

2.4 非臨床試験の概括評価

小野薬品工業株式会社

目次

用語及び略号一覧.....	3
2.4 非臨床試験の概括評価.....	5
2.4.1 非臨床試験計画概略.....	5
2.4.2 薬理試験.....	6
2.4.2.1 効力を裏付ける試験.....	6
2.4.2.2 副次的薬理試験.....	8
2.4.2.3 安全性薬理試験.....	8
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験.....	8
2.4.3 薬物動態試験.....	9
2.4.3.1 吸収.....	9
2.4.3.2 分布.....	9
2.4.3.3 代謝.....	9
2.4.3.4 排泄.....	10
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用.....	10
2.4.4 毒性試験.....	10
2.4.4.1 単回投与毒性試験.....	10
2.4.4.2 反復投与毒性試験.....	10
2.4.4.3 遺伝毒性試験.....	11
2.4.4.4 がん原性試験.....	11
2.4.4.5 生殖発生毒性試験.....	11
2.4.4.6 その他の毒性試験.....	12
2.4.5 総括及び結論.....	13
2.4.6 参考文献一覧.....	17

2.4 非臨床試験の概括評価
チラブルチニブ塩酸塩

用語及び略号一覧

用語及び略号	略さない表現又は説明
ABC-DLBCL	活性化 B 細胞様びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
ADP	アデノシン二リン酸
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC24h	投与後 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BA	バイオアベイラビリティ
BCR	B 細胞受容体
BCRP	Breast cancer resistance protein
B-NHL	B 細胞性非ホジキンリンパ腫
BLK	Src ファミリーチロシンキナーゼ BLK
BMX	Bone marrow tyrosine kinase gene on chromosome X
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ
CD4, CD69	CD 分子蛋白質
CLEC-2	C-type lectin-like receptor 2
CLL	慢性リンパ性白血病
Cmax	最高血漿中濃度
CYP	チトクロム P450
DAT	ドーパミン輸送体
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
EC ₅₀	50%効果濃度
EGFR	上皮成長因子受容体
ERBB2 及び ERBB4	上皮成長細胞受容体ファミリーキナーゼ ERBB2 及び ERBB4
FOB	機能観察総合評価
FYN	Src ファミリーチロシンキナーゼ FYN
GCB-DLBCL	胚中心 B 細胞様びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC ₅₀	50%阻害濃度
IC _{50_MAX}	最大阻害率の半分の阻害率を示す濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
IgM	免疫グロブリン M
ITK	インターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼ
JAK3	ヤヌスキナーゼ 3
Ki	阻害定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LCK	Src ファミリーチロシンキナーゼ LCK
LYNa	Src ファミリーチロシンキナーゼ LYNa
MATE	Multidrug and toxin extrusion
MBI	Mechanism-based inhibition
MCL	マントル細胞リンパ腫
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NET	ノルエピネフリン輸送体
Non-GCB	非胚中心 B 細胞様
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide

2.4 非臨床試験の概括評価
チラブルチニブ塩酸塩

OCT	Organic cation transporter
PBMC	末梢血単核細胞
PBPK	生理学的薬物速度論
PCNSL	中枢神経系原発リンパ腫
P-gp	P-糖蛋白質
(Q)SAR	定量的構造活性相関
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
SLL	小リンパ球性リンパ腫
SRC	がん原遺伝子チロシンプロテインキナーゼ
TEC	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TEC
TXK	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TXK
UGT	ウリジン 5'-二リン酸グルクロン酸転移酵素

2.4 非臨床試験の概括評価

BTK は細胞質のタンパク質チロシンキナーゼの TEC ファミリーに属し^{1) 2)}、主として血液細胞のうち特に B 細胞に発現する³⁾。BTK は BCR を介して活性化し、B 細胞の生存、活性化、増殖、成熟及び分化の中心的役割を担っている^{4) ~7)}。また、悪性リンパ腫のうち、特に B-NHL 及び CLL では、BCR シグナル伝達経路が恒常的に活性化していることが知られており^{8) 9)}、これらの腫瘍細胞では BTK の阻害によりアポトーシスが誘導されることから^{10) 11)}、BTK を阻害する薬剤には抗腫瘍効果が期待できる。また、国内では既に BTK 阻害剤であるイブルチニブが、再発又は難治性の MCL 及び CLL (SLL を含む) を適応に承認されている¹²⁾。

PCNSL は、初発時に病変が脳脊髄に局在する悪性リンパ腫であり、病理学的にはその多くが B-NHL で Non-GCB タイプの DLBCL に分類される^{13) 14)}。本邦では、PCNSL は中枢神経系腫瘍の約 4.9%を占めると報告されており、年間発症数は約 980 人と推定されている^{15) 16)}。未治療 PCNSL 患者に対しては、脳腫瘍診療ガイドラインにおいて高用量メトトレキサート療法を基盤とする化学療法及びその後の全脳照射療法が推奨されており¹³⁾、奏効率は比較的良好である。しかし、5 年無増悪生存率は 34.7%であり¹⁷⁾、多くの患者が再発又は難治性に至る。再発又は難治性の PCNSL 患者に対する標準治療は確立しておらず、また、遅発性中枢神経障害を合併する患者も多い¹³⁾。よって、脳機能を維持しつつ治癒に至る割合は未だ低く、新たな薬物療法の臨床的意義は大きい。

