2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

小野薬品工業株式会社

目次

用語及び略号一覧.....3
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表.....4
2.6.1 緒言.....4
引用文献.....5

2.6.1 緒言
チラブルチニブ塩酸塩

用語及び略号一覧

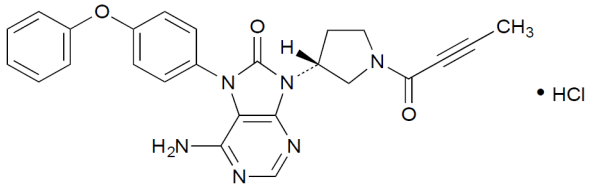
用語及び略号	略さない表現又は説明
BCR	B 細胞受容体
B-NHL	B 細胞性非ホジキンリンパ腫
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ
CLL	慢性リンパ性白血病
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
IC_{50}	50%阻害濃度
PCNSL	中枢神経系原発リンパ腫
Non-GCB	非胚中心 B 細胞様
TEC	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TEC

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

チラブルチニブ塩酸塩（以下，チラブルチニブ）は，小野薬品工業株式会社が創製したBTK 阻害剤であり，BTK の活性部位近傍の 481 位システイン残基と共有結合する 2-ブチン酸アミド構造を有する．

【構造式】



【化学名】

6-Amino-9-[(3*R*)-1-(but-2-ynoyl)pyrrolidin-3-yl]-7-(4-phenoxyphenyl)-7,9-dihydro-8*H*-purin-8-one monohydrochloride

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 [1) 2)]．本邦では未治療 PCNSL 患者に対する治療として，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いる [1)]．これらの治療による奏効率は比較的良好であるものの，5 年無増悪生存率は 34.7%であり [3)]，多くの患者が再発又は難治性に至る．一方，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，新たな薬物療法の臨床的意義は大きい．

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 [4) 5)]，主として血液細胞のうち特に B 細胞に発現する [6)]．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 [7) ~10)]．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いる [11) 12)]．チラブルチニブは，ヒト BTK の活性を 2.10 nmol/L の IC_{50} 値で阻害した．*In vitro* 試験では Non-GCB DLBCL 細胞株の TMD8 において細胞内 BTK 自己リン酸化を阻害し，細胞増殖を抑制するとともに，細胞死を誘導した．また，*in vivo* 試験では TMD8 を用いたマウス異種移植モデルにおいて経口投与により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 の新たな治療薬となることが期待される．

本申請における効能・効果及び用法・用量の案は以下のとおりである.

【効能・効果（案）】

再発又は難治性の中枢神経系原発リンパ腫

【用法・用量（案）】

通常，成人にはチラブルチニブとして 1 日 1 回 480 mg を空腹時に経口投与する．なお，患者の状態により適宜減量する.

引用文献

1） 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

2） 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.

3） 成田　善孝. 原発性脳腫瘍の疫学. CLINICIAN. 2014;627:244-50.

4） Qiu Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. Oncogene. 2000 Nov 20;19 (49):5651-61.

5） Kurosaki T, Hikida M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. Immunol Rev. 2009 Mar;228(1):132-48.

6） Genevier 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.

7） 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.

8） Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. Nat Rev Cancer. 2014 Apr;14(4):219-32.

9） 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.

10） 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.

11） 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.

12） 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.

2.6.2 薬理試験の概要文

小野薬品工業株式会社

目次

用語及び略号一覧 3
関連化合物の一覧表 5
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.3 副次的薬理試験 17
2.6.2.4 安全性薬理試験 19
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 24
2.6.2.6 その他の薬理試験 24
2.6.2.7 考察及び結論 25
2.6.2.8 図表 29
2.6.2.9 参考文献 30

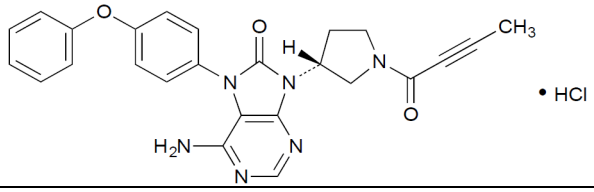
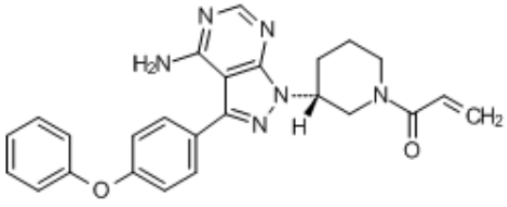
用語及び略号一覧

用語及び略号	略さない表現又は説明
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
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
AKT	プロテインキナーゼ B
ALP	アルカリホスファターゼ
ATP	アデノシン三リン酸
AUC24h	投与後 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCR	B 細胞受容体
BLK	Src ファミリーチロシンキナーゼ BLK
BLNK	B 細胞リンカー蛋白質
BMX	Bone marrow tyrosine kinase gene on chromosome X
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ
BTK-pY223	BTK タンパク質内のチロシン 223
CD3，CD4，CD20，CD28，CD63，CD69，CD79a，CD79b	CD 分子蛋白質
CLEC-2	C-type lectin-like receptor 2
Cmax	最高血漿中濃度
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
DMSO	ジメチルスルホキシド
EC_{50}	50%効果濃度
ECG	心電図
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
Fc γ R	Fc ガンマ受容体
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	胚中心 B 細胞様
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GVVI	血小板膜糖タンパク質VI
H_2O_2	過酸化水素
HEK293 細胞	ヒト胎児腎臓由来細胞株
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
hsCRP	高感度 C 反応性蛋白
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
IgE, IgG, IgM	免疫グロブリン E, G, M
IL-6	インターロイキン 6
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
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
MAPK	分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ

MC	メチロセルロース
M-CSF	マクロファージコロニー刺激因子
MFI	平均蛍光強度
mPDPN/Fc	Mouse Podoplanin Fc Chimera
NET	ノルエピネフリン輸送体
NETs	好中球細胞外トラップ
NF-κB	核内因子κB
Non-GCB	非胚中心 B 細胞様
P1P	Procollagen Type I C- Peptide
PBMC	末梢血単核細胞
PCNSL	中枢神経系原発リンパ腫
PDK	ホスホイノシチド依存性キナーゼ
PI3K	ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ
PIP3	ホスファチジルイノシトール 3 リン酸
PLCγ2	ホスホリパーゼ Cγ2
PRP	多血小板血漿
PQ 間隔あるいは PR 間隔	心電図 PQ 又は PR 間隔（房室伝導時間）
QRS 幅	Q 波の始まりから S 波の終わりまでの間隔
QT 間隔	Q 波の始まりから T 波の終わりまでの間隔
QTcB	Bazett の補正式により心拍数で補正した QT 間隔
QTcF	Fridericia の補正式により心拍数で補正した QT 間隔
QD あるいは q.d.	1 日 1 回
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RFU	相対蛍光単位
RLU	相対発光単位
Scid	重症複合免疫不全症
SD	Sprague-Dawley
SYK	Spleen チロシンキナーゼ
SRC	がん原遺伝子チロシンプロテインキナーゼ
TCR	T 細胞受容体
TEC	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TEC
TLR	Toll 様受容体
TNF-α	腫瘍壊死因子α
TRAP	酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ
TXK	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TXK

2.6.2 薬理試験の概要文
チラブルチニブ塩酸塩

関連化合物の一覧表

名称（説明）	構造式	その他の名称
チラブルチニブ 塩酸塩（原薬）		チラブルチニブ GS-4059
イブルチニブ （BTK 阻害剤）		Ibrutinib

2.6.2 薬理試験の概要文

各試験において，チラブルチニブ塩酸塩（以下，チラブルチニブ）を使用したが，本資料では，用量及び薬物濃度はすべてフリー体の量として表記した．

2.6.2.1 まとめ

チラブルチニブの効力を裏付ける試験を *in vitro* 及び *in vivo* で実施した．*In vitro* 試験では，チラブルチニブはヒト組換え BTK の活性を 2.10 nmol/L の IC_{50} 値で阻害した．また，阻害様式の検討から，チラブルチニブは BTK に共有結合し，不可逆的に阻害すると考えられた．類縁キナーゼ（FYN，LCK 及び LYNa）に対するチラブルチニブの選択性は，BTK に比して概ね 30 倍以上であったが，BMX，TXK 及び TEC に対しては，それぞれ 0.9，13.8 及び 8.7 倍であった．チラブルチニブはヒト末梢血由来 B 細胞の抗 IgM 抗体刺激による CD69 発現を抑制したが，ヒト末梢血由来 T 細胞の機能は抑制しなかった．チラブルチニブは ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 において細胞内 BTK 自己リン酸化を阻害し，細胞増殖を抑制するとともに，細胞死を誘導した．*In vivo* 試験では，チラブルチニブは TMD8 を用いたマウス異種移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示した．

副次的薬理試験として，67 種類の受容体，イオンチャンネル及び輸送体に対するチラブルチニブのリガンド結合阻害能を評価した結果，NET と DAT に対して阻害作用を示したが，それらの IC_{50} 値は BTK 酵素阻害活性と比較して 1000 倍以上高値であった．また，ヒトで BTK の発現が確認されている好塩基球，好中球，単球及び破骨細胞の各機能に対し，チラブルチニブは抑制作用を示した．

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 mg/kg/日以上で痛覚反応の低下及び歩行異常，サルでは 100 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 mg/kg/日であった．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 μmol/L であったが，覚醒下サルにおいて最高用量の 300 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．血液凝固系では，*in vitro* において 10 μmol/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 μmol/L であった．また，チラブルチニブは CLEL-2 惹起によるヒト血小板凝集を抑制し，その IC_{50} 値は 0.432～1.43 μmol/L であった．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

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)]，主として造血細胞のうち，特に B 細胞で発現し，T 細胞や形質細胞では発現していない[3)]．BTK は BCR を介して活性化し，BCR を介したシグナル伝達は，B 細胞の活性化と増殖を制御し，生存，分化及びクローン増殖を促進する[4) ~7)]．また，BTK は BCR を介したシグナル伝達だけでなく，TLR や CXC ケモカイン受容体 4 型及び 5 型のシグナル伝達にも関与し，B 細胞の活性化や遊走に寄与することが知られている[5) 8) 9)]．BTK 遺伝子に変異のある X 連鎖無ガンマグロブリン血症では，前駆 B 細胞（細胞質中 IgM 初期における μ H 鎖陽性）の増殖が不完全であり，B 細胞への分化がほぼ完全に停止するため，末梢の B 細胞及び形質細胞のほぼ完全な欠損と，すべてのクラスの免疫グロブリンの血清濃度の著しい低値が認められる[10) ~13)]．このことは，BTK が B 細胞への分化過程において重要な分子であることを示している．

BTK は自然免疫を担当するエフェクター細胞（単球，マクロファージ，好塩基球，好中球，破骨細胞及び肥満細胞）内にも存在し，Fc 受容体を介したシグナル伝達の調節により，細胞の分極化，ファゴサイトーシス，カルシウムシグナリング，抗原提示，サイトカインやケモカイン産生及び脱顆粒の調節に関与している[14)]．また，BTK のシグナル伝達は，血小板においてコラーゲン誘導 GPVI受容体の活性化を介した血小板凝集や微粒子放出を調節する[15)]．

チラブルチニブは，BTK の活性部位のシステイン残基と共有結合を形成するように設計されており[16)]，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る（図 2.6.2-1）．チラブルチニブは，BTK の SRC 相同ドメイン 3 内の Y223 における自己リン酸化[17)]を阻害する．

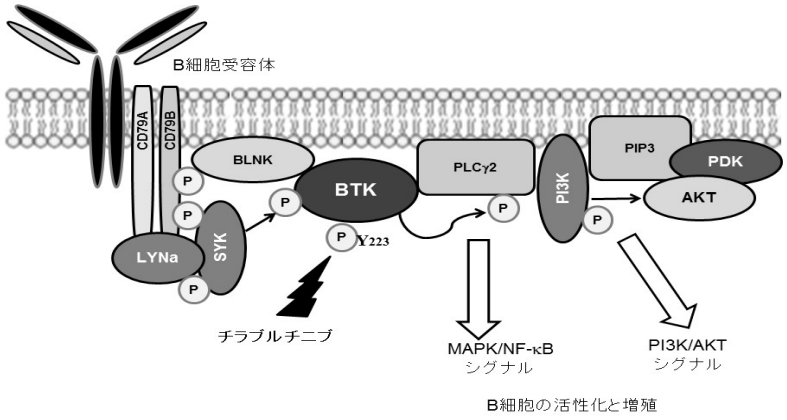


図 2.6.2-1　チラブルチニブによる BCR シグナル伝達経路の阻害

2.6.2.2.1 作用機序

2.6.2.2.1.1 BTK 阻害活性及びキナーゼ選択性

［評価資料 4.2.1.1-1］

ヒト組換え BTK に対するチラブルチニブの阻害強度及び類縁キナーゼ（FYN，LCK 及び LYNa）に対する選択性を評価した（表 2.6.2.2.1.1-1）．FYN 及び LYNa は BCR シグナル伝達に関与する BTK の上流に位置するキナーゼであり，LCK は TCR シグナル伝達に関与するキナーゼである．ヒト組換え BTK，FYN，LCK 及び LYNa に対する阻害活性を，合成基質を用いた Mobility Shift Assay 法により検討した．その結果，チラブルチニブの BTK，FYN，LCK 及び LYNa に対する IC_{50} 値は，それぞれ 2.10，2220，788 及び 3490 nmol/L であった．また，チラブルチニブの BTK に対する IC_{50} 値を 1 とした場合，これら類縁キナーゼに対して 375 倍以上の選択性を示した．

