫瘍のリスクを増大させることを示唆する報告があるが、バリシチニブの臨床試験における悪性腫瘍の発現率は、他の疾患修飾性抗リウマチ薬での報告よりも低かった（CTD 第 2.7.4.2.1.5.2 項）。

#### [その他の毒性試験]

- バリシチニブは、Balb/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 試験で光毒性を示さなかった (CTD 第 2.6.6.8.1 項)。
- バリシチニブは、摘出ウシ角膜を用いた *ex vivo* 試験で眼刺激性を示さなかった (CTD 第 2.6.6.8.2 項)。
- バリシチニブは、ウサギを用いた *in vivo* 試験で皮膚刺激性を示さなかった (CTD 第 2.6.6.8.3 項)。

#### 2.4.5 総括及び結論

バリシチニブは JAK のアデノシン三リン酸 (ATP) 結合部位を占有し、JAK/STAT シグナル伝達を阻害する。JAK 阻害剤によるシグナル伝達経路の抑制はキナーゼ阻害剤の効力及びその阻害剤の細胞内濃度に依存する。多くの JAK 阻害剤はその消失半減期が短く、体内から速やかに消失する。阻害剤の濃度は次の投与までの間に一旦減少するため、シグナル伝達の抑制作用は持続的ではない。IL-6 (JAK1/JAK2)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (JAK2/JAK2) 及びインターフェロン (JAK1/JAK2、JAK1/TYK2) などの RA の病態に関与する炎症性サイトカインは、JAK/STAT 経路を介してシグナルを伝達する。バリシチニブは JAK1 及び JAK2 を阻害し、RA に関与するサイトカインシグナル伝達経路に作用して炎症、細胞の活性化、標的免疫細胞の増殖を抑制する。

*In vitro* 及び *in vivo* における効力を裏付ける試験により、バリシチニブの適応症である RA に対する臨床での有効性が裏付けられた。*In vitro* 結合親和性試験及び細胞を用いた試験において、バリシチニブは JAK1 及び JAK2 の強力かつ選択的な阻害剤であることが示された。バリシチニブは、RA に関連するサイトカインシグナル伝達を阻害すると共に、ヒトでの病態を反映するげっ歯類の関節炎モデルで有効性を示した。これら非臨床試験成績は、RA 患者を対象とした第 III 相臨床試験におけるバリシチニブの有効性を支持するものであった (CTD 第 2.5 項)。

安全性薬理試験において、血圧の低下、自律神経活性及び自発運動量の低下並びに呼吸数の減少が認められたが、これらの変化は、臨床有効用量での曝露量を十分に上回る曝露量で認められ、概して軽度であり、モニタリング可能な変化であった。バリシチニブが hERG チャンネル電流を阻害し QT を延長させるリスクは非常に低いと考えられた (CTD 第 2.6.2.4.1.1 項)。安全性薬理試験で見られたバイタルサイン及び身体的特性への影響は臨床試験では見られなかった (CTD 第 2.7.4.4 項)。

薬物動態試験により、各動物種におけるバリシチニブの吸収、分布、代謝及び排泄の特徴が明らかになった。ヒトの成績 (CTD 第 2.7.2.3.1.7 項、JADG 試験) から、バリシチニブは主に腎臓を介して排泄され、大部分が未変化体として尿中に排泄された。一方、マウス、ラット及びイヌではヒトに比べてバリシチニブの消失に及ぼす代謝の寄与が大きいと考えられた。ヒトの尿及び糞中に認められた代謝物はバリシチニブの毒性評価に用いた動物種の少なくとも 1 種以上の生体試料 (血漿、尿、糞、胆汁) 中に認められ、これらの代謝物の安全性が適切に評価されていると考えられた。

毒性試験で見られた主要な毒性所見は、バリシチニブの薬理作用 (JAK1/JAK2 阻害) から予想される免疫系への影響であった。臨床有効曝露量を大幅に超える高い曝露量では、心臓、腎臓あ

るいは肝臓の毒性がラット又はイヌで見られたが、このうちの少なくとも一部は種特異的な病変の悪化、あるいは毛包虫症の治療に用いた薬剤の影響であると考えられた。

#### 2.4.5.1 特記すべき安全性評価上の留意点

##### 2.4.5.1.1 免疫系への影響

反復投与毒性試験で見られた免疫系への影響は、主に薬理作用（JAK1/JAK2 阻害）に関連するものであり、リンパ球、好酸球、赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少、並びに骨髄及びリンパ系器官（脾臓、胸腺、リンパ節）の細胞充実性の低下であった。JAK を阻害することにより赤血球、リンパ球及び好酸球が減少することが多くの公表論文で示されている（Pazdrak et al. 1995; Neubauer et al. 1998; Stout et al. 2004）。血液学的変化 [赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値）の減少、並びにリンパ球及び好酸球の減少] は、回復期間終了時まで部分的又は完全に回復した。イヌで見られた毛包虫症による二次的変化はほとんど回復せず、一部は進行し安楽殺又は死亡に至った。ラット及びマウスでは日和見感染は見られなかった。

