オルミエント錠４ｍｇ
オルミエント錠２ｍｇ

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1　緒言 3

略語一覧

ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ALYM	リンパ球の絶対数
Ames 試験	細菌を用いる復帰突然変異試験
ANEU	好中球の絶対数
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	アデノシン三リン酸
AUC	血漿（血液）中濃度－時間曲線下面積
BDC	胆管カニューレ
b.i.d./bid	1 日 2 回
B/P 比	血液／血漿分配比
CAIA	抗コラーゲン抗体誘発関節炎
CaMK	カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ
CaMKK	カルシウム・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
Cl	クリアランス
C_{max}	最高血漿（血液）中濃度
cMET	受容体型チロシンキナーゼ
DMAC	ジメチルアセトアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子
GGT	ガンマグルタミルトランスフェラーゼ
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
HEK	ヒト胎児腎臓由来
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HGB	ヘモグロビン
HPBDC	ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	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
iNOS	誘導型一酸化窒素合成酵素
ISR	incurred sample reanalysis；実試料を用いた定量値の再現性確認
IV	静脈内投与
JAK	ヤヌスキナーゼ
Km	ミカエリス定数
LC/MS	液体クロマトグラフィー質量分析
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析
LPS	リポポリサッカライド
m/z	質量対電荷比
MAPK	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1、単球走化性タンパク質-1
Mics	ミクロソーム
MS	質量分析
MS/MS	タンデム質量分析
MTD	最大耐量
NA	該当なし
NC	採取せず
NDS	シグナルが検出されなかった
NF	検出されず
NK	ナチュラルキラー
NOAEL	無毒性量

（続く）

略語一覧（続き）

NOEL	無影響量
ns	有意差なし
NZW	ニュージーランドホワイト
OECD	経済協力開発機構
PBMC	末梢血単核球
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応法
PHA	phytohemagglutinin
PK	薬物動態
p-STAT/pSTAT	リン酸化 STAT
q.d./qd	1 日 1 回
QT_CV	心拍数で補正した QT 間隔
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー法
rAIA	アジュバント関節炎
RBC	赤血球
RET	網状赤血球
SD	標準偏差
SEM	平均値の標準誤差
STAT	シグナル伝達兼転写活性化因子
THP-1	ヒト急性単球性白血病由来株化細胞
TK	トキシコキネティクス
T_{MAX}	最大反応潜時
T_{max}	最高血漿（血液）中濃度到達時間
TNFα	腫瘍壊死因子α
TYK	チロシンキナーゼ
UVA	紫外線 A
V_{MAX}	最大反応振幅
V_{AVE}	平均反応振幅
WBC	白血球

2.6.1 緒言

バリシチニブ（開発記号：LY3009104）はヤヌスキナーゼ（JAK）1及びJAK2に高い選択性を有する JAK 阻害剤であり、Incyte Corporation が開発を始め（Incyte Corporation での開発記号はINCB028050）、20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日にイーライリリー・アンド・カンパニーにその開発が移管された。

バリシチニブは JAK の ATP 結合部位を一過性に占有し、JAK/シグナル伝達兼転写活性化因子（STAT）シグナル伝達を阻害する。抗体による治療ではシグナル伝達経路が完全かつ持続的に阻害されるが、JAK 阻害薬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。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、関節リウマチの病因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。したがって、JAK1 及び JAK2 の阻害剤は、関節リウマチに関与するサイトカインシグナル伝達経路を標的とし、炎症や細胞の活性化、免疫細胞の増殖を抑制する。

バリシチニブは、関節リウマチを適応症とする臨床開発に関して日米欧規制当局との協議を行ったうえで臨床試験を実施し、有効性及び安全性について評価を行った。

これらの臨床試験結果から、関節リウマチに対するバリシチニブの有効性及び安全性の特性を明らかにすることができた。

今般、品質に関する試験成績、非臨床試験成績、及び臨床試験成績に基づくベネフィット／リスク評価において、バリシチニブの関節リウマチに対する高い有用性が示されたことから医薬品製造販売承認申請することとした。

今回申請する効能又は効果、用法及び用量は以下の通りである。

【効能又は効果】

既存治療で効果不十分な関節リウマチ（関節の構造的損傷の防止を含む）

【用法及び用量】

通常、成人にはバリシチニブとして 4 mg を 1 日 1 回経口投与する。なお、患者の状態に応じて 2 mg に減量すること。

オルミエント錠４ｍｇ
オルミエント錠２ｍｇ

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

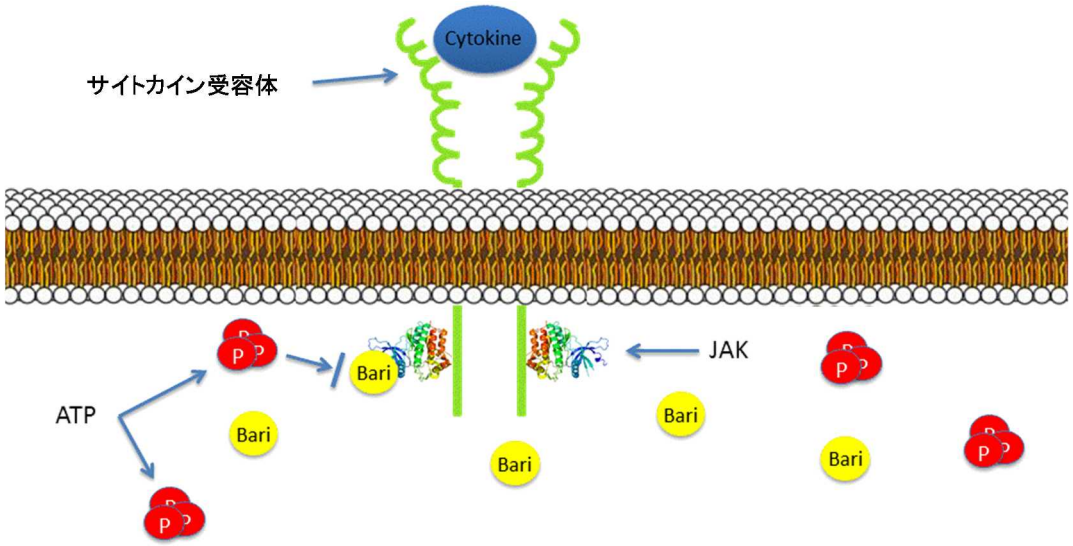
目次

2.6.2 薬理試験の概要文 1
2.6.2.1 まとめ 1
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 2
2.6.2.2.1 In Vitro 試験 2
2.6.2.2.1.1 JAK 活性に対する阻害作用 2
2.6.2.2.1.2 IL-2 によるヒト初代培養 T 細胞の増殖及び JAK/STAT シグナル伝達に対する作用 3
2.6.2.2.1.3 ヒト初代培養 T 細胞における IL-23 刺激による IL-17 及び IL-22 産生並びに STAT3 リン酸化に対する作用 4
2.6.2.2.1.4 ヒト初代培養 T 細胞における IL-12 刺激による IFNγ 産生及び STAT3 リン酸化に対する作用 6
2.6.2.2.1.5 ヒト末梢血単核細胞における IL-6 刺激による STAT3 リン酸化及び MCP-1 産生に対する作用 7
2.6.2.2.1.6 ラット、イヌ及びヒト全血における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対する作用 8
2.6.2.2.1.7 イヌ反復投与毒性試験で得られた血液における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対する作用 9
2.6.2.2.1.8 サイトカイン刺激したヒト末梢血単核球におけるバリシチニブ及びトファシチニブによるシグナル伝達阻害作用（IC_{50} 値の比較） 10
2.6.2.2.2 In Vivo 試験 12
2.6.2.2.2.1 マウス遅延型過敏症モデルにおける有効性 12
2.6.2.2.2.2 コラーゲン誘発関節炎マウスにおける有効性 13
2.6.2.2.2.3 抗コラーゲン抗体誘発関節炎マウスにおける有効性 15
2.6.2.2.2.4 アジュバント関節炎ラットにおける有効性 16
2.6.2.2.2.4.1 アジュバント関節炎ラットを用いた持続皮下投与試験 16
2.6.2.2.2.4.2 アジュバント関節炎ラットを用いた経口投与試験 18
2.6.2.2.2.4.3 アジュバント関節炎ラットにおけるバリシチニブの STAT リン酸化の抑制作用 22
2.6.2.2.2.4.4 アジュバント関節炎ラットにおけるリンパ節由来サイトカイン mRNA レベルの上昇に及ぼすバリシチニブの影響 23
2.6.2.3 副次的薬理試験 24
2.6.2.3.1 受容体、イオンチャネル、酵素及びトランスポーターへの影響 24
2.6.2.4 安全性薬理試験 26
2.6.2.4.1 心血管系に及ぼす影響の検討 26
2.6.2.4.1.1 hERG チャネル電流に及ぼす影響の検討 26
2.6.2.4.1.2 イヌを用いた心血管系に及ぼす影響の検討 26
2.6.2.4.2 中枢神経系に及ぼす影響の検討 27
2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響の検討 28
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 28
2.6.2.6 考察及び結論 28
2.6.2.7 図表 30
2.6.2.8 参考文献 30

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

バリシチニブ（LY3009104 又は INCB028050）は、ヤヌスキナーゼ（JAK）1 及び JAK2 の強力かつ選択的な阻害剤であり、JAK3 又はチロシンキナーゼ 2（TYK2）も軽度に阻害する（図 2.6.2-1）。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 in vitro 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いる。サイトカインシグナル伝達に対するバリシチニブの阻害作用は動物及びヒト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。なお、すべての in vitro 及び in vivo 試験において、特に記載しない限り、バリシチニブリン酸塩を使用した。



略語：ATP = アデノシン三リン酸、Bari = バリシチニブ、JAK = ヤヌスキナーゼ、P = リン酸
バリシチニブは、JAK1 及び JAK2 キナーゼの ATP 結合部位に可逆的に結合することにより、これらキナーゼへの ATP の結合を妨げてサイトカインシグナル伝達を阻害する。

図 2.6.2-1 JAK を介したシグナル伝達経路

効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験の主な結果を以下に示した。

- 酵素活性阻害試験で、バリシチニブは JAK1 及び JAK2 の両キナーゼ活性を阻害した。一方で、JAK3 又は TYK2 に対する阻害作用は軽度であった（LOB06、LOB07 試験）。
- バリシチニブはヒト末梢血単核球（PBMC）及びヒト急性単球性白血病由来株化細胞（THP-1）溶解液中の JAK1 及び JAK2 を最も強く阻害することが示された（QSB30 試験）。
- バリシチニブは、ヒトリンパ球におけるインターロイキン（IL）-2（JAK1/JAK3）（LOB08 試験）、IL-23（JAK2/TYK2）（LOB06、LOB09 試験）、IL-12（JAK2/TYK2）（LOB10 試験）、IL-6（JAK1/JAK2/TYK2）（LOB06、LOB11、LOB12 試験）のシグナル伝達を阻害することが、シグナル伝達兼転写活性化因子（STAT：signal transducer and activator of transcription）リン酸化及びサイトカイン産生の阻害により示された。

- フローサイトメトリー法において、バリシチニブはナチュラルキラー（NK）細胞及び単球のサイトカインシグナル伝達（STAT リン酸化）を阻害した。この作用は、IL-6（JAK1/JAK2/TYK2）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）（JAK2/TYK2）、IL-10（JAK1/TYK2）、インターフェロンα（IFNα）（JAK1/TYK2）及びインターフェロンγ（IFNγ）（JAK1/JAK2）刺激による STAT リン酸化抑制作用によって確認された。JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行うサイトカインである IL-2、IL-4、IL-15 又は IL-21 刺激 STAT リン酸化の抑制作用は、トファシチニブと比較してバリシチニブで弱かった（LOB15 試験）。
- マウスの遅延型過敏反応モデルにおいて、耳介腫脹を抑制した（LOB06 試験）。
- バリシチニブは、マウスのコラーゲン誘発関節炎（CIA）及び抗コラーゲン抗体誘発関節炎（CAIA）モデルの関節炎をいずれも用量依存的に抑制した（LOB06 試験）。
- マウスの CAIA モデルにおいて、バリシチニブは、ヘモグロビン値、網状赤血球数、赤血球数、骨髄系細胞数、リンパ球数及び総白血球数に影響を及ぼさず、関節炎を抑制した（LOB06 試験）。
- バリシチニブは、ラット全血中の STAT3 リン酸化を 24 時間にわたり持続的に抑制することなく、アジュバント関節炎（rAIA）ラットにおいて用量依存的な有効性を示した（LOB06、LOB14 試験）。
- rAIA ラットにおいて、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（LOB14 試験）。
- 一連の安全性薬理試験の成績から、バリシチニブは臨床曝露量では中枢神経系、心血管系及び呼吸系機能に臨床上問題となるような影響を及ぼさないことが示唆された。

以上、非臨床薬理試験結果から、バリシチニブは、JAK1 及び JAK2 活性を特異的かつ強力に阻害し、in vitro ヒト全血及び PBMC の細胞溶解液において、自己免疫疾患に関与するサイトカインを介したシグナル伝達を抑制するとともに、げっ歯類の関節炎モデルにおいて有効性を示すことが明らかとなった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In Vitro 試験

バリシチニブの JAK 酵素活性に対する阻害作用、細胞を用いた in vitro 試験（JAK／STAT リン酸化の阻害作用）、並びにサイトカインで誘発した JAK 活性の阻害に起因する細胞増殖の抑制作用及びサイトカイン／ケモカイン産生に対する阻害作用を一連の in vitro 試験で評価した。なお、これらの試験には、関節リウマチなどの炎症性疾患に関与するヒト PBMC 及びヒト初代培養 T 細胞（Firestein 2008）を用いた。

2.6.2.2.1.1 JAK 活性に対する阻害作用

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1), LOB07 (4.2.1.1.2)

ヒト JAK ファミリーの JAK1、JAK2、JAK3 及び TYK2 に対するバリシチニブの阻害作用を、触媒ドメインを含んだ各ファミリーの切断型を用いた酵素アッセイにより検討した。本アッセイ

では、蛍光発生ペプチドのリン酸化を測定した。これらのアッセイは、JAK/TYK2 のミカエリス定数（Km）値に相当する ATP 濃度で実施した（LOB07 試験）。バリシチニブの酵素阻害活性を 50%阻害濃度（IC_{50}）で表した。複数ロットのバリシチニブから得られた IC_{50} 値を表 2.6.2-1 に示した（LOB07 試験）。これらの結果から、バリシチニブは、JAK ファミリーの中で JAK1 及び JAK2 に対して強い阻害を示した。

表 2.6.2-1 各種ヒト JAK ファミリーに対するバリシチニブの酵素阻害活性（LOB07 試験）（JAK/TYK2 の Km に相当する濃度の ATP を使用）

酵素	IC_{50} の平均値±標準偏差 (nM)	試験回数
JAK1	1.09 ± 0.11	5
JAK2	0.31 ± 0.05	5
JAK3	8.77 ± 0.90	6
TYK2	3.45 ± 0.36	6

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、JAK = ヤヌスキナーゼ、Km = ミカエリス定数、TYK = チロシンキナーゼ

次に、別の試験では、生物学的に ATP の細胞内濃度をより厳密に反映する 1 mM で実施した（表 2.6.2-2、LOB06 試験）。

表 2.6.2-2 各種ヒト JAK ファミリーに対するバリシチニブの酵素阻害活性（LOB06 試験）（ATP 濃度は 1 mM）

酵素	IC_{50} の平均値±標準偏差 (nM)	試験回数
JAK1	5.9 ± 0.9	4
JAK2	5.7 ± 1.7	6
JAK3	>400	2
TYK2	53	2
cMET	>10,000[a]	1
Chk2	>1000[a]	1

略語：Chk2 = チェックポイントキナーゼ 2、cMET = 受容体型チロシンキナーゼ、IC_{50} = 50%阻害濃度、JAK = ヤヌスキナーゼ、TYK = チロシンキナーゼ