表 2.6.2.2.1.1-1 BTK 及び類縁キナーゼに対するチラブルチニブの阻害強度及び選択性

キナーゼ	IC_{50}（nmol/L）	IC_{50} に基づく選択性（BTK を基準にした場合）
BTK	2.10	1
FYN	2220	1060
LCK	788	375
LYNa	3490	1660

各キナーゼにそれぞれ Km 値付近の濃度の ATP と 10 濃度のチラブルチニブ（BTK：0.03～1000 nmol/L，類縁キナーゼ：1～30000 nmol/L）を添加し 30 分間プレインキュベーションした．その後，基質ペプチドを加え，更に室温で 1 時間反応させた．各濃度の阻害率（%）は各濃度 2 例の平均値とし，IC_{50} 値は各濃度の阻害率（%）を基に 4-parameter logistic モデルを用いた非線形回帰分析より算出した．

2.6.2.2.1.2 その他のキナーゼに対する選択性

［参考資料 4.2.1.1-2］

ヒトゲノムには BTK と同様に活性部位にシステイン残基を有するチロシンキナーゼが BTK 以外に 9 種類報告されており [18]，チラブルチニブがこれらに共有結合して阻害作用を示す可能性が考えられた．そこで，これら 9 種類のキナーゼ（BLK，BMX，EGFR，ERBB2，ERBB4，ITK，JAK3，TXK 及び TEC）に対するチラブルチニブの選択性を評価した（表 2.6.2.2.1.2-1）．その結果，チラブルチニブの BTK に対する IC_{50} 値を 1 とした場合，BLK，EGFR，ERBB2，ERBB4，ITK 及び JAK3 に対するチラブルチニブの選択性は 30 倍以上であった．一方，BMX，TXK 及び TEC に対する選択性はそれぞれ 0.9，13.8 及び 8.7 倍であった．

表 2.6.2.2.1.2-1　活性部位にシステイン残基を有するチロシンキナーゼに対するチラブルチニブの阻害強度及び選択性

キナーゼ	IC_{50}（nmol/L）	IC_{50} に基づく選択性（BTK を基準にした場合）
BTK	3.4±0.8	1
BLK	127	38
BMX	3.2±0.9	0.9
EGFR	2150±127	632
ERBB2	8730±3493	2568
ERBB4	318±65	94
ITK #	＞20000	＞5882
JAK3	5515±2425	1622
TXK	46.9±8.7	13.8
TEC	29.6±4.7	8.7

データはいずれも 3 つの別々の実験の平均値±標準偏差で示した．BLK は 2 つの別々の実験の平均値で示した．各キナーゼにそれぞれ Km 値付近の濃度の ATP と 10 濃度のチラブルチニブ（20000 nmol/L を最高濃度として公比 3 倍）を添加し，1 時間プレインキュベーションした．その後，基質ペプチドを加え，更に室温で 1 時間反応させた．IC_{50} 値は各濃度の阻害率（%）を基に sigmoidal dose-response モデルにより算出した．
最高濃度に設定した 20000 nmol/L においても阻害が認められなかった．

2.6.2.2.1.3　　BTK に対する阻害様式

［参考資料 4.2.1.1-3］

BTK に対するチラブルチニブの阻害様式は，質量分析法を用いてチラブルチニブと BTK との共有結合付加体形成を検出することにより評価した．チラブルチニブは BTK に対して付加体を形成し，質量分析によってチラブルチニブの分子量と一致する BTK の質量シフトが認められた．また，活性部位のシステインとの共有結合により BTK を不可逆的に阻害することが報告されている [6)] イブルチニブを過剰量添加しても，チラブルチニブと BTK との共有結合付加体は質量変化しなかったことから，チラブルチニブはイブルチニブと同様に，活性部位のシステインと共有結合することで，BTK を不可逆的に阻害することが示唆された（図 2.6.2.2.1.3-1）．

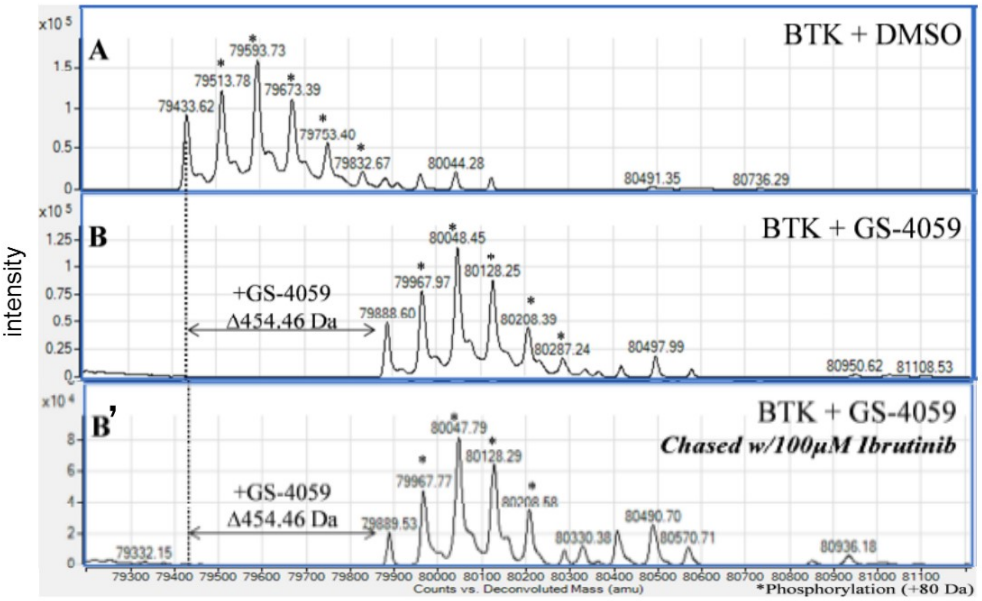


図 2.6.2.2.1.3-1　質量分析法によるチラブルチニブの阻害様式
BTK タンパク質 2 μ mol/L に DMSO（A），チラブルチニブ 10 μ mol/L（B）を添加し，4℃，18 時間静置した．チラブルチニブを添加し，4℃，18 時間静置後，イブルチニブ 100 μ mol/L（B’）を添加し，更に 4℃，6 時間静置した．

2.6.2.2.1.4　細胞内 BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの抑制作用

［参考資料 4.2.1.1-4］

チラブルチニブの細胞内 BTK に対するキナーゼ阻害活性をヒト PBMC 中の B 細胞及び ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 における BTK 自己リン酸化を指標に検討した（表 2.6.2.2.1.4-1 及び図 2.6.2.2.1.4-1）．その結果，ヒト PBMC 中の B 細胞及び TMD8 においてチラブルチニブは濃度に応じて BTK 自己リン酸化を抑制し，20 時間処置した際の IC_{50_MAX} はそれぞれ 1.90 及び 3.60 nmol/L であった．また，いずれの細胞においても作用強度が処置時間に応じて強くなることから，チラブルチニブは細胞内 BTK に対して緩慢結合型の阻害を示すと考えられた．

表 2.6.2.2.1.4-1　ヒト PBMC 及び TMD8 における BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの作用

	PBMC			TMD8		
	1 時間	6 時間	20 時間	1 時間	6 時間	20 時間
最大抑制率（%）	62.9（59.6~66.2）	62.9（60.8~65.0）	66.6（64.2~69.0）	75.8（71.0~80.7）	75.6（73.0~78.3）	81.3（77.2~85.4）
IC_{50_MAX}（nmol/L）	68.5（58.7~80.1）	6.79（5.86~7.87）	1.90（1.59~2.27）	50.3（40.8~61.9）	9.78（8.57~11.2）	3.60（2.87~4.52）
Hill slope	1.20（0.968~1.42）	1.22（1.01~1.42）	1.20（0.952~1.45）	1.73（1.18~2.28）	1.86（1.41~2.31）	1.44（0.996~1.88）

データは各 3 例の平均値と 95%信頼区間（括弧内）で示した．PBMC 及び TMD8 に媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 0.1～3000 nmol/L を処置した後，H_2O_2 により刺激した．刺激後，PBMC については抗 CD3 抗体，抗 CD20 抗体及び抗 BTK-pY223 抗体で免疫染色し，フローサイトメーターを用いて CD20 陽性 CD3 陰性細胞（B 細胞）領域に分離し，BTK-pY223 の MFI を測定した．TMD8 については，抗 BTK-pY223 抗体のみで免疫染色し，フローサイトメーターを用いて BTK-pY223 の MFI を測定した．最大抑制率（%），IC_{50_MAX} 及び Hill slope は，各濃度における抑制率（%）を基に非線形回帰分析により算出した．

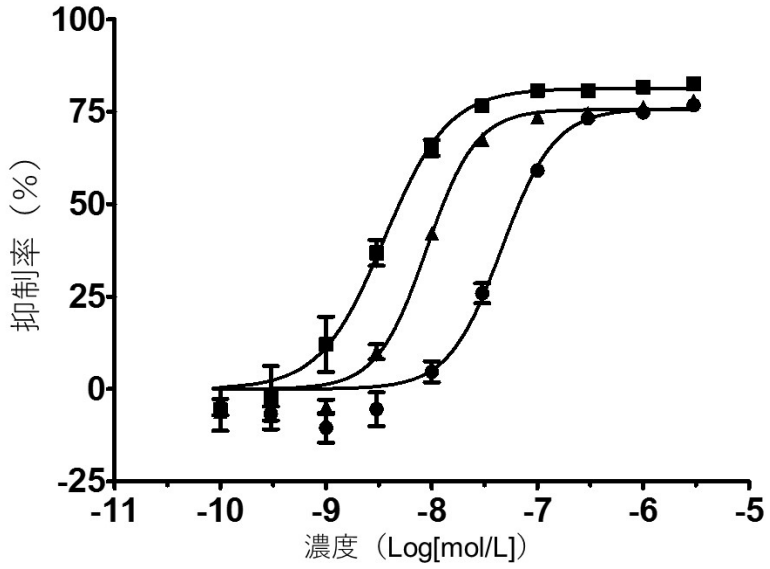


図 2.6.2.2.1.4-1　TMD8 における BTK リン酸化抑制の変化

データは各 3 例の平均値±標準誤差で示した．チラブルチニブを 1 時間処置（●），6 時間処置（▲）及び 20 時間処置（■）した後の BTK 自己リン酸化抑制率（%）を算出した．

2.6.2.2.1.5 ヒト末梢血 B 細胞及び T 細胞の活性化に対するチラブルチニブの作用

［参考資料 4.2.1.1-5］

ヒト PBMC 中の B 細胞及び T 細胞の活性化に対するチラブルチニブの作用を検討した．B 細胞及び T 細胞の活性化は，PBMC をそれぞれ抗 IgM 抗体及び抗 CD3/CD28 抗体で刺激した際のリンパ球活性化誘導分子マーカーである CD69 の発現を指標として評価し，チラブルチニブの抑制率（%）及び IC_{50} 値（nmol/L）を算出した（図 2.6.2.2.1.5-1）．その結果，チラブルチニブは，B 細胞の活性化を濃度に応じて抑制し，その IC_{50} 値は 13.8 nmol/L であった．一方，チラブルチニブは最高濃度である 10 μ mol/L においても T 細胞の活性化を抑制しなかった．

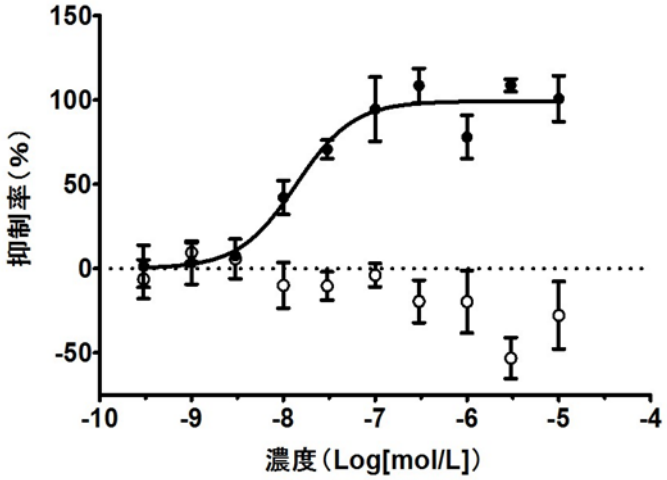


図 2.6.2.2.1.5-1　ヒト PBMC 中の B 及び T 細胞活性化に対するチラブルチニブの作用
データは各 3 例の平均値±標準誤差で示した．ヒト PBMC に媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 0.3～10000 nmol/L を 10 分間処置した後，B 細胞に対する作用評価では抗 IgM 抗体で 22 時間，T 細胞に対する作用評価では抗 CD3/CD28 抗体で 16 時間それぞれ刺激した．刺激後，CD3，CD20 及び CD69 抗体で免疫染色し，フローサイトメーターを用いて CD20 陽性 CD3 陰性細胞（B 細胞，●）及び CD3 陽性 CD20 陰性細胞（T 細胞，○）領域に分離し，CD69 の MFI を測定した．IC_{50} 値は各濃度における抑制率（%）を基に 4-parameter logistic モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．

