**第 2 部　CTD の概要**

一般名：アカラブルチニブ

版番号：[redacted]

# 2.6.1　緒言
# カルケンス®カプセル

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

# 目次

目次 ..... 2
略語及び専門用語一覧表 ..... 3
2.6.1.1 緒言 ..... 4
2.6.1.2 参考文献 ..... 5

# 図目次

図 1 アカラブルチニブの化学構造 ..... 5

# 略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

| 略語及び専門用語 | 用語の説明 |
|---|---|
| BCR | B 細胞受容体 |
| BTK | ブルトン型チロシンキナーゼ |
| CLL | 慢性リンパ性白血病 |
| MCL | マントル細胞リンパ腫 |

# 2.6.1.1 緒言

## ブルトン型チロシンキナーゼの背景

ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）は、Tec キナーゼファミリーに属する非受容体型タンパク質チロシンキナーゼであり、T リンパ球を除く造血系細胞で発現している。BTK は、B 細胞、骨髄細胞及び血小板の増殖、アポトーシス、分化及び細胞遊走等の複数の細胞過程を調節する（Hendriks et al 2014, Kaptein et al 2019, Lopez-Herrera et al 2014）。B 細胞において、抗原の B 細胞受容体（BCR）結合に反応して、活性化 BTK は細胞膜に移動し、細胞の増殖及び生存に重要な役割を果たすシグナルを伝達する（Hendriks et al 2014）。

多くの B 細胞悪性腫瘍では、BCR により亢進又は活性化されたシグナルにより細胞増殖及び抗アポトーシス経路がアップレギュレートされ、増殖及び耐性の両方が推進される（Buggy and Elias 2012）。BTK の薬理学的阻害により、悪性 B 細胞における BCR からのシグナル伝達が不活化され、腫瘍微小環境内での細胞遊走を変化させる受容体及び細胞骨格タンパク質の制御、細胞増殖の転写調節、共刺激フィードバック・ループを支援するサイトカイン、細胞表面シグナル伝達分子の産生等、下流に存在する複数の細胞生存機能が消失する（Hendriks et al 2014, Buggy and Elias 2012）。BTK の阻害は、マントル細胞リンパ腫（MCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）及びワルデンストロームマクログロブリン血症の治療において臨床的に検証された標的である（Tucker and Rule 2015, Wang et al 2018）。ファースト・イン・クラスの BTK 阻害薬イブルチニブにより、これらの疾患患者の治療に重要な選択肢が追加された（Castillo et al 2016）。

CLL は成熟 B 細胞悪性腫瘍であり、血液、骨髄、リンパ節及び、その他のリンパ系組織におけるモノクローナル B 細胞リンパ球の増加を特徴とする（Fabbri and Dalla-Favera 2016）。CLL 患者の 80%を超える患者で病態を促進させるのに重要な細胞遺伝学的異常が認められる。全エクソーム解析の研究により、これら細胞遺伝学的異常のうち 40 種を超える標的遺伝子が明らかになっている（Gaidano and Rossi 2017）。これらの遺伝子異常により誤制御された経路には、Notch シグナル伝達、RNA プロセシング、DNA 損傷、細胞周期／アポトーシス、核内因子 κB 活性化等がある。ゲノム腫瘍内不均一性が CLL 患者において注目されており、予後予測因子となる可能性がある（Podoll et al 2019, Roos-Weil et al 2016）。

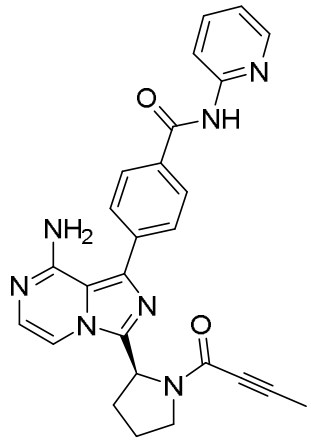
## アカラブルチニブの開発の背景

アカラブルチニブ（ACP-196）を創製した創薬プログラムは、BTK を強力に阻害し、優れたキナーゼ選択性を示し、薬物相互作用の可能性が低い経口投与可能な薬剤を同定することを目的としていた。血漿中曝露期間を超えて薬力学作用を延長させることにより安全性及び有効性に潜在的利点をもたらす可能性があることから、BTK に対する共有結合型阻害薬の創製が求められた（Barf and Kaptein 2012）。また、BTK に対する共有結合は、血液又は組織検体における標的阻害の測定を容易にし、最適な標的対象を有する臨床治療計画の選択にも役立つ。さらに、経口投与は長期の治療的使用を容易にする点で好ましい。

## アカラブルチニブの化学的性質

アカラブルチニブは選択性が高く、強力かつ経口投与可能な BTK 阻害薬である。その化学名は 4-{8-Amino-3-[(2*S*)-1-(but-2-ynoyl)pyrrolidin-2-yl]imidazo[1,5-*a*]pyrazin-1-yl}-*N*-(pyridin-2-yl)benzamide（図 1）、分子式は $C_{26}H_{23}N_7O_2$ である。また、アカラブルチニブはイミダゾピラジンアナログで、モル質量は 465.5 g/mol である。本薬は 1 つの不斉中心を有し、アカラブルチニブは S-エナンチオマーである。

**図 1　　アカラブルチニブの化学構造**



アカラブルチニブは、即放性カプセル剤として適切な物理化学的性質及び生物薬剤学的性質を有する(生物薬剤学試験及び関連する分析法 2.7.1 項参照）。
1 種類以上の前治療を受けた CLL 患者の推奨用量は 100mg 1 日 2 回である。

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

**【効能・効果（案）】**

再発又は難治性の慢性リンパ性白血病（小リンパ球性リンパ腫を含む）

**【用法・用量（案）】**

通常、成人にはアカラブルチニブとして 1 回 100 mg を 1 日 2 回、経口投与する。なお、患者の状態により適宜増減する。

## 2.6.1.2　　参考文献

Barf and Kaptein 2012

Barf T, Kaptein A.　Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks.　J Med Chem 2012;55:6243–62.

Buggy and Elias 2012

Buggy JJ, Elias L.　Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy.　Int Rev Immunol. 2012;31(2):119-32.

Castillo et al 2016

Castillo JJ, Treon SP, Davids MS.　Inhibition of the Bruton tyrosine kinase pathway in B cell lymphoproliferative disorders.　Cancer J. 2016;22(1):34-9.