[a] 検討した最高濃度

バリシチニブは JAK1 及び JAK2 の両キナーゼに対して選択的で、細胞内環境を反映する ATP 濃度で両キナーゼに対してほぼ等しい阻害作用を示した。また、TYK2 及び JAK3 に対する阻害作用は弱いことが示された。バリシチニブの JAK ファミリーに対する阻害活性は Clark らが報告しており、その IC_{50} 値は本試験で得られた値とほぼ同等であった（Clark et al. 2014）。

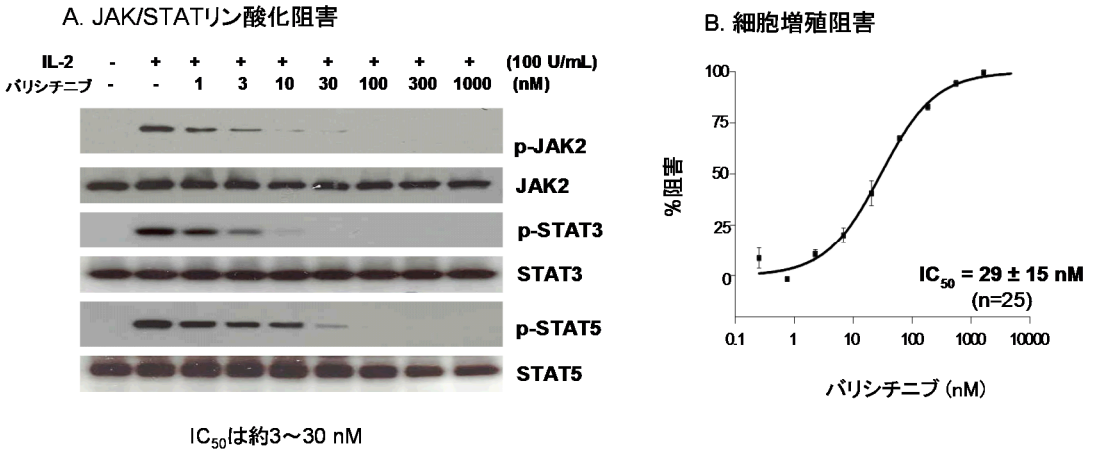
2.6.2.2.1.2 IL-2 によるヒト初代培養 T 細胞の増殖及び JAK/STAT シグナル伝達に対する作用

評価資料：LOB08 (4.2.1.1.3)

T 細胞及び T 細胞由来サイトカインは炎症に重要な役割を有するため、T 細胞のサイトカイン刺激による JAK/STAT シグナル伝達活性化に対するバリシチニブの作用及びそれによる T 細胞への生物学的作用について、in vitro で検討した。T 細胞の IL-2 受容体に IL-2 が結合すると、JAK1 及び JAK3 が活性化される。活性化された JAK は STAT をリン酸化し、活性化させる（Frank et al. 1995; Lin and Leonard 2000）。この JAK/STAT 経路は、IL-2 刺激によるシグナル伝達経路の 1

つであり、T 細胞増殖に関与している。そこで、T 細胞を IL-2 で刺激したときの JAK 及び STAT のリン酸化、並びに T 細胞の増殖に対するバリシチニブの作用を評価した。

健康成人の PBMC から分取した T 細胞を phytohemagglutinin（PHA）で処理して細胞表面に IL-2 受容体を発現させた後、IL-2 で刺激し、JAK2、STAT3、STAT5 のリン酸化及び細胞増殖に対するバリシチニブの作用を検討した。図 2.6.2-2A に示すように、バリシチニブは 3 nM 以上の濃度で、IL-2 刺激による JAK2、STAT3 及び STAT5 のリン酸化を強力に阻害した。JAK2、STAT3 及び STAT5 の総蛋白量には影響を及ぼさなかった。バリシチニブは、JAK2 及び STAT のリン酸化を阻害した濃度とほぼ同じ濃度（およそ 30 nM）で IL-2 刺激による T 細胞増殖を阻害し、その IC_{50} 値は 29 ± 15 nM であった（n = 25、図 2.6.2-2B）。これらの結果から、バリシチニブは T 細胞におけるサイトカイン刺激による JAK リン酸化を抑制し、STAT 活性化を阻害することにより、IL-2 刺激による T 細胞の増殖を抑制することが示された。



略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、IL = インターロイキン、JAK = ヤヌスキナーゼ、p-JAK2 = リン酸化 JAK2、p-STAT3 = リン酸化 STAT3、p-STAT5 = リン酸化 STAT5、PHA = phytohemagglutinin、STAT = シグナル伝達兼転写活性化因子

A：PHA 活性化ヒト T 細胞を表示濃度のバリシチニブで 20 分間プレインキュベート後、IL-2（100 U/mL）で 10 分間刺激した。反応終了後、細胞を溶解し、ウェスタンブロット法により各蛋白を分析した。同ウェスタンブロット法により、総 JAK2、STAT3 又は STAT5 をリプローブした。

B：PHA 活性化ヒト T 細胞を IL-2（100 U/mL）及び表示濃度のバリシチニブの存在下で 3 日間増殖させた。溶媒対照には 0.2%ジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。細胞増殖阻害率（%）は溶媒あるいは IL-2 を単独で処置した細胞の増殖との比較から求めた。図中の値は代表的な試験での平均値±標準偏差（triplicate）を示し、IC_{50} 値は独立した 25 回の試験の平均値を示す。

図 2.6.2-2 IL-2 で刺激した T 細胞の JAK2/STAT3/STAT5 リン酸化及び増殖に対するバリシチニブの抑制作用（LOB08 試験）

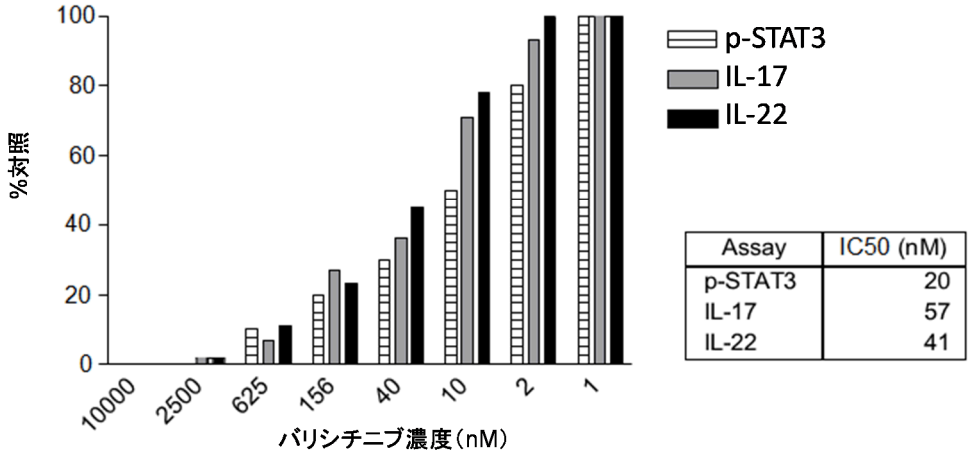
2.6.2.2.1.3 ヒト初代培養 T 細胞における IL-23 刺激による IL-17 及び IL-22 産生並びに STAT3 リン酸化に対する作用

評価資料：LOB09 (4.2.1.1.4)

T 細胞機能に及ぼす JAK の阻害作用をさらに検討するために、IL-23 刺激によるサイトカイン産生に対するバリシチニブの作用について検討した。IL-23 は JAK2 及び TYK2 を活性化し、その結果 STAT 経路が活性化される。IL-23 はナイーブ $CD4^+$ T 細胞の特定サブセットのヘルパーT

細胞への分化を促進する（Iwakura and Ishigame 2006; Ghilardi and Ouyang 2007）。IL-17 は、内皮細胞、マクロファージ及び線維芽細胞を刺激して、IL-1、IL-6、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、マトリックスメタロプロテアーゼ、ケモカインなどの炎症性メディエーターを産生する（Kolls and Lindén 2004）。IL-17 に加えて、IL-22 も催炎症作用を有していると報告されている（Ghilardi and Ouyang 2007）。IL-23 刺激による STAT リン酸化並びに IL-17 及び IL-22 産生に対するバリシチニブの作用を、ヒト初代培養 T 細胞を用いて評価した。

ヒト PBMC から T 細胞を分取した。バリシチニブの IL-23 刺激による STAT リン酸化に対する作用を評価するために、T 細胞を PHA で処理し、細胞表面に IL-23 受容体を発現させた後、IL-23 で 15 分間刺激して、STAT3 リン酸化を測定した。図 2.6.2-3 に示したように、バリシチニブは、IL-23 による STAT3 リン酸化を強力に阻害し、その IC_{50} 値は 20 nM であった。バリシチニブは、JAK 及び STAT のリン酸化を阻害する濃度で、IL-23 の 4 日間処置で活性化させたヒト初代培養 T 細胞の IL-17 及び IL-22 産生を抑制した。IL-17 及び IL-22 の産生を抑制するバリシチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 57 nM（n = 2）及び 41 nM（n = 2）であった（図 2.6.2-3）。これらの結果から、バリシチニブは、IL-23 刺激による JAK/STAT 経路の活性化を阻害することにより IL-17 及び IL-22 産生を低下させることが示された。



略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、IC_{50} = 50%阻害濃度、IL = インターロイキン、p-STAT3 = リン酸化 STAT3、PHA = phytohemagglutinin、STAT = シグナル伝達兼転写活性化因子

PHA 処理したヒト T 細胞を表示濃度のバリシチニブで 10 分間プレインキュベートし、次に 100 ng/mL の IL-23 で 15 分間刺激した。細胞溶解液中のリン酸化 STAT3（Tyr705）を酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）で分析した。IL-23 刺激によるサイトカイン産生に対するバリシチニブの作用を評価するために、ヒト初代培養 T 細胞を抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体の存在下で 2 日間増殖させ、洗浄後に IL-23 (100 ng/mL) + IL-2 (10 ng/mL) 及び表示濃度のバリシチニブで 4 日間刺激した。培養液上清中の IL-17 及び IL-22 を ELISA で分析した。図中の値は、IL-23 及び溶媒（DMSO）で処理した細胞と比較したときのリン酸化 STAT3、IL-17 及び IL-22 の割合（溶媒対照に対する割合：%対照）を示す。IC_{50} 値は、独立した 2 試験の平均値を示す。

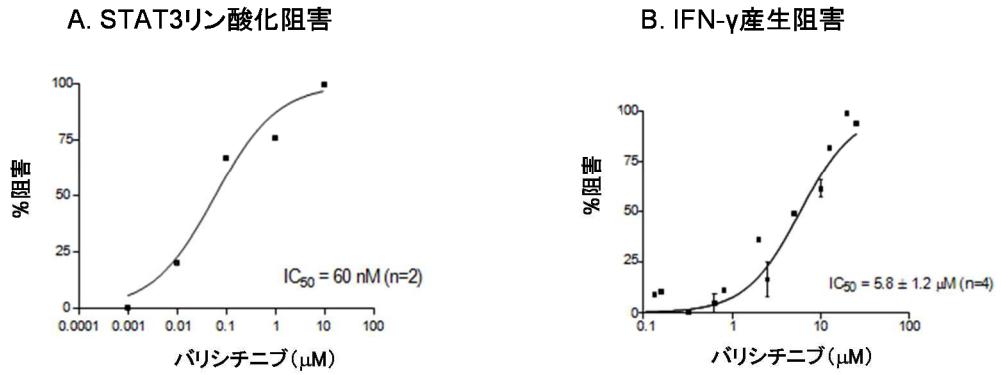
図 2.6.2-3 IL-23 で刺激した T 細胞の STAT3 リン酸化及びサイトカイン産生に対するバリシチニブの阻害作用（LOB09 試験）

2.6.2.2.1.4 ヒト初代培養 T 細胞における IL-12 刺激による IFNγ 産生及び STAT3 リン酸化に対する作用

評価資料：LOB10 (4.2.1.1.5)

IL-23 及び IL-12 は共に p40 サブユニットを有するヘテロ二量体蛋白質であり、いずれも炎症への関与が示唆されている。P40 ノックアウト動物を用いた試験において、IL-23 及び IL-12 の炎症への関与が示唆されている（Iwakura and Ishigame 2006）。IL-12 は JAK2 及び TYK2 を活性化し、STAT 経路を活性化させること、また、ナイーブ T 細胞の TH1 細胞への分化を促進して IFNγ産生を増加させることが示されている（Rosmarin and Strober 2005）。そこで、ヒト初代培養 T 細胞を用い、IL-12 刺激による STAT3 リン酸化及び IFNγ産生に対するバリシチニブの抑制作用を検討した。

IL-12 刺激による STAT3 リン酸化に対するバリシチニブの作用を、PHA により細胞表面上に IL-12 受容体を発現させた T 細胞を用いて評価した。T 細胞を IL-12 で刺激し、STAT3 のリン酸化及び IFNγ産生を測定した（それぞれ 15 分間及び 24 時間の刺激）。図 2.6.2-4A に示したように、バリシチニブは、IL-12 による STAT3 リン酸化を抑制し、その IC_{50} 値は 60 nM であった。バリシチニブは、JAK 及び STAT3 のリン酸化を阻害すると共に、IL-12 で刺激したヒト T 細胞の IFNγ産生を抑制し、バリシチニブの IC_{50} 値は 5.8 ± 1.2 μM（n = 4）であった（図 2.6.2-4B）。これらの結果から、バリシチニブは IL-12 刺激による JAK/STAT 経路の活性化を抑制することが示された。バリシチニブの IFNγ産生阻害作用は STAT3 リン酸化抑制作用よりも弱かった。これは、初代培養 T 細胞においては IL-12 が JAK/STAT 経路に加えて p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（p38 MAPK）の活性化を介して IFNγ産生を促進する（Zhang and Kaplan 2000）ためと考えられる。



略語：ELISA = 酵素結合免疫吸着測定法、IC_{50} = 50%阻害濃度、IFNγ = インターフェロンγ、IL = インターロイキン、PHA = phytohemagglutinin、STAT = シグナル伝達兼転写活性化因子

A：PHA 処理したヒト T 細胞を表示濃度のバリシチニブで 10 分間プレインキュベートし、次に 20 ng/mL の IL-12 で 15 分間刺激した。細胞溶解液中のリン酸化 STAT3 を ELISA で分析した。IC_{50} 値は 2 試験の平均値を示す。

B：PHA 処理したヒト T 細胞を IL-12（10 ng/mL）及び表示濃度のバリシチニブの存在下で 24 時間増殖させた。培養液上清中の IFNγ濃度を測定した。IFNγ阻害率（%）は、IL-12 及び溶媒を処置した細胞との比較とした。図中の値は独立した 3 回の試験で得られた平均阻害率を示す。IC_{50} 値は 4 試験の平均値±標準偏差を示す。

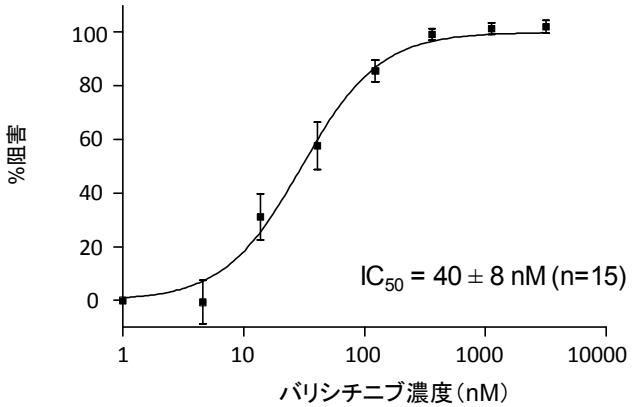
図 2.6.2-4 IL-12 で刺激した T 細胞の STAT3 リン酸化及び IFNγ産生に対するバリシチニブの阻害作用（LOB10 試験）

2.6.2.2.1.5 ヒト末梢血単核細胞における IL-6 刺激による STAT3 リン酸化及び MCP-1 産生に対する作用

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1), LOB11 (4.2.1.1.6)