2.6.2.2.2 *In vitro* 有効性

DLBCL は免疫組織学的に GCB と Non-GCB の 2 群に分類され，Non-GCB の方が予後不良であることが報告されている [19]．PCNSL は，病理学的に 95%が DLBCL であり，そのほとんどが Non-GCB に分類される [20] [21]．そこで，*in vitro* 及び *in vivo* 有効性試験は，主に Non-GCB に属する ABC-DLBCL 細胞株の TMD8 を用いて評価した．

2.6.2.2.2.1 ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 の増殖に対するチラブルチニブの抑制作用

［評価資料 4.2.1.1-6］

ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 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（図 2.6.2.2.2.1-1）．その結果，チラブルチニブは TMD8 の増殖を濃度に応じて抑制し，IC_{50} 値は 3.59 nmol/L であった．また，30 nmol/L 以上の濃度では TMD8 の増殖を完全に抑制した．

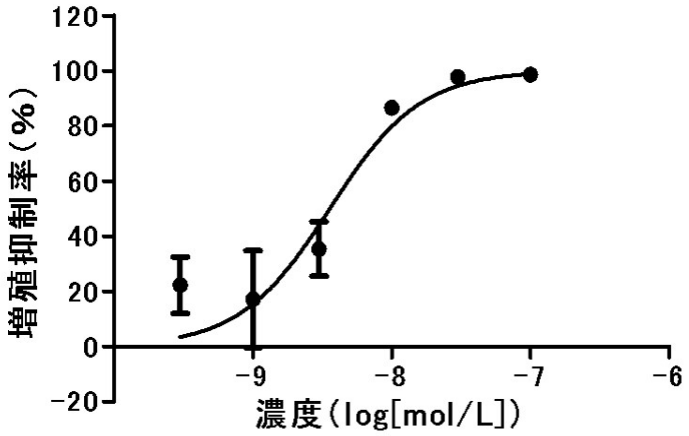


図 2.6.2.2.2.1-1　TMD8 の増殖に対するチラブルチニブの作用
データは各 3 例の平均値±標準誤差で示した．TMD8 に媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 0.3～100 nmol/L を処置し，37℃，5%CO_2，95%Air の条件下で 72 時間静置培養した．Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて細胞内在性 ATP 量に比例した発光シグナル（RLU）を測定した．IC_{50} 値は各濃度における増殖抑制率（%）を基に 2-parameter logistic モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．

2.6.2.2.2.2 ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 に対するチラブルチニブの細胞死誘導作用

［参考資料 4.2.1.1-4］

ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 に対するチラブルチニブの細胞死誘導作用を検討した（図 2.6.2.2.2.2-1）．その結果，チラブルチニブの処置後 48 時間より明らかな細胞死誘導が確認された．また，処置後 72 時間ではチラブルチニブの濃度に応じて細胞死誘導が認められた．一方，チラブルチニブを 6 時間処置後，洗浄操作を行い，1，24，48 及び 72 時間静置した場合，最高濃度においても，明らかな細胞死誘導作用は認められなかった．

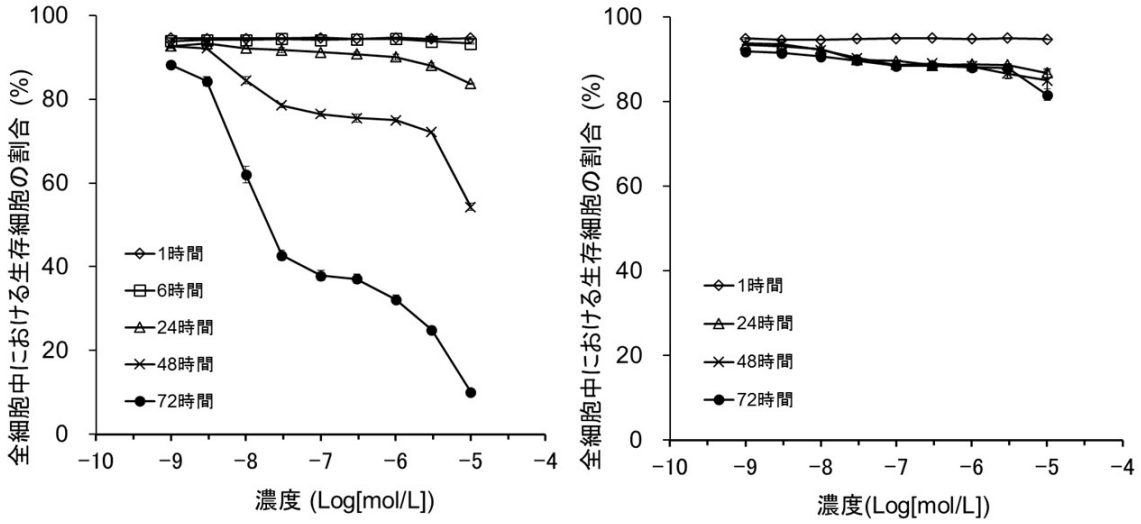


図 2.6.2.2.2.2-1　チラブルチニブの TMD8 に対する細胞死誘導作用の検討

データは各 3 例の平均値±標準誤差で示した．TMD8 に媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 1～10000 nmol/L を 1，6，24，48 及び 72 時間処置した（左図）．チラブルチニブ洗浄除去における細胞死誘導作用の検討では，6 時間処置した後，洗浄操作を行い，1，24，48，及び 72 時間静置した（右図）．各時間経過後，7-AAD で染色し，フローサイトメーターを用いて 7-AAD 陽性細胞率（%）を測定した．全細胞中における生存細胞数の割合（%）は，以下の式より算出した．

全細胞中における生存細胞数の割合（%）＝ 100 － 7-AAD 陽性細胞率（%）

2.6.2.2.2.3　その他の DLBCL 細胞株に対するチラブルチニブの増殖抑制作用

［参考資料 4.2.1.1-7］

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（表 2.6.2.2.2.3-1）．その結果，チラブルチニブは ABC-DLBCL 細胞株 TMD8，OCI-LY10 及び Ri-1 の増殖に対し同程度の阻害を示した．一方，GCB-DLBCL 細胞株 Pfeiffer の細胞増殖に対してチラブルチニブは明らかな抑制作用を示さず，EC_{50}値は TMD8 に比して 2000 倍以上高値であった．

表 2.6.2.2.2.3-1　その他の DLBCL 細胞株に対するチラブルチニブの増殖抑制作用

細胞株	分類	EC_{50}（nmol/L）	例数
TMD8	ABC-DLBCL	4.30±2.80	8
OCI-LY10		13.0±210	6
Ri-1		26±110	12
Pfeiffer	GCB-DLBCL	9100±1600	10

データは平均値±標準偏差で示した．各種細胞に媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 0.51～10000 nmol/L を処置し，37℃，5%CO_2，95%Air の条件下で 96 時間静置培養した．培養終了後，Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用い，細胞内在性 ATP 量に比例した RLU

を測定した．EC_{50} 値は各濃度における増殖抑制率（%）を基に 4-parameter variable slope モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．

2.6.2.2.3 *In vivo* 有効性

雌性 Scid マウスを用いた有効性試験において，投与経路は経口，投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．

2.6.2.2.3.1 マウス TMD8 異種移植モデルにおける用法用量

［参考資料 4.2.1.1-8］

マウス TMD8 皮下移植モデルを用いてチラブルチニブの用法用量を検討するため，1 日の投与量は同じにして 1 回及び 2 回の用法で反復経口投与し，最終評価日（Day 21）の腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を検討した（図 2.6.2.2.3.1-1）．その結果，1 日 1 回の用法では，チラブルチニブはいずれの用量群においても媒体群に比して有意に腫瘍体積を抑制しなかった．一方，1 日 2 回の用法では，チラブルチニブは 3 及び 10 mg/kg 群において媒体群に比して有意に腫瘍体積を抑制した．

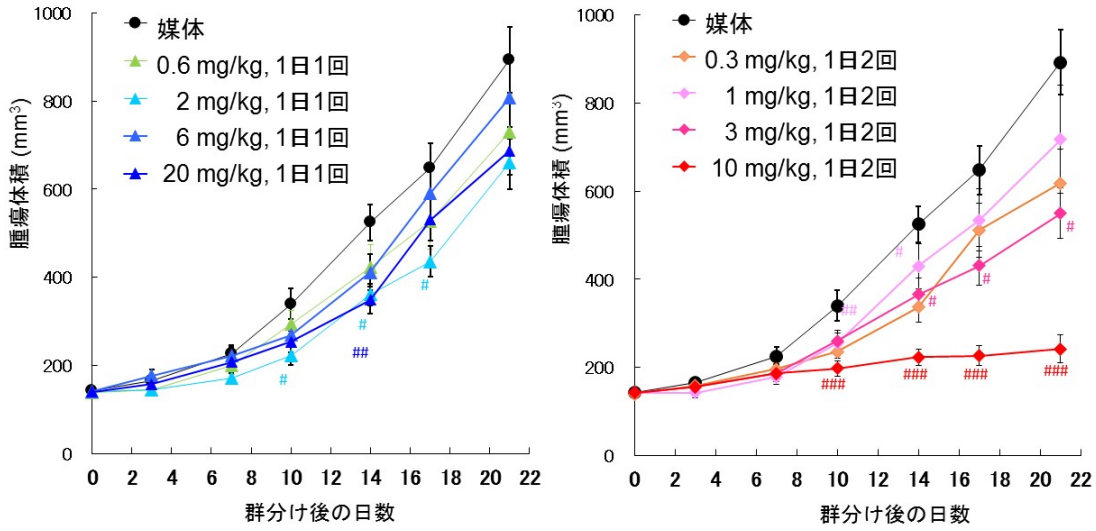


図 2.6.2.2.3.1-1　マウス TMD8 皮下移植モデルにおける用法用量

データは各群 10 例の平均値±標準誤差を示した．
雌性 Scid マウスの頸背部皮下に 1×10^8 cells/mL の TMD8 細胞懸濁液 0.1 mL を移植し，移植 2 日後に腫瘍体積を指標に群分けした．群分け日を Day 0 とし，媒体（0.5 w/v%MC）又はチラブルチニブ 0.6，2，6 及び 20 mg/kg を Day 0 から 1 日 1 回又は 0.3，1，3 及び 10 mg/kg を Day 0 から 1 日 2 回の用法で 21 日間反復経口投与した．群分け後は腫瘍径を 3 又は 4 日毎に測定し，腫瘍体積を算出した．媒体群と各チラブルチニブ群の腫瘍体積の比較は，Dunnett 検定により行った．p 値 5%未満を統計学的有意とした（# : $p<0.05$，## : $p<0.01$，### : $p<0.001$）．

2.6.2.2.3.2　　マウス TMD8 異種移植モデルにおける抗腫瘍効果

［評価資料 4.2.1.1-9，参考資料 4.2.1.1-10］

マウス TMD8 皮下移植モデルを用いてチラブルチニブの *in vivo* 抗腫瘍効果を検討した（図 2.6.2.2.3.2-1）．チラブルチニブは 1 日 2 回反復経口投与した．主要評価項目は最終評価日（Day 21）における腫瘍体積とし，チラブルチニブ群の媒体群の腫瘍体積に対する増殖抑制率（%），体重推移及び一般状態を副次評価項目とした．その結果，チラブルチニブ 3 mg/kg 群では Day 9 及び Day 15 において，10 mg/kg 群では Day 3 より媒体群に比して有意に腫瘍体積を抑制した．また，チラブルチニブは主要評価項目である Day 21 の腫瘍体積を用量に応じて抑制し，Day 21 における増殖抑制率は，1 mg/kg 群が-15.6%，3 mg/kg 群が 21.3%，10 mg/kg 群が 49.4%であった．なお，チラブルチニブのいずれの用量においても媒体と比して体重推移に差はなく，一般症状に影響も認められなかった．