Fabbri and Dalla-Favera 2016

Fabbri G, Dalla-Favera R.　The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia.　Nat Rev Cancer. 201616:145-62.

Gaidano and Rossi 2017

Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2017;(1):329-37.

Hendriks et al 2014

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

Kaptein et al 2019

Kaptein A, Podoll T, de Bruin G, Emmelot-van Hoek M, de Jong A, van Lith B. Preclinical pharmacological profiling of ACP-5862, the major metabolite of the covalent BTK inhibitor acalabrutinib, displays intrinsic BTK inhibitory activity. AACR 2019:abstract 2194.

Lopez-Herrera et al 2014

López-Herrera G, Vargas-Hernández A, González-Serrano ME, Berrón-Ruiz L, Rodríguez-Alba JC, Espinosa-Rosales F. Bruton's tyrosine kinase - an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system. J Leukoc Biol. 2014;95(2):243-50.

Podoll et al 2019

Podoll T, Pearson PG, Evarts J, Ingallinera T, Bibikova E, Sun H. Bioavailability, biotransformation, and excretion of the covalent Bruton tyrosine kinase inhibitor acalabrutinib in rats, dogs, and humans. Drug Metab Dispos. 2019;47(2):145-54.

Roos-Weil et al 2016

Ross-Weil D, Nguyen-Khac F, Bernard OA. Chronic lymphocytic leukemia: Time to go past genomics? Am J Hematol. 2016;91(5):518-28.

Tucker and Rule 2015

Tucker DL, Rule SA. A critical appraisal of ibrutinib in the treatment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Ther Clin Risk Manag. 2015;11:979-90.

Wang et al 2018

Wang M, Rule S, Zinzani PL, Goy A, Casasnovas O, Smith S. Acalabrutinib in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (ACE-LY-004): in a single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancelet. 2018;391:659-67.

**第 2 部　CTD の概要**

一般名：アカラブルチニブ

版番号：[redacted]

# 2.6.2　薬理試験の概要文
# カルケンス®カプセル

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

# 目次

目次 ..... 2
略語及び専門用語一覧表 ..... 5
2.6.2.1 まとめ ..... 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ..... 11
2.6.2.2.1 背景 ..... 11
2.6.2.2.2 *In vitro* 試験 ..... 13
2.6.2.2.2.1 アカラブルチニブの効力及び作用機序 ..... 13
2.6.2.2.2.2 アカラブルチニブ、ACP-5862、イブルチニブ、イブルチニブ代謝物 M37 及び Spebrutinib のキナーゼ選択性 ..... 15
2.6.2.2.2.3 B 細胞及び非標的細胞における BTK 阻害薬の活性 ..... 22
2.6.2.2.3 *In vivo* 試験 ..... 27
2.6.2.2.3.1 マウスにおける単回投与時の作用：イブルチニブとの用量-反応関係の比較 ..... 27
2.6.2.2.3.2 マウスにおける単回投与後の BTK 占有率及び BCR シグナル伝達機能の回復 ..... 28
2.6.2.2.3.3 ヒト CLL 異種移植マウスモデル ..... 30
2.6.2.2.3.4 ヒト DLBCL 及び MCL 異種移植マウスモデルを用いたアカラブルチニブ及びイブルチニブの有効性評価 ..... 34
2.6.2.2.3.5 血栓形成に対するアカラブルチニブ及びイブルチニブの作用 ..... 38
2.6.2.2.3.6 ラットのアジュバント誘発関節炎モデルにおけるアカラブルチニブの薬理活性 ..... 39
2.6.2.2.3.7 コンパニオンドッグ自然発症 B 細胞リンパ腫モデルにおけるアカラブルチニブの評価 ..... 41
2.6.2.3 副次的薬理試験 ..... 43
2.6.2.3.1 アカラブルチニブの *in vitro* 薬理試験 ..... 43
2.6.2.3.2 アカラブルチニブ及び ACP-5862 の *in vitro* 薬理試験 ..... 44
2.6.2.4 安全性薬理試験 ..... 44
2.6.2.4.1 中枢神経系 ..... 45
2.6.2.4.2 心血管系 ..... 45
2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験 ..... 45
2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験 ..... 46
2.6.2.4.3 呼吸器系 ..... 47
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 47
2.6.2.6 考察及び結論 ..... 47
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験 ..... 47
2.6.2.6.2 副次的薬理試験及び安全性薬理試験 ..... 48
2.6.2.7 図表 ..... 49
2.6.2.8 参考文献 ..... 49

# 表目次

表 1 アカラブルチニブ（ACP-196）の非臨床薬理試験の概要 ..... 8
表 2 IMAP アッセイプラットフォームで測定した BTK に対するアカラブルチニブ、イブルチニブ、イブルチニブの代謝物 M37 及び Spebrutinib の阻害作用 .. 14
表 3 *In vitro* におけるアカラブルチニブ及び ACP-5862 の共有結合による BTK 阻害の評価 ..... 14
表 4 アカラブルチニブ及び ACP-5862 の阻害動態パラメータ ..... 15
表 5 アカラブルチニブ及び他の BTK 阻害薬の 3F-Cys キナーゼに対する阻害作用 .. 17
表 6 280 種類のキナーゼの ThermoFisher スクリーニングにおける阻害作用 ..... 18
表 7 DiscoveRx KINOMEscan によるプロファイリング結果の要約（1 μM におけるスクリーニング） ..... 19
表 8 KINOMEscan で濃度 1 μM において阻害率が 65%を超えたキナーゼ ..... 21
表 9 Src ファミリーキナーゼを用いた機能試験：アカラブルチニブ、イブルチニブ、spebrutinib 及びイブルチニブの代謝物 M37 ..... 22
表 10 ヒト PBMC 及び全血中の B 細胞における BCR 刺激後の CD69 発現に対する阻害活性 ..... 23
表 11 BCR 刺激後の CD69 発現に対するアカラブルチニブ及び ACP-5862 の阻害活性 ..... 24
表 12 T 細胞活性化及び EGFR シグナル伝達におけるアカラブルチニブ、イブルチニブ及び spebrutinib の作用の評価 ..... 25
表 13 ヒト又はマウス由来の CD8 陽性 T 細胞を用いた増殖試験 ..... 25
表 14 SKBr3 細胞に対するトラスツズマブによる ADCC ..... 26
表 15 足関節骨吸収の病理組織学的評価 ..... 41
表 16 末梢 B 細胞における 1 日目の投与 3 時間後及び 7 日目の投与前のアカラブルチニブの薬力学的作用 ..... 42
表 17 リンパ節の穿刺吸引細胞診検体における投与 3 時間後及び 7 日目の投与前のアカラブルチニブの薬力学的作用 ..... 42