IL-6 は、JAK1 及び JAK2 を介してシグナル伝達し、STAT 経路を活性化するサイトカインで、複数の細胞に作用し、多面的な炎症を誘発する（Nishimoto and Kishimoto 2006）。関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン誘発モデルに抗 IL-6 受容体抗体を投与すると有効性が認められること、また、IL-6 ノックアウトマウスにコラーゲンを投与しても病態が発症しないことが示されている。さらに、抗 IL-6 受容体抗体のトシリズマブを関節リウマチ患者に投与した臨床試験で奏効が示されたことから、IL-6 経路を標的とした関節リウマチの治療が有効であることが示された。

これらの知見に基づき、IL-6 刺激による単球走化性タンパク質-1（MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1）産生を薬力学的指標として、IL-6 シグナル伝達をバリシチニブが抑制するか否かを評価した。ヒト PBMC をバリシチニブであらかじめ処理し、IL-6 で 24 時間刺激して、培養上清中の MCP-1 量を ELISA で測定した。図 2.6.2-5 に示すように、バリシチニブは IL-6 刺激による PBMC 液中の MCP-1 産生を強力に阻害し、その IC_{50} 値は 40 ± 8 nM（n = 15）であった（LOB11、LOB06 試験）。バリシチニブはほぼ同じ濃度で IL-6 刺激による PBMC 液中の STAT3 リン酸化を抑制した（表 2.6.2-3）。これらの結果から、バリシチニブは IL-6 刺激による JAK/STAT 経路の活性化を抑制することにより MCP-1 産生を低下させることが示された。



略語：DMSO = ジメチルスルホキシド、IC_{50} = 50%阻害濃度、IL = インターロイキン、MCP-1 = 単球走化性タンパク質-1、PBMC = 末梢血単核細胞
ヒト PBMC を IL-6（10 ng/mL）及び各種濃度のバリシチニブの存在下で 24 時間刺激した。上清を回収して、MCP-1 を測定した。MCP-1 阻害率（%）は、IL-6 又は DMSO 溶媒を処理した細胞との比較とした。図中の値は独立した 15 回のアッセイから得られた平均阻害率を示す。IC_{50} 値は 15 試験の平均値±標準偏差を示す。

図 2.6.2-5 IL-6 刺激による PBMC の MCP-1 産生に対するバリシチニブの阻害作用（LOB11 試験）

以上、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 を使用した複数の細胞を用いた試験において、バリシチニブによる JAK/STAT 経路の抑制作用が確認された。使用した 4 つのアッセイにおけるバリシチニブの作用を表 2.6.2-3 に要約した。

表 2.6.2-3 サイトカインで刺激した免疫細胞におけるバリシチニブの効力（In Vitro）（LOB11 試験）

サイトカイン	細胞型	測定パラメータ	バリシチニブの IC_{50}（平均値±標準偏差）	試験回数
IL-2	T 細胞	JAK2/STAT3/STAT5 リン酸化	約 3～30 nM	2
		細胞増殖	29 ± 15 nM	25
IL-23	T 細胞	STAT3 リン酸化	20 nM	2
		IL-17 産生	57 nM	2
		IL-22 産生	41 nM	2
IL-12	T 細胞	STAT3 リン酸化	60 nM	2
		IFNγ 産生	5.8 ± 1.2 μM	4
IL-6	PBMC	STAT3 リン酸化	44 nM	2
		MCP-1 産生	40 ± 8 nM	15

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、IL = インターロイキン、JAK = ヤヌスキナーゼ、MCP-1 = 単球走化性タンパク質-1、PBMC = 末梢血単核細胞、STAT = シグナル伝達兼転写活性化因子

2.6.2.2.1.6 ラット、イヌ及びヒト全血における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対する作用

評価資料：LOB12 (4.2.1.1.7), LOB11 (4.2.1.1.6)

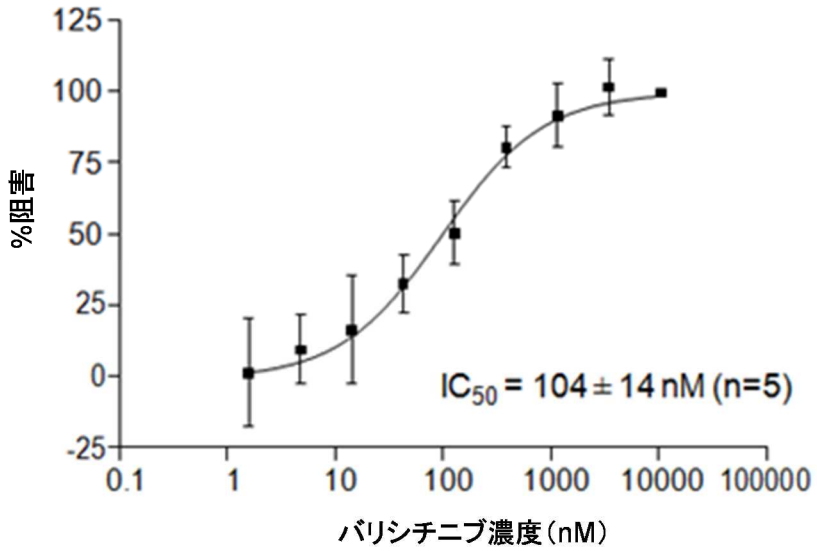
造血細胞の JAK 活性に対する遊離型バリシチニブの作用を検討するために、サイトカイン刺激による STAT3 リン酸化を測定する全血を用いた試験系を確立した。ヒト、イヌあるいはラットから採取したヘパリン加全血にバリシチニブ（1.5 nM～10,000 nM）を添加し、その 10 分後に IL-6 で 15 分間刺激した。赤血球を溶解した後、白血球から細胞質抽出物を調製し、リン酸化 STAT3 特異的な ELISA により細胞質抽出物を分析した。

ヒト、イヌ及びラット全血において、IL-6 刺激による STAT3 リン酸化の抑制が認められ、バリシチニブの IC_{50} 値は、それぞれ 104、49 及び 128 nM で（表 2.6.2-4、図 2.6.2-6）、バリシチニブの血清蛋白非結合率は 47%～61%とほぼ同程度であった。バリシチニブの IL-6 刺激 STAT3 リン酸化抑制作用には動物種間で交差反応性が確認された。

表 2.6.2-4 各種全血における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対するバリシチニブの阻害作用（LOB12 試験）

種	バリシチニブ 血清蛋白非結合率（%）	バリシチニブ IC_{50} 平均値±標準偏差（nM）	試験回数
ヒト	50	104 ± 14	5
イヌ	61	49（40 及び 58）	2
ラット	47	128（204 及び 51）	2

略語：IC_{50} = 50%阻害濃度、IL = インターロイキン、STAT = シグナル伝達兼転写活性化因子



略語：ELISA＝酵素結合免疫吸着測定法、IC_{50}＝50%阻害濃度、IL＝インターロイキン、STAT＝シグナル伝達兼転写活性化因子
ヒト全血を表示濃度のバリシチニブで 10 分間プレインキュベートし、次に IL-6（100 ng/mL）で 15 分間刺激した。全溶解液中のリン酸化 STAT3 を ELISA で分析した。図中の値は独立した 5 回の試験で得られた平均阻害率を示す。IC_{50} 値は 5 試験の平均値±標準偏差を示す。

図 2.6.2-6 ヒト全血における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対するバリシチニブの阻害作用（LOB11 試験）

2.6.2.2.1.7 イヌ反復投与毒性試験で得られた血液における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対する作用

評価資料：LOB13 (4.2.1.1.8)

イヌの 1 ヵ月間反復投与毒性試験（T07-12-03 試験）で得られた全血中の IL-6 刺激 STAT3 リン酸化レベルを定量した。試験 7 日目、バリシチニブの投与 1、8 及び 24 時間後に血液を採取した。血液試料を IL-6 で 15 分間刺激した後、STAT3 リン酸化レベルを ELISA で定量した。

バリシチニブのすべての投与群で用量及び時間依存的な STAT3 リン酸化の抑制が認められた（表 2.6.2-5）。

表 2.6.2-5 バリシチニブの反復経口投与 7 日目のイヌ全血における IL-6 刺激 STAT3 リン酸化に対する抑制率（溶媒投与群に対する抑制率、%）（LOB13 試験）

用量（mg/kg/日）	投与後時間		
	1 時間	8 時間	24 時間
0.15	15	3	2
0.45	69	35	21
3	100	75	46

略語：ELISA＝酵素結合免疫吸着測定法
雌雄ビーグル犬（n＝6/性）から血液を採取後、雌雄別にプールし、ELISA で STAT3 リン酸化レベルを定量した。データは雌雄の平均値（n＝2）で示す。

2.6.2.2.1.8 サイトカイン刺激したヒト末梢血単核球におけるバリシチニブ及びトファシチニブによるシグナル伝達阻害作用（IC_{50} 値の比較）

評価資料：LOB15 (4.2.1.1.10)

トファシチニブは JAK1 及び JAK3 の強力かつ特異的な阻害剤であり、バリシチニブは JAK1 及び JAK2 の強力かつ特異的な阻害剤である（Fridman et al. 2010; Clark et al. 2014）。本試験では、フローサイトメトリー法（Krutzik and Nolan 2006）を用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（いずれも 2.44～10,000 nM）の阻害作用を比較した。健康成人（6 例）から白血球リッチな分画を採取し、バリシチニブ又はトファシチニブクエン酸塩と 1 時間インキュベートした後、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IL-15、IL-21、IFNγ、G-CSF、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）又は IFNα（いずれも 30 ng/mL）で 37°C、15 分間刺激した。フローサイトメトリー法により、B 細胞、$CD4^+$ T 細胞、$CD8^+$ T 細胞、NK 細胞及び単球におけるバリシチニブ又はトファシチニブの STAT リン酸化抑制作用の IC_{50} 値を算出した（LOB15 試験）。

表 2.6.2-6 に IC_{50} 値を示した。IL-6、IL-10、IFNγ及び IFNα刺激による STAT リン酸化抑制作用の IC_{50} 値はバリシチニブ及びトファシチニブで同程度であったが、前述した以外のサイトカイン刺激時には IC_{50} 値に違いが見られた。バリシチニブと比較して、トファシチニブは単球の IL-10 刺激シグナル伝達をより強く阻害したが、この作用の違いは他の白血球では見られなかった。また、バリシチニブと比較して、トファシチニブは IFNα刺激による STAT1、STAT3 及び STAT5 のリン酸化も強く阻害したが、この作用は $CD4^+$ T 細胞、NK 細胞及び単球において顕著であった。バリシチニブとトファシチニブの IC_{50} 値が顕著に異なっていたのは、JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行うサイトカインの IL-4、IL-15 及び IL-21 であった。すなわち、IL-15 刺激によるシグナル伝達に対するバリシチニブの IC_{50} 値は白血球間で異なり 37～73 nM であったが、同じドナーの同じ種類の細胞におけるトファシチニブの IC_{50} 値は 14～24 nM であった。IL-4 及び IL-21 についてもバリシチニブ及びトファシチニブの間に差異が見られた。IL-15 及び IL-21 は NK 細胞の増殖及び機能発現に重要な役割を果たしている（Floros and Tarhini 2015）。JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行うサイトカインに対するバリシチニブとトファシチニブの IC_{50} 値にこのような違いが見られたことは、両薬物の JAK3 の活性に対する阻害作用に違いがあることを反映していると考えられる。一方、バリシチニブは G-CSF シグナル伝達に対してトファシチニブより強い阻害作用を示し、このことはバリシチニブがトファシチニブよりも強い JAK2 及び TYK2 阻害作用を示すことと一致していた。IC_{50} 値を指標としたとき、両薬物により最も強力に阻害されたのは IFNγ及び IFNαシグナル伝達であった（IFNαについては STAT3 及び STAT5 リン酸化に対する阻害作用の IC_{50} 値に基づく）。なお、IFNα刺激 STAT3 及び STAT5 リン酸化に対する阻害作用の IC_{50} 値は同程度であったが、IFNα刺激 STAT1 リン酸化の阻害活性は STAT3 及び STAT5 リン酸化に対する阻害活性よりも低かった。この違いについての理由は不明である。IL-2（JAK1/JAK3）、IL-3（JAK2/JAK2）及び GM-CSF（JAK2/JAK2）刺激による STAT リン酸化抑制作用の IC_{50} 値を得るため、同じ試験系で追加試験を行った。トファシチニブは IL-2 刺激による STAT5 リン酸化を強く抑制し、JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行う他のサイトカイン（IL-4、IL-15 及び IL-21）で見られた阻害作用と一致したが、バリシチニブは JAK2/2 複合

体を介してシグナル伝達を行う IL-3 及び GM-CSF 刺激による STAT5 リン酸化を強く抑制した（表 2.6.2-6）。

本試験結果から、バリシチニブとトファシチニブとの間で見られた最も大きな違いは、JAK1/3 複合体を介したサイトカインシグナル伝達阻害作用の違いであり、これらのサイトカイン（NK 細胞機能に関与するサイトカインが含まれる）のシグナル伝達に対してはトファシチニブがより強い阻害作用を示すと考えられる。

表 2.6.2-6 サイトカイン刺激したヒト末梢血単核球におけるバリシチニブ及びトファシチニブによるシグナル伝達阻害作用（IC_{50} 値の要約）（LOB15 試験）

Cytokine	pSTAT	B cells		CD4+ T cells		CD8+ T cells		NK cells		Monocytes	
		Bari (nM)	Tofa (nM)	Bari (nM)	Tofa (nM)	Bari (nM)	Tofa (nM)	Bari (nM)	Tofa (nM)	Bari (nM)	Tofa (nM)
IL-4	pSTAT5	27	11	NDS		NDS		NDS		NDS	
IL-4	pSTAT6	135	61**	50	18***	27	10***	17	6***	50	39*
IL-15	pSTAT5	NDS		37	14***	64	24***	73	24***	NDS	
IL-21	pSTAT3	86	28***	63	22***	65	22***	61	21***	NDS	
IL-21	pSTAT5	NDS		20	7***	NDS		NDS		NDS	
IL-6	pSTAT3	NDS		44	41	NDS		NDS		51	42
IL-10	pSTAT3	82	76	59	48	63	57	71	61	165	121*
IFNγ	pSTAT1	17	20	NDS		NDS		NDS		46	54***
IFNγ	pSTAT5	NDS		NDS		NDS		NDS		6	7
IFNα	pSTAT1	246	195	77	59*	117	91	137	110**	139	99*
IFNα	pSTAT3	27	19*	25	19*	26	20	25	18	17	12*
IFNα	pSTAT5	25	18	21	15*	26	18*	NDS		13	9**
G-CSF	pSTAT3	NDS		NDS		NDS		NDS		69	103**
IL-3	pSTAT5	79	160	NDS		NDS		NDS		154	221***
IL2	pSTAT5	NDS		23	9***	24	9**	43	15***	NDS	
GM-CSF	pSTAT5	NDS		NDS		NDS		NDS		116	163**

略語：Bari = バリシチニブ、G-CSF = 顆粒球コロニー刺激因子、GM-CSF = 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、IC_{50} = 50%阻害濃度、IFN = インターフェロン、IL = インターロイキン、NDS = シグナルが検出されなかった、NK = ナチュラルキラー、pSTAT = リン酸化 STAT、Tofa = トファシチニブ

IL-4、IL-15 及び IL-21 のシグナル伝達は JAK1/3、IL-6 及び IFNγのシグナル伝達は JAK1/2、IL-10 及び IFNαのシグナル伝達は JAK1/TYK2、G-CSF のシグナル伝達は JAK2/TYK2、IL-2 は JAK1/3、IL-3 及び GM-CSF は JAK2/2 複合体をそれぞれ介する（O'Shea and Plenge 2012）。

IC_{50} 値は 6 名の健康成人の幾何平均値である。

統計解析：各ドナーで得られたバリシチニブ及びトファシチニブの IC_{50} 値を対数変換し、対応のある t 検定を用いて比較した。各サイトカイン刺激ごとに Bonferroni 補正を施した。