チラブルチニブ塩酸塩（以下、チラブルチニブ）は BTK のキナーゼ活性を不可逆的に阻害する共有結合型の阻害剤であり、BTK の SRC 相同ドメイン 3 内のチロシン 223 における自己リン酸化¹⁸⁾を阻害する。チラブルチニブは、*in vitro*において Non-GCB DLBCL 細胞株である TMD8 の細胞内 BTK 自己リン酸化を阻害することで増殖を抑制し、細胞死を誘導した。また、チラブルチニブは TMD8 を皮下移植したマウス担がんモデルで抗腫瘍効果を示した。

以上より、チラブルチニブは、再発又は難治性の PCNSL に対する新たな治療選択肢になり得ると考えた。

2.4.1 非臨床試験計画概略

チラブルチニブの非臨床試験は、「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（薬食審査発 0604 第 1 号，平成 22 年 6 月 4 日）」（以下、ICH S9 ガイドライン）に基づいて実施した。なお、適応疾患の拡大も考慮し、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス（薬食審査発 0219 第 4 号，平成 22 年 2 月 19 日）」に準拠した試験も一部実施した。

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

薬理試験

効力を裏付ける試験として、*in vitro* においてヒト組み換え BTK に対する酵素阻害作用、キナーゼ選択性、酵素阻害様式、細胞内の BTK 自己リン酸化に対する阻害作用及び TMD8 を含む各種 DLBCL 細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。*In vivo* では、TMD8 を皮下移植したマウス担がんモデルを用いて、経口投与によりチラブルチニブの抗腫瘍効果を検討した。

副次的薬理試験として、*in vitro* において各分子標的に対する結合阻害並びにヒト好塩基球、好中球、単球、破骨細胞及び骨芽細胞に対する作用を検討した。

安全性薬理試験として、ラット又はサルを用いて中枢神経系、心血管系及び呼吸系に対する作用を評価し、*in vitro* において hERG チャネル電流に対する作用を評価した。また、補足的安全性薬理試験として、ヒト血小板凝集に対する作用を評価した。評価資料とした試験は、いずれも GLP を遵守して実施した。

薬物動態試験

薬物動態試験は、主に薬理試験及び毒性試験と同種同系統のマウス、ラット及びサルを用いて、チラブルチニブ又は ^{14}C -チラブルチニブを経口投与したときの吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。また、*in vitro* においてヒトを含む各動物種の血清蛋白に対する結合率及び代謝を評価した。さらに、ヒトの *in vitro* 試料を用いて薬物動態学的薬物相互作用を検討した。

毒性試験

チラブルチニブの毒性試験として、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、胚・胎児発生毒性試験、免疫毒性試験、不純物の毒性試験及び光毒性試験を実施した。毒性試験の投与経路は、原則、チラブルチニブの臨床適用経路である経口投与とした。反復投与毒性試験では、チラブルチニブの曝露が適切に得られ、*in vitro* での代謝プロファイルがヒトと類似しているラット及びサルを使用し、それぞれ最長 26 あるいは 39 週間まで反復経口投与した。評価資料とした毒性試験は、いずれも GLP を遵守して実施した。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 酵素系

ヒト組換え BTK に対するチラブルチニブの IC_{50} 値は 2.10 nmol/L であった [2.6.2.2.1.1]。また、BTK に対するチラブルチニブの阻害様式の検討から、チラブルチニブは BTK のシステイン残基に共有結合し、不可逆的に阻害することが示唆された [2.6.2.2.1.3]。

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

チラブルチニブのキナーゼ選択性を評価した結果、BCR シグナル伝達に關与する BTK の上流キナーゼである FYN, LYNa 及び TCR シグナル伝達に關与するキナーゼ LCK に対する選択性は 375 倍以上であった [2.6.2.2.1.1]。また、BTK と同様に活性部位にシステイン残基を有する 9 種類のキナーゼに対するチラブルチニブの選択性を評価した結果、BLK, EGFR, ERBB2, ERBB4, ITK 及び JAK3 に対する選択性は 30 倍以上であったが、BMX, TXK 及び TEC に対する選択性は 0.9, 13.8 及び 8.7 倍であった [2.6.2.2.1.2]。

2.4.2.1.2 *In vitro* 試験

チラブルチニブの細胞内の BTK 自己リン酸化に対する阻害作用をヒト PBMC 中の B 細胞及び TMD8 を用いて評価した結果、チラブルチニブは濃度に応じて細胞内の BTK 自己リン酸化を抑制した。いずれの細胞においてもチラブルチニブの阻害強度は処置時間に応じて強くなり、20 時間処置した際の IC_{50_MAX} 値はそれぞれ 1.90 及び 3.60 nmol/L であった [2.6.2.2.1.4]。また、チラブルチニブのヒト PBMC 中の B 及び T 細胞の機能に対する作用を評価した結果、チラブルチニブは B 細胞の抗 IgM 抗体刺激による CD69 発現を濃度に応じて抑制し、その IC₅₀ 値は 13.8 nmol/L であった [2.6.2.2.1.5]。一方、T 細胞の機能は抑制しなかった。