# 図目次

図 1 B 細胞受容体結合後の B 細胞における BTK 伝達経路 ..... 12
図 2 1 μM における化合物の KINOMEscan プロファイリング ..... 20
図 3 Ramos 細胞におけるアカラブルチニブ及び ACP-5862 の BTK 占有率 ..... 23
図 4 K562 細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性 ..... 26
図 5 用量反応関係：BCR 刺激による CD69 のアップレギュレーションに対する阻害 ..... 28

図 6 アカラブルチニブ 25 mg 単回投与後のマウス脾細胞における BTK 標的占有率の推移 ..... 29
図 7 BTK 阻害薬を投与したマウスから採取した脾細胞（B 細胞）における BCR 刺激による CD86 及び CD69 アップレギュレーションに対する阻害動態 ..... 30
図 8 脾臓における CLL 細胞の割合 － 溶媒 vs アカラブルチニブ ..... 31
図 9 患者由来異種移植マウスモデルにおける CLL 細胞の増殖率に対するアカラブルチニブの阻害作用 ..... 32
図 10 患者由来異種移植マウスモデルにおける CLL 細胞に対するアカラブルチニブの on-target 効果－ pPLCγ2 及び pERK ..... 33
図 11 患者由来異種移植モデルにおける CLL 細胞の絶対数 ..... 34
図 12 OCI-Ly10 DLBCL 移植マウスモデルにおける腫瘍増殖に対するアカラブルチニブ及びイブルチニブの作用 ..... 36
図 13 Jeko-1 MCL モデルにおける腫瘍増殖に対するアカラブルチニブの作用 ..... 37
図 14 Jeko-1 腫瘍移植マウスにアカラブルチニブを 8 日間投与した後の血漿中アカラブルチニブ濃度 ..... 38
図 15 *Ex Vivo / In Vivo* 血栓形成試験 ..... 39
図 16 AIA ラットの足関節における個々の病理組織学的スコア ..... 40
図 17 イヌにアカラブルチニブを投与したときの標的病変サイズの縮小 ..... 43

# 略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

| 略語及び専門用語 | 用語の説明 |
|---|---|
| A2A | adenosine A2A receptor：アデノシン A2A 受容体 |
| A3 | adenosine A3 receptor：アデノシン A3 受容体 |
| ABC | activated B-cell-like：活性化 B 細胞型 |
| ADCC | antibody dependent cellular cytotoxicity：抗体依存性細胞介在性細胞傷害 |
| ADME | absorption, distribution, metabolism, and excretion：<br>吸収、分布、代謝及び排泄 |
| AIA | adjuvant induced arthritis：アジュバント誘発関節炎 |
| ATP | adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸 |
| BCR | B-cell receptor　：B 細胞受容体 |
| BLK | BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase：<br>BLK 癌原遺伝子、Src ファミリーチロシンキナーゼ |
| BMX | BMX non-receptor tyrosine kinase　：<br>X 染色体上の骨髄チロシンキナーゼ遺伝子 |
| BTK | Bruton tyrosine kinase：ブルトン型チロシンキナーゼ |
| CHO | Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣 |
| CLL | chronic lymphocytic leukemia：慢性リンパ性白血病 |
| Cmax | maximum observed concentration：最高血漿中濃度 |
| DLBCL | diffuse large B-cell lymphoma：びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 |
| EGF | epidermal growth factor：上皮成長因子 |
| EGFR | epidermal growth factor receptor：上皮成長因子受容体 |
| ERBB2 | erb-b2 receptor tyrosine kinase 2：erb-b2 受容体チロシンキナーゼ 2 |
| ERBB4 | erb-b2 receptor tyrosine kinase 4：erb-b2 受容体チロシンキナーゼ 4 |
| ERK | Extracellular Signal-regulated Kinase：細胞外シグナル調節キナーゼ |
| FDA | United States Food and Drug Administration：米国食品医薬品局 |
| FGFR | fibroblast growth factor receptor：線維芽細胞増殖因子受容体 |
| FGR | FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase：<br>FGR 癌原遺伝子, Src ファミリーチロシンキナーゼ |
| FLT | fms related tyrosine kinase 1：fms 関連チロシンキナーゼ 1 |
| FNA | Fine Needle Aspiration：穿刺吸引細胞診 |
| GLP | Good Laboratory Practice：<br>医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 |
| GPVI | glycoprotein VI：糖蛋白質 VI |
| HEK | human embryonic kidney：ヒト胎児腎臓 |
| hERG | human ether-a-go-go-related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 |
| Ig | Immunoglobulin：免疫グロブリン |
| IgM | immunoglobulin type M：免疫グロブリン M |

| 略語及び専門用語 | 用語の説明 |
|---|---|
| IMAP | ion affinity-based fluorescence polarization：<br>固定化金属イオンアフィニティ蛍光偏光 |
| ITK | interleukin-2-inducible T-cell kinase：<br>インターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼ |
| JAK3 | Janus kinase 3：ヤヌスキナーゼ 3 |
| $K_i$ | inhibitory constant：阻害定数 |
| KI | inhibitory constant for mechanism-based inhibitor：<br>最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度 |
| Ki67 | proliferation antigen Ki-67：<br>増殖抗原 Ki-67 |
| $K_{inact}$ | inactivation rate constant：最大不活性化速度定数 |
| LIMK1 | LIM domain kinase 1：LIM ドメインキナーゼ 1 |
| MCL | mantle cell lymphoma：マントル細胞リンパ腫 |
| MEK5 | mitogen-activated protein kinase kinase 5：<br>分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼキナーゼ 5 |
| NFκB | nuclear factor kappa B：核内因子 κB |
| NK2 | neurokinin 2：ニューロキニン 2 |
| NK 細胞 | natural killer　：ナチュラルキラー細胞 |
| NOAEL | no observed adverse effect level：無毒性量 |
| NOEL | no observed effect level：無作用量 |
| NSG | non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency (NOD SCID)/ γ cnull　：非肥満糖尿病、重症複合免疫不全症、γcnull |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells：末梢血単核細胞 |
| PBPK | physiologically based pharmacokinetic：生理学的薬物速度論 |
| PI3Kδ | phosphatidylinositol 3-kinase delta isoform：<br>ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ δ |
| PSGL | P-selectin glycoprotein ligand：P-セレクチン糖蛋白リガンド |
| PTK6 | protein-tyrosine kinase 6：蛋白チロシンキナーゼ 6 |
| RANKL | tumor necrosis factor superfamily member 11：<br>腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー11 |
| SCID | severe combined immunodeficiency：重症複合免疫不全症 |
| SRC | SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase　：<br>SRC 癌原遺伝子、非受容体型チロシンキナーゼ |
| TEC | tec protein tyrosine kinase　：Tec 蛋白チロシンキナーゼ |
| TLR | Toll-like receptor　：Toll 様受容体 |
| TXK | TXK tyrosine kinase/protein tyrosine kinase 4：<br>TXK チロシンキナーゼ／蛋白チロシンキナーゼ 4 |
| VWF | von Willebrand factor：フォン・ヴィレブランド因子 |
| WM | Waldenström macroglobulinemia：<br>ワルデンストレームマクログロブリン血症 |
| XLA | X-linked agammaglobulinemia　：X 連鎖性無ガンマグロブリン血症 |