* $p < 0.01$、** $p < 0.001$、*** $p < 0.0001$

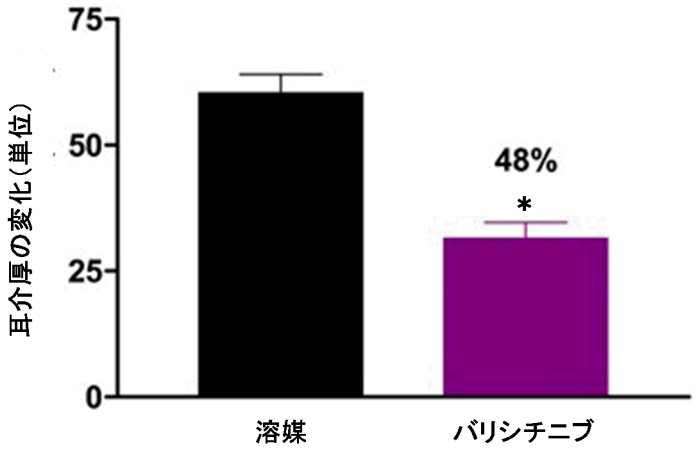
2.6.2.2.2 In Vivo 試験

2.6.2.2.2.1 マウス遅延型過敏症モデルにおける有効性

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1)

抗原特異的メモリーT 細胞は活性化されハプテン刺激部位に遊走することにより炎症反応をもたらすが、遅延型過敏反応は、この抗原特異的メモリーT 細胞を介する反応である（Kobayashi et al. 2001）。このタイプの細胞免疫に対するバリシチニブの作用を検討する目的で雌 BALB/c マウス（7～8 週齢）の腹部にハプテン（ジニトロフルオロベンゼン）を塗布して感作した後、ハプテンを耳介に塗布して遅延型過敏反応を誘発した。バリシチニブ（10 mg/kg）又は溶媒（0.5% メチルセルロース水溶液）をハプテンによる感作前（試験 0 日）からハプテン耳介塗布の翌日（試験 6 日）まで 1 日 1 又は 2 回投与し、試験 6 日に耳介厚を測定した（8 例/群）。図 2.6.2-7（LOB06 試験）に示したように、バリシチニブは溶媒投与群と比較して耳介腫脹を 48%抑制し、この抑制は統計学的に有意であった（$p < 0.00001$、t 検定）。

以上の結果から、関節リウマチを反映するげっ歯類モデルにおいて、バリシチニブは遅延型過敏反応を抑制することが示唆された。



動物にジニトロフルオロベンゼンを腹部塗布して感作した後、耳介塗布により遅延型過敏反応を誘発した（8 例/群）。バリシチニブ（10 mg/kg、強制経口投与、1 日 2 回）を誘発直前及び誘発期間中に投与し、耳介厚を計測した。縦軸にはパプテン塗布前の耳介厚からの変化を示した（1 単位 = 0.0001 インチ）。データは平均値及び標準偏差で示した。バリシチニブ投与により、溶媒対照と比較して耳介腫脹が 48%抑制された。
* $p < 0.00001$、t 検定
溶媒群：60.31 ± 3.74U、バリシチニブ 10 mg/kg 投与群：31.44 ± 3.22U（平均値±標準誤差）。

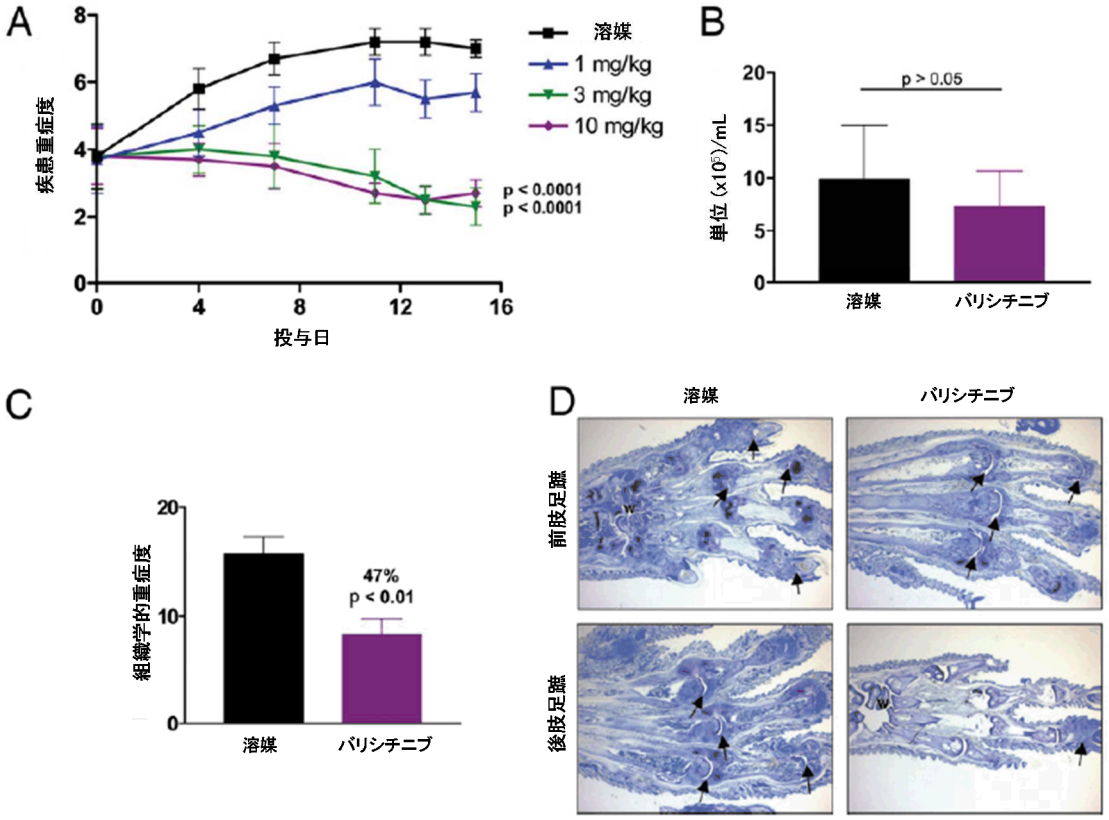
図 2.6.2-7 バリシチニブによる遅延型過敏反応の抑制作用（LOB06 試験）

2.6.2.2.2.2 コラーゲン誘発関節炎マウスにおける有効性

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1)

マウス CIA モデルは、最も汎用されている関節リウマチのモデルである（Brand et al. 2007）。本モデルを用い、関節炎発症後にバリシチニブを投与したときの治療効果を検討した。雄 DBA/1J マウスの尾根部皮内にフロイント完全アジュバントと混合したウシ II 型コラーゲン 100 μL を投与し、初回免疫の 21 日後にフロイント不完全アジュバントと混合したコラーゲン溶液 50 μL を接種することにより関節炎を誘発させた。1 つ以上の足蹠に関節炎を発症したマウスを溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）群又はバリシチニブの 1、3 及び 10 mg/kg 群の計 4 群（8 例/群）に群分けし、1 日 2 回、15 日間経口投与した。各足蹠の炎症の重症度を 0～3 のスコアで点数化し（各動物で最高 12 点）、足蹠の関節炎を評価した。すなわち、腫脹又は発赤がない場合は 0 点、軽度の発赤がある場合は 1 点、中等度の発赤及び腫脹がある場合は 2 点、中等度から重度の発赤及び腫脹がある場合は 3 点とした。ELISA により血清中の抗 II 型コラーゲン抗体価を測定した。各群 4 例の血清を希釈後、分析を実施するまで凍結保存した。足蹠における関節炎、パンヌス形成、骨損傷及び軟骨損傷について組織学的評価を行った。

足蹠炎症の重症度、組織学的変化をそれぞれ図 2.6.2-8A、C、D に示した。バリシチニブは溶媒群と比較して、炎症の重症度及び組織学的変化を用量依存的に抑制した。炎症の重症度を示すスコアの低下は投与開始 4 日後に見られ、3 及び 10 mg/kg 群の炎症のスコアは溶媒群のそれぞれ 67%及び 61%まで有意に（$p < 0.0001$）低下した。1 mg/kg 群の炎症のスコアは 19%低下したが、有意差は認められなかった（$p = 0.55$）。溶媒群と 10 mg/kg 群の足蹠の組織学的評価の結果、炎症、パンヌス形成、軟骨損傷及び骨損傷は溶媒群に比較し、それぞれ 43%、53%、41%、及び 53%のスコアの低下が見られ、これらはいずれも統計学的に有意（$p < 0.01$、t 検定）であった。バリシチニブは、関節損傷の総合スコアを有意（$p < 0.01$）に 47%低下させた（図 2.6.2-8C、$n = 6$）。関節部の代表的な組織像を図 2.6.2-8D に示した。バリシチニブは抗 II 型コラーゲン抗体価に影響を及ぼさなかった（$P = 0.4$、図 2.6.2-8B）ことから、バリシチニブは抗体反応に直接影響しないことが示唆された。



関節炎を呈する雄 DBA/1 マウスを溶媒群又はバリシチニブ（1、3 又は 10 mg/kg 群、8 例/群）の計 4 群に群分けし、1 日 2 回 15 日間経口投与した。
バリシチニブ投与により、足蹠の炎症の重症度が顕著に低下したが（A: 3 及び 10 mg/kg の用量で $p < 0.0001$）、血清中の抗コラーゲン抗体価の抑制は認められなかった（$p > 0.05$）ことから、体液性免疫は抑制されないことが示唆された（B: n = 5）。溶媒群及びバリシチニブ 10 mg/kg 群の足蹠における関節炎、パンヌス形成、骨損傷及び軟骨損傷について組織学的評価を行い、総合スコアを算出した（C: n = 6）。バリシチニブは、組織学的重症度を 47%（$p < 0.01$）抑制した［溶媒群：15.67 ± 1.61、バリシチニブ 10 mg/kg 群：8.29 ± 1.49（平均値±標準誤差）］。溶媒群及び 10 mg/kg 群の前肢足蹠及び後肢足蹠の損傷例を示す（D: 矢印は変化を示した関節を示し、W は足関節を示す。顕微鏡倍率は 16 倍。両側 Student t 検定を用いて、バリシチニブ投与群と溶媒群を比較した）。

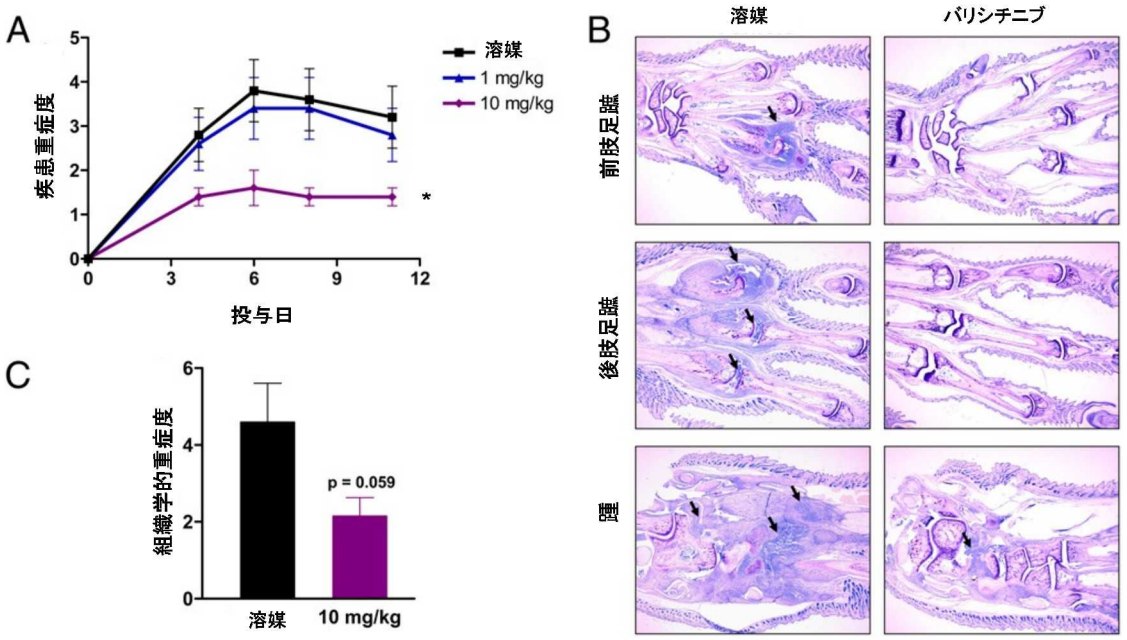
図 2.6.2-8　コラーゲン誘発関節炎マウスにおける炎症の重症度及び組織学的変化に及ぼすバリシチニブの影響（LOB06 試験）

以上、マウス CIA モデルにおいて、バリシチニブは 3 及び 10 mg/kg の投与で足蹠炎症の重症度を低下させ、足蹠の組織学的評価の結果、10 mg/kg の投与で足蹠の炎症、パンヌス形成、軟骨損傷及び骨損傷を抑制した。関節炎の進展には B 細胞及び T 細胞が関与するが、バリシチニブは適応性自己免疫応答に関わるこれらサイトカインのシグナル伝達を調節することにより有効性を示すと考えられた。

2.6.2.2.2.3 抗コラーゲン抗体誘発関節炎マウスにおける有効性

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1)

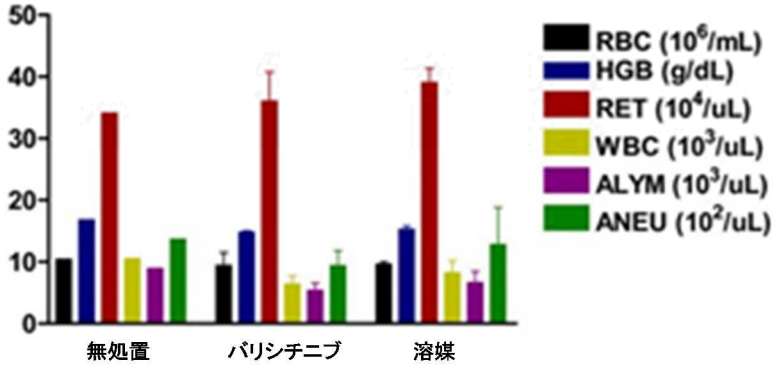
CAIA マウスにおけるバリシチニブの作用を評価した。本モデルでは、抗コラーゲン II 抗体混合物の投与により自己抗体の産生を伴わない全身性の関節炎が誘発される（Khachigian 2006）。雌 BALB/c マウス（7～8 週齢）に、200 µL の関節由来抗コラーゲン抗体を腹腔内投与し、その 2 日後に 25 µg のリポポリサッカライド（LPS、大腸菌由来）を腹腔内投与した。LPS 投与 24 時間後にマウスを溶媒群（0.5%メチルセルロース水溶液）又はバリシチニブ群（1 及び 10 mg/kg）に群分けし（5 例/群）、溶媒又はバリシチニブを 1 日 2 回 12 日間経口投与した。CIA モデルと同様の足蹠炎症の重症度スコアに従い、12 日間に渡ってスコア付けし、試験終了時に組織学的変化を評価した。図 2.6.2-9A～C に示したように、バリシチニブ 10 mg/kg 群では溶媒投与群と比較して足蹠炎症の重症度スコアの有意な抑制（56%、$p < 0.05$、t-検定、両側検定）が認められた。1 mg/kg 群では足蹠炎症の重症度スコアの 13%の抑制が見られたものの、有意差は認められなかった（$p > 0.05$）。溶媒投与群では、軽微から中等度のパンヌス形成、軟骨損傷及び骨損傷を伴う軽度から重度の炎症が認められた。10 mg/kg 群では、有意なパンヌス形成及び骨損傷の抑制（それぞれ 74%及び 78%、いずれも $p < 0.05$）が確認された。しかしながら、軟骨損傷及び炎症徴候の抑制（それぞれ 43%及び 33%）には溶媒投与群との間に統計学的有意差は見られず（$p > 0.05$）、その結果、組織学的重症度の総合スコアは抑制されたものの（53%）、有意ではなかった（$p = 0.059$）。溶媒投与群及びバリシチニブ 10 mg/kg 群の前肢足蹠、後肢足蹠及び踵の組織像を示した（図 2.6.2-9B）。