イヌを用いた 9 ヶ月間反復投与毒性試験における免疫フェノタイピング検査の結果から、バリシチニブの投与による特定のリンパ球への影響は認められないことが示された。バリシチニブの臨床試験では、関連した有害事象として、ヘモグロビン、網状赤血球、好中球及び NK 細胞の減少が認められた一方で、リンパ球及び血小板の増加が見られた（CTD 第 2.7.4.2 項）。臨床試験において見られた血液学的パラメータの変化は一過性で、投与期間中に投与前値にまで回復したことから、JAK 阻害に対する代償的な反応であることが示唆される。

##### 2.4.5.1.2 生殖発生毒性

###### 2.4.5.1.2.1 受胎能への影響

雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（CTD 第 2.6.6.6.1 項）において、雄では受精率（妊娠させた動物数／交配動物数）及び受胎率（妊娠させた動物数／交尾動物数）の低下が見られたが、精子の運動能、濃度及び形態への影響は認められなかった。雌では受精率及び受胎率の低下に加えて、黄体数及び着床数の減少、着床前胚死亡率の増加及び子宮内胚生存に対する有害作用が見られた。この試験では雌雄ともに投与を行ったため、受胎能低下に関与したのは雄、雌又は雌雄両方のいずれであったかを明確に判断することはできないものの、雌では受精率・受胎率の低下に加え、黄体数の減少及び胚生存率の低下が見られ、一方、雄では受精率・受胎率の低下が見られたのみであったことから、影響を受けたのは雌の生殖過程であった可能性が高いと考えられた。雌の受胎能への影響は JAK/STAT 経路を介した早期胎児発生への影響に関連したものと考えられる。ラットで受胎能への影響が見られたことを添付文書に記載する予定である。

###### 2.4.5.1.2.2 胚・胎児発生への影響

ラット胚・胎児発生に関する試験では、骨格奇形（四肢弯曲及び肋骨異常）及び骨格変異の発現頻度の増加が、中及び高用量（それぞれ 10 及び 40 mg/kg）群の胎児に認められた（CTD 第 2.6.6.6.2.1 項）。ウサギを用いた試験では、母動物に毒性が見られたのと同じ用量で、骨格奇形

(肋骨及び椎骨の異常)の発現頻度の増加が見られた(CTD第2.6.6.6.2.2項)。ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、前肢異常回転の発現頻度の増加及び前肢/後肢の握力への影響が認められた(CTD第2.6.6.6.3項)。JAK/STAT経路は、特にSTAT3経路を介して初期胚発生に関与し(Aaronson and Horvath 2002)。また、胎児の発生においては上皮系細胞の極性化に基づき形態形成が生じるが、JAK/STAT経路は、細胞接着、細胞極性の確立及び極性変化にも関与する(Hombria and Sotillos 2008)。ラット及びウサギの所見に基づくと、妊娠中にバリシチニブを服薬した場合、又はバリシチニブを服薬中に妊娠した場合には、ヒト胎児への潜在的な危険性が示唆されることから、添付文書で注意喚起する予定である。これまでのところ、妊娠中のバリシチニブ投与と催奇形性との関連性は認められていない(CTD第2.7.4.5.4項)。

バリシチニブがヒト乳汁中に分泌されるかどうかは不明であるが、<sup>[14C]</sup>-バリシチニブを投与したラットの乳汁に放射能が移行したことから(CTD第2.6.4.6.4項)、授乳中の乳児が母乳を介してバリシチニブに曝露される可能性が示唆された。出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において、出生児体重の低下が見られたが、乳汁中へのバリシチニブの移行との関連性は不明である。バリシチニブの服薬中は、授乳を中止させることを添付文書で注意喚起する予定である。

#### 2.4.5.2 結論

以上、一連の薬理、薬物動態及び毒性試験の成績は、RAを有する成人患者を対象にバリシチニブを使用するために必要な安全性及び有効性を裏付けるものであった(安全域は表2.4-1を参照)。毒性試験で見られた主要な所見は、バリシチニブの薬理作用(JAK1/JAK2阻害作用)から予想される免疫系への影響であった。このほか、心臓(ラット)、腎臓(ラット)あるいは肝臓(ラット及びイヌ)の毒性が見られたが、一部は種特異的な病変の悪化、あるいは毛包虫症の治療に用いた薬剤の影響の可能性が考えられ、いずれも臨床有効曝露量を大幅に超える高い曝露量で見られ、治療的有效濃度でバリシチニブに曝露される患者でこれらの毒性に関連した有害事象が発現する可能性は低いと考えられる。