## 2.6.2.1 まとめ

アカラブルチニブ（ACP-196 及び ORG300196-0 とも称す）は、強力かつ選択性の高い経口投与可能なブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）阻害薬であり、マントル細胞リンパ腫（MCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）及びワルデンストレームマクログロブリン血症（WM）を含む様々な B 細胞悪性腫瘍において臨床的に有効性が評価されている。本概要文の薬理試験パッケージは、CLL 患者の治療薬としてのアカラブルチニブの承認申請を支持するものである。

アカラブルチニブの特性を生化学的試験で検討したところ、共有結合を形成することにより BTK を強力に阻害することが示された。アカラブルチニブは、BTK の Cys481（共有結合部位［Barf and Kaptein 2012］）に相当する位置にシステイン残基を有するキナーゼを含め、他のキナーゼよりも BTK に対する選択性が高いことが示されている。また、他の共有結合型 BTK 阻害薬と比較して、アカラブルチニブは高い選択性を有することが示されている（広範なキノームパネルを用いた結合相互作用試験及びキナーゼ活性に基づく機能試験でイブルチニブ及び spebrutinib と比較した）。

*In vitro* における細胞を用いた機能試験で、ヒト B 細胞及び Ramos 細胞株を用いて B 細胞受容体（BCR）を介した機能を評価した結果、アカラブルチニブの効力が確認された。さらに、非 B 細胞（即ち、T 細胞、ナチュラルキラー［NK］細胞、上皮細胞株及び血小板）を用いた機能試験では、アカラブルチニブの BTK に対する選択性が確認された。これらの結果から、生化学的試験で確認された標的外結合及びキナーゼに対する活性に基づき定義されたアカラブルチニブの選択性の薬理学的重要性が示された。

ヒトにおける吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）試験において、代謝物 M27（ACP-5862）は、アカラブルチニブを 100 mg の用量で経口投与したときの血漿中放射能の 10%以上を占めることが示された（Podoll et al 2019）。このことから、ACP-5862 は、米国食品医薬品局（FDA）より発出されたガイダンス Safety Testing of Drug Metabolites（FDA 2016）の定義に基づくアカラブルチニブの主代謝物である。ラット及びイヌを用いた[$^{14}$C]-アカラブルチニブのマスバランス試験の結果から、これらの動物種の血漿中に ACP-5862 が認められることが示された（Podoll et al 2019）。ACP-5862 の非結合型曝露量を比較したところ、ACP-5862 はヒトにおける不均衡性代謝物（disproportionate metabolite）ではないことが示されたことから、安全性薬理試験において ACP-5862 の作用を十分に評価できると考えられる。

代謝物 ACP-5862 の特性は、生化学試験及び細胞を用いた試験で明らかにされている。アカラブルチニブと ACP-5862 を直接比較した結果から、ACP-5862 も強力で選択性の高い BTK 阻害活性を有すると考えられた。*In vitro* における BTK 阻害作用の最大不活性化速度定数 ($k_{inact}$)/ 最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度($K_I$)比に基づくと、ACP-5862 の効力はアカラブルチニブの約 1/2 であった。全血を含む細胞を用いた試験で $IC_{50}$ 値の変化を確認したところ、ACP-5862 の効力はアカラブルチニブの 1/7 であった。*In vitro* キナーゼ試験の結果から、ACP-5862 も共有結合を形成することにより BTK を阻害することが示された。

幅広いキノーム・プロファイリングによると、アカラブルチニブと ACP-5862 の全般的な選択性スコアはほぼ同じであった。キノーム全体にわたり、アカラブルチニブ及び ACP-5862 と非関連キナーゼとの相互作用は非常に少なかった（アカラブルチニブについては LIM ドメインキナーゼ 1［LIMK1］、ACP-5862 については蛋白チロシンキナーゼ 6［PTK6］及び分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼキナーゼ 5［MEK5］）。Tec ファミリーキナーゼを用いた機能試験では、アカラブルチニブと ACP-5862 の活性はほぼ同程度であった。生理学的薬物速度論（PBPK）モデルを用いて、アカラブルチニブと ACP-5862 の BTK との反応速度、血漿蛋白結合率（薬物動態試験の

概要文 2.6.4 項参照）及びヒトでの体内動態（臨床薬理試験 2.7.2 項参照）を考慮して解析したところ、ACP-5862 が臨床的に BTK 標的部位占有に寄与している可能性が示唆された。

マウス、ラット及びイヌモデルを用いたアカラブルチニブの経口投与試験により、BTK 占有率及び B 細胞における阻害作用、並びに各種疾患モデルにおける有効性に関わるアカラブルチニブの活性が確認された。

アカラブルチニブ及び ACP-5862 の副次的薬理特性は、広範な薬理学的標的分子パネル（受容体、チャネル及びトランスポーター）を用いた放射性リガンド結合試験により明らかにされている。この試験で認められた相互作用は、臨床での曝露量に基づけば生理学的に重要ではないと考えられた。