関節炎を発症する抗コラーゲン抗体の混合物を接種したマウス（5 例/群）にバリシチニブ 10 mg/kg を 1 日 2 回経口投与したとき、足蹠炎症の重症度スコア（A: 10 mg/kg 群で 56%の抑制、$p < 0.05$）及び組織学的変化（B 及び C: 10 mg/kg 群）が抑制された。図 B の矢印は、著しい炎症／骨損傷部位を示す（溶媒群及びバリシチニブ群の組織像の代表例を示す。顕微鏡倍率は 16 倍）。
両側 Student t 検定を用いて、バリシチニブ群と溶媒群を比較した。* $p < 0.05$。

図 2.6.2-9 抗コラーゲン抗体誘発関節炎マウスにおけるバリシチニブの有効性（LOB06 試験）

本試験終了時に、溶媒群及びバリシチニブ 10 mg/kg 群のマウスから血液を採取し、ヘモグロビン、網状赤血球、赤血球、総白血球並びに好中球及びリンパ球に及ぼす影響を無処置マウスと比較した。図 2.6.2-10 に示したように、無処置群、溶媒群及びバリシチニブ 10 mg/kg 群の 3 群間で、これら血球成分及びヘモグロビン値に差は認められなかった。



略語：ALYM = リンパ球の絶対数、ANEU = 好中球の絶対数、CAIA = 抗コラーゲン抗体誘発関節炎、HGB = ヘモグロビン、RBC = 赤血球、RET = 網状赤血球、WBC = 白血球
CAIA マウスの試験で得られた血液の血球成分及びヘモグロビンを測定した（溶媒群及びバリシチニブ 10 mg/kg 群は 5 例/群、無処置群は 2 例）。統計学的に有意な作用は認められなかった（$p > 0.05$、t 検定）。

図 2.6.2-10 血液学的パラメータに対するバリシチニブの作用（LOB06 試験）

バリシチニブは、CAIA マウスにおいて足蹠炎症の重症度スコア及び組織学的変化を抑制した。また、関節炎に対する作用は、白血球及び赤血球数の減少を伴わなかった。

2.6.2.2.2.4 アジュバント関節炎ラットにおける有効性

雌の rAIA ラットを用いて、in vivo でのバリシチニブの治療効果を持続皮下投与及び経口投与による 2 試験において評価した。常法（Hegen et al. 2008）に従い、雌 Lewis ラット（体重 150～200 g）にアジュバントによる関節炎を誘発した。*Mycobacterium butyricum*（10 mg/mL）をフロイント不完全アジュバント中に乳濁させた液（100 µL）をラット尾根部に接種し、関節炎を誘発させた（LOB14 試験）。

2.6.2.2.2.4.1 アジュバント関節炎ラットを用いた持続皮下投与試験

評価資料：LOB14 (4.2.1.1.9)

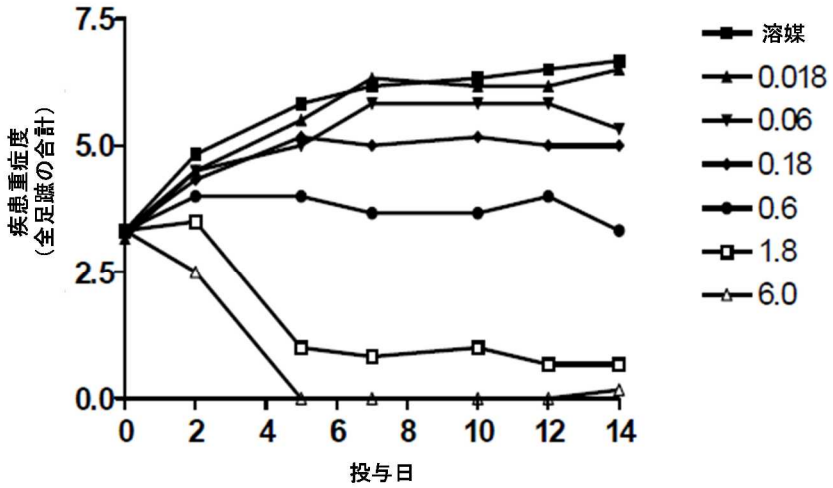
14 日間の持続皮下投与が可能な浸透圧ポンプを用い、バリシチニブの持続皮下投与による関節炎の炎症スコア及び病理組織学的変化の抑制作用を評価した。抗原及びアジュバントの接種 14 日後に皮下に浸透圧ポンプを埋め込んだ。週 2 回、四肢足蹠の炎症を観察し、スコア化した（0 = 正常、1 = 指趾の発赤及び軽微な腫脹、2 = 指趾／足蹠の中等度腫脹、3 = 指趾／足蹠の重度の腫脹）。各群の四肢足蹠のスコアを合計し、平均値±標準誤差で示した。足蹠の炎症スコアが 3 以上のラット（11～13 週齢、6 例/群）に溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）、又はバリシチニブ 0.018、0.06、0.18、0.6、1.8 及び 6.0 mg/kg/日（投与開始時の体重 200 g に基づく）を投与した。定常状態におけるバリシチニブの血漿中濃度を測定するために血漿を採取した。浸透圧

ポンプを埋め込んでから 14 日後（浸透圧ポンプからバリシチニブの放出が停止する前）に試験を終了した。足蹠炎症の組織学的重症度によりスコア（0～7）付けし、試験終了時に組織学的変化を評価した。関節周囲の病理組織像の重症度、及び足根関節屈曲部の横断面の厚さ（背部皮膚表面-腹部皮膚表面の距離を顕微鏡下で観察）を組み合わせた判定基準により、足蹠炎症の組織学的重症度を次のようにスコア付けした（表 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7　足蹠炎症の組織学的重症度

スコア	組織学的重症度	足根関節屈曲部の厚さ（μm）
0	正常	5670～7560
1	炎症性細胞浸潤（minimum）	
2	炎症性細胞浸潤（mild）	
3	浮腫を伴う細胞浸潤（moderate）	6993～7560
4	浮腫（marked）を伴う細胞浸潤（marked）	7623～8190
5	浮腫（severe）及び限局性又は多巣性の微小膿瘍を伴う細胞浸潤（severe）、関節周囲組織の拡張	8253～8820
6	浮腫（severe）及び多数の微小膿瘍を伴う細胞浸潤（very severe）、関節周囲組織の拡張	8883～9450
7	浮腫（severe）を伴う細胞浸潤（very severe）、関節周囲組織の拡張	>9450

図 2.6.2-11 に示すように、バリシチニブは足蹠の炎症スコアを用量依存的に抑制した。表 2.6.2-8 に示すように、炎症スコアの抑制率は持続投与により上昇したバリシチニブの血漿中濃度と相関した。バリシチニブの血漿中濃度が 6、13、53 及び 181 nM のときの足蹠の炎症スコアの抑制率（溶媒群に対する抑制率）はそれぞれ 20%、25%、50%及び 90%であった。この成績はラットの全血を用いた試験において IL-6 刺激による STAT3 のリン酸化を抑制する濃度（IC_{50} 値：128 nM）とほぼ一致した（表 2.6.2-4）。



用量は 0.018～6.0 mg/kg/日

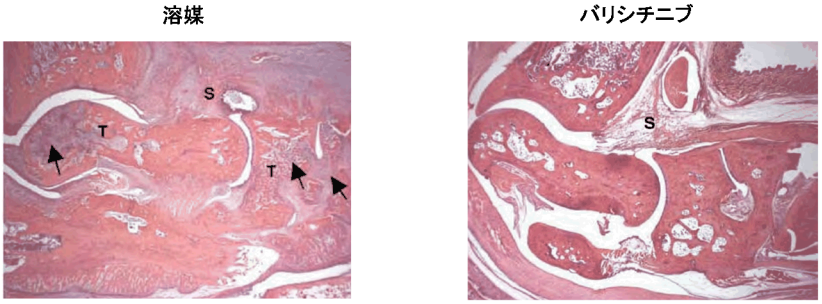
図 2.6.2-11　アジュバント関節炎ラットに対するバリシチニブ持続投与による作用（LOB14 試験）

また、組織学的評価の結果、バリシチニブの血漿中濃度が 53、181 及び 480 nM のとき、足蹠炎症の抑制率は溶媒群に対してそれぞれ 65%、88%及び 100%で有意（いずれも $p < 0.05$）な炎症の抑制が認められた（表 2.6.2-8）。以上、足蹠の炎症の程度を病理組織学的に評価した結果、溶媒群と比較してバリシチニブの有効性が確認された（表 2.6.2-8、図 2.6.2-12）。

表 2.6.2-8 アジュバント関節炎ラットにおけるバリシチニブ持続投与による作用－炎症スコア及び組織学的スコアの抑制並びに血漿中濃度（LOB14 試験）

用量（mg/kg/日）	血漿中バリシチニブ濃度±標準偏差（nM）	足蹠の炎症スコアの抑制（%）	組織学的炎症の抑制（%）
0.018	1	2.5	15
0.06	6 ± 1	20	22
0.18	13 ± 2	25	31
0.6	53 ± 8	50	65*
1.8	181 ± 19	90	88*
6.0	480 ± 145	97.5	100*

* $p < 0.05$（Student t 検定を用いて、バリシチニブの各投与群と溶媒群を比較した）。



溶媒を投与した rAIA ラットの足関節組織切片において、顕著な骨吸収（矢印）が足根骨（T）に高頻度で認められた。滑膜炎及び関節周囲炎症は顕著であった（左図、S）。バリシチニブ群（6.0 mg/kg/日）から得られた足関節についても同様に検査したところ、骨吸収又は滑膜炎（右図、S）が認められたが軽微であった。

図 2.6.2-12 アジュバント関節炎ラットにおける溶媒群及びバリシチニブ群の足関節の組織学的比較（LOB14 試験）

2.6.2.2.2.4.2 アジュバント関節炎ラットを用いた経口投与試験

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1), LOB14 (4.2.1.1.9)

抗原及びアジュバントの接種 14 日後に関節炎を発症したラットを用い、バリシチニブを 1 日 1 回又は 1 日 2 回 14 日間反復経口投与した。

持続皮下投与試験と同様に、バリシチニブは反復経口投与により炎症スコア及び病理組織学的に評価した足蹠の炎症を用量依存的に抑制した（図 2.6.2-13、表 2.6.2-9）。

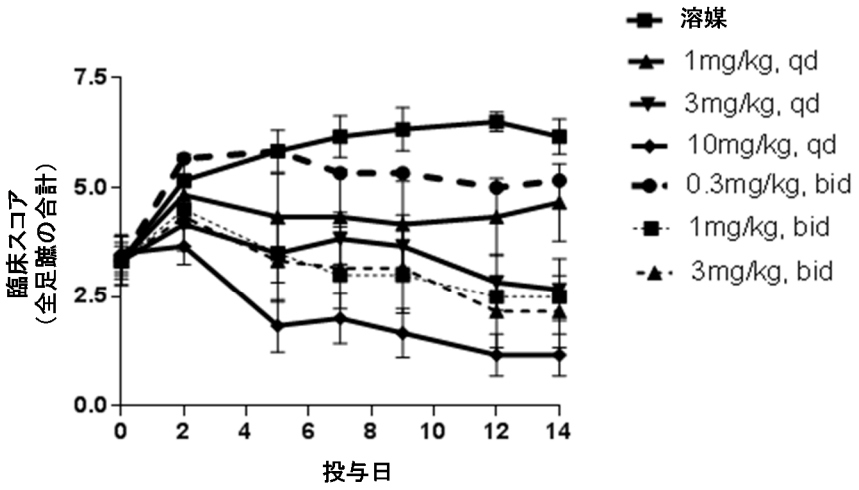
表 2.6.2-9 アジュバント関節炎ラットにおけるバリシチニブ経口投与による作用（LOB14 試験）

用量 (mg/kg)	投与頻度	AUC[a] (μM*h)	炎症スコアの抑制（%）（溶媒群との比較）	組織学的炎症の抑制（%）（溶媒群との比較）
0.3	b.i.d.	0.20	14	32
1	q.d.	0.67	25.3	27
1	b.i.d.	1.34	44.5	55*
3	q.d.	2.01	39.2	65*
3	b.i.d.	4.02	44.5	57*
10	q.d.	6.70	61.7	82*

略語：AUC = 血漿中濃度－時間曲線下面積

[a] AUC はラット 1 ヵ月反復投与毒性試験（T07-11-01 試験）で用いた 2 mg/kg/日の用量で得られたトキシコキネティクス（DMB-08-06-1 試験）に基づき、AUC が低用量で線形であると仮定して算出した。ラットへの投与は 1 日 1 回（q.d.）又は 1 日 2 回（b.i.d.）14 日間反復投与とした。

* $p < 0.05$（Student t 検定を用いて、バリシチニブ群と溶媒群を比較した）。



day	0	2	5	7	9	12	14
Vehicle vs. 1, qd	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Vehicle vs. 3, qd	ns	ns	ns	ns	ns	**	**
Vehicle vs. 10, qd	ns	ns	**	**	***	****	****
Vehicle vs. 0.3, bid	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Vehicle vs. 1, bid	ns	ns	ns	*	*	***	**
Vehicle vs. 3, bid	ns	ns	ns	*	*	***	**

p<0.05 ANOVA

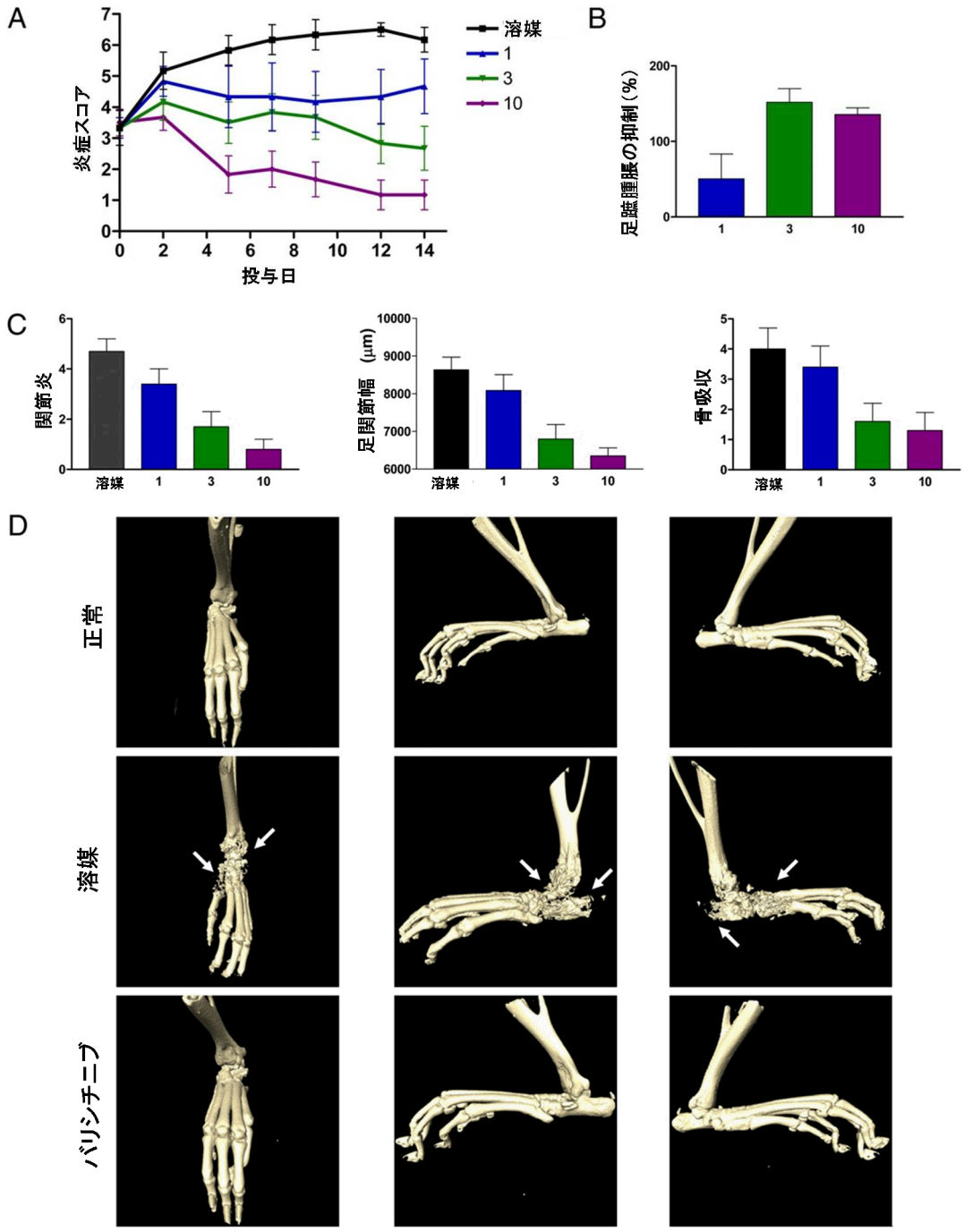
略語：bid = 1 日 2 回投与、ns = 有意差なし、qd = 1 日 1 回投与