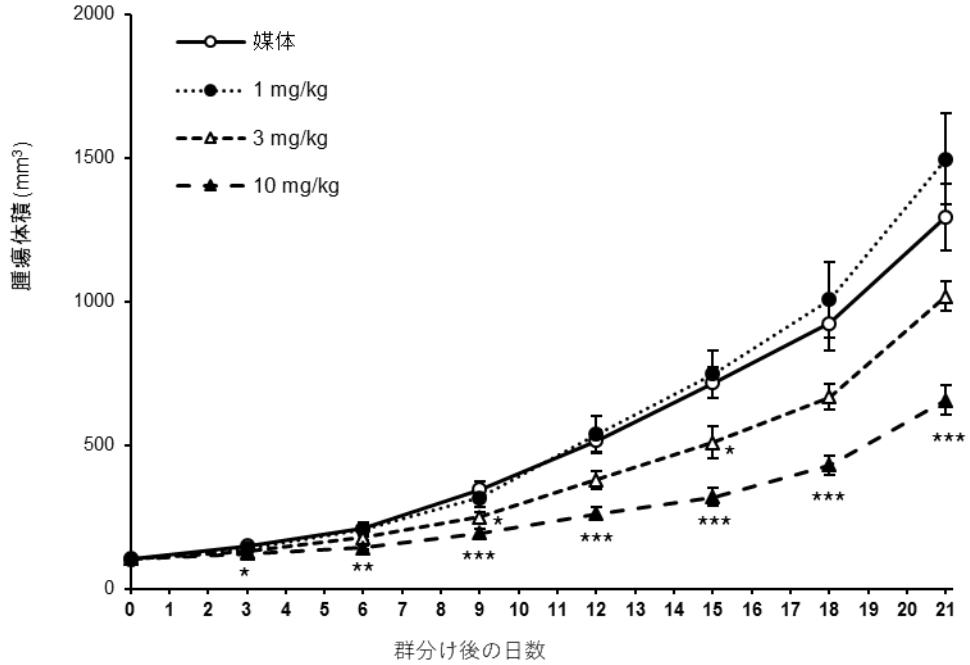


図 2.6.2.2.3.2-1　マウス TMD8 皮下移植モデルの腫瘍体積推移

データは各群 10 例の平均値±標準誤差を示した．
雌性 Scid マウスの頸背部皮下に 1×10^8 cells/mL の TMD8 細胞懸濁液 0.1 mL を移植し，移植 8 日後に腫瘍体積を指標に群分けした．群分け日を Day 0 とし，媒体（0.5 w/v%MC）又はチラブルチニブ 1，3 及び 10 mg/kg を Day 0 に 1 回，Day 1~Day 20 は 1 日 2 回反復経口投与した．観察終了日は Day 21 とし，群分け後は腫瘍径を 3 日毎に測定し，腫瘍体積を算出した．媒体群と各チラブルチニブ群の腫瘍体積の比較は，Dunnett 検定により行った．p 値 5%未満を統計学的有意とした（*：$p<0.05$, **：$p<0.01$，***：$p<0.001$）．Day 21 における各チラブルチニブ群の腫瘍体積を基に直線回帰分析した結果，傾きの p 値は $p<0.001$ であった．また，Day 21 の腫瘍体積増殖抑制率（%）は以下の式より算出した．
腫瘍体積増殖抑制率（%）＝（1 － 各チラブルチニブ群の腫瘍体積 Day 21／媒体群の腫瘍体積 Day 21）×100

次に同モデルを用いて TMD8 移植 22 又は 23 日後にチラブルチニブ 1，3 及び 10 mg/kg を単回投与し，腫瘍中の BTK リン酸化に対する抑制作用を経時的に評価した（図 2.6.2.2.3.2-2）．その結果，いずれの評価時間においても，腫瘍中 BTK リン酸化の抑制が確認された．また，チラブルチニブは概ね各評価時間において用量に応じて腫瘍中の BTK リン酸化を抑制した．

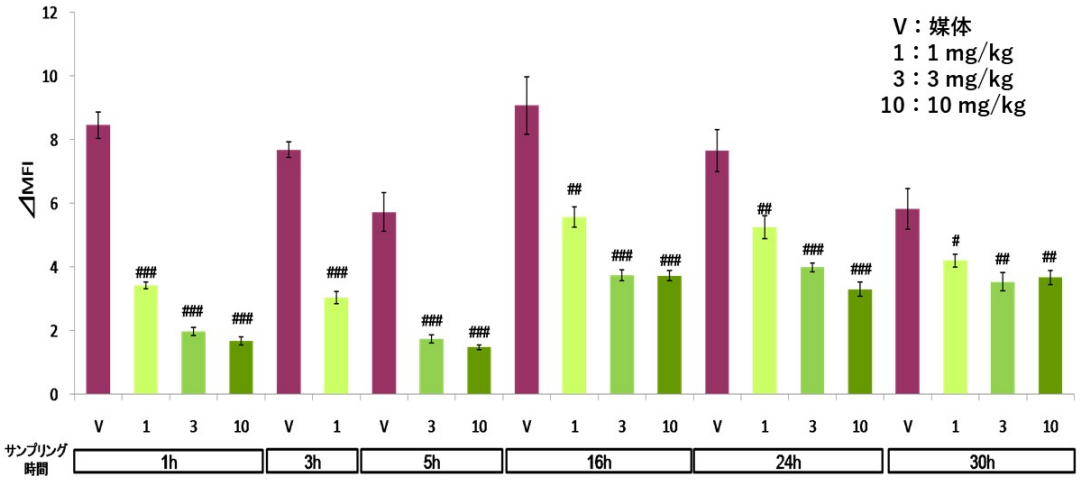


図 2.6.2.2.3.2-2　マウス TMD8 モデルにおける腫瘍中の BTK リン酸化抑制
データは各群 4 例の平均値±標準誤差で示した．雌性 Scid マウスの頸背部皮下に 1×10^8 cells/mL の TMD8 細胞懸濁液 0.1 mL を移植し，移植 21 日後に各個体の腫瘍体積を指標として層別無作為化法により各群 4 匹，計 21 群に群分けした．群分け 1 又は 2 日後に媒体（0.5 w/v%MC）又はチラブルチニブ 1，3 及び 10 mg/kg を単回経口投与し，その 1，3，5，16，24 又は 30 時間後に腫瘍を採取した．各腫瘍細胞を H_2O_2 により刺激後，抗 BTK-pY223 抗体で免疫染色し，BTK-pY223 の MFI を測定した．媒体群及び各チラブルチニブ群における⊿MFI は以下の式より算出した．
⊿MFI＝H_2O_2 刺激時の MFI － 非刺激時の MFI
媒体群と各チラブルチニブ群との比較は，1，5，16，24 及び 30 時間後は Dunnett 検定，3 時間後は t 検定により行い，p 値 5%未満を統計学的有意とした（#，p＜0.05．##，p＜0.01．###，p＜0.001）．投与 1，5，16，24 及び 30 時間後におけるチラブルチニブ群の⊿MFI を直線回帰分析した結果，傾きの p 値は，それぞれ 0.0000，0.1428，0.0004，0.0004 及び 0.1590 であった．

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　各種分子標的に対する結合

［評価資料 4.2.1.2-1］

G 蛋白質共役受容体，イオンチャネル，核ホルモン受容体，受容体型チロシンキナーゼ及び輸送体を含む 67 種類の分子標的のリガンド結合に対する阻害作用を評価した．その結果，チラブルチニブは 10 μmol/L で NET 及び DAT へのリガンド結合を 50%以上阻害し，これら

の IC_{50} 値はそれぞれ 10.2 及び 3.91 μmol/L（4.64 及び 1.78 μg/mL）であった．チラブルチニブはその他の分子標的に対して，10 μmol/L で 50%以上の阻害を示さなかった．

2.6.2.3.2 ヒト好塩基球，好中球及び単球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用

［参考資料 4.2.1.2-2，4.2.1.2-3，4.2.1.2-4，4.2.1.2-5］

抗 IgE 抗体刺激によるヒト好塩基球の脱顆粒，免疫複合体刺激によるヒト好中球の NETs 放出及び FcγR や TLR9 リガンド刺激によるヒト単球のサイトカイン産生に対するチラブルチニブの抑制作用を検討した（表 2.6.2.3.2-1）．その結果，チラブルチニブはヒト好塩基球，ヒト好中球及びヒト単球の細胞機能を抑制した．

表 2.6.2.3.2-1 ヒト好塩基球，好中球及び単球の機能に対するチラブルチニブの作用

細胞	機能	IC_{50} 値 （nmol/L，95%信頼区間）
ヒト好塩基球 [1]	抗 IgE 抗体刺激による CD63 発現	1 時間インキュベーション時： 377（84.8～1680） 6 時間インキュベーション時： 164（67.1～399）
ヒト好中球 [2]	免疫複合体刺激による NETs 放出	22.5（6.04～83.7）
ヒト単球 [3]	FcγR 及び TLR9 刺激による TNF-α 及び IL-6 産生量	FcγR 刺激時 TNF-α：12.4（8.45～18.2） IL-6：49.5（32.0～76.4） TLR9 刺激時 TNF-α：5.20（4.13～6.56） IL-6：12.8（9.43～17.3）

1. データは各 3 例の平均値と 95%信頼区間（括弧内）を示した．ヒト全血に媒体（0.1 vol% DMSO）又はチラブルチニブ 3～10000 nmol/L を処置し，室温で 1 又は 6 時間インキュベーションした．その後 anti-IgE を添加し，37℃で 20 分間刺激後，CD63 陽性細胞の割合を測定した．IC_{50} 値は各濃度における抑制率（%）を基に Sigmoid Emax モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．
2. データは各 3 例の平均値及び 95%信頼区間（括弧内）を示した．ヒト全血より調製した好中球に媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 0.3～10000 nmol/L を処置し，室温で 1 時間静置した．免疫複合体を固相化したプレートに SYTOX Green 溶液を加え，チラブルチニブを処置した好中球を播種し，37℃，5%CO_2，95%Air の条件下で 4 時間静置した．その後，好中球の NETs に結合した SYTOX Green の RFU を測定した．IC_{50} 値は各濃度における抑制率（%）を基に Sigmoid Emax モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．
3. データは各 4 例の平均値及び 95%信頼区間（括弧内）を示した．ヒト単球に媒体（0.1 vol% DMSO）又はチラブルチニブ 0.1～1000 nmol/L を処置し，37℃，5%CO_2，95%Air の条件下で 1 時間静置培養した後，ヒト単球を IgG 固相化プレートに播種又はヒト単球に TLR9 リガンドを処置した．更に 18 時間静置培養した後，培養上清中の TNFα 又は IL-6 濃度を測定した．IC_{50} 値（nmol/L）は各濃度における抑制率（%）を基に Sigmoid Emax モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．

2.6.2.3.3 ヒト破骨前駆細胞及び骨芽細胞に対するチラブルチニブの作用

［参考資料 4.2.1.2-6，4.2.1.2-7］

ヒト破骨前駆細胞の M-CSF/RANKL 刺激による分化及び骨芽細胞のヒト間葉系幹細胞を用いた分化に対するチラブルチニブの作用を検討した（表 2.6.2.3.3-1）．その結果，チラブルチニブはヒト破骨前駆細胞の分化を抑制し，その IC_{50} 値は 0.853 nmol/L であった．一方，骨芽細胞の分化の指標とした細胞内 ALP 含量，細胞内ハイドロキシアパタイト量及び培地中 P1P 濃度の産生に対して，いずれも 1 μmol/L まで抑制しなかった．

表 2.6.2.3.3-1 ヒト破骨前駆細胞及び骨芽細胞に対するチラブルチニブの作用

細胞	評価項目	IC_{50} 値 （nmol/L，95%信頼区間）
ヒト破骨前駆細胞 [1]	TRAP 陽性の多核細胞数	0.853（0.671～1.09）
ヒト骨芽細胞 [2]	細胞内 ALP 含量 細胞内ハイドロキシアパタイト量 培地中 P1P 濃度	いずれも ＞1 μmol/L

1. データは各 4 例の平均値及び 95%信頼区間（括弧内）を示した．ヒト破骨前駆細胞を M-CSF 及び RANKL を含む培地にて調製し，媒体（0.1 vol%DMSO）又はチラブルチニブ 0.1～1000 nmol/L を添加した後，37℃，5%CO_2，95%Air の条件下で 7 日間静置培養した．培養終了後，TRAP 染色を行い，TRAP 陽性の多核細胞（3 つ以上）を破骨細胞として計測した．IC_{50} 値（nmol/L）は各濃度における分化抑制率（%）を基に Sigmoid Emax モデルを用いた非線形回帰分析により算出した．
2. データは各 3 例の平均値で示した．ヒト間葉系幹細胞を媒体（0.1 vol%DMSO）又は 0.01～1 μmol/L のチラブルチニブを含む分化培地にて 37°C，5%CO_2，95%Air の条件下で 7 日間培養した．培養後の細胞内 ALP 含量，細胞内ハイドロキシアパタイト量及び培地中 P1P 濃度を測定した．

2.6.2.4 安全性薬理試験

チラブルチニブの安全性薬理試験として，コアバッテリー試験及び補足的安全性薬理試験を実施した．コアバッテリー試験では，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では，*in vitro* においてヒト，ラット及びサル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．

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

2.6.2.4.1.1 ラットにおける中枢神経系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1，参考資料：4.2.3.7.3-1］

SD 系ラット（雌 8 例／群）にチラブルチニブを 100，300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，中枢神経系に対する作用を評価した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．神経学的評価は Irwin の変法を用い，ホームケージ

内での観察，ハンドリングでの観察，オープンフィールドでの観察，刺激に対する反応の観察及び体温について，投与後 1，3，6，8，24 及び 48 時間に評価した．

その結果，300 mg/kg 以上で投与後 1～6 時間に痛覚反応の低下又は消失が認められた．

また，ラット 4 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg/日で死亡例が認められたことから［2.6.6.3.3］，ラットが死亡に至るまでの症状推移を検討するため，SD 系ラット（雌 8 例／群）に，チラブルチニブを 100，300，600 及び 1000 mg/kg の用量で 1 日 1 回 4 日間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．日中はホームケージ及びオープンフィールドで，夜間はビデオで一般状態を観察した．

初回投与後，1000 mg/kg/日の 2 例が死亡した．うち 1 例は，初回投与後 13 時間に歩行異常（つま先歩行）及び自咬，17 時間より歩行失調，19 時間より横臥が認められ，26 時間に死亡した．うち 1 例は，初回投与後 10 時間に歩行異常（つま先歩行）及び眼瞼下垂，13 時間に歩行失調，16 時間より横臥が認められ，24 時間に死亡発見された．