アカラブルチニブの安全性薬理試験として、ラットの神経行動及び呼吸器系に及ぼす影響の評価、*in vitro* ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル試験及びイヌの心血管系に及ぼす影響の評価を実施した。コアバッテリー試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を準拠して実施した。さらに、アカラブルチニブと ACP-319（ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ δ［PI3Kδ］の選択的阻害薬）を併用時の作用を評価する hERG チャネル試験及びイヌ心血管系安全性試験を実施した。安全性薬理試験では、アカラブルチニブに関連する有害作用はみられなかった。*In vitro* における hERG 相互作用は、QT 評価試験においてアカラブルチニブの治療量を超える高用量 400 mg を投与した患者の血漿中濃度よりも大幅に高い濃度でのみ認められた。QT 評価試験から、QT 評価試験において、アカラブルチニブは QT 間隔を延長しなかった（ACE-HV-005 試験参照）。

アカラブルチニブの非臨床薬理試験プログラムの概要を表 1 に示す。

**表 1　　アカラブルチニブ（ACP-196）の非臨床薬理試験の概要**

| Study Type and Duration | Test Compound | Route | Species | Report/Study Number | GLP Compliant |
|---|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics (in vitro):** | | | | | |
| Kinase activity and selectivity | ACP-196[a] | In vitro | Human (recombinant) | R20[redacted]002A | No |
| Kinase activity and selectivity | ACP-5862[b] | In vitro | Human (recombinant) | R20[redacted]001 | No |
| Cellular activity and selectivity | ACP-196[a] | In vitro | Human (primary cells & cell lines) | R20[redacted]003A | No |
| Cellular activity | ACP-5862 | In vitro | Human (primary cells) | R20[redacted]002 | No |
| NK-cell and CD8 T-cell functions | ACP-196[a] | In vitro | Human and mouse (primary cells) | Pharmacology Report 01 | No |
| NK-cell and T-cell functions | ACP-196[a] | In vitro | Human and mouse (primary cells) | P23328<br>（参考資料） | No |
| **Primary Pharmacodynamics (in vivo):** | | | | | |
| In vivo potency | ACP-196[a] | PO | Mouse (BALB/c) | R20[redacted]004A | No |
| In vivo kinetics and return of BTK function | ACP-196[a] | PO | Mouse (BALB/c) | R20[redacted]005A | No |
| PK/PD in dogs with spontaneous lymphoma | ACP-196 | PO | Dog (Companion) | R2015001 (Harrington et al 2016) | No |

| Study Type and Duration | Test Compound | Route | Species | Report/Study Number | GLP Compliant |
|---|---|---|---|---|---|
| CLL xenograft model (primary CLL) | ACP-196 | PO | Mouse (NSG, w/human cells) | ACE-NC-002 (Herman et al 2013) | No |
| Lymphoma xenograft models (OCI-LY10 and Jeko-1) | ACP-196 | PO | Mouse (CB.17 SCID, w/human cell lines) | Pharmacology Report 02 | No |
| Platelet function and thrombus formation | ACP-196[a] | Ex vivo, In vivo | Human (primary cells) | R20[redacted]005 (Byrd et al 2016) | No |
| AIA | ACP-196 | PO | Rat (male Lewis) | RIAI-LA-ACP-1 | No |
| BTK occupancy in rat AIA model | ACP-196 | PO | Rat (male Lewis) | R2017007 | No |
| **Secondary Pharmacodynamics:** | | | | | |
| Off-target binding | ACP-196[a] | In vitro | Human (recombinant) | 840327 （参考資料） | No |
| Off-target binding | ACP-196[a] | In vitro | Human (recombinant) | 840290 （参考資料） | No |
| Off-target binding | ACP-5862 | In vitro | Human (recombinant) | 100032432 | No |
| Off-target binding | ACP-5862 | In vitro | Human (recombinant) | 100033052 | No |
| **Safety Pharmacology:** | | | | | |
| Effects on hERG channel activity | ACP-196 | In vitro | Human (HEK transfected with hERG) | 503219 | Yes |
| Effects on hERG channel activity | ACP-196, ACP-319[c] | In vitro | Human (HEK transfected w/ hERG) | 794950 | Yes |
| Effects on respiratory system | ACP-196 | PO | Rat (Sprague-Dawley) | 503221 | Yes |
| Effects on central nervous system | ACP-196 | PO | Rat (Sprague-Dawley) | 503222 | Yes |
| Effects on Cardiovascular System | ORG300196-0[d] | PO | Dog (Beagle) | 491868 （参考資料） | No |
| Effects on Cardiovascular System | ACP-196 | PO | Dog (Beagle) | 594019 | Yes |
| Effects on Cardiovascular System | ACP-196, ACP-319 | PO | Dog (Beagle) | 2219-015 （参考資料） | Yes |

AIA=Adjuvant-induced Arthritis; BTK=Bruton tyrosine kinase; CLL=chronic lymphocytic leukemia; GLP=Good Laboratory Practice; HEK=human embryonic kidney; hERG=human ether-a-go-go-related gene; NK=natural killer; NSG= non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency (NOD SCID)/γcnull; PD=pharmacodynamics; PK=pharmacokinetics; PO=per orally; SCID=severe combined immunodeficiency; w/=with.

a Ibrutinib and its metabolite 37, and/or other BTK inhibitors were included for comparison.

b ACP-5862 is the designated identifier for acalabrutinib metabolite 27.

c ACP-319, also termed AMG-319, is a selective inhibitor of PI3Kδ.

d ORG 300196-0 was the NV Organon code for acalabrutinib.

## 非臨床薬理試験における主要所見

アカラブルチニブ及びその活性代謝物 ACP-5862 の非臨床薬理特性は十分に解明されている。アカラブルチニブの薬理プログラムで認められた主要所見を以下に要約する。