**** $p < 0.0001$、*** $p < 0.001$、** $p < 0.01$、* $p < 0.05$

図 2.6.2-13 アジュバント関節炎ラットにおけるバリシチニブ経口投与による作用（LOB14 試験）

関節炎発症後の rAIA ラットを用いて、バリシチニブを 1、3 及び 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回 14 日間反復経口投与した試験（LOB06 試験）において、投与 2 日目以降に炎症スコアの低下が認められ、10 mg/kg 群で炎症スコアが最も低かった（図 2.6.2-14A）。10 mg/kg 群の血漿中濃度は、バリシチニブの最終投与 12 時間後に IL-6 刺激による STAT3 リン酸化を抑制する IC_{50} 値（128 nM）を上回っていた。14 日間の投与終了後にプレチスモグラフィーを用いて足蹠容積を測定した結果、溶媒群の足蹠容積に対して、バリシチニブ 1 mg/kg 群では 50%、3 及び 10 mg/kg 群では完全な（100%）抑制が認められた（図 2.6.2-14B）。屠殺時に関節の病理組織学的検査を実施した結果、免疫学的浸潤、浮腫、関節周囲組織の総合スコアで評価した関節の炎症は溶媒群と比較して 1 mg/kg 群では 27%の抑制で統計学的な有意差が認められなかった（$p > 0.05$）ものの、3 mg/kg 群及び 10 mg/kg 群ではそれぞれ 64%及び 82%のいずれも有意な（$p < 0.05$、t 検定）抑制が認められた（図 2.6.2-14C）。また、足関節幅及び骨吸収においても同様の抑制が見られた（図 2.6.2-14C）。溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）又はバリシチニブ 10 mg/kg を投与した rAIA ラット群を別途設定し、これらラットから得たホルマリン固定後の関節標本について、マイクロ CT を使用した関節の X 線撮影による画像解析を行った結果（[redacted]社、米国ミシガン州アン・アーバー）、関節構造の正常化及び骨破壊の抑制（白矢印）が認められた（図 2.6.2-14D）。

これらの結果から、関節炎発症後の rAIA ラットにバリシチニブを投与したときに有効性が認められた。本モデルの組織学的検査、足蹠及び足関節の容積／腫脹の変化、マイクロ CT スキャンによる X 線撮像における関節炎の進行などの各評価項目に用量依存的な有効性が認められた。また、rAIA ラットでは 1 日 1 回の投与で有効性が得られ、この有効性は、前述の CIA マウス及び CAIA マウスにおいて 1 日 2 回投与で認められた有効性の成績と一致した（CTD 第 2.6.2.2.2.2 項、2.6.2.2.2.3 項）。



明らかな炎症徴候を呈したラットに、溶媒又はバリシチニブ（1、3 又は 10 mg/kg）を 1 日 1 回、14 日間反復経口投与した（6 例/群）。

A：投与開始 2 日目から用量依存的な炎症スコアの抑制が認められ、最終投与日まで効果が持続した。

B：プレチスモグラフィーを用いて試験終了時に足蹠容積を測定し、バリシチニブ群と溶媒群を比較した。投与開始日（投与前）から最終投与日の足蹠容積を差し引き、溶媒群に対するバリシチニブ群の阻害率（%）を算出した。

C：盲検により、足関節及び足蹠組織切片の組織学的検討を行った結果、関節炎（C 左）、足関節幅（C 中央）及び骨吸収（C 右）の用量依存性な改善が認められ、炎症スコアの改善結果と一致した。結果は平均値±標準誤差で示した。

D：バリシチニブを投与したラットから得られた足関節のマイクロ CT 画像の代表例から、バリシチニブ（10 mg/kg/日）が関節構造を正常化し、骨破壊（白矢印）を妨げたことが示された。

図 2.6.2-14　アジュバント関節炎ラットにおいて、関節炎発症後にバリシチニブを 1 日 1 回 14 日間反復投与したときの抗炎症作用（LOB06 試験）

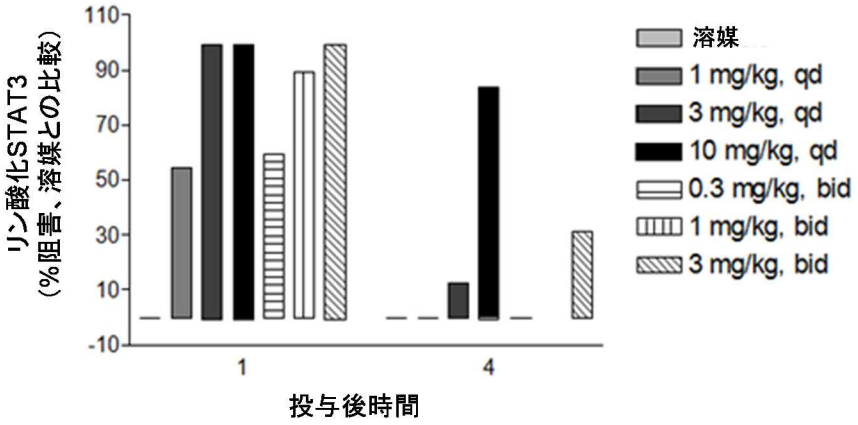
2.6.2.2.2.4.3 アジュバント関節炎ラットにおけるバリシチニブの STAT リン酸化の抑制作用

評価資料：LOB06 (4.2.1.1.1), LOB14 (4.2.1.1.9)

バリシチニブが rAIA モデルにおいて有効性を示した際に、バリシチニブにより JAK/STAT シグナル伝達が完全に、あるいは持続的に遮断されたか否かを明らかにする目的で、以下の検討を行った。すなわち、関節炎を発症したラットに、バリシチニブの 1、3 及び 10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間投与又は、0.3、1 及び 3 mg/kg を 1 日 2 回 14 日間投与し、最終投与（試験 14 日）の 1 及び 4 時間後に全血を採取し、IL-6 刺激によるリン酸化 STAT3 を定量した（図 2.6.2-15、LOB14 試験）。

溶媒群（0.5%メチルセルロース水溶液）と比較して、バリシチニブ 3 及び 10 mg/kg 群（1 日 1 回 14 日間投与）又は 1 及び 3 mg/kg 群（1 日 2 回 14 日間投与）の投与 1 時間後に 90%を上回る STAT3 リン酸化の抑制が認められた（LOB14 試験）。

さらに、関節炎を発症した rAIA ラットにバリシチニブの 1、3 及び 10 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間経口投与した試験（LOB06 試験）において、溶媒群と比較して、3 及び 10 mg/kg 群の投与 4 時間後では全血中 STAT3 リン酸化がそれぞれ 13%及び 84%抑制されたが、投与 24 時間後では、いずれの用量においても STAT3 リン酸化の抑制は認められなかった（表 2.6.2-10）。これらの結果から、関節リウマチを反映する本モデルにおいて、バリシチニブは、JAK/STAT シグナル伝達を持続的に抑制することなく、関節炎に対する有効性を示すと考えられ、検討したバリシチニブの用量では rAIA ラットにおける STAT3 リン酸化の抑制は可逆的であることが示唆された。



略語：bid = 1 日 2 回投与、qd = 1 日 1 回投与

図 2.6.2-15 rAIA ラットにバリシチニブを反復経口投与したときの
全血中リン酸化 STAT3 に対する作用（LOB14 試験）

表 2.6.2-10 rAIA ラットにバリシチニブを 1 日 1 回 14 日間反復経口投与したときの
全血中リン酸化 STAT3 の抑制作用（LOB06 試験）

用量（mg/kg）	投与 1 時間後の抑制率（%）	投与 4 時間後の抑制率（%）	投与 24 時間後の抑制率（%）
1	55 ± 6	0.1 ± 37	0
3	100	13 ± 37	0
10	100	84 ± 18	0

値は平均値±標準偏差、n = 3

2.6.2.2.2.4.4 アジュバント関節炎ラットにおけるリンパ節由来サイトカイン mRNA レベルの上昇に及ぼすバリシチニブの影響

評価資料：LOB14 (4.2.1.1.9)

rAIA ラットを用いた追加試験を実施し、バリシチニブで認められた足蹠の炎症抑制作用が自己免疫疾患に関与するサイトカインの mRNA 低下と相関するか否かについて検討した。溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）又はバリシチニブ（10 mg/kg）を 1 日 1 回 14 日間反復投与後に鼠蹊部リンパ節を得て、IFNγ、IL-12A、IL-17、IL-21 及び IL-22 の mRNA レベルをリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法（PCR 法）で定量した。鼠蹊部リンパ節を採取後、液体窒素で凍結し、キアゲンの RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出した。rAIA ラットの溶媒群及びバリシチニブ群のサイトカイン mRNA レベルから無処置ラットにおける背景値を差し引いた。背景値は無処置ラット（正常ラット）から得た。各サイトカイン転写産物の Ct 値（PCR 増幅産物量が閾値に達したときのサイクル数）を標準曲線と比較することにより定量した。rAIA ラットの溶媒群のサイトカイン mRNA は無処置ラットと比較して増加し、バリシチニブ群では、溶媒群と比較してサイトカイン mRNA が 55%～83%低下した。この抑制率は IL-17A と IL-22 を除いて統計学的に有意であった（表 2.6.2-11）。サイトカイン mRNA の抑制率は、本モデルにおける炎症スコア（61.7%）及び組織学的変化の抑制率（82%）とほぼ一致した（CTD 第 2.6.2.2.2.4.2 項、表 2.6.2-9）。

表 2.6.2-11 rAIA ラットにおけるリンパ節由来サイトカイン mRNA レベルの上昇に及ぼすバリシチニブ（10 mg/kg）の影響（LOB14 試験）

	無処置群の中央値に対する発現				
	無処置群	溶媒群	バリシチニブ群（試験 14 日）	抑制率[a]（%）	試験 14 日の溶媒群に対する P 値
IFNγ	1.01 ± 0.07106	6.978 ± 2.190	3.095 ± 0.4889	−65%	0.0346
IL-12A	1.02 ± 0.07875	4.385 ± 1.064	1.839 ± 0.1078	−76%	0.0035
IL-17A	1.023 ± 0.2328	244.7 ± 59.71	109.7 ± 42.16	−55%	0.5821
IL-21	1.126 ± 0.2908	4.494 ± 1.110	1.959 ± 0.2540	−75%	0.0371
IL-22	15.43 ± 14.45	330.1 ± 153.7	69.30 ± 43.55	−83%	0.0672

[a] 試験 14 日における溶媒群に対するバリシチニブ群の抑制率（%）で示した（背景値として無処置群の値をそれぞれから差し引いた値を使用）。

値は無処置群の中央値に対する発現（倍数）の平均値±標準誤差、n = 4

以上、rAIA ラットにおいて、バリシチニブは 10 mg/kg の用量でリンパ節由来の関連サイトカイン転写産物を低下させたことから、この作用は、バリシチニブの有効性に関与すると考えられた。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 受容体、イオンチャネル、酵素及びトランスポーターへの影響

評価資料：T07-07-12 (4.2.1.2.3), T07-05-06 (4.2.1.2.1), T07-07-11 (4.2.1.2.2), QSB30 (4.2.1.2.4)

各種受容体、イオンチャネル、酵素及びトランスポーターに対するバリシチニブの影響を 3 つの in vitro 試験において検討した。T07-07-12 試験、T07-05-06 試験及び T07-07-11 試験ではそれぞれ、0.1 及び 10 μM、0.1 及び 1 μM、0.2 μM のバリシチニブを用いた。T07-07-12 試験及び T07-05-06 試験においては、バリシチニブによる特定の受容体、イオンチャネル、トランスポーターに対する結合阻害作用は見られなかった。T07-07-11 試験では、バリシチニブ 0.2 μM の酵素活性阻害作用を検討し、JAK2 及び JAK3 活性がそれぞれ 102%及び 67%抑制された。しかしながら、これらはバリシチニブの 1 濃度（0.2 μM）で得られた結果であり、正確な IC_{50} 値は得られなかった。その他のキナーゼは 0.2 μM で影響は認められなかった。

次に、[redacted] 社の広範囲なプロテインキナーゼプロファイリング（Patricelli et al. 2007）を用い、バリシチニブ（5 nM～5 μM）存在下で各種キナーゼに対する阻害作用及び選択性を検討した（QSB30 試験）。バリシチニブはヒト PBMC 溶解液及び THP-1 溶解液中の JAK1 及び JAK2 を強力に抑制した（表 2.6.2-12）。バリシチニブは検討した他の酵素に対して活性を示さなかった。JAK1 の IC_{50} 値は 27 ± 2 nM（活性化ループ）及び 31 ± 8 nM（ATP 結合部位）、JAK2 の IC_{50} 値は 36 ± 10 nM 及び 53 ± 23 nM（n = 3）であった。JAK3 に対する作用は 1.60 ± 0.458 μM 及び 1.44 ± 0.45 μM で抑制は弱かった。バリシチニブは、THP-1 細胞由来の TYK2 を阻害し、IC_{50} 値は 65 nM 及び 32 nM（n = 1）であった。また、バリシチニブはカルモジュリン依存性プロテインキナーゼの 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_{50} 値はそれぞれ 170 ± 26 nM 及び 150 ± 53 nM（n = 3）で、その他のヒト CaMK に対する作用はごく軽微（IC_{50} 値 > 500 nM）もしくは、活性を示さなかった（IC_{50} 値 > 5 μM）。バリシチニブは、PBMC 及び THP-1 細胞を用いた他のキナーゼに対して活性を示さなかった（QSB30 試験）。

表 2.6.2-12 各種キナーゼに対するバリシチニブの選択性（QSB30 試験）

キナーゼ	配列	標識部位	IC_{50}±標準偏差 (μM) バリシチニブ
JAK1 ドメイン 2	IGDFGLTKAIETDKEYYTVK	活性化ループ	0.0273 ± 0.002
JAK1 ドメイン 2	YDPEGDNTGEQVAVKSLKPESGGNHIADLKK	Lys1	0.031 ± 0.008
JAK2 ドメイン 2	YDPLQDNTGEVVAVKK	Lys1	0.036 ± 0.010
JAK2 ドメイン 2	IGDFGLTKVLPQDKEYYK	活性化ループ	0.053 ± 0.023
JAK3 ドメイン 2	YDPLGDNTGALVAVKQLQHSGPDQQR	Lys1	1.60 ± 0.458
JAK3 ドメイン 2	IADFGLAKLLPLDKDYYVVR	活性化ループ	1.443 ± 0.45
CaMK1a	LVAIKCIAK	Lys1	1.79 ± 0.121
CaMK1a	DLKPENLLYYSLDEDSK	Lys2	2.85 ± 0.252
CaMK1d	DLKPENLLYYSQDEESK	Lys2	0.74 ± 0.329
CaMK1d	LFAVKCIPK	Lys1	0.64 ± 0.121
CaMK2a, CaMK2b, CaMK2d, CaMK2g	DLKPENLLLASK	Lys2	0.56 ± 0.154
CaMK2d	IPTGQEYAAKIINTKK	Lys1	0.17 ± 0.026
CaMK2g	TSTQEYAAKIINTK	Lys1	0.15 ± 0.053
CaMK4	GTQKPYALKVLK	Lys1	>5
CaMK4	DLKPENLLYATPAPDAPLK	Lys2	>5
CaMKK2	DIKPSNLLVGEDGHIK	Lys2	>5
CaMKK2	LAYNENDNTYYAMKVLSK	Lys1	>5
TYK2 ドメイン 2*	IGDFGLAKAVPEGHEYYR	活性化ループ	0.0650
TYK2 ドメイン 2*	VSLYCYDPTNDGTGEMVAVKALK	Lys1	0.0320