チラブルチニブは TMD8 の増殖を濃度に応じて抑制し、IC₅₀ 値は 3.59 nmol/L であった [2.6.2.2.2.1]。また、チラブルチニブは TMD8 の細胞死を 48 時間以上の連続処置により誘導し、処置後 72 時間ではチラブルチニブの濃度に応じた細胞死誘導が認められた [2.6.2.2.2.2]。TMD8 及びその他の DLBCL 細胞株の細胞増殖に対するチラブルチニブの抑制作用を検討した結果、TMD8 と同じ ABC-DLBCL 細胞株である OCI-LY10 及び Ri-1 の増殖に対する EC₅₀ 値はそれぞれ 13.0 及び 26 nmol/L であり、TMD8 の増殖に対する EC₅₀ 値 (4.30 nmol/L) と同程度であった。一方、GCB-DLBCL 細胞株である Pfeiffer の増殖に対する EC₅₀ 値は TMD8 に比して 2000 倍以上高値であった [2.6.2.2.2.3]。

2.4.2.1.3 *In vivo* 試験

マウス TMD8 皮下移植モデルにおいて、チラブルチニブは 1 日 1 回の用法では明らかな抗腫瘍効果を示さなかったが、1 日 2 回の用法では 1 回 3 mg/kg 以上で抗腫瘍効果を示した [2.6.2.2.3.1]。同モデルにおいてチラブルチニブを 1, 3 及び 10 mg/kg で 1 日 2 回経口投与し、抗腫瘍効果を評価した結果、チラブルチニブは一般症状及び体重推移に明らかな影響を及ぼすことなく、用量に応じて腫瘍体積の増加を抑制し、10 mg/kg で有意な抗腫瘍効果が確認された [2.6.2.2.3.2]。また、同モデルにおいてチラブルチニブを 1, 3 及び 10 mg/kg で経

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

口投与した後、腫瘍中 BTK リン酸化を経時的に測定した結果、いずれの用量においても腫瘍中の BTK リン酸化抑制が確認された [2.6.2.2.3.2] .

2.4.2.2 副次的薬理試験

67 種類の分子標的のリガンド結合に対する阻害を検討した結果、チラブルチニブは NET 及び DAT へのリガンド結合を $10\ \mu\text{mol/L}$ で 50%以上阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 10.2 及び $3.91\ \mu\text{mol/L}$ であった [2.6.2.3.1] . 一方、その他の分子標的にチラブルチニブは結合親和性を示さなかった.

また、BTK の発現が知られているヒト好塩基球、好中球、単球及び破骨細胞を用いて、各細胞機能あるいは分化に対する影響を検討した結果、チラブルチニブは好塩基球、好中球及び単球の細胞機能、破骨細胞の分化に対して抑制作用を示し、これらの阻害強度はヒト B 細胞の機能に対する阻害強度 (IC_{50} 値 : $13.8\ \text{nmol/L}$) と概ね同程度であった [2.6.2.3.2, 2.6.2.3.3] .

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験として、ラット及びサルを用いて中枢神経系に対する影響を評価した結果、ラットでは $300\ \text{mg/kg/日}$ 以上で痛覚反応の低下及び歩行異常、サルでは $100\ \text{mg/kg/日}$ で歩行失調、意識の低下、手足を動かす力及び手足の動きの異常、触覚反応の低下などの中枢神経症状が認められた. ラット及びサルにおける中枢神経系に対する無影響量は、それぞれ 100 及び $30\ \text{mg/kg}$ であった [2.6.2.4.1] . 心血管及び呼吸系では、*in vitro* における hERG チャネル電流に対する IC_{50} 値は $5.59\ \mu\text{mol/L}$ ($2.54\ \mu\text{g/mL}$) であった [2.6.2.4.2.1] . また、覚醒下サルにおいて最高用量の $300\ \text{mg/kg}$ まで血圧、心拍数及び心電図に対する影響を示さず、呼吸数及び血液ガスに対しても影響しなかった [2.6.2.4.2.2, 2.6.2.4.3.1] . 血液凝固系では、*in vitro* において $10\ \mu\text{mol/L}$ 以上で ADP 惹起及びコラーゲン惹起によるヒト血小板凝集を抑制し、その無影響濃度は $6\ \mu\text{mol/L}$ ($2.73\ \mu\text{g/mL}$) であった [2.6.2.4.4.1] . また、チラブルチニブは CLEC-2 惹起によるヒト血小板凝集を抑制し、その IC_{50} 値は $0.432\sim 1.43\ \mu\text{mol/L}$ ($0.196\sim 0.650\ \mu\text{g/mL}$) であった [2.6.2.4.4.2] .

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない.