生存例では，300 mg/kg/日で投与 2 日の投与後 2 時間，600 mg/kg/日で投与 2 日の投与前より歩行異常（つま先歩行）を示す動物が散見された．1000 mg/kg/日では，全例で投与 1 又は 2 日に歩行異常（つま先歩行）が認められ，うち 2 例では自咬又は歩行失調が認められた後，投与 2 日の投与前及び投与後 8 時間に横臥が認められた．なお，当該 2 例を投与 2 又は 3 日より休薬した結果，これらの一般状態変化はいずれも消失した．

以上より，300 mg/kg/日以上で痛覚反応の低下又は消失，歩行異常（つま先歩行）などの一般状態変化が認められたことから，ラットの中枢神経系に対する無影響量は 100 mg/kg/日であった．

2.6.2.4.1.2　　サルにおける中枢神経系に対する作用

［評価資料：4.2.3.2-7］

カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験において，チラブルチニブの中枢神経系に対する作用を FOB 法により評価した．カニクイザル（雌雄各 4 又は 6 例／群）にチラブルチニブを 3，10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 4 週間反復経口投与した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．また，対照群，30 及び 100 mg/kg の雌雄各 2 例／群を休薬動物とし，4 週間の休薬による回復性を検討した．投与 3 及び 23 日並びに休薬 23 日に FOB 法による一般症状及び神経行動学的機能観察（以下，FOB 検査）を実施した．また，対照群の雄については投与 7 及び 14 日，100 mg/kg/日の雄については投与 7 及び 14 日並びに休薬 12 日にも検査を実施した．

投与 3 日の FOB 検査では，いずれの用量においても異常は認められなかった．しかし，一般状態観察において，投与 6 日以降に 100 mg/kg/日の雄 1 例で歩行失調，運動失調，座位

及び自発運動減少などの症状が認められたことから，対照群及び 100 mg/kg/日の雄を対象にFOB 検査を投与 7 日に追加実施した．その結果，一般状態の変化が認められた 100 mg/kg/日の雄 1 例では投与前から投与後 24 時間にかけて歩行失調，座位，行動の低下，意識の低下，手足を動かす力及び手足の動きの異常（不随意運動，起立不能など）や触覚反応の低下などが認められ，歩行失調は同用量のその他の雄 1 例でも認められた．これらの中枢神経症状は投与 14 日の FOB 検査においても 100 mg/kg/日の雄 3 例で認められた．また，投与 23 日のFOB 検査において 100 mg/kg/日の雌 2 例で行動の低下又は歩行失調が認められた．100 mg/kg/日の雌雄で認められた中枢神経症状は休薬 12 及び 23 日の FOB 検査では認められず，休薬により回復する変化であった．30 mg/kg/日以下の用量では，いずれの時点の FOB 検査においてもチラブルチニブによる影響は認められなかった．

以上より，100 mg/kg/日で運動機能異常を主体とする中枢神経症状が認められたことから，サルの中枢神経系に対する無影響量は 30 mg/kg/日であった．

2.6.2.4.1.3 サルにおける体温に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

テレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒下のカニクイザル（雄 5 例）を用いて，チラブルチニブの体温に対する作用を評価した．チラブルチニブはクロスオーバー法により 0，10，30，100 及び 300 mg/kg の用量で単回経口投与した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．体温は投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に測定した．

その結果，チラブルチニブは 300 mg/kg まで体温に影響を示さなかった．

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1 hERG チャネル電流に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-3］

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により，hERG チャネル電流への作用を *in vitro* にて評価した．チラブルチニブは 0.1，0.3，1，3，10 及び 30 μmol/L の濃度で細胞を静置したチャンバー内に灌流した．陰性対照には媒体である 0.1 vol%DMSO を用いた．

その結果，チラブルチニブは 1 μmol/L（0.45 μg/mL）以上で濃度に応じた hERG チャネル電流に対する抑制作用を示し，その IC_{50} 値は 5.59 μmol/L（2.54 μg/mL）であった．

2.6.2.4.2.2 サルにおける心血管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

テレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒下のカニクイザル（雄 5 例）を用いて，チラブルチニブの心血管系に対する作用を評価した．チラブルチニブはクロスオーバー法により 0，10，30，100 及び 300 mg/kg の用量で単回経口投与した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．血圧，心拍数及び ECG パラメータ（PR 間隔，QRS 幅，QT 間隔及び QTcB）は投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に測定した．

その結果，チラブルチニブは 300 mg/kg まで血圧，心拍数及び ECG パラメータに影響を示さなかった．

2.6.2.4.2.3 ラットにおける心血管系に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-4］

麻酔下の SD 系ラット（雌 5 例／群）にチラブルチニブを 1000 mg/kg の用量で単回十二指腸内投与し，心血管系に対する作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．血圧，心拍数及び ECG パラメータ（PQ 間隔，QRS 幅，QTcF）は投与前，投与後 1，2，4 及び 6 時間に測定した．

その結果，チラブルチニブは 1000 mg/kg において血圧，心拍数及び ECG パラメータに影響を示さなかった．

2.6.2.4.3 呼吸系に対する作用

2.6.2.4.3.1 サルにおける呼吸系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

テレメトリー送信器を埋め込んだ覚醒下のカニクイザル（雄 5 例）を用いて，チラブルチニブの呼吸系に対する作用を評価した．チラブルチニブはクロスオーバー法により 0，10，30，100 及び 300 mg/kg の用量で単回経口投与した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%MC 溶液を投与した．呼吸数及び血液ガスパラメータ（動脈血 pH，動脈血酸素分圧，動脈血炭酸ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度）は投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に測定した．

その結果，チラブルチニブは 300 mg/kg まで呼吸数及び血液ガスパラメータに影響を示さなかった．

2.6.2.4.4 補足的安全性薬理試験

2.6.2.4.4.1 ヒト血小板に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-5］

健康成人の血液から作製した PRP（5 例／群）を用いて，*in vitro* でチラブルチニブの血小板凝集に対する惹起作用，ADP 又はコラーゲン惹起による血小板凝集に対する抑制作用を評価した．チラブルチニブは 0.001，0.01，0.1，1，3，6，10 及び 100 μmol/L の濃度で PRP に添加し，陰性対照には 0.5 vol%DMSO を用いた．

その結果，チラブルチニブは最高濃度である 100 μmol/L までヒト血小板凝集に対する惹起作用を示さなかった．一方，10 μmol/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た．ADP 惹起によるヒト血小板凝集率は 0，10 及び 100 μmol/L でそれぞれ 74.4，58.8 及び 49.4%であり，コラーゲン惹起によるヒト血小板凝集率は 0，10 及び 100 μmol/L でそれぞれ 79.4，69.0 及び 10.2%であった．チラブルチニブのヒト血小板凝集に対する無影響量は 6 μmol/L（2.73 μg/mL）であった．

2.6.2.4.4.2 ヒトにおける CLEC-2 を介した血小板凝集に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-6］

健康成人の血液から作製した PRP（2 又は 3 例／群）を用いて，*in vitro* で CLEC-2 を介した血小板凝集に対する抑制作用を検討した．チラブルチニブは 0.1，0.3，1，3 及び 10 μmol/L の濃度で PRP に添加し，2，60 及び 240 分間のインキュベーション後，抗 CLEC-2 抗体惹起による血小板凝集を検討した．陰性対照には 0.1 vol%DMSO を用いた．

その結果，チラブルチニブは抗 CLEC-2 抗体惹起によるヒト血小板凝集を時間に応じて抑制した．ヒト血小板凝集に対する IC_{50} 値は，2，60 及び 240 分の各インキュベーション条件下においてそれぞれ 1.43，1.11 及び 0.432 μmol/L（0.196～0.650 μg/mL）であった．

2.6.2.4.4.3 ラット及びカニクイザル血小板に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-7］

SD 系ラット及びカニクイザルの血液から作製した PRP（ラット：3～5 例／群，サル：1～5 例／群）を用いて，*in vitro* で ADP 又はコラーゲン惹起及び CLEC-2 を介した血小板凝集に対する抑制作用を検討した．チラブルチニブは 0.1，0.3，1，3 及び 10 μmol/L の濃度で PRP に添加し，2，60 及び 240 分間のインキュベーション後，ADP 又はコラーゲン惹起並びに CLEC-2 を介した血小板凝集を検討した．陰性対照には 0.1 vol%DMSO を用いた．なお，CLEC-2 を介した血小板凝集のための惹起剤として，サル血小板には抗 CLEC-2 抗体を用い

たが，抗 CLEC-2 抗体に反応しなかったラット血小板には mPDPN/Fc 及び抗マウス IgG 抗体を用いた．

その結果，チラブルチニブは ADP 惹起によるラット及びサル血小板凝集を抑制しなかったが，コラーゲン惹起によるラット及びサル血小板凝集を抑制した．その IC_{50} 値は，2，60 及び 240 分の各インキュベーション条件下において，ラット血小板ではそれぞれ 4.09，2.90 及び 0.643 μmol/L（0.292～1.86 μg/mL），サル血小板ではそれぞれ 1.37，0.110 及び 0.194 μmol/L（0.0500～0.623 μg/mL）であった．また，チラブルチニブは CLEC-2 を介したラット及びサル血小板凝集を抑制した．その IC_{50} 値は，2，60 及び 240 分の各インキュベーション条件下において，ラット血小板ではそれぞれ 4.38，1.74 及び 0.704 μmol/L（0.320～1.99 μg/mL），サル血小板ではそれぞれ 1.24，0.582 及び 0.374 μmol/L（0.170～0.564 μg/mL）であった．

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし

2.6.2.6 その他の薬理試験

2.6.2.6.1 サル末梢血 B 細胞の BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの作用

［参考資料 4.2.1.1-11］

チラブルチニブの細胞内 BTK に対するキナーゼ阻害活性をサル PBMC 中の B 細胞における BTK 自己リン酸化を指標に検討した．その結果，チラブルチニブは投与 4 及び 24 時間後において，概ね用量に応じてサル PBMC 中の B 細胞の BTK 自己リン酸化を抑制した（図 2.6.2.6.1-1）．

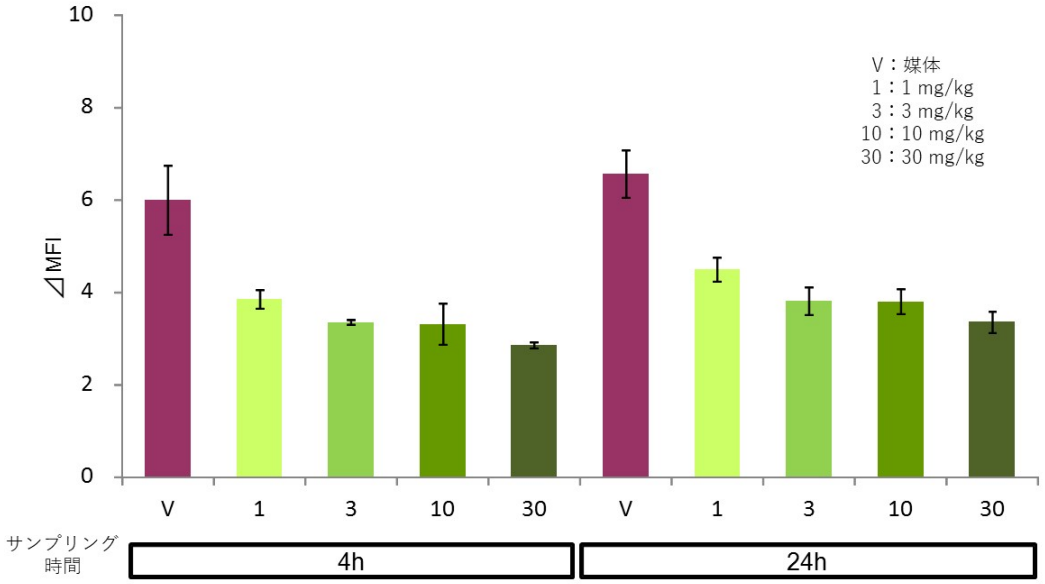


図 2.6.2.6.1-1　サル末梢血 B 細胞の BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの作用
データは各群 3 例の平均値±標準誤差で示した．雄性カニクイザルに媒体（0.5 w/v%MC）又はチラブルチニブ 1，3，10 及び 30 mg/kg を 13 週間反復経口投与した毒性試験［2.6.6.3.8］において，最終投与の 4 及び 24 時間後の血液を採取し，PBMC を調製した．H_2O_2 により刺激後，抗 BTK-pY223 抗体で免疫染色し，BTK-pY223 の MFI を測定した．媒体群及び各チラブルチニブ群における⊿MFI は以下の式より算出した．⊿MFI＝H_2O_2 刺激時の MFI －非刺激時の MFI