略語：CaMK = カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ、CaMKK = カルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ、IC_{50} = 50%阻害濃度、JAK = ヤヌスキナーゼ、TYK = チロシンキナーゼ
3 点の用量反応から IC_{50} 値を求め、算術平均値±標準偏差（n = 3）で示した。
* TYK2 ドメイン 2 の結果は 1 回の試験である。

これらの試験から、バリシチニブは JAK1 及び JAK2 に選択的な阻害剤であることが示された。CaMK2d 及び CaMK2g に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.17 及び 0.15 μM であったが、他のヒト CaMK に対する阻害は認められなかった。バリシチニブの CaMK 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。JAK に対する IC_{50} 値が試験間で異なっていた理由はアッセイ系及び試験条件の差を反映していると考えられ、いずれの試験においても、バリシチニブの JAK1 及び JAK2 に対する選択性が認められた。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の影響は認められなかったことから、バリシチニブの自己免疫疾患治療薬としての作用機序は、JAK1 及び JAK2 阻害作用により説明できると考えられる。

2.6.2.4 安全性薬理試験

日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7 ガイドライン及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に則って、一連の安全性薬理試験を実施した。得られた成績から、バリシチニブは臨床曝露量では中枢神経系、心血管系及び呼吸系機能に臨床上問題となるような影響を及ぼさないことが示唆された。予定臨床用量（4 mg/日）での曝露量［最高血漿中濃度（C_{max}）］の約 21 倍（イヌ）～167 倍（ラット）の曝露量（C_{max}）において、ラットを用いた中枢神経系の評価では自律神経活性の変化、自発運動の一過性の減少及び流涙が、ラットを用いた呼吸系の評価では呼吸数の減少及び分時換気量の低下が、イヌを用いた心血管系の評価では動脈圧（投与 2～3 時間後）及び脈圧（投与 7～18 時間後）の軽度な低下並びに心拍数（投与 0～18 時間後）の軽度な増加がそれぞれ認められた。イヌにおいて QTc 間隔の延長は見られず、ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル電流に対する IC_{50} 値は 161.5 μM（予定臨床用量での C_{max} の約 1400 倍に相当）であった。

2.6.2.4.1 心血管系に及ぼす影響の検討

2.6.2.4.1.1 hERG チャネル電流に及ぼす影響の検討

評価資料：T07-12-08 (4.2.1.3.1)

hERG を発現させたヒト胎児腎臓由来（HEK）-293 細胞を用いて、バリシチニブの hERG チャネル電流に対する阻害作用を検討した（T07-12-08 試験）。バリシチニブの処理濃度は 30、100 及び 300 μM とし、生理的温度で試験を実施した。バリシチニブは、hERG チャネル電流を 30、100 及び 300 μM でそれぞれ 13.6 ± 1.6%、39.1 ± 1.5%及び 64.6 ± 0.5%阻害し、その IC_{50} 値は 161.5 μM であった。非結合型濃度に基づくと、IC_{50} 値は予定臨床用量（4 mg/日）での C_{max} の約 1400 倍に相当する。溶媒対照の阻害率は 0.4 ± 0.1%で、陽性対照（60 nM のテルフェナジン）の阻害率は 88.2 ± 1.1%であった。

2.6.2.4.1.2 イヌを用いた心血管系に及ぼす影響の検討

評価資料：T07-11-14 (4.2.1.3.2)

バリシチニブを無麻酔イヌに単回経口投与した際の心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響を評価した（T07-11-14 試験）。イヌ 7 日間反復投与毒性試験（T07-10-09 試験）において、30 mg/kg で死亡が観察され、10 mg/kg で免疫抑制及び一般状態の毒性変化が見られたことから、本試験（T07-11-14 試験）における高用量は 3 mg/kg とし、低用量は臨床曝露量に相当する曝露が得られる用量である 0.15 mg/kg とした。雌雄各 4 例のテレメトリー装置埋植ビーグル犬に 0（0.5%メチルセルロース水溶液）、0.15、0.45 及び 3 mg/kg の用量で、胃挿管法（投与容量：10 mL/kg）によりバリシチニブを単回経口投与した。ラテン方格法（Cochran and Cox 1957）に従って投与用量を割り付け、各投与間に 7 日間の休薬期間を設けた。なお、イヌにおけるバリシチニブの半減期は約 3 時間である（CTD 第 2.6.4 項、表 2.6.4-5）。

すべての動物について、死亡及び瀕死状態の有無を 1 日 2 回観察した。投与前に詳細な身体的検査を実施し、一般状態の観察は投与時並びに投与日の投与 4 及び 24 時間後に実施した。各動物の体重を無作為化時及び投与日に記録した。投与後 24 時間以上にわたり、10 分ごとに 30 秒間の心拍数（動脈波形から得た）、動脈圧（収縮期圧、拡張期圧、脈圧及び平均動脈圧）、体温及

び心電図波形［PR 間隔、QRS 間隔、RR 間隔、QT 間隔及び心拍補正 QT 間隔（QT_CV、Van de Water 式による補正）］を得た。臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査）は投与開始前に実施した。

トキシコキネティクス（TK）評価用の血液検体は、各投与日の投与前（ベースラインデータ収集の 2 時間以上前）並びに投与約 4 及び 24 時間後（心血管系データ収集終了時）に全動物から採取した。概して、血漿中濃度に雌雄差は見られず、イヌ 1 ヵ月間反復投与毒性試験（T07-12-03 試験）における同用量での投与 1 日目の値とほぼ同等であった。バリシチニブの血漿中濃度は投与 4 時間後でより高く、0.15、0.45 及び 3 mg/kg 投与群でそれぞれ 15.9、45.6 及び 363.9 ng/mL であった。

3 mg/kg の投与後、18 時間にわたり心拍数の軽度増加が見られ、最大作用（対照群との比較で 12%の増加）は投与 4 時間後に認められた。3 mg/kg の投与 2 及び 3 時間後に収縮期圧、拡張期圧及び平均動脈圧が対照群と比較して低下した（それぞれ最大 8%、7%及び 8%の低下）。また、脈圧はおよそ投与 7～18 時間後に対照群と比較して 5%低下した。

体温及び心電図には、バリシチニブ投与に関連した生理的意義のある変化は見られず、心拍数で補正した QT 間隔（QT_CV）にも影響は見られなかった。

以上、本試験において、3 mg/kg で心拍数の増加及び動脈圧の低下が見られたが、いずれも一過性の変化で、かつその程度は小さかったことから、バリシチニブが臨床で重篤な有害作用を引き起こすことを示唆するものではなかった。0.15 及び 0.45 mg/kg ではバリシチニブの影響は見られず、イヌにバリシチニブを単回経口投与した際の心血管系パラメータに対する無影響量（NOEL）は 0.45 mg/kg と考えられた。イヌ 1 ヵ月間反復投与毒性試験の試験 1 日目（概要表 2.6.7.7F、T07-12-03 試験）及び予定臨床用量（4 mg/日）で得られた曝露量を用いた場合、NOEL（0.45 mg/kg）での血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）及び C_{max} に基づく曝露量比はそれぞれ約 1.3 倍及び 2.8 倍であった。

2.6.2.4.2 中枢神経系に及ぼす影響の検討

評価資料：T07-12-07 (4.2.1.3.3)

バリシチニブを 0（0.5%メチルセルロース水溶液）、2、10 及び 100 mg/kg の用量で雌雄 Sprague-Dawley ラットに単回経口投与した際の中枢神経系に及ぼす影響を評価した（T07-12-07 試験）。機能観察総合評価法による観察及び自発運動測定は投与開始前及び投与約 60 分後に実施した。

100 mg/kg 群の雌雄で、皮膚／粘膜の暗色化、軽度な眼瞼下垂、瞳孔反射の欠如、体温低下傾向が見られた。同群では流涙及びあえぎ呼吸がそれぞれ 1 例のみで見られたが、上記の所見と同時に認められたことから、バリシチニブ投与に関連する影響と考えられた。自発運動評価では、100 mg/kg 群の雌雄で 0～15 分間の総カウント数及び移動カウント数の減少が見られ、同群では 0～60 分間の総カウント数及び移動カウント数にも減少が認められた。2 及び 10 mg/kg ではバリシチニブ投与に関連する影響は見られなかった。

曝露量は TK 群を用いて評価した。TK に明らかな性差は見られなかった。C_{max} 及び AUC は 2 mg/kg と 10 mg/kg の間で用量に比例して増加し、10 mg/kg と 100 mg/kg の間では用量比をわずかに上回る増加を示した。最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）及び消失半減期は全投与群で同程度

であった。2、10 及び 100 mg/kg での C_{max} は、雄ラットでそれぞれ 127、734 及び 8014 ng/mL、雌ラットではそれぞれ 135、805 及び 9646 ng/mL であり、$AUC_{0\text{-}24hr}$ は、雄ラットでそれぞれ 490、2344 及び 48972 ng·h/mL、雌ラットではそれぞれ 434、2434 及び 59731 ng·h/mL であった。

以上、本試験において、100 mg/kg の投与 60 分後に自律神経活性の変化及び自発運動量の減少が見られた。2 及び 10 mg/kg ではバリシチニブの影響は見られず、ラットにバリシチニブを単回経口投与した際の中枢神経系パラメータに対する NOEL 及び無毒性量（NOAEL）は共に 10 mg/kg と考えられた。予定臨床用量（4 mg/日）で得られた曝露量を用いた場合、NOEL（10 mg/kg）での AUC 及び C_{max} に基づく曝露量比はそれぞれ約 5 倍及び 15 倍であった。

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響の検討

評価資料：T07-12-06 (4.2.1.3.4)

バリシチニブを 0（0.5%メチルセルロース水溶液）、2、10 及び 100 mg/kg の用量で雄 Sprague-Dawley ラットに単回経口投与した際の呼吸系に及ぼす影響を評価した（T07-12-06 試験）。各群 8 例とし、1 回各群 2 例の評価を 4 日間にわたり 4 回実施した。すべての動物について、死亡及び瀕死状態の有無を 1 日 2 回観察した。投与前に詳細な身体的検査を実施した。各動物の体重を無作為化時及び投与日に記録した。ヘッドアウトプレチスモグラフを用いて、投与前 1 時間及び投与後 6 時間にわたり呼吸系パラメータを測定した。

いずれの群においても死亡例は見られず、バリシチニブ投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。バリシチニブは 2 及び 10 mg/kg では呼吸数、一回換気量及び分時換気量に影響を及ぼさなかった。100 mg/kg 投与群では投与 31～120 分後に呼吸数が減少し、最大変化（22%の低下）は投与 31～45 分後に見られた。また、同群では、投与 0～105 分後に有意な分時換気量の低下が認められた。

以上、本試験において、100 mg/kg で呼吸数の減少及び生理的意義があると考えられる分時換気量の低下が見られた。2 及び 10 mg/kg ではバリシチニブの影響は見られず、ラットにバリシチニブを単回経口投与した際の呼吸系パラメータに対する NOEL 及び NOAEL は共に 10 mg/kg と考えられた。中枢神経系に及ぼす影響を検討した試験（CTD 第 2.6.2.4.2 項、T07-12-07 試験）及び予定臨床用量（4 mg/日）で得られた曝露量を用いた場合、NOEL（10 mg/kg）での AUC 及び C_{max} に基づく曝露量比は、それぞれ約 5 倍及び約 15 倍であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

バリシチニブは、強力かつ選択的な JAK1 及び JAK2 阻害剤であることが確認された。また、バリシチニブの TYK2 に対する阻害作用も軽度に認められるが、TYK2 に対する阻害作用の生理学的な意義は明確にされていない（O'Shea and Plenge 2012）。

種々の試験系から求めた JAK3 に対する IC_{50} 値から、バリシチニブは、マウス及びラットの関節炎モデルで使用した用量で JAK3 を直接阻害する可能性は低いと考えられた。しかしながら、バリシチニブは STAT リン酸化を阻害する濃度で IL-2 刺激による T 細胞増殖を阻害したことか

ら、この作用は JAK1/3 複合体を介したシグナル伝達の抑制作用であると考えられた。より強力な JAK3 阻害剤と比較した場合、JAK1/3 複合体を介してシグナルを伝達するサイトカインの阻害作用に違いが認められるか否かを検討するため、フローサイトメトリー法を用いバリシチニブ及びトファシチニブによるサイトカインシグナル伝達抑制作用（IC_{50} 値）を比較した。JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行うサイトカインの IL-4、IL-15 及び IL-21 に対しては、バリシチニブとトファシチニブとの間で IC_{50} 値が大きく異なっていた。白血球のサブポピュレーションに対するバリシチニブの IC_{50} 値は 37～73 nM であったのに対して、トファシチニブの IC_{50} 値は 14～24 nM であった。NK 細胞の増殖及び機能発現に重要な役割を示す IL-15、IL-21 についてもトファシチニブの抑制作用がバリシチニブより強力であった。JAK1/3 複合体を介してシグナル伝達を行うサイトカインに対するバリシチニブとトファシチニブの IC_{50} 値にこのような違いが見られたことは、両薬物の JAK3 の酵素阻害作用に差異があることを反映していると考えられる。JAK1/JAK3 阻害作用の強いトファシチニブを投与した患者と比較して、バリシチニブを投与した患者では NK 細胞の増殖及び機能発現に対する影響が少ないと考えられる。一方、同試験において、バリシチニブは G-CSF シグナル伝達に対してトファシチニブより強力な阻害作用を示し、このことはバリシチニブがトファシチニブよりも強い JAK2 及び TYK2 阻害作用を示すことと一致していた。バリシチニブの JAK1 及び JAK2 活性阻害作用は、全血を用いた試験において、各種サイトカイン刺激 STAT リン酸化に対するバリシチニブの抑制作用（IC_{50} 値）と一致し、また、IL-6 刺激による MCP-1 産生及び IL-23 刺激による IL-17／IL-22 産生に対する IC_{50} 値とも一致した。

関節リウマチに関与するサイトカインに対するバリシチニブの効力が in vitro で確認され、アジュバント関節炎ラット、コラーゲン誘発関節炎及び抗コラーゲン抗体誘発関節炎マウスにおいてもバリシチニブの有効性が確認された。また、ex vivo で全血の IL-6 刺激による STAT リン酸化阻害作用を検討した試験、並びに炎症の組織学的変化及び炎症スコアなどの薬力学的指標を用いた試験において、バリシチニブの有効性が確認された。アジュバント関節炎ラットを用いた試験において、IL-6 刺激による STAT3 リン酸化の IC_{50} 値（128 nM）を上回る曝露が、バリシチニブの 10 mg/kg 群で約 12 時間に渡って持続することが確認された（LOB06 試験）。本試験でバリシチニブ 10 mg/kg の投与 1 時間後に C_{max}（約 2 μM）が認められた。3 mg/kg 群及び 10 mg/kg 群の投与 4 時間後では全血中 STAT3 リン酸化がそれぞれ 13%及び 84%抑制されたが、投与 24 時間後にはいずれの投与群においても STAT3 リン酸化の抑制は認められず、本薬による STAT3 リン酸化の抑制が回復することが示された。以上のことから、これらげっ歯類の関節リウマチモデルにおいて、バリシチニブの有効性がサイトカインシグナル伝達の部分的かつ一過性阻害のみで認められ、サイトカインシグナル伝達の持続的な阻害を要しないことが示唆された。

一連の安全性薬理試験により、バリシチニブの心血管系、中枢神経系及び呼吸系機能に及ぼす影響を評価した。これらの試験において、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。しかしながら、これらの変化は予定臨床用量（4 mg/日）での曝露量（C_{max}）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。hERG チャネル電流に対する IC_{50} 値は予定臨床用量（4 mg/日）での C_{max} 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。

2.6.2.7 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. Nat Protoc. 2007;2(5):1269-1275.