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

Caco-2 細胞におけるチラブルチニブの膜透過性は高かった [2.6.4.3.1]。また、P-gp 発現細胞を用いた検討から、チラブルチニブは P-gp の基質であると考えられた [2.6.4.3.1]。ラット及びイヌにチラブルチニブを単回経口投与したときの BA は 15.5 及び 89.2%であった [2.6.4.3.3, 2.6.4.3.4]。また、ラットの胆汁排泄試験よりチラブルチニブの吸収率は 90%以上と推定された [2.6.4.6.2]。以上より、チラブルチニブの吸収は良好であることが示唆された。

2.4.3.2 分布

チラブルチニブの血清蛋白に対する結合率はラットで約 97%，サルで約 90%及びヒトで約 92%であった。チラブルチニブのヒト血清中での主結合蛋白はアルブミンであった [2.6.4.4.1]。

マウス及びラットに ^{14}C -チラブルチニブを単回経口投与したとき、放射能は全身に広く分布した。マウスでは投与後 96 時間ですべての組織中放射能濃度は定量下限未満となり、ラットでは投与後 168 時間ですべての組織中放射能濃度は C_{max} の 10%未満に低下した。また、標的組織である中枢への放射能の移行が確認された [2.6.4.4.2, 2.6.4.4.3]。有色ラットを用いた分布試験の結果、チラブルチニブ又はその代謝物のメラニンを含む組織への選択的な結合は示唆されなかった [2.6.4.4.3]。

2.4.3.3 代謝

ラット、サル及びヒト肝細胞中で ^{14}C -チラブルチニブを代謝させたとき、10～13 種の代謝物ピークが認められたが、ヒト特異的な代謝物ピークは認められなかった。主代謝物は、ラットでは未変化体のグルタチオン抱合体、サルでは未変化体のグルタチオン抱合体及び水酸化体の硫酸抱合体、ヒトでは水酸化体の硫酸抱合体であった [2.6.4.5.1]。ヒトでのチラブルチニブの酸化代謝には主に CYP3A4 が関与すると考えられた [2.6.4.5.2]。

マウス、ラット及びサルに ^{14}C -チラブルチニブを単回経口投与したとき、糞及び尿中に排泄された放射能の大部分はチラブルチニブの代謝物であり、いずれの種でもチラブルチニブは代謝を受けて消失した。チラブルチニブの代謝経路は動物種間で類似しており、酸化、還元、グルタチオン抱合及び加水分解が主に関与した。また、水酸化体の硫酸抱合体、水酸化体のグルクロン酸抱合体といった二次代謝物も認められた [2.6.4.5.3, 2.6.4.5.4, 2.6.4.5.5]。

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

2.4.3.4 排泄

^{14}C -チラブルチニブを単回経口投与したとき、マウス及びラットにおける放射能の主な排泄経路は糞中であつた [2.6.4.6.1, 2.6.4.6.2]。胆管カニユーレ処置したラットにおける放射能の主な排泄経路は胆汁中であつた [2.6.4.6.2]。サルにおいて投与放射能は糞中と尿中へ同程度排泄された [2.6.4.6.3]。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝細胞において、チラブルチニブは CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4 を誘導しなかつた [2.6.4.7.1]。ヒト肝ミクロソームにおいて、チラブルチニブは CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5 (基質: テストステロン) 及び UGT1A1 による代謝を可逆的に阻害し、 IC_{50} 値はそれぞれ、24.6, 13.4, 29.1, 89.5, 37.6 及び $12.4 \mu\text{mol/L}$ であつた。また、CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2C19 に対する K_i 値はそれぞれ、7.02, 8.31 及び $14.4 \mu\text{mol/L}$ であつた [2.6.4.7.2]。チラブルチニブは CYP3A4/5 に対して MBI 作用を示し、ミダゾラム 1'-水酸化活性に対する見かけの阻害定数は $18.9 \mu\text{mol/L}$ 、最大不活性化速度定数は 0.0797 min^{-1} であつた [2.6.4.7.2]。

各種トランスポーター発現細胞を用いた検討において、チラブルチニブは BCRP の基質ではなく、P-gp, OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であることが確認された [2.6.4.7.3]。また、チラブルチニブは複数のトランスポーターを阻害し、P-gp, MRP1, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1 及び OATP1B3 に対する IC_{50} 値はそれぞれ、26.8, 44, 2.06, 5.59, 0.829, 37.6, 約 50, 5.95, 13.4 及び $47.4 \mu\text{mol/L}$ であつた [2.6.4.7.4]。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

マウス、ラット及びサルを用いて、単回経口投与時の急性毒性を評価した [2.6.6.2]。

マウスでは、 1500 mg/kg まで一般状態変化は認められず、概略の致死量は 1500 mg/kg を超える量と判断した。ラット及びサルでは、 1000 mg/kg 以上で鎮静又は自発運動減少などの一般状態の変化、死亡及び切迫剖検例が認められ、ラット及びサルの概略の致死量はいずれも 1000 mg/kg と判断した。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット及びサルを用いて、1 日 1 回の経口投与による 26 及び 39 週間までの反復投与毒性試験をそれぞれ実施した [2.6.6.3]。その結果、主に中枢神経系、脾臓、リンパ節、肝臓及び甲状腺への影響が認められ、高用量では中枢神経系への作用に基づく死亡例及び切迫剖検