2.6.2.7　　考察及び結論

チラブルチニブはヒト組換え BTK を阻害し，その IC_{50} 値は 2.10 nmol/L であった．質量分析法を用いてチラブルチニブの BTK への阻害様式を検討した結果，チラブルチニブはイブルチニブと同様に BTK の活性部位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．チラブルチニブのキナーゼ選択性を検討した結果，BCR シグナル伝達に関与する BTK の上流キナーゼである FYN 及び LYNa，並びに TCR シグナル伝達に関与するキナーゼである LCK に対して 300 倍を超える選択性を示した．また，BTK と同様，活性部位にシステイン残基を有する 6 種類のキナーゼ（BLK，EGFR，ERBB2，ERBB4，ITK 及び JAK3）に対して 30 倍を超える選択性を示した．チラブルチニブは *in vitro* においてヒト末梢血 B 細胞の BTK 自己リン酸化を阻害し，抗 IgM 抗体刺激による活性化を抑制したのに対し，ヒト末梢血 T 細胞の活性化を抑制しなかった．これらはチラブルチニブが LCK，ITK あるいは JAK3 など TCR シグナル伝達に関与するキナーゼに比して，BTK への選択性が高いことに基づくものと考えられた．

一方，チラブルチニブは BMX，TXK 及び TEC のキナーゼ活性に対しては BTK と比して 0.9，13.8 及び 8.7 倍の阻害活性を有することから，これらキナーゼを阻害した際の影響につ

いて以下に考察した．BMX は，G 蛋白質共役受容体，インテグリン，受容体型チロシンキナーゼ，抗原受容体及びサイトカイン受容体を介した Stat シグナル伝達経路の活性化に関与し，細胞接着，アクチンの再構成，カルシウムの代謝などの機能に関与することが報告されている[22]．一方，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 細胞特異的に発現して Th1 細胞の分化に関与しているという報告があるが[23][24]，一方，TXK 欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞では正常な TCR 応答を示すこと[25]，また，チラブルチニブはヒト末梢血 T 細胞の活性化に影響を及ぼさなかったことから（2.6.2.2.1.5），ヒトに及ぼす明らかな影響はないものと推察される．TEC は，骨髄系細胞およびリンパ球系細胞に発現し，増殖刺激に反応して分化誘導に関与するが，TEC 欠損マウスは正常に発育し免疫系に大きな変化はない[26]．一方，TEC と BTK を二重欠損した際には，B リンパ球成熟及び破骨細胞形成が著しく抑制されることが報告されている[26][27]．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［2.6.6.3.5］，T 細胞依存性の抗体産生を抑制した［2.6.6.8.2.1］．これらを考慮すると，チラブルチニブの B 細胞への作用に TEC への阻害も関与する可能性が考えられた．なお，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，RANKL 惹起マウス骨破壊モデルにおいて骨破壊の進行を抑制することが報告されているが[28]，ラット及びサル反復投与毒性試験で骨梁増生など骨吸収抑制を示唆する変化が認められなかったことから，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．

PCNSL は病理学的にそのほとんどが ABC-DLBCL を含む Non-GCB に分類されることから[20][21]，チラブルチニブの *in vitro* 及び *in vivo* 有効性試験は，主に ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 を用いて評価した．*In vitro* 有効性試験では，チラブルチニブは濃度に応じて TMD8 の細胞増殖を抑制し，また細胞死を誘導した．これらの作用濃度はいずれも，チラブルチニブが TMD8 の細胞内 BTK 自己リン酸化を阻害する濃度と同程度であることから，BTK 阻害に基づくものと考えられた．TMD8 を含む各種 DLBCL 細胞株に対するチラブルチニブの増殖抑制作用を検討した結果，ABC-DLBCL 細胞株である OCI-LY10 及び Ri-1 の増殖に対するチラブルチニブの EC_{50} 値は，いずれも TMD8 と同程度であったが，GCB-DLBCL 細胞株である Pfeiffer の増殖に対する EC_{50} 値は TMD8 に比して 2000 倍以上高値であった．ABC-DLBCL 細胞株では CD79a，CD79b 等の遺伝子変異により BCR シグナル経路が恒常的に活性化されていることから[29]，その下流にある BTK をチラブルチニブが強力に阻害することで，GCB-DLBCL 細胞株に比して強い増殖抑制作用を示したと考えられた．

In vivo 有効性試験では，チラブルチニブは ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 を用いたマウス異種移植モデルにおいて，1 日 2 回の反復投与により用量に応じて抗腫瘍効果を示した．また，同モデルでチラブルチニブは，抗腫瘍効果を示す用量で腫瘍中 BTK リン酸化を阻害したことから，BTK 阻害に基づき腫瘍増殖が抑制されたと考えられた．一方，用法については，1 日 2 回投与と同じ 1 日量を 1 日 1 回反復投与しても，用量に応じた有意な抗腫瘍効果は認められなかった．この結果はマウスの血中でチラブルチニブが速やかに消失し（投与後 16 時間までに検出限界以下）［2.6.4.4.4］，1 日 1 回投与では BTK 阻害が持続せず，細胞増殖を十分に抑制できなかったことが原因と考えられた．よって，チラブルチニブが抗腫瘍効果を発揮するためには持続的に BTK を阻害する必要があると考えられた．

副次的薬理試験では，67 種類の各分子標的に対するチラブルチニブのリガンド結合阻害能並びに BTK の発現が確認されているヒト好塩基球[30]，ヒト好中球[31]，ヒト単球[32]及びヒト破骨前駆細胞[27]に対する作用を検討した．チラブルチニブは NET 及び DAT に対して結合阻害作用（IC_{50}：10.2 及び 3.91 μmol/L［4.64 及び 1.78 μg/mL］）を示したが，これらの IC_{50} 値は BTK 酵素阻害活性（IC_{50}：2.10 nmol/L）に比較して 1000 倍以上高値である．また，臨床用量である本薬 480 mg QD を投与した際の血漿中非結合型濃度の Cmax 0.215 μg/mL［2.7.2.2.3.3］の 22 及び 8.3 倍に相当することから，臨床使用時に影響を及ぼす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，これらの作用強度はヒト末梢血 B 細胞に対する作用強度と同程度であったことから，臨床用量では B 細胞の機能に加えて，好塩基球，好中球及び単球の機能を抑制すると考えられた．また，チラブルチニブは *in vitro* においてヒト骨芽細胞の機能に影響を及ぼさなかったが，BTK 酵素阻害活性を示す濃度付近でヒト破骨前駆細胞の分化を抑制した（IC_{50} 値：0.853 nmol/L）．上述の通り，ラット及びサル反復投与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ていないことから，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．

安全性薬理試験では，チラブルチニブの中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する作用並びに血小板凝集に対する作用を評価した結果，中枢神経系及び血小板凝集に対する影響が認められた．

チラブルチニブの中枢神経系に対する影響として，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，無影響量における Cmax と臨床用量における Cmax（2.69 μg/mL）

［2.7.2.2.3.3］との安全域はそれぞれ 3.1 及び 0.98～1.1 倍（表 2.6.2.7-1），無影響量における AUC24h と臨床用量における AUC24h（13.4 μg･h/mL）［2.7.2.2.3.3］との安全域はそれぞれ 3.2 及び 1.0～1.1 倍であった（表 2.6.2.7-2）．臨床用量と中枢神経系に対する無影響量の安全域が 1 倍程度であること，ラット及びサルにおいて中枢神経症状の悪化により死亡又は切迫剖検に至る例が認められていることを踏まえると（2.6.2.4.1.1）［2.6.6.3.7］，臨床使用時には中枢神経症状に留意する必要があると考える．

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 μmol/L（4.54 μg/mL）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 μmol/L（2.73 μg/mL）と臨床用量における Cmax との安全域は 1 倍（1.0 倍）であった（表 2.6.2.7-1）．臨床用量と血小板凝集に対する無影響量の安全域や，臨床において結膜出血，血尿など出血に関連した事象が認められていること［2.7.4.2.1.5］を踏まえると，臨床使用時には出血に関連した有害事象に留意する必要があると考える．なお，チラブルチニブは CLEC-2 を介したヒトの血小板凝集を低濃度より抑制し，その IC_{50} 値は 0.432～1.43 μmol/L（0.196～0.650 μg/mL）であったが，CLEC-2 の生体内リガンドであるポドプラニンは血管内皮には存在せず [33]，抗 CLEC-2 抗体を処置したマウスにおいて出血性の変化は報告されていないことから [34] [35]，CLEC-2 を介した血小板凝集の阻害作用は全身出血などの重大な出血リスクとなる可能性は低いと考えられた．

その他，心血管系に対して，チラブルチニブは *in vitro* で hERG チャネル電流を阻害し，その IC_{50} 値は 5.59 μmol/L（2.54 μg/mL）であったが，覚醒下サルにおいて最高用量の 300 mg/kg まで血圧，心拍数及び心電図に対して影響を示さなかった．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．チラブルチニブの心血管系及び呼吸系に対する無影響量は 300 mg/kg（Cmax：12.4 μg/mL）であり，臨床用量における Cmax との安全域は 4.6 倍であったことから（表 2.6.2.7-1），チラブルチニブが臨床において心血管系又は呼吸系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

以上の結果から，チラブルチニブは運動機能異常などの中枢神経症状や出血に関連した有害事象に留意することで，PCNSL の新たな治療選択肢となり得ると考えられた．

表 2.6.2.7-1　安全性薬理試験の無影響量における Cmax 及びヒトの Cmax 比

試験項目	動物種	無影響量（mg/kg）		性別	Cmax（μg/mL）		動物／ヒト Cmax 比 [d]
					初回	反復	
中枢神経系	ラット	100		雌	8.35	－	3.1
	サル	一般行動，神経行動学的機能	30	雄 雌	1.56 [a] 1.95 [a]	2.64 [a] 2.93 [a]	0.58～0.98 0.72～1.1
		体温	300	雄	12.4 [b]	－	4.6
心血管系	サル	300		雄	12.4 [b]	－	4.6
呼吸系							
血液凝固系（*In vitro*）	ヒト	APD 惹起及びコラーゲン惹起血小板凝集抑制作用			2.73 [c]	－	1.0

－：該当なし
a：サルの 4 週間反復投与毒性試験における Cmax［2.6.7.7D］
b：サルの 1 週間反復投与毒性試験における Cmax［2.6.7.6］
c：ADP 惹起及びコラーゲン惹起による血小板凝集抑制に対する無影響濃度
d：PCNSL 患者にチラブルチニブを 480 mg/person の用量で空腹時に 1 日 1 回 28 日間経口投与した際の投与 28 日のチラブルチニブの Cmax（2.69 μg/mL）［2.7.2.2.3.3］との比較

表 2.6.2.7-2　中枢神経系に対する無影響量における AUC24h 及びヒトの AUC24h 比

動物種	無影響量（mg/kg）	性別	AUC24h（μg･h/mL）		動物／ヒト AUC24h 比 [b]
			初回	反復	
ラット	100	雌	42.4	－	3.2
サル	30	雄 雌	11.1 [a] 11.5 [a]	13.5 [a] 15.2 [a]	0.83～1.0 0.86～1.1

－：該当なし
a :サルの 4 週間反復投与毒性試験における AUC24h［2.6.7.7D］
b : PCNSL 患者にチラブルチニブを 480 mg/person の用量で空腹時に 1 日 1 回 28 日間経口投与した際の投与 28 日のチラブルチニブの AUC24h（13.4 μg･h/mL）［2.7.2.2.3.3］との比較

2.6.2.8　図表

図表は本文中に記載した.

2.6.2.9 参考文献

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） Genevier 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） Kenny EF, Quinn SR, Doyle SL, Vink PM, van Eenennaam H, O'Neill LA. Bruton's tyrosine kinase mediates the synergistic signalling between TLR9 and the B cell receptor by regulating calcium and calmodulin. PLoS ONE. 2013 Aug 14;8(8):e74103.

9） de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012 Mar 15;119(11):2590-4.

10） Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. Cell. 1993 Jan 29;72(2):279-90.

11） Conley ME, Rohrer J, Rapalus L, Boylin EC, Minegishi Y. Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse. Immunol Rev. 2000 Dec;178:75-90.

12） Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. Annu Rev Immunol. 2009;27:199-227.

13） Nomura K, Kanegane H, Karasuyama H, Tsukada S, Agematsu K, Murakami G, et al. Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway. Blood. 2000 Jul 15;96(2):610-7.

14） Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. Nature Rev Immunol. 2008 Jan;8(1):34-47.

15） Hsu J, Gu Y, Tan SL, Narula S, DeMartino JA, Liao C. Bruton's Tyrosine Kinase mediates platelet receptor-induced generation of microparticles: a potential mechanism for amplification of inflammatory responses in rheumatoid arthritis synovial joints. Immunol Lett. 2013 Feb;150(1-2):97-104.

16） Yu H, Truong H, Mitchell S, Liclican A, Gosink J, Li W, et al. Homogeneous BTK Occupancy Assay for Pharmacodynamic Assessment of Tirabrutinib (GS-4059/ONO-4059) Target Engagement. SLAS Discov. 2018 Oct;23(9):919-929.

17） 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.

18） Liu Q, Sabnis Y, Zhao Z, Zhang T, Buhrlage SJ, Jones LH, et al. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. Chem Biol. 2013 Feb 21;20(2):146-59.

19） Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 2004 Jan 1;103(1):275-82.

20） 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.

21） 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.

22） Takesono A, Finkelstein LD, Schwartzberg PL. Beyond calcium: new signaling pathways for Tec family kinases. J Cell Sci. 2002 Aug 1;115(Pt15):3039-48.

23） 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.

24） 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-γ Gene Transcription. J Immunol. 2002 Mar 1;168(5):2365-70.

25） 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.