- アカラブルチニブは、選択性が高く、強力な共有結合型の BTK 阻害薬であり、標的である BTK 以外への活性はほとんどない。機能試験の結果から、ACP-5862 も共有結合により BTK を阻害することが示された。キノーム・プロファイリングによる生化学試験の結果から、ACP-5862 のキナーゼ選択性はアカラブルチニブと同程度であることが示された。
- アカラブルチニブは B 細胞における BCR を介した機能を強力に阻害したが、B 細胞以外（T 細胞、NK 細胞、上皮細胞又は血小板）への影響はほとんどなかった。また、ACP-5862 も BCR を介した機能を阻害したことから、アカラブルチニブの薬理活性に寄与していると考えられる。
- 非臨床薬力学及び疾患モデルを用いた非臨床 *in vivo* 試験において、アカラブルチニブの効力及び有効性は低選択性 BTK 阻害薬と同等以上であったことから、アカラブルチニブの on-target 活性（BTK 阻害作用）が治療における作用機序であることが確認された。
- CLL、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）及び MCL を含む B 細胞性腫瘍異種移植マウスモデル、及びイヌ自然発症 B 細胞リンパ腫モデルを用いた試験で、アカラブルチニブの *in vivo* における有効性が示された。
- *In vitro* 受容体結合試験の結果、A3 アデノシン受容体(A3)とアカラブルチニブ及び ACP-5862 の結合親和性を示す阻害定数（$K_i$)は、ヒトに予定治療量を投与したときの定常状態におけるアカラブルチニブの非結合形最高血漿中濃度($C_{max}$)と比較して未変化体では 15 倍、代謝物では 267 倍高かった 。
- ラットに最高 300 mg/kg までのアカラブルチニブを単回経口投与したとき、神経行動学的作用並びに直腸温及び呼吸器パラメータに対するアカラブルチニブの作用は認められなかった。
- hERG を安定的に発現させた HEK-293 細胞において、濃度 10 μM のアカラブルチニブ（ヒトでの非結合形 $C_{max}$ の 294 倍）は hERG を 25%阻害した。イヌの心血管系安全性試験において、最高用量 30 mg/kg の投与後にアカラブルチニブに関連する作用はみられなかった。これらの結果は、アカラブルチニブが QTc 間隔延長に対して重要な作用を示さなかった QT/QTc 評価試験（ACE-HV-005 試験、臨床薬理試験 2.7.2 項参照）の結果と合致している。
- ラット及びイヌに[$^{14}$C]-アカラブルチニブを投与したマスバランス試験の結果から、アカラブルチニブ経口投与後、これらの動物種の血液中にヒトでの曝露量と同等以上の ACP-5862 が認められることが確認された。このことから、ラット及びイヌを用いた安全性薬理試験において、アカラブルチニブ及びその主代謝物 ACP-5862 が重要臓器に及ぼす影響を十分に評価できると考えられる。
- アカラブルチニブと PI3Kδ 阻害薬 ACP-319 との併用を検討した *in vitro* hERG 試験及び心血管系安全性試験では、併用群で効果の増加が認められた。その効果の程度は弱く、

心血管系安全性試験の高用量の併用（アカラブルチニブ 30 mg/kg＋ACP-319 25 mg）でみられた変化は有害ではないと考えられた。

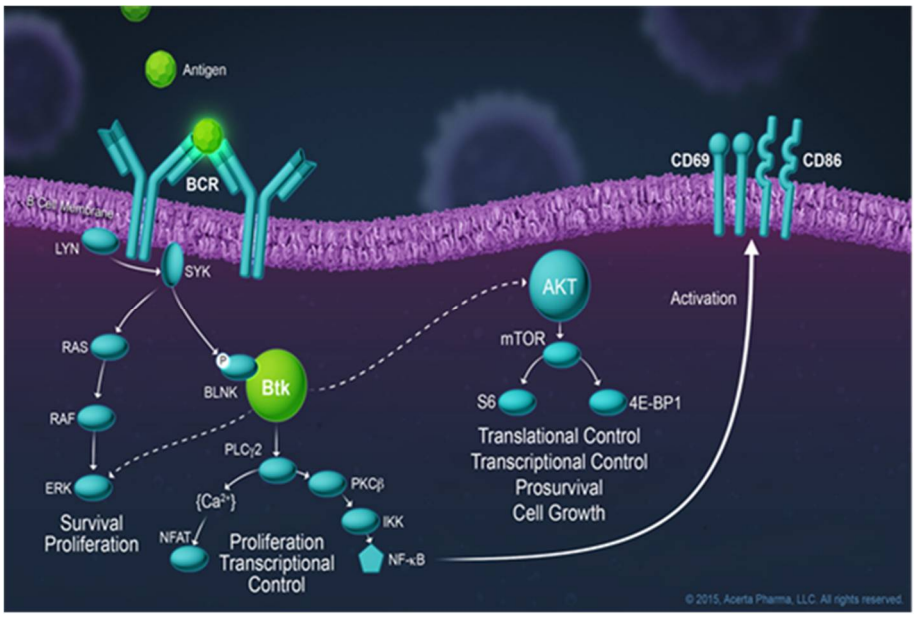
以上、包括的な効力を裏付ける試験の結果、アカラブルチニブ及びその主代謝物 ACP-5862 の良好な活性及び選択性が示された。マウス、ラット及びイヌ疾患モデルを用いた試験で、*in vivo* における有効性が示された。ラットを用いた安全性薬理試験では神経行動学的又は呼吸器系パラメータへの影響は認められず、イヌを用いた安全性薬理試験では心血管系パラメータへの影響は認められなかった。総括すると、非臨床試験の有効性及び安全性薬理の結果は、予定している適応症におけるアカラブルチニブの使用を支持するものである。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

### 2.6.2.2.1 背景

BTK は、B 細胞、骨髄球系細胞、肥満細胞及び血小板に発現する Tec ファミリーの非受容体型蛋白チロシンキナーゼである。シグナル伝達経路における BTK の機能が BCR を介して活性化されることは確立しており、これは正常な B 細胞の発生及び機能活性化の一環である（Maas and Hendriks 2001）。遺伝的に BTK を欠損した（X 連鎖性無ガンマグロブリン血症［XLA］）小児患者の B 細胞ではプレ B 細胞の段階で成長が止まり、ガンマグロブリン濃度が著しく低下する（Maas and Hendriks 2001、Winkelstein et al 2008）。BTK を欠損したマウスモデルでは、これより重症度の低い表現型が認められた。マウスでは Tec ファミリーキナーゼのメンバー間での多重性が高いことが、この差の原因となっている（Maas and Hendriks 2001、De Bruijn et al 2017）。B 細胞活性化における BTK の役割に関する概念図を図 1 に示した。

図 1　　B 細胞受容体結合後の B 細胞における BTK 伝達経路




4E-BPI=eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1; BCR=B-cell receptor; BLNK=B-cell linker; BTK=Bruton tyrosine kinase; ERK=extracellular signal-regulated kinase 1 and 2; GTPase=guanosine triphosphatase; IKK=IκB kinase; LYN=LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; mTOR=mechanistic target of rapamycin; NFAT=nuclear factors of activated T cells; NFκB=nuclear factor κB; PKCβ=protein kinase C beta; PLCγ2=phosphoinositide phospholipase C gamma 2; RAF=RAF family mitogen-activated protein kinase kinase kinase; RAS=RAS type GTPase; S6=mitochondrial ribosomal protein S6; SYK=spleen-associated tyrosine kinase.