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

例も認められた。これら変化のうち、脾臓の変化、リンパ節の変化、肝障害を伴わない肝臓の変化、甲状腺の変化はヒトに外挿されない変化あるいは毒性学的意義に乏しい変化と判断した。また、免疫系への影響として、ラット及びサルではそれぞれ 60 及び 3 mg/kg/日以上でリンパ節又は脾臓の胚中心のリンパ球減少及び脾臓重量の低値が認められたが、これらはチラブルチニブの薬理作用に関連した変化と考えられた。ラット 300 mg/kg/日以上での肝障害、ラット 300 mg/kg/日以上及びサル 100 mg/kg/日以上での中枢神経系への影響などに基づき、ラット 4, 13 及び 26 週間反復投与毒性試験の無毒性量は雌雄ともにそれぞれ 100, 100 及び 60 mg/kg/日、サル 4, 13 及び 39 週間反復投与毒性試験の無毒性量は雌雄ともにいずれも 30 mg/kg/日と判断した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラットにおける小核試験を実施した [2.6.6.4]。その結果、いずれも陰性であり、チラブルチニブは遺伝毒性を有しないと判断した。

2.4.4.4 がん原性試験

チラブルチニブの抗悪性腫瘍薬としての申請に際しては、ICH S9 ガイドラインに基づき、がん原性試験は実施しなかった。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

チラブルチニブの抗悪性腫瘍薬としての申請に際しては、ICH S9 ガイドラインに基づき、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施せず、雌雄の生殖器に対する影響を反復投与毒性試験で評価した。また、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験は実施したが [2.6.6.6]，出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は実施しなかった。

チラブルチニブの反復投与毒性試験において、ラットでは雌雄生殖器に影響は認められなかった。一方、サルでは雄性生殖器への影響として、100 mg/kg/日で精細管のびまん性変性が認められた。雌雄生殖器に対する無毒性量は、ラットでは 300 mg/kg/日、サルでは 30 mg/kg/日であった。

ラット胚・胎児発生に関する試験では、母動物において 600 mg/kg/日で体重減少又は体重増加抑制、摂餌量の低値が認められた。胚・胎児では、600 mg/kg/日で胚・胎児死亡率の高値、胎児の頸椎体及び胸骨の発育不全、肝臓の副葉、催奇形性を示唆する胸骨及び肋軟骨の

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

異常が認められた。ラットの母動物及び胚・胎児発生に対する無毒性量はいずれも 300 mg/kg/日と判断した。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、母動物において 30 mg/kg/日以上で体重減少、摂餌量の低値及び死亡例、100 mg/kg/日で状態悪化に基づく切迫剖検例、流産及び早産例が認められた。胚・胎児では、100 mg/kg/日で胚・胎児死亡率の高値が認められたが、最高用量である 100 mg/kg/日まで胎児の外表、内臓及び骨格への影響は認められなかった。ウサギの母動物に対する無毒性量は 10 mg/kg/日、胚・胎児発生に対する無毒性量は 30 mg/kg/日と判断した。

2.4.4.6 その他の毒性試験

免疫毒性試験

ラットを用いた KLH 惹起による T 細胞依存性抗体産生能試験を実施した [2.6.6.8.2.1]。その結果、チラブルチニブは 10 mg/kg/日以上で抗体産生能を抑制したが、休薬により回復性を示した。

毒性発現機序などに関する試験

ラット 4 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg/日の雄及び 1000/300 mg/kg/日の雌で死亡例が認められたことから、死亡に至るまでの一般状態の推移を詳細に観察した [2.6.6.8.3.1]。その結果、1000 mg/kg/日の死亡例では投与初期に歩行異常（つま先歩行）、眼瞼下垂、歩行失調などの中枢神経症状が観察されたことから、中枢神経系への影響がラットの高用量投与時の死因と考えられた。

ラットで認められた膵臓病変の長期反復投与時の影響を詳細に検討するため、ラットに 300 mg/kg の用量で 1 日 1 回 26 週間反復経口投与し、経時的にグルコース、インスリン、アミラーゼ及びリパーゼ測定、糖負荷試験などを実施した [2.6.6.8.3.2]。その結果、投与 12 週よりインスリンの低値が認められ、投与 12 及び 26 週に耐糖能異常（糖負荷後の血糖値の高値及びインスリンの低値）が認められた。また、投与 12 週の病理組織学的検査で膵島の線維化及び膵臓間質に褐色色素沈着が認められた。投与 26 週の病理組織学的検査でも膵臓に同じ変化が認められたが、頻度及び程度ともに 12 週時点と同程度であった。

ラット 13 週間反復投与毒性試験及び膵臓毒性に関する検討試験で変異肝細胞巣が認められたことから、変異肝細胞巣の発がんリスクを評価した [2.6.6.8.3.3]。その結果、肝臓の変異肝細胞巣は、前がん病変や細胞増殖活性の亢進を伴うものではなかったことから、発がん性を示唆する変化ではないと判断した。