26） 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.

27） 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.

28） 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.

29） 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.

30） Smiljkovic D, Blatt K, Stefanzl G, Dorofeeva Y, Skrabs C, Focke-Tejkl M, et al. BTK inhibition is a potent approach to block IgE-mediated histamine release in human basophils. Allergy. 2017 Nov;72(11):1666-1676.

31） Volmering S, Block H, Boras M, Lowell CA, Zarbock A. The Neutrophil Btk Signalosome Regulates Integrin Activation during Sterile Inflammation. Immunity. 2016 Jan 19;44(1):73-87.

32） Fiorcari S, Maffei R, Audrito V, Martinelli S, Ten Hacken E, Zucchini P, et al. Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. Oncotarget. 2016 Oct 4;7(40):65968-65981.

33） Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol. 1999 Feb;154(2):385-94.

34） Bender M, May F, Lorenz V, Thielmann I, Hagedorn I, Finney BA, et al. Combined in vivo depletion of glycoprotein VI and C-type lectin-like receptor 2 severely compromises hemostasis and abrogates arterial thrombosis in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 May;33(5):926-34.

35） May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vogtle T, Eble J, et al. CLEC-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. Blood. 2009 Oct 15;114(16):3464-72.

2.6.3 薬理試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 10
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 18
2.6.3.6 その他の薬理試験 19

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：チラブルチニブ塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
BTK 阻害活性及びキナーゼ選択性	ヒト組換え BTK, FYN, LCK, LYNa	*In vitro*	[redacted]	[redacted]0166	4.2.1.1-1
その他のキナーゼに対する選択性	BTK, BLK, BMX, EGFR, ERBB2, ERBB4, ITK, JAK3, TXK, TEC	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc.	PC-401-2011	4.2.1.1-2 （参考資料）
BTK に対する阻害様式	ヒト全長 BTK，質量分析	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc.	PC-401-2007	4.2.1.1-3 （参考資料）
細胞内 BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの抑制作用 ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 に対するチラブルチニブの細胞死誘導作用	ヒト末梢血単核細胞， ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8 ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM032	4.2.1.1-4 （参考資料）
ヒト末梢血 B 細胞及び T 細胞の活性化に対するチラブルチニブの作用	ヒト末梢血単核細胞	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM021	4.2.1.1-5 （参考資料）
ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 の増殖に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]QA001	4.2.1.1-6
その他の DLBCL 細胞株に対するチラブルチニブの増殖抑制作用	ヒトびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞株	*In vitro*	Gilead Sciences, Inc.	PC-401-2003	4.2.1.1-7 （参考資料）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
マウス TMD8 異種移植モデルにおける用法用量	細胞株：ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8 モデル：マウス皮下移植	*In vivo*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM017	4.2.1.1-8 （参考資料）
マウス TMD8 異種移植モデルにおける抗腫瘍効果	細胞株：ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8 モデル：マウス皮下移植	*In vivo*	[redacted]	P[redacted]0031	4.2.1.1-9
	ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8 腫瘍中 BTK リン酸化	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM031	4.2.1.1-10 （参考資料）
副次的薬理試験					
各種分子標的に対する結合	67 種類の受容体結合活性	*In vitro*	[redacted]	AB03535	4.2.1.2-1
ヒト好塩基球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト全血抗 IgE 刺激による CD63 陽性細胞	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM003	4.2.1.2-2 （参考資料）
ヒト好中球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト精製好中球の免疫複合体刺激による NETs 形成	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM005	4.2.1.2-3 （参考資料）
ヒト単球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト単球の FcγR 刺激による TNFα 及び IL-6 産生	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM006	4.2.1.2-4 （参考資料）
	ヒト単球の TLR9 リガンド刺激による TNFα 及び IL-6 産生	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM008	4.2.1.2-5 （参考資料）
ヒト破骨前駆細胞及び骨芽細胞に対するチラブルチニブの作用	ヒト破骨前駆細胞の M-CSF/RANKL 刺激による分化誘導	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM009	4.2.1.2-6 （参考資料）
	ヒト骨芽細胞又は間葉系幹細胞における分化誘導	*In vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM014	4.2.1.2-7 （参考資料）

試験の種類	試験系	投与方法	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
安全性薬理試験						
中枢神経系に対する作用	ラット	経口	適用	[redacted]	PC-401-2005	4.2.1.3-1
	ラット	経口	非適用	小野薬品工業株式会社	P[redacted]XP003	4.2.3.7.3-1 (参考資料)
	サル	経口	適用	[redacted]	[redacted]015-216	4.2.3.2-7
	サル	経口	適用	[redacted]	[redacted]015-223	4.2.1.3-2
心血管系に対する作用	HEK293 細胞	*In vitro*	適用	[redacted]	[redacted]015-238	4.2.1.3-3
	サル	経口	適用	[redacted]	[redacted]015-223	4.2.1.3-2
	ラット	十二指腸内	非適用	小野薬品工業株式会社	P[redacted]XP016	4.2.1.3-4 (参考資料)
呼吸系に対する作用	サル	経口	適用	[redacted]	[redacted]015-223	4.2.1.3-2
補足的安全性薬理試験	ヒト血小板	*In vitro*	適用	小野薬品工業株式会社	P[redacted]PD009	4.2.1.3-5
	ヒト血小板	*In vitro*	非適用	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM020	4.2.1.3-6 (参考資料)
	ラット及びサル血小板	*In vitro*	非適用	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM006	4.2.1.3-7 (参考資料)

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
その他の薬理試験					
サル末梢血 B 細胞の BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの作用	サル末梢血単核細胞	*in vitro*	小野薬品工業株式会社	E[redacted]IM028	4.2.1.1-11 (参考資料)

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：チラブルチニブ塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
BTK 阻害活性及びキナーゼ選択性	ヒト組換え BTK, FYN, LCK, LYNa	*In vitro*	BTK: 0.00003～1 μ mol/L FYN, LCK, LYNa: 0.001～30 μ mol/L	チラブルチニブは，ヒト組換え BTK 及び FYN，LCK，LYNa を阻害し，IC_{50} 値は 2.10 及び 2220，788，3490 nmol/L であった.	[redacted]-[redacted]0166	4.2.1.1-1
その他のキナーゼに対する選択性	ヒト BTK, BLK, BMX, EGFR, ERBB2, ERBB4, ITK, JAK3, TXK, TEC	*In vitro*	0.001～20 μ mol/L	チラブルチニブは，活性部位にシステインを有する BTK 及び BLK, BMX，EGFR，ERBB2，ERBB4, ITK，JAK3，TXK，TEC を阻害し，IC_{50} 値は 3.4 及び 127，3.2，2150, 8730，318，>20000，5515，46.9, 29.6 nmol/L であった.	PC-401-2011	4.2.1.1-2 （参考資料）
BTK に対する阻害様式	ヒト全長 BTK，質量分析	*In vitro*	10 μ mol/L	チラブルチニブはヒト組換え BTK に対して付加体を形成し，質量分析によってチラブルチニブの分子量と一致する BTK の質量シフトが認められた．またチラブルチニブ 10 μ mol/L を BTK と終夜反応させた後，イブルチニブ 100 μ mol/L を添加してさらに 6 時間反応させたが，チラブルチニブの共有結合付加体の質量に変化はなかった.	PC-401-2007	4.2.1.1-3 （参考資料）

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
細胞内 BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト末梢血単核細胞， ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8	*In vitro*	0.1～3000 nmol/L	チラブルチニブ処置 1，6 及び 20 時間後の Btk 自己リン酸化の最大抑制率の半分に相当する濃度（IC_{50_MAX} 値）は，PBMC では 68.5，6.79 及び 1.90 nmol/L，TMD8 では 50.3，9.78 及び 3.60 nmol/L であった．両細胞種において，処置時間に応じてチラブルチニブの阻害強度が増強した．	E[redacted]IM032	4.2.1.1-4 （参考資料）
ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 に対するチラブルチニブの細胞死誘導作用	ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8	*In vitro*	1～10000 nmol/L	チラブルチニブの TMD8 に対する細胞死誘導作用の検討では，72 時間継続して曝露すると，処置濃度に応じて細胞死誘導が認められた．一方，チラブルチニブを 6 時間処置後に洗浄により除去すると，細胞死誘導が大きく減弱した（10 μmol/L 72 時間後の生細胞率は，無洗浄時と洗浄時でそれぞれ 10.1%及び 81.6%）．		
ヒト末梢血 B 細胞及び T 細胞の活性化に対するチラブルチニブの作用	ヒト末梢血単核細胞	*In vitro*	0.3～10000 nmol/L	チラブルチニブは，抗 IgM 抗体刺激による B 細胞の活性化を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値は 13.8 nmol/L であった． 一方，抗 CD3/CD28 抗体刺激による T 細胞の活性化に対しては，最高濃度の 10 μmol/L においても抑制しなかった．	E[redacted]IM021	4.2.1.1-5 （参考資料）
ABC-DLBCL 細胞株 TMD8 の増殖に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト B 細胞リンパ腫細胞株 TMD8	*In vitro*	0.3～100 nmol/L	チラブルチニブは，媒体群における TMD8 の増殖を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値は 3.59 nmol/L であった．	E[redacted]QA001	4.2.1.1-6

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
その他の DLBCL 細胞株に対するチラブルチニブの増殖抑制作用	ヒトびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫細胞株	*In vitro*	0.51～10000 nmol/L	チラブルチニブは，ABC-DLBCL 細胞株の TMD8，OCI-LY10，Ri-1 を濃度依存的に抑制し，EC_{50} 値は 4.30，13.0，26 nmol/L であった．一方，GCB-DLBCL 細胞株の Pfeiffer に対しては明らかな抑制作用を示さず，EC_{50} 値は 9100 nmol/L であった．	PC-401-2003	4.2.1.1-7 （参考資料）
マウス TMD8 異種移植モデルにおける用法用量	マウス／C.B-17/lcr-scid/scidJcl （雌 10 例／群）	経口	媒体（0.5 w/v%メチルセルロース） 0.6，2，6，20 mg/kg ［1 日 1 回，21 日間連日投与］ 0.3，1，3，10 mg/kg ［1 日 2 回，21 日間連日投与］	チラブルチニブの 1 日 1 回投与群の腫瘍体積はいずれも媒体群と比べて低く推移したものの，最終評価日（Day 21）では，いずれの用量においても有意な腫瘍体積の低下が認められなかった．一方，チラブルチニブの 1 日 2 回投与群の腫瘍体積はいずれも媒体群と比べて低く推移し，Day 21 では，3 及び 10 mg/kg 群で有意に腫瘍増殖を抑制した．また，チラブルチニブはいずれの群においても，体重推移に影響を及ぼさなかった．	E[redacted]IM017	4.2.1.1-8 （参考資料）

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
マウス TMD8 異種移植モデルにおける抗腫瘍効果	マウス／C.B-17/Icr-scid/scidJcl（雌 10 例／群）	経口	媒体（0.5 w/v%メチルセルロース） 1，3，10 mg/kg ［1 日 2 回，21 日間連日投与］	腫瘍体積に関して，最終評価日（Day 21）における媒体群の平均腫瘍体積は 1294.0 mm^3 であった．チラブルチニブの 1，3 及び 10 mg/kg 群の平均腫瘍体積はそれぞれ 1495.8 mm^3，1017.8 mm^3，654.8 mm^3 であった．媒体群と比較して，チラブルチニブ 3 mg/kg 群では Day 9 及び 15 において，10 mg/kg 群では Day 3～21 において，有意な低値が認められた．Day 21 における媒体群に対する各チラブルチニブ群の腫瘍体積増殖抑制率はそれぞれ-15.6%，21.3%，49.4%であった．また，一般状態に関して，実験期間を通じて，全例に異常は認められなかった．	P[redacted]0031	4.2.1.1-9
	担がんマウスから採取した腫瘍	*In vitro*	媒体（0.5 w/v%メチルセルロース） 1，3，10 mg/kg （単回投与後，1，3，5，16，24，30 時間に腫瘍を採取）	チラブルチニブの 1，3 及び 10 mg/kg 投与群の BTK リン酸化は，いずれの時間においても媒体群と比べて有意に低値であり，各時間において用量依存的に Btk リン酸化が抑制された．また，いずれの投与群についても，投与 1 又は 3 時間後が最も強く Btk リン酸化を抑制し，その後時間経過に伴い抑制率は低下した．	E[redacted]IM031	4.2.1.1-10（参考資料）