Note: B-cell antigen receptor stimulation initiates activation of Src-family kinase LYN, which recruits and phosphorylates SYK, resulting in recruitment of BTK to membrane and association with the BCR signaling complex.　Activated BTK initiates signal cascades including: the PLCγ2 pathway, leading to Ca++ mobilization; the PKCβ pathway leading to NFκB activation; the AKT/mTOR pathway leading to translational up-regulation of multiple transcripts.　Activation of ERK signaling networks are also enhanced by BTK activity. Downstream functional changes associated with BTK-mediated BCR stimulation include expression of early activation markers CD69 and CD86, cell cycle entry, changes to cell migration/adhesion, and induction of pro inflammatory and pro-survival gene transcription (Hendriks et al 2014、Kenny et al 2013).

肥満細胞及び好塩基球（免疫グロブリン［Ig］E による脱顆粒［Ellmeier et al 2011、Hata et al 1998、MacGlashan et al 2011］）、好中球（P-セレクチン糖蛋白リガンド［PSGL-1］を介したテザリング及び遊走［Mueller et al 2010］）、単球／マクロファージ及び樹状細胞（Toll 様受容体［TLR］9 を介したシグナル［Lougaris et al 2014、Köprülü et al 2013］）、破骨細胞（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー11［RANKL］に誘導される破骨細胞の分化［Shinohara et al 2008］）、血小板（糖蛋白質 VI［GPVI］を介した凝集及び血栓形成［Quek et al 1998、Atkinson et al 2003］）等、B 細胞以外の造血器系由来の細胞でも、BTK 活性化の機能的作用が報告されている。マウスの NK 細胞では、TLR3 及び核内因子 κB（NFκB）を介した活性化に対する応答に、BTK が関与していると報告されている（Bao et al 2012）。一方、T リンパ球は機能活性化に BTK を必要としない（Smith et al 1994、Andreotti et al 2010）。

BCR 経路の持続的活性化は、様々な B 細胞性悪性腫瘍の増殖及び生存において重要な役割を果たしている（Buggy and Elias 2012）。共有結合型 BTK 阻害薬は、5 つすべての Tec ファミリー

キナーゼ並びにヤヌスキナーゼ 3（JAK3）、上皮成長因子受容体（EGFR）、erb-b2 受容体チロシンキナーゼ（ERBB）2、ERBB-4 及び Src ファミリーチロシンキナーゼである BLK 癌原遺伝子（BLK）で共通するアデノシン三リン酸（ATP）結合ポケットに位置する Cys481 を標的とする。システイン残基の位置に基づき、これらのキナーゼをまとめて 3F-Cys キナーゼと称す（Barf and Kaptein 2012）。B 細胞性悪性腫瘍患者で、アカラブルチニブ又はイブルチニブの BTK 標的阻害による抗腫瘍効果が認められており、BTK が妥当な治療標的であることが確認されている（Advani et al 2013、Wang et al 2018）。イブルチニブは BTK を強力に阻害するが、9 個の 3F-Cys キナーゼのうち 8 個のキナーゼも同時に阻害する（選択性は BTK に対する効力と比較して 10 倍未満）（Byrd et al 2016）。アカラブルチニブは強力な BTK 阻害作用を示すだけでなく、他の 3F-Cys キナーゼと比べて BTK への選択性が高く、他のキナーゼとの相互作用はほとんどないことから選択された薬剤である。BTK を発現しない細胞への標的外効果が限られていることから、アカラブルチニブは患者にとってより良い安全性プロファイルを有する薬剤である可能性が考えられる。

本概要文には、アカラブルチニブ及びその代謝物 ACP-5862 の BTK に対する効力及び選択性について、イブルチニブ、その主代謝物 M37 及び他の共有結合型 BTK 阻害薬 spebrutinib と比較したデータを示した。*In vitro* におけるヒト及びマウス初代免疫細胞を用いた BTK 依存機能試験で、アカラブルチニブの細胞内活性が確立された。*In vivo* におけるアカラブルチニブの薬理学的特性を、BCR 依存性正常免疫細胞を用いて評価した。*In vivo* での有効性を、疾患モデル（マウス MCL 及び CLL モデル、マウス及びイヌ DLBCL モデル及びラット炎症性骨吸収モデル）を用いて検討した結果から、選択性の高い BTK 阻害により、マウスの B 細胞性悪性腫瘍モデル及びイヌの患者由来白血病モデルにおいて意義のある有効性がもたらされることが示された。

## 2.6.2.2.2 *In vitro* 試験

### 2.6.2.2.2.1 アカラブルチニブの効力及び作用機序

（試験 R20[redacted]002A、試験 R20[redacted]001 参照）

複数のプラットフォームを用いて、アカラブルチニブ、イブルチニブ及びその主代謝物 M37、並びに spebrutinib の効力及び標的結合機序を評価した。また、アカラブルチニブ及び ACP-5862 の BTK 阻害作用を評価した。イブルチニブ及びその代謝物 M37（ここではすべての試験で同程度の活性を示した M37 の 2 つのエナンチオマーのうちの 1 つである ACP-5009 を指す）及び spebrutinib（ACP-4006）の比較結果を表 2 に示す。BTK の酵素活性は、固定化金属イオンアフィニティ蛍光偏光（IMAP）アッセイで測定した。アカラブルチニブ及び ACP-5862 の阻害作用は同程度であったが、イブルチニブの代謝物 M37 の阻害作用は未変化体の 1/10 であった。

表 2　IMAP アッセイプラットフォームで測定した BTK に対するアカラブルチニブ、イブルチニブ、イブルチニブの代謝物 M37 及び Spebrutinib の阻害作用

| Compound [a] | Experiment 1[b] $IC_{50}$ (nM) | Experiment 2[c] $IC_{50}$ (nM) |
|---|---|---|
| Acalabrutinib | 5.1±1.0 | 3.0±0.7 |
| ACP-5862 (M27) | ND | 5.0±1.0 |
| Ibrutinib | 1.5±0.2 | ND |
| Ibrutinib M37<br>R,R enantiomer (ACP-5009) | 14.2±1.7 | ND |
| Spebrutinib[d] | 2.3±0.5 | ND |

ATP=adenosine triphosphate; BTK=Bruton tyrosine kinase; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; IMAP=ion affinity-based fluorescence polarization; ND=not done.

a　Each assay included a head-to-head comparison of compounds listed. Data shown represent mean ± SD of values from 3 to 4 independent assay runs. All test compounds were preincubated for 60 minutes before starting the kinase reaction by the addition of ATP.

b　Reported in Study R20[redacted]002A.

c　Reported in Study R20[redacted]001.

d　Also known as CC-292.