表 2.4-1 バリシチニブを 4 mg の用量でヒトに経口投与したときの安全域

動物種 試験	用量	AUC <sub>0-24hr</sub> (ng•hr/mL)	非結合体の AUC <sub>0-24hr</sub> <sup>a</sup> (ng•hr/mL)	非結合体の 安全域
ヒト <sup>b</sup>	4 mg	477.6	238.8	–
ラット 6 ヶ月間反復投与毒性試験の NOAEL	5 mg/kg	1616	792	3.3
イヌ 9 ヶ月間反復投与毒性試験の NOAEL	0.5 mg/kg	447.5	246	1.0
ラット 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験の NOAEL				
雄ラットの生殖能	15 mg/kg	5859	2870.9	12.0
雌ラットの生殖能	5 mg/kg	1972	966.3	4.0
ラット 胚・胎児発生に関する試験の NOAEL				
胚・胎児発生	2 mg/kg	1092	535.1	2.2
ウサギ 胚・胎児発生に関する試験の NOAEL				
胚・胎児発生	10 mg/kg	3027	1422.7	6.0
ラット 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験の NOAEL				
F <sub>1</sub> 発達	2 mg/kg	840	411.6	1.7
F <sub>0</sub> 母動物、F <sub>1</sub> の生殖、F <sub>2</sub> 児の生存	25 mg/kg	10300	5047	21.1
ラット 2 年間がん原性試験の NOEL				
雄	8 mg/kg	2874	1408.3	5.9
雌	25 mg/kg	12964	6352.4	26.6
マウス 6 ヶ月間がん原性試験の NOEL				
雄	300 mg/kg	26400	11616	48.6
雌	150 mg/kg	37200	16368	68.5

略語：AUC<sub>0-24hr</sub> = 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、NOAEL = 無毒性量、NOEL = 無影響量

a In vitro 試験から算出した血漿中非結合型分率はラットで 49%、マウスで 44%、イヌで 55%、ウサギで 47%、ヒトで 50%であった。

b 関節リウマチ患者に 4 mg/日の用量で投与したときの AUC は、臨床第 2/3 相試験の母集団薬物動態解析により算出した（CTD 第 2.7.2.3.1.2 項）。薬物動態パラメータに人種（日本人/外国人）による影響は認められなかった。

#### 2.4.6 参考文献

Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. Science. 2002;296(5573):1653-1655.

Ananthkrishnan R, Hallam K, Li Q, Ramasamy R. JAK-STAT pathway in cardiac ischemic stress. Vascul Pharmacol. 2005;43(5):353-356.

Awad S, Al-Haffar KM, Marashly Q, Quijada P, Kunhi M, Al-Yacoub N, et al. Control of histone H3 phosphorylation by CaMKII $\delta$  in response to haemodynamic cardiac stress. J Pathol. 2015;235(4):606-618.

Booz GW, Day JN, Baker KM. Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2002;34(11):1443-1453.

Cayen MN, Kraml M, Ferdinandi ES, Greselin E, Dvornik D. The metabolic disposition of etodolac in rats, dogs, and man. Drug Metab Rev. 1981;12(2): 339-362.

- EtoGesic® (Etodolac). 2004. Label, NADA 141-108. Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa (2004). Available at: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/DrugLabels/UCM050389.pdf>. Accessed November 26, 2015.
- Ferrer L, Ravera I, Silbermayr K. Immunology and pathogenesis of canine demodicosis. *Vet Dermatol*. 2014;25(5):427-e65.
- Fridman JS, Scherle PA, Collins R, Burn TC, Li Y, Li J, et al. Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050. *J Immunol*. 2010;184(9):5298-5307.
- Hombria JC, Sotillos S. Disclosing JAK/STAT links to cell adhesion and cell polarity. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(4):370-378.
- Jokinen MP, Lieuallen WG, Boyle MC, Johnson CL, Malarkey DE, Nyska A. Morphologic aspects of rodent cardiotoxicity in a retrospective evaluation of National Toxicology Program studies. *Toxicol Pathol*. 2011;39(5):850-860.
- Keenan KP, Soper KA, Hertzog PR, Gumprecht LA, Smith PF, Mattson BA, et al. Diet, overfeeding, and moderate dietary restriction in control Sprague-Dawley rats: II. Effects on age-related proliferative and degenerative lesions. *Toxicol Pathol*. 1995;23(3):287-302.
- Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D, et al. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):1895-1905.
- Kurdi M, Booz GW. Can the protective actions of JAK-STAT in the heart be exploited therapeutically? Parsing the regulation of interleukin-6-type cytokine signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50(2):126-141.
- Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, et al. Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1230-1240.
- Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. JAK2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998;93(3):397-409.
- O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*. 2012;36(4):542-550.
- Pazdrak K, Stafford S, Alam R. The activation of the JAK-STAT1 signaling pathway by IL-5 in eosinophils. *J Immunol*. 1995;155(1):397-402.
- Scott EW, McKellar QA. The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. *Vet Res Commun*. 1992;16(2):139-146.
- Stout BA, Bates ME, Liu LY, Farrington NN, Bertics PJ. IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activate STAT3 and STAT5 and promote Pim-1 and Cyclin D3 protein expression in human eosinophils. *J Immunol*. 2004;173(10):6409-6417.