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

代謝物の安全性試験

チラブルチニブの抗悪性腫瘍薬としての申請に際しては、ICH S9 ガイドラインに基づき、代謝物を用いた毒性試験は実施しなかった。

不純物の毒性試験

チラブルチニブの原薬中には、「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（医薬審発第 1216001 号，平成 14 年 12 月 16 日）」の安全性確認の必要な閾値を超える不純物として，不純物A，不純物B，不純物C 及び 不純物D が含有される可能性がある [2.3.S.4.1]。また，チラブルチニブの製剤中には，「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」（医薬審発第 0624001 号，平成 15 年 6 月 24 日）の安全性確認の必要な閾値を超える不純物として 不純物A が含有される可能性がある [2.3.P.5.1]。

これら不純物を含むチラブルチニブ原薬を用いたラット 4 週間反復投与毒性試験を実施し，一般毒性を評価した [2.6.6.8.5.1]。その結果，不純物に起因する新規毒性の発現や毒性の増強は認められなかった。なお，無毒性量に含まれる各不純物含量は，それぞれの規格値上限における臨床 1 日摂取量を上回っていた。

遺伝毒性評価では，不純物A を含有する原薬を用いた遺伝毒性試験 [2.6.6.4]，不純物C 及び 不純物D の *in silico* (Q)SAR による変異原性評価 [3.2.S.3.2.6]，並びに 不純物B () の構造特性を踏まえた評価 [2.6.6.9.5] により，これら不純物に遺伝毒性の懸念はないと考えられた。

以上の結果より，チラブルチニブの原薬及び製剤中に含まれる可能性のある不純物について，いずれも安全性の懸念はないと判断した。

光毒性試験

マウス線維芽細胞株（Balb/c 3T3 細胞）を用いて光毒性を評価した [2.6.6.8.6]。その結果，チラブルチニブは光毒性を有しないと判断した。

2.4.5 総括及び結論

チラブルチニブは BTK の活性部位のシステイン残基に共有結合し，キナーゼ活性を不可逆的に阻害した。 *In vitro* においてチラブルチニブは ABC-DLBCL 細胞株である TMD8 において BTK リン酸化を阻害することで細胞増殖を抑制し，細胞死を誘導した。また，TMD8 以外の ABC-DLBCL 細胞株の増殖に対し，同程度の阻害活性を示した。 *In vivo* においてチラブ

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

ルチニブは TMD8 を皮下移植したマウス担がんモデルにおいて腫瘍中 BTK リン酸化を阻害し、抗腫瘍効果を示した。

チラブルチニブは BTK と同様に活性部位にシステイン残基を有するキナーゼ BMX, TXK 及び TEC のキナーゼ活性を阻害した。BMX については、生理作用に関して報告がなく、チラブルチニブの非臨床試験結果からも BMX 阻害の影響は明らかでなかったことから、ヒトに及ぼす影響を推察することはできなかった。TXK は、T 細胞に特異的に発現し、Th1 細胞の分化に関与するという報告がある^{19) 20)}。しかし、TXK 欠損マウスでは CD4 陽性 T 細胞の TCR 応答は正常なこと²¹⁾、また、チラブルチニブがヒト末梢血 T 細胞の機能に影響を及ぼさなかったことから、TXK 阻害がヒトに及ぼす明らかな影響はないものと推察された。TEC については、TEC と BTK を二重欠損したマウスでは B リンパ球の成熟や破骨細胞の形成が抑制されることが報告されている^{22) 23)}。ラットを用いた毒性試験において、チラブルチニブはリンパ節及び脾臓の B リンパ球数を減少させ、また T 細胞依存性の抗体産生を抑制した。これらのことから、チラブルチニブの B 細胞機能への抑制作用には、TEC 阻害も関与している可能性が考えられた。チラブルチニブは *in vitro* で低濃度よりヒト破骨前駆細胞の分化を抑制し、また RANKL 惹起マウス骨破壊モデルでは骨破壊の進行を抑制することが報告されている²⁴⁾。よって、チラブルチニブの破骨細胞機能への抑制作用にも TEC 阻害が関与している可能性が考えられた。なお、ラット及びサル反復毒性試験では骨梁増生など骨吸収抑制を示唆する変化は認められないことから、骨代謝回転が亢進されていない状態ではチラブルチニブが骨代謝に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

副次的薬理試験では、67 種類の分子標的のリガンド結合に対する阻害を検討した結果、チラブルチニブは NET 及び DAT に対して阻害作用を示し、その IC₅₀ 値は 10.2 及び 3.91 $\mu\text{mol/L}$ (4.64 及び 1.78 $\mu\text{g/mL}$) であった。これらは臨床用量における血漿中非蛋白結合型チラブルチニブの C_{max} (0.215 $\mu\text{g/mL}$) の 22 及び 8.3 倍に相当することから、これらの阻害作用が臨床で問題となる可能性は低いと考えられた。