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：チラブルチニブ塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
各種分子標的に対する結合	67 種類の受容体結合活性	*In vitro*	10 μ mol/L NET，DAT: 0.03～100 μ mol/L	チラブルチニブは 10 μ mol/L の濃度において，NET 及び DAT に対して阻害率 50%以上の阻害作用を示し，その阻害率はそれぞれ 60 及び 70%であった．NET 及び DAT に対するチラブルチニブの IC_{50} 値は，それぞれ 10.2 及び 3.91 μ mol/L であった．	AB03535	4.2.1.2-1
ヒト好塩基球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト全血（成人ボランティア 3 名）	*In vitro*	0.003～10 μ mol/L	チラブルチニブは，ヒト全血を anti-IgE で刺激した際の脱顆粒を濃度依存的に抑制した．3 名の平均 IC_{50} 値は，1 時間処置時で 377，6 時間処置時で 164 nmol/L であった．	E[redacted]IM003	4.2.1.2-2（参考資料）
ヒト好中球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト精製好中球（成人ボランティア 3 名）	*In vitro*	0.0003～10 μ mol/L	チラブルチニブは，ヒト好中球を免疫複合体で刺激した際の NETs 形成を濃度依存的に抑制した．3 名の平均 IC_{50} 値は 22.5 nmol/L であった．	E[redacted]IM005	4.2.1.2-3（参考資料）
ヒト単球の機能に対するチラブルチニブの抑制作用	ヒト単球	*In vitro*	0.3～1000 nmol/L	チラブルチニブは，ヒト単球の Fc γ R 刺激による TNF α 及び IL-6 の産生を濃度依存的に抑制し，それぞれの IC_{50} 値は，12.4 及び 49.5 nmol/L であった．	E[redacted]IM006	4.2.1.2-4（参考資料）
			0.1～300 nmol/L	チラブルチニブは，ヒト単球の TLR9 リガンド刺激による TNF α 及び IL-6 産生を濃度依存的に抑制し，それぞれの IC_{50} 値は，5.20 及び 12.8 nmol/L であった．	E[redacted]IM008	4.2.1.2-5（参考資料）

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
ヒト破骨前駆細胞及び骨芽細胞に対するチラブルチニブの作用	ヒト破骨前駆細胞	*In vitro*	0.1～1000 nmol/L	チラブルチニブは，ヒト破骨細胞の分化を濃度依存的に抑制し，IC_{50} 値は 0.853 nmol/L であった.	E[redacted]IM009	4.2.1.2-6 （参考資料）
	ヒト骨芽細胞 ヒト間葉系幹細胞	*In vitro*	0.01～1 μ mol/L	ヒト骨芽細胞及びヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化において，チラブルチニブ 1 μ mol/L まで，分化に伴う細胞内 ALP 含量，培地中 P1P 濃度及び，細胞内ハイドロキシアパタイト含量に影響を与えなかった.	E[redacted]IM014	4.2.1.2-7 （参考資料）

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：チラブルチニブ塩酸塩

<table>
<tr><th>試験項目</th><th>動物種／系統</th><th>投与方法</th><th>投与量</th><th>方法</th><th>特記すべき所見</th><th>GLP適用</th><th>試験番号</th><th>記載箇所</th></tr>
<tr><td>中枢神経系</td><td>ラット／SD
（雌 8 例／群）</td><td>経口</td><td>0，100，300，1000 mg/kg</td><td>ホームケージ内での観察，ハンドリングでの観察，オープンフィールドでの観察，刺激に対する反応の観察及び体温を Irwin 変法により評価 [a]</td><td>＜300 mg/kg 群＞
投与後 1 時間に 1 例で痛覚反応の消失
＜1000 mg/kg 群＞
投与後 3 及び 6 時間にそれぞれ 2 例及び 1 例で痛覚反応の低下
トキシコキネティクス（サテライト動物，3 例／時点／群の平均値）：
<table>
<tr><th>投与量 (mg/kg)</th><th>Cmax (ng/mL)</th><th>Tmax (h)</th><th>AUC24h (ng·h/mL)</th></tr>
<tr><td>100</td><td>8350</td><td>0.5</td><td>42400</td></tr>
<tr><td>300</td><td>15900</td><td>1.0</td><td>223000</td></tr>
<tr><td>1000</td><td>24100</td><td>1.0</td><td>263000</td></tr>
</table></td><td>適用</td><td>PC-401-2005</td><td>4.2.1.3-1</td></tr>
</table>

a：投与後 1，3，6，8，24 及び 48 時間

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
（続き） 中枢神経系	ラット／SD （雌 8 例／群）	経口	0，100，300，600，1000 mg/kg（1 日 1 回 4 日間 [a]）	一般状態観察及び自発運動量測定（毎日）	一般状態： 死亡例：1000 mg/kg 2 例 1 例は初回投与後 13 時間に歩行異常（つま先歩行）及び自咬，17 時間より歩行失調，19 時間より横臥がみられ，26 時間に死亡した．他の 1 例は初回投与後 10 時間に歩行異常（つま先歩行）及び眼瞼下垂，13 時間に歩行失調，16 時間から横臥がみられ，24 時間に死亡発見された． 回復性検討例：1000 mg/kg 2 例 歩行異常（つま先歩行），自咬あるいは歩行失調がみられ，その後，横臥が投与 2 日の投与前及び投与後 8 時間に各 1 例にみられた．いずれの所見も休薬による回復性が認められた． 生存例 300 mg/kg 以上で歩行異常（つま先歩行），600 mg/kg 以上で眼瞼下垂 自発運動量： 1000 mg/kg で自発運動量の亢進（投与 2 日） 夜間自発運動量：影響なし 剖検： 死亡例；副腎の腫大 回復性検討例；肝臓及び副腎の腫大 生存例；300 及び 600 mg/kg で肝臓の腫大，1000 mg/kg で肝臓及び副腎の腫大	非適用	F[redacted]XP003	4.2.3.7.3-1 （参考資料）

a：1000 mg/kg の死亡例 2 例は単回投与．回復性検討例（1000 mg/kg 2 例）のうち 1 例は単回投与，残る 1 例は 2 日間投与

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
（続き） 中枢神経系	カニクイザル （雌雄各 4 又は 6 例／群）	経口	0，3，10，30，100 mg/kg （1 日 1 回 4 週間）	一般症状及び神経行動学的機能を FOB 法により評価（投与 3 及び 23 日目並びに休薬 23 日目．対照群の雄及び 100 mg/kg の雄のみ投与 7 及び 14 日，100 mg/kg の雄のみ休薬 12 日）	＜3～30 mg/kg 群＞ なし ＜100 mg/kg 群＞ 投与 3 日目：なし 投与 7 日目：雄 1 例で座位，行動の低下，歩行失調，手の力と動きの異常（不随意運動），脚の力と動きの異常（起立不能），触覚反応の低下，異常行動（左前肢で右前肢を頻繁に触る，身づくろいの増加），意識の低下及び歩行困難．他の雄 1 例で歩行失調 投与 14 日目：雄 3 例で座位，意識の低下，行動の低下，歩行失調，手の力と動きの異常（掴めないあるいは筋力の低下），脚の力と動きの異常（起立不能）及び／あるいは触覚反応の低下 投与 23 日目：雌 1 例で異常行動（後頭部をかきむしる，しきりに後肢及び／あるいは前肢の指をなめる行動及び／あるいは陰核，膣，陰部周辺を頻繁に触る行動）及び行動の低下．他の雌 1 例で歩行失調 休薬 12 及び 23 日：なし	適用	[redacted]015-216	4.2.3.2-7
	カニクイザル （雄 5 例／群）	経口	0，10，30，100，300 mg/kg [a]	腹腔内体温をテレメトリーシステムにより測定 [b]	無影響	適用	[redacted]015-223	4.2.1.3-2

a：クロスオーバー法により，各動物に媒体（0.5 w/v%メチルセルロース），被験物質の 10，30 及び 100 mg/kg を投与 1，8，22 及び 29 日のいずれかに単回投与し，投与 36 日にはいずれの動物にも 300 mg/kg を投与
b：投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
心血管系	HEK293 細胞（5 例／群）	*In vitro*	0，0.1，0.3，1，3，10，30 μ mol/L	hERG チャネル電流をホールセルパッチクランプ法により測定	1 μ mol/L 以上で濃度に応じた減少 IC_{50} 値：5.59 μ mol/L（2.54 μ g/mL）	適用	[redacted]015-238	4.2.1.3-3
	カニクイザル（雄 5 例／群）	経口	0，10，30，100，300 mg/kg [a]	血圧（収縮期，拡張期及び平均血圧），心拍数，心電図（PR 間隔，QRS 幅，QT 間隔及び QTcB）をテレメトリーシステムにより測定 [b]	無影響	適用	[redacted]015-223	4.2.1.3-2
	ラット／SD（雌 5 例／群）	十二指腸内	0，1000 mg/kg	ウレタン麻酔下で，平均血圧，心拍数及び心電図（PQ 間隔，QRS 幅及び QTcF）を測定 [c]	無影響	非適用	P[redacted]XP016	4.2.1.3-4（参考資料）
呼吸系	カニクイザル（雄 5 例／群）	経口	0，10，30，100，300 mg/kg [a]	呼吸数をテレメトリーシステムにより，血液ガスパラメータ（動脈血 pH，動脈血酸素分圧，動脈血炭酸ガス分圧及びヘモグロビン酸素飽和度）をポータブル血液分析器によりそれぞれ測定 [b]	無影響	適用	[redacted]015-223	4.2.1.3-2

a：クロスオーバー法により，各動物に媒体（0.5 w/v%メチルセルロース），被験物質の 10，30 及び 100 mg/kg を投与 1，8，22 及び 29 日のいずれかに単回投与し，投与 36 日にはいずれの動物にも 300 mg/kg を投与
b：投与前，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間
c：投与前，投与後 1，2，4 及び 6 時間

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
補足的安全性薬理	ヒト血小板（5例／群）	*In vitro*	0，0.001，0.01，0.1，1，3，6，10，100 μmol/L	多血小板血漿（PRP）における血小板凝集作用を自動血小板凝集能測定装置により測定	＜血小板凝集惹起作用＞ なし ＜ADP惹起血小板凝集に対する作用＞ 10及び100 μmol/Lで抑制傾向（対照群の凝集率74.4%に対してそれぞれ58.8及び49.4%），無影響量6 μmol/L（2.73 μg/mL） ＜コラーゲン惹起血小板凝集に対する作用＞ 10及び100 μmol/Lで抑制（対照群の凝集率79.4%に対してそれぞれ69.0及び10.2%），無影響量6 μmol/L（2.73 μg/mL）	適用	P[redacted]PD009	4.2.1.3-5
	ヒト血小板（2又は3例／群）	*In vitro*	0，0.1，0.3，1，3，10 μmol/L	PRPにおける血小板凝集を多機能自動血小板凝集能測定装置により測定	＜抗CLEC-2抗体惹起血小板凝集に対する作用＞ 2，60及び240分間処置時のIC_{50}値： 1.43，1.11及び0.432 μmol/L （0.196～0.650 μg/mL）	非適用	E[redacted]IM020	4.2.1.3-6 （参考資料）

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	方法	特記すべき所見	GLP適用	試験番号	記載箇所
（続き） 補足的 安全性薬理	SDラット 血小板 （3～5例／群）	*In vitro*	0，0.1，0.3，1，3，10 μmol/L	PRPにおける血小板凝集を多機能自動血小板凝集能測定装置により測定	＜ADP惹起血小板凝集に対する作用＞ なし ＜低濃度コラーゲン惹起血小板凝集に対する作用＞ 2，60及び240分間処置時のIC_{50}値： 4.09，2.90及び0.643 μmol/L （0.292～1.86 μg/mL） ＜高濃度コラーゲン惹起血小板凝集に対する作用＞ 2，60及び240分間処置時のIC_{50}値： 6.08，4.09及び2.95 μmol/L （1.34～2.76 μg/mL） ＜CLEC-2を介した血小板凝集に対する作用＞ mPDPN/Fc及び抗マウスIgG抗体刺激惹起の凝集反応[a]に対する2，60及び240分間処置時のIC_{50}値： 4.38，1.74及び0.704 μmol/L （0.320～1.99 μg/mL）	非適用	E[redacted]IM006	4.2.1.3-7 （参考資料）
	カニクイザル 血小板 （1～5例／群）	*In vitro*	0，0.1，0.3，1，3，10 μmol/L	PRPにおける血小板凝集を多機能自動血小板凝集能測定装置により測定	＜ADP惹起血小板凝集に対する作用＞ なし ＜低濃度コラーゲン惹起血小板凝集に対する作用＞ 2，60及び240分間処置時のIC_{50}値： 1.37，0.110及び0.194 μmol/L （0.0500～0.623 μg/mL） ＜抗CLEC-2抗体惹起血小板凝集反応に対する作用＞ 2，60及び240分間処置時のIC_{50}値： 1.24，0.582及び0.374 μmol/L （0.170～0.564 μg/mL）	非適用	E[redacted]IM006	4.2.1.3-7 （参考資料）

a：抗CLEC-2抗体（ヤギ抗ヒトCLEC-2抗体）はラットCLEC-2を認識しなかったため，CLEC-2のリガンドであるmPDPN/Fcを処置した後抗マウスIgG抗体を添加して架橋することで血小板凝集を惹起

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

なし

2.6.3.6 その他の薬理試験

被験物質：チラブルチニブ塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	投与量	試験成績	試験番号	記載箇所
サル末梢血 B 細胞の BTK 自己リン酸化に対するチラブルチニブの作用	カニクイザルから単離した末梢血単核細胞（雄雌各 3 例／群）	経口	媒体（0.5 w/v%メチルセルロース） 1，3，10，30 mg/kg ［1 日 1 回，13 週間連日投与］	1，3，10 及び 30 mg/kg 投与群の全血における H_2O_2 刺激 BTK 自己リン酸化に対する抑制作用（⊿MFI）を評価した．雌雄において，投与 4 時間及び 24 時間後の BTK 自己リン酸化は概ね用量に応じた抑制が認められた．	E[redacted]IM028	4.2.1.1-11 （参考資料）