Clark JD, Flanagan ME, Telliez JB. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. J Med Chem. 2014;57(12):5023-5038.

Cochran WG, Cox GM. Plans and Tables of Random Permutations. In: Experimental Designs, John Wiley and Sons: New York. 1957;pp 145, 577-582.

Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Firestein GS, Budd RC, Harris ED, McInnes IB, Ruddy S, Sergent JS, eds. Kelley's Textbook of Rheumatology, 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier;2008:1035-1086.

Floros T, Tarhini AA. Anticancer cytokines: Biology and clinical effects of Interferon-α2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. Sem Oncol. 2015;42(4):539-548.

Frank DA, Robertson MJ, Bonni A, Ritz J, Greenberg ME. Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(17):7779-7783.

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.

Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. Semin Immunol. 2007;19(6):383-393.

Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2008;67(11):1505-1515.

Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest. 2006;116(5):1218-1222.

Khachigian LM. Collagen antibody-induced arthritis. Nat Protoc. 2006;1(5):2512-2516.

Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. Microsc Res Tech. 2001;53(4):241-245.

Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity. 2004;21(4):467-476.

Krutzik PO, Nolan GP. Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. Nat Methods. 2006;3(5):361-368.

Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. Oncogene. 2000;19(21):2566-2576.

Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. Nat Clin Pract Rheumatol. 2006;2(11):619-626.

O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. Immunity. 2012;36(4):542-550.

Patricelli MP, Szardenings AK, Liyanage M, Nomanbhoy TK, Wu M, Weissig H, et al. Functional interrogation of the kinome using nucleotide acyl phosphates. Biochemistry. 2007;46(2):350-358.

Rosmarin D, Strober BE. The potential of interleukin 12 inhibition in the treatment of psoriasis. J Drugs Dermatol. 2005;4(3):318-325.

Zhang S, Kaplan MH. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-γ expression. J Immunol. 2000;165(3):1374-1380.

オルミエント錠４ｍｇ
オルミエント錠２ｍｇ

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 1
2.6.3.1 Pharmacology: Overview 1
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2) 3
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics 7
2.6.3.4 Safety Pharmacology 8
2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions (Not Applicable) 9

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Multiple assays: Cell based In Vitro, Mouse delayed type hypersensitivity model, Collagen Induced Arthritic Mouse Model, Anti-Collagen Ab-Induced Arthritic Mouse Model, and Adjuvant Arthritic Rat Model	Purified recombinant enzyme assay, BALB/c mice DBA/1j mice, and Lewis rats	In Vitro and In Vivo	Incyte Corporation	LOB06	4.2.1.1.1
Enzyme based In Vitro Inhibition	Purified recombinant enzyme assay	In Vitro	Incyte Corporation	LOB07	4.2.1.1.2
Cell based In Vitro Activity	T cell phosphorylation and cell proliferation assay	In Vitro	Incyte Corporation	LOB08	4.2.1.1.3
Cell based In Vitro Activity	T cell STAT phosphorylation assay	In Vitro	Incyte Corporation	LOB09	4.2.1.1.4
Cell based In Vitro Activity	T cell IFNγ production assay and STAT3 Phosphorylation assay	In Vitro	Incyte Corporation	LOB10	4.2.1.1.5
Cell based In Vitro Activity	Peripheral blood mononuclear cells STAT3 phosphorylation and MCP-1 production assay	In Vitro	Incyte Corporation	LOB11	4.2.1.1.6
Cell based In Vitro Activity	Rat, canine, and human whole blood assays	In Vitro	Incyte Corporation	LOB12	4.2.1.1.7
Cell based In Vitro Activity	Canine whole blood assay	In Vitro	Incyte Corporation	LOB13	4.2.1.1.8
Cell based In Vitro Activity	Human peripheral blood mononuclear cell with flow cytometry coupled with fluorescence cell bar coding	In Vitro	[redacted]	LOB15	4.2.1.1.10
Adjuvant Arthritic Rat Model	Rat, Lewis	In Vivo, oral	Incyte Corporation	LOB14	4.2.1.1.9

(Continuted)

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (Concluded)

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Cell-Based In Vitro Binding	Competition Binding Assays	In Vitro	[redacted]	T07-05-06	4.2.1.2.1
Cell-Based In Vitro Binding	Kinase Specificity	In Vitro	[redacted]	T07-07-11	4.2.1.2.2
Cell-Based In Vitro Binding	Nicotinic Binding	In Vitro	[redacted]	T07-07-12	4.2.1.2.3
Cell-Based In Vitro Binding	Kinase profiling, KiNativ™ platform	In Vitro	Eli Lilly and Company	QSB30	4.2.1.2.4
Safety Pharmacology					
Cardiovascular[a]	Dog, beagle	In Vivo, oral	[redacted]	T07-11-14	4.2.1.3.2
Central Nervous System[a]	Rat, Sprague-Dawley	In Vivo, oral	[redacted]	T07-12-07	4.2.1.3.3
Respiratory Function[a]	Rat, Sprague-Dawley	In Vivo, oral	[redacted]	T07-12-06	4.2.1.3.4
Cardiovascular Ion Channel[a]	HEK293 cells transfected with hERG clone	In Vitro	[redacted]	T07-12-08	4.2.1.3.1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Not Applicable					

Abbreviations: GLP = good laboratory practice, HEK = human embryonic kidney, hERG = human ether-à-go-go-related gene, IFNγ = interferon gamma, MCP-1 = monocyte chemotactic protein-1, STAT = signal transducers and activator of transcription.

[a] Contains a GLP compliance statement.

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2)

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses[a]	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Enzyme based In Vitro Inhibition	Purified recombinant enzyme assay	In Vitro	0.1 nM to 100 nM for JAK1 and JAK2. 1 nM to 1000 nM for TYK2 and JAK3 all at 2-fold serial dilutions.	n = 5-6	Baricitinib was potent against JAK2, JAK1, TYK2, and less active against JAK3 with IC_{50} values of 0.31, 1.09, 3.45, and 8.77 nM respectively.	N	LOB07 4.2.1.1.2
Enzyme based In Vitro Inhibition	Purified recombinant enzyme assay	In Vitro	0.1 nM to 1000 nM for JAK1 and JAK2. 0.26 nM to 2500 nM for TYK2 and JAK3, all with 2.5-fold serial dilutions.	n = 1-6	At 1 mM ATP baricitinib was equipotent on JAK1 and JAK 2 (5.9 and 5.7 nM) respectively, less against TYK2 (53 nM) and against JAK3 (>400 nM).	N	LOB06 4.2.1.1.1
Cell based In Vitro Activity	T cell phosphorylation and cell proliferation assay	In Vitro	0.3 nM to 5,000 nM	n = 25	Baricitinib inhibits IL-2 induced T cell proliferation and JAK2/STAT3/STAT5 phosphorylation with IC_{50} values of 3-30 nM in PHA activated human T cells.	N	LOB08 4.2.1.1.3
Cell based In Vitro Activity	T cell STAT phosphorylation assay	In Vitro	1 nM to 10,000 nM	n = 2	Baricitinib inhibits IL-23 induced STAT3 phosphorylation and both IL-17 and IL-22 secretion with IC_{50} values of 20-57 nM in PHA activated human T cells.	N	LOB09 4.2.1.1.4
Cell based In Vitro Activity	T cell IFNγ production assay	In Vitro	0.6 nM to 25 μM	n = 4	Baricitinib inhibits IL-12 induced STAT3 phosphorylation in activated human T cells with IC_{50} values of 60 nM and interferon gamma production with an IC_{50} of 5.8 μM.	N	LOB10 4.2.1.1.5

(continued)

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (Continued)

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses[a]	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Cell based In Vitro Activity	Peripheral blood mononuclear cells STAT3 phosphorylation and MCP-1 production assay	In Vitro	1.5 nM to 10,000 nM	n = 5-15	Baricitinib inhibits IL-6 induced MCP-1 production in human peripheral blood mononuclear cells with an IC_{50} of 40 nM and inhibits IL-6 induced STAT3 phosphorylation in human whole blood with an IC_{50} of 104 nM.	N	LOB11 4.2.1.1.6
Cell based In Vitro Activity	Rat, canine, and human whole blood assays	In Vitro	1.5 nM to 10,000 nM	n = 2-5	Baricitinib inhibits IL-6 induced STAT3 phosphorylation with similar potency in rat (IC_{50} of 128 nM) as man and more potent in canine whole blood assays (IC_{50} of 49 nM).	N	LOB12 4.2.1.1.7
Cell based In Vitro Activity	Canine whole blood assay	In Vitro	0, 0.15, 0.45, and 3 mg/kg/day orally	n = 2	Baricitinib in a 4 week toxicology study inhibited in a dose and time dependent manner ex vivo IL-6 stimulated STAT3 phosphorylation.	N	LOB13 4.2.1.1.8

(continued)

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (Continued)

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses[a]	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Cell based In Vitro Activity	Human peripheral blood mononuclear cell with flow cytometry	In Vitro	2.44 - 10,000 nM Baricitinib and tofacitinib	n = 6	Baricitinib inhibits STAT phosphorylation of multiple cytokines including IL-4, 6, 10, 15, 21, interferons α and γ, and G-CSF in various human leukocyte subpopulations. Inhibition of cytokine signaling was most potent for the interferons and least potent against IL-10 and cytokines that depend on a JAK1/3 signaling complex including IL-4, 15, 21. All IC_{50} values were compared to tofacitinib run in the same donors.	N	LOB15 4.2.1.1.10
Mouse delayed type hypersensitivity model	BALB/c mice	In Vivo	10 mg/kg, twice daily, orally	F, n = 8	Baricitinib inhibits a delayed-type hypersensitivity response.	N	LOB06 4.2.1.1.1
Collagen Induced Arthritic Mouse Model	DBA/1j mice	In Vivo	1, 3 or 10 mg/kg, twice daily, orally	M, n = 8	Baricitinib at 3 and 10 mg/kg inhibits clinical and histologic signs of arthritic disease progression without an effect in humoral immunity in a dose dependent manner in mice with established disease.	N	LOB06 4.2.1.1.1
Anti-Collagen Ab-Induced Arthritic Mouse Model	BALB/c mice	In Vivo	1 and 10 mg/kg, twice daily, orally	F, n = 5	Baricitinib at 10 mg/kg inhibits clinical and histologic disease progression in a humoral immunity independent arthritis model.	N	LOB06 4.2.1.1.1

(continued)

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics (Concluded)

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses[a]	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Adjuvant Arthritic Rat Model	Lewis rats	In Vivo	0, 0.018, 0.06, 0.18, 0.6, 1.8 and 6.0 mg/kg/day (continuous subcutaneously) and 0, 1, 3 and 10 mg/kg once daily orally and 0.3, 1 and 3 mg/kg twice daily orally	F, n = 6	Baricitinib has been demonstrated to be effective in the rat adjuvant arthritis model when administered either orally or by continuous infusion in animals with established disease. Efficacy as demonstrated by improvements in clinical scores, histologic assessment and by micro CT with inhibition of bone erosion also apparent. These effects were dose dependent.	N	LOB06 4.2.1.1.1 LOB14 4.2.1.1.9
Adjuvant Arthritic Rat Model STAT3 phosphorylation	Lewis rats	In Vivo	0, 1, 3 and 10 mg/kg once daily orally and 0.3, 1 and 3 mg/kg twice daily orally	F, n = 3	Efficacy in the rat adjuvant arthritis model with baricitinib does not require complete or sustained inhibition of STAT3 phosphorylation as determined with ex vivo IL-6 stimulated whole blood assays.	N	LOB06 4.2.1.1.1 LOB14 4.2.1.1.9
Adjuvant Arthritic Rat Model cytokine mRNA levels	Lewis rats	In Vivo	10 mg/kg once daily orally	F, n = 4	Baricitinib at 10 mg/kg reduces elevated IFNγ, IL-12A, IL-17, IL-21, and IL-22 mRNA levels in draining lymph nodes in the rat adjuvant arthritis model by Day 14.	N	LOB06 4.2.1.1.1

Abbreviations: ATP = adenosine triphosphate, F = female, G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor, GLP = good laboratory practice, IC_{50} = 50% inhibitory concentration, IFNγ = interferon gamma, IL = interleukin, JAK = Janus kinase, M = male, MCP-1 = monocyte chemotactic protein-1, PHA = phytohemagglutinin, STAT = signal transducers and activator of transcription, TYK = tyrosine kinase.

[a] Single doses unless specified otherwise.

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses[a]	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Cell-Based In Vitro Binding	Nicotinic Binding	In Vitro	100 nM and 10 μM	n = 1	Baricitinib exhibited no binding to nicotinic acid binding receptors.	N	T07-07-12 4.2.1.2.3
	Competition Binding Assays	In Vitro	100 nM to 1 μM	n = 1	Baricitinib did not compete with relevant ligands against a panel of receptors, transporters, and ion channels demonstrating specificity against cell surface receptors representing multiple pharmacologic classes.	N	T07-05-06 4.2.1.2.1
	Kinase Specificity	In Vitro	200 nM	n = 1	Baricitinib inhibited JAK2 and JAK3 kinase activity without inhibition of 28 other kinases.	N	T07-07-11 4.2.1.2.2
	Kinase profiling, KiNativ™ platform	In Vitro	5 nM to 5 μM	n = 1-3	Baricitinib specificity was determined against over 250 different kinases in human peripheral blood mononuclear cells and the monocytic line THP-lysates using a competitive binding assay to establish binding affinity constants. baricitinib was most potent against JAK1, JAK2, and TYK2 with IC_{50} values between 27-65 nM, and showed moderate affinity to CaMK2d and CaMK2g between 150-170 nM and significantly less activity >500 nM for all remaining kinases.	N	QSB30 4.2.1.2.4

Abbreviations: CaMK = calmodulin-dependent protein kinase, GLP = good laboratory practice, IC_{50} = 50% inhibitory concentration, JAK = Janus kinase, TYK = tyrosine kinase.

[a] Single doses unless specified otherwise.

2.6.3.4 Safety Pharmacology

Organ Systems Evaluated	Species, Strain	Route	Test article Doses[a]	Sex #/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Cardiovascular	Dog, beagle	Oral gavage	0.15, 0.45, 3.0 mg/kg	4 male 4 female	NOEL: 0.45 mg/kg 3.0 mg/kg: ↑HR (5-12%) 1-18 hrs pd; ↓ sys, dia, mbp (≤ 8%) 2-3 hrs pd; ↓ pp (≤ 10%) 2-3 hrs pd, (5-7%) 7-18 hrs pd	Yes	T07-11-14 4.2.1.3.2
Central Nervous System	Rat, Sprague-Dawley	Oral gavage	2, 10, 100 mg/kg	10 male 10 female	NOEL: 10 mg/kg 100 mg/kg: 1-hr pd; red flushing of skin, eyelids slightly drooped, lacrimation, low arousal, no pupil response, ↓ BT, ↓ total and mean ambulatory counts	Yes	T07-12-07 4.2.1.3.3
Respiratory Function	Rat, Sprague-Dawley	Oral gavage	2, 10, 100 mg/kg	8 male	NOEL: 10 mg/kg 100 mg/kg: ↓RF (≤22%) 31-120 min pd; ↓ MV (≤24%) 0-120 min pd	Yes	T07-12-06 4.2.1.3.4
Cardiovascular Ion Channel	HEK293 cells transfected with hERG clone	In vitro	30, 100, 300 μM	n = 3-4 replicates	IC_{50} = 161.5 μM	Yes	T07-12-08 4.2.1.3.1

Abbreviations: # = number, ↑ = increased, ↓ = decreased, BT = body temperature, dia = diastolic, GLP = good laboratory practice, HEK = human embryonic kidney, hERG = human ether-à-go-go-related gene, HR = heart rate, hr(s) = hour(s), mbp = mean blood pressure, MV = minute volume, NOEL = no-observed-effect level, pd = post dose, pp = pulse pressure, RF = respiratory frequency, sys = systolic.

[a] Single doses unless specified otherwise.

2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions (Not Applicable)