チラブルチニブは *in vitro* においてヒト末梢血 B 細胞の機能に加え、BTK の発現が確認されているヒト好塩基球、好中球及び単球の各種抗原刺激による細胞機能を抑制した。また、チラブルチニブはラットにおいて T 細胞依存性の抗体産生を抑制した。これらを考慮すると、チラブルチニブは免疫細胞の機能を抑制することで免疫アレルギー疾患への効果が期待される一方、易感染性を始めとする感染症への影響には注意が必要と考えられた。

安全性薬理試験では、チラブルチニブは中枢神経系及び血小板凝集に対する影響を示した。中枢神経系への影響として、ラットでは 300 mg/kg/日以上で痛覚反応の低下及び歩行異常などの一般状態の変化が認められ、サルでは 4 週間反復投与毒性試験で実施した FOB 法による一般症状及び神経行動学的機能観察において、100 mg/kg/日で歩行失調、意識の低下、手

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

足を動かす力及び手足の動きの異常、触覚反応の低下などの中枢神経症状が認められた。ラット及びサルの中枢神経系に対する無影響量はそれぞれ 100 及び 30 mg/kg/日であり、臨床用量における C_{max} ($2.69 \mu\text{g/mL}$) との安全域はそれぞれ 3.1 及び 0.98~1.1 倍、臨床用量における AUC_{24h} ($13.4 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) との安全域はそれぞれ 3.2 倍及び 1.0~1.1 倍であった。また、血小板凝集に対する影響として、チラブルチニブは *in vitro* において $10 \mu\text{mol/L}$ 以上で ADP 惹起及びコラーゲン惹起によるヒト血小板凝集を抑制し、その無影響濃度である $6 \mu\text{mol/L}$ ($2.73 \mu\text{g/mL}$) と臨床用量における C_{max} との安全域は 1.0 倍であった。その他、心血管系に対して、チラブルチニブの hERG チャネル電流に対する IC_{50} 値は $5.59 \mu\text{mol/L}$ ($2.54 \mu\text{g/mL}$) であったが、覚醒サルにおいて最高用量である 300 mg/kg (C_{max} : $12.4 \mu\text{g/mL}$) まで血圧、心拍数及び心電図への影響は認められず、チラブルチニブが臨床において催不整脈作用を示す可能性は低いと考えられた。また、覚醒下サルの呼吸系に対して、チラブルチニブは最高用量の 300 mg/kg まで呼吸数及び血液ガスに影響を示さなかった。

以上より、臨床使用時には運動機能異常などの中枢神経症状及び出血に関連した有害事象に留意する必要があると考えられた。

ラット及びイヌに経口投与したときのチラブルチニブの吸収は良好と考えられた。 ^{14}C -チラブルチニブをマウス及びラットに経口投与したとき、放射能は標的組織である中枢（大脳、小脳及び脊髄）を含む全身に分布した。ラット、サル及びヒトの肝細胞でチラブルチニブを代謝させたとき、ヒト特異的な代謝物は認められなかった。また、マウス、ラット及びサルにチラブルチニブを単回経口投与したときの代謝経路は動物種間で類似していた。

チラブルチニブは *in vitro* で CYP3A 及び P-gp の基質であることが示唆された。臨床試験において、CYP3A4 及び P-gp 誘導剤であるリファンピシンとの併用によりチラブルチニブの曝露は低下したことから [2.7.2.2.2.2]，チラブルチニブと CYP3A4 及び P-gp 誘導剤との併用は注意すべきと考えられた。また、CYP3A4 及び P-gp 阻害剤であるイトラコナゾールとの併用によりチラブルチニブの曝露は増加したことから [2.7.2.2.2.1]，チラブルチニブと CYP3A4 及び P-gp 阻害剤との併用は注意すべきと考えられた。

チラブルチニブは *in vitro* で OATP1B1 及び OATP1B3 基質であることが示唆されたが、臨床試験において OATP1B 及び OATP1B3 阻害剤であるリファンピシンを単回投与でチラブルチニブと併用したとき、リファンピシンはチラブルチニブの薬物動態に顕著な影響を及ぼさなかった [2.7.2.2.2.2]。

チラブルチニブは *in vitro* で複数の代謝酵素を阻害し、Mechanistic static model 解析では CYP3A 基質との薬物相互作用の可能性が示唆されたが [2.7.2.2.1.6]，臨床試験においてチラブルチニブを CYP3A 基質であるミダゾラムと併用したとき、ミダゾラムの曝露は上昇し

2.4 非臨床試験の概括評価

チラブルチニブ塩酸塩

なかった [2.7.2.2.2.1] . また, チラブルチニブは *in vitro* で複数のトランスポーターを阻害したが, Mechanistic static model あるいは PBPK model 解析の結果, 臨床において薬物相互作用の可能性は低いと考えられた [2.7.2.2.1.8] .

反復投与毒性試験では, 主に中枢神経系, 肝臓及び免疫系への影響が認められた. 中枢神経系への影響として, ラット及びサルではそれぞれ 300 及び 100 mg/kg/日以上で歩行異常 (つま先歩行) や歩行失調などの運動機能異常を主体とする中枢神経症状が認められ, 投与を継続することにより死亡又は一般状態の悪化により切迫剖検に至る例も認められた. また, 肝臓への影響として, ラットでは 300 mg/kg/日で AST 及び ALT の高値, 肝細胞壊死が認められた. 免疫系への影響として, ラット及びサルではそれぞれ 60 及び 3 mg/kg/日以上でリンパ節又は脾臓の胚中心のリンパ球減少及び脾臓重量の低値が認められ, ラットでは 10 mg/kg/日以上で T 細胞依存性抗体産生能の低下が認められた. これらの免疫系への影響はチラブルチニブの薬理作用に起因すると考えられた. ラットの 26 週間及びサルの 39 週間の反復投与毒性試験の無毒性量はそれぞれ 60 mg/kg/日及び 30 mg/kg/日であり, 臨床用量における AUC_{24h} との安全域はラットで 1.4~3.2 倍, サルで 1.1 倍であった.

以上のことから, 臨床使用時には前述した運動機能異常などの中枢神経症状に加え, 肝機能パラメータの上昇及び免疫機能の低下に留意する必要があると考えられた.

チラブルチニブは, 細菌を用いた復帰突然変異試験, ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験でいずれも陰性であったことから, 遺伝毒性を有しないと判断した. ラット及びウサギにおいて, 母動物に毒性を示す用量で胚・胎児死亡率の高値が, またラットでは同用量で催奇形性を示す胸骨及び肋軟骨の異常が認められた. 胚・胎児発生に対する無毒性量における AUC_{24h} と臨床用量における AUC_{24h} との安全域はラットで 9.2 倍, ウサギで 1.4 倍であった. したがって, 妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には治療上の有益性が危険性を上回ると判断される場合にのみ投与すべきと考えられた.

以上の非臨床試験成績から, 選択的な BTK 阻害剤であるチラブルチニブは, PCNSL に対する新たな治療薬になり得ると考えられた.

2.4.6 参考文献一覧

- 1) Qiu Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene*. 2000 Nov 20;19(49):5651-61.
- 2) Kurosaki T, Hikida M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228(1):132-48.
- 3) Geneviev HC, Hinshelwood S, Gaspar HB, Rigley KP, Brown D, Saeland S, et al. Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur J Immunol*. 1994 Dec;24(12):3100-5.
- 4) Aoki Y, Isselbacher KJ, Pillai S. Bruton tyrosine kinase is tyrosine phosphorylated and activated in pre-B lymphocytes and receptor-ligated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 25;91(22):10606-9.
- 5) Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2014 Apr;14(4):219-32.
- 6) Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):13075-80.
- 7) Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol*. 2013 Aug;13(8):578-91.
- 8) Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 Jan 7;463(7277):88-92.
- 9) Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):563-74.
- 10) Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6287-96.
- 11) Cinar M, Hamedani F, Mo Z, Cinar B, Amin HM, Alkan S. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk Res*. 2013 Oct;37(10):1271-7.
- 12) ヤンセンファーマ株式会社. イムブルビカ®カプセル 140mg 添付文書. 2018 年 7 月改訂 (第 4 版)
- 13) 特定非営利活動法人 日本脳腫瘍学会編 (2019) , 脳腫瘍診療ガイドライン 2019 年版 第 2 版 1.成人脳腫瘍編 2.小児脳腫瘍編 金原出版

- 14) Lin CH, Kuo KT, Chuang SS, Kuo SH, Chang JH, Chang KC, et al. Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin. Clin Cancer Res. 2006 Feb 15;12(4):1152-6.
- 15) The Committee of Brain Tumor Registry of Japan. Report of Brain Tumor Registry of Japan (2005-2008) 14th Edition. Neurol Med Chir (Tokyo). 2017;57(Supplement 1):9-102.
- 16) 成田 善孝, 渋井 壮一郎. 脳腫瘍の治療結果を可視化する大規模データの収集・臨床試験の必要性. Jpn J Neurosurg (Tokyo). 2015 Oct;24(10):669-704.
- 17) 成田 善孝. 原発性脳腫瘍の疫学. CLINICIAN. 2014;627:244-50.
- 18) Middendorp S, Dingjan GM, Maas A, Dahlenborg K, Hendriks RW. Function of Bruton's tyrosine kinase during B cell development is partially independent of its catalytic activity. J Immunol. 2003 Dec 1;171(11):5988-96.
- 19) Haire RN, Ohta Y, Lewis JE, Fu SM, Kroisel P, Litman GW. TXK, a novel human tyrosine kinase expressed in T cells shares sequence identity with Tec family kinases and maps to 4p12. Hum Mol Genet. 1994 Jun;3(6):897-901.
- 20) Takeba Y, Nagafuchi H, Takeno M, Kashiwakura J, Suzuki N. Txk, a member of nonreceptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell-specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. J Immunol. 2002 Mar 1;168(5):2365-70.
- 21) 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 Nov 1;181(9):6125-31.
- 22) 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 Dec 4;192(11):1611-24.
- 23) Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. Cell. 2008 Mar 7;132(5):794-806.
- 24) Ariza Y, Murata M, Ueda Y, Yoshizawa T. Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitor tirabrutinib suppresses osteoclastic bone resorption. Bone Rep. 2019 Mar 15;10:100201.