### アカラブルチニブ及び ACP-5862 の共有結合形成機序の評価

IMAP アッセイを用い、様々なプレインキュベーション時間（0、30、60 分）及び ATP 濃度（5、25、100 μM）でアカラブルチニブ及び ACP-5862 の BTK 阻害作用の特性を評価した。アカラブルチニブ及び ACP-5862 共に、プレインキュベーション時間が長いほど阻害作用は増強した（表 3）。さらに、BTK とアカラブルチニブ及び ACP-5862 とのプレインキュベーション後に ATP との競合が消失した。これらの結果は、キナーゼに共有結合して不活性化する化合物に共通してみられる特徴である。本項の検討から、アカラブルチニブ及び ACP-5862 は共有結合形成により BTK を阻害することが示された。

表 3　*In vitro* におけるアカラブルチニブ及び ACP-5862 の共有結合による BTK 阻害の評価

| | $IC_{50}$ (nM) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acalabrutinib | | | ACP-5862 | | |
| ATP (μM) | 0 min | 30 min | 60 min | 0 min | 30 min | 60 min |
| 5 | 12 | 4.6 | 3.2 | 27 | 13 | 6.9 |
| 25 | 28 | 7.6 | 3.9 | 72 | 18 | 9.5 |
| 100 | 61 | 9.0 | 4.4 | 101 | 24 | 10.8 |

ATP=adenosine triphosphate; BTK=Bruton tyrosine kinase; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; IMAP=ion affinity-based fluorescence polarization; min=minute(s).

**Note**: Single experiment. IC50 derived from a 10 point curve. $IC_{50}$ values calculated from dose curves of acalabrutinib and ACP-5862 in IMAP assays where preincubation time and ATP concentrations were varied.

**Source**: Report R20[redacted]001.

アカラブルチニブ及び ACP-5862 が共有結合形成により BTK を阻害することを確認するため、野生型 BTK 又は BTK の Cys481 が Ser で置換された変異形態（BTK C481S）を用いてさらなる検討を実施した。BTK C481S 変異体のセリン残基は共有結合の求核剤ではなくなり、BTK 阻害薬の ATP 結合ポケットへの親和性を大きく低下させる。これらの機能試験で、アカラブルチニブ及び ACP-5862 の BTK 阻害は時間と共に増強したが、BTK C481S ではその増強がみられなかった。これらの結果から、ACP-5862 の BTK 阻害機序もアカラブルチニブと同様に Cys481 への共有結合形成であることが確認された。表 4 に示す $K_I$ 及び $k_{inact}$ から算出した二次速度定数（$k_{inact}/K_I$）より、アカラブルチニブによる時間依存的不活性化は ACP-5862 の 2 倍であることが示された（表 4）。これらの阻害定数を用いて、アカラブルチニブ及び ACP-5862 の PBPK モデルを構築した（臨床薬理試験 2.7.2 項参照）。

**表 4　　アカラブルチニブ及び ACP-5862 の阻害動態パラメータ**

| Compound | $K_I$ (nM) | $k_{inact}$ ($s^{-1}$) | $k_{inact}/K_I$ ($s^{-1}*M^{-1}$)* |
|---|---|---|---|
| Acalabrutinib | 300 ± 74 | 0.0102 ± 0.0032 | 3.38E+04 ± 8.29E+03 |
| ACP-5862 | 188 ± 9 | 0.0031 ± 0.0003 | 1.65E+04 ± 7.77E+02 |

$IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; $K_I$=inhibitory constant for mechanism-based inhibitor; $k_{inact}$=inactivation rate constant.

**Note**: Acalabrutinib and M27 binding to BTK-WT was measured by LanthaScreen as reported by Krippendorff et al 2009 at different timepoints. The $K_i$ and $k_{inact}$values were determined from average IC50 values from 4 experiments as described in Experimentals section. *Ratio of Kinact to Ki values. Data are mean + SD from 4 experiments.

**Source**: Report R20[redacted]001.

## 2.6.2.2.2.2　アカラブルチニブ、ACP-5862、イブルチニブ、イブルチニブ代謝物 M37 及び Spebrutinib のキナーゼ選択性

（試験 R20[redacted]002A 及び試験 R20[redacted]001 参照）

BTK の他に、9 個の 3F-Cys キナーゼが存在する（Tec 蛋白チロシンキナーゼ（TEC）、X 染色体上の骨髄チロシンキナーゼ遺伝子（BMX）、インターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼ（ITK）、TXK チロシンキナーゼ／蛋白チロシンキナーゼ 4（TXK）、EGFR、ERBB2、ERBB4、BLK 及び JAK3（Barf and Kaptein 2012）。3F-Cys キナーゼは共有結合型 BTK 阻害薬による共有結合の標的となる可能性があるため、アカラブルチニブの 3F-Cys キナーゼに対する選択性をイブルチニブ、イブルチニブの活性代謝物 M37 及び spebrutinib と直接比較した。また、ヒト血漿中に存在する M37 のエナンチオマーは不明であるため、両方のエナンチオマーを合成して評価した。その結果、両エナンチオマーで同様の値が得られたため、M37 の R,R エナンチオマー（ACP-5009）の結果を代表値として示した。

3 種のアッセイプラットフォームを用いて $IC_{50}$ 値を求めた（表 5）。すべての化合物が強い BTK 阻害作用を示し、$IC_{50}$ 値はイブルチニブの 1.5 nM からアカラブルチニブの 5.1 nM の範囲であった。アカラブルチニブは 3F-Cys キナーゼグループに対して良好な選択性を示し、BMX 及び ERBB4 以外のすべての標的外キナーゼに対する $IC_{50}$ 値は 100 nM を超えていた。ACP-5862 のキナーゼ選択性はアカラブルチニブと類似しており、BTK に対し高い選択性を示した。その他の 3F-Cys キナーゼでは、ACP-5862 は BMX に対して阻害活性を示したが、ERBB4 に対する阻害活性はアカラブルチニブと比較して約 1/20 であった。TEC 及び TXK に対する ACP-5862 の $IC_{50}$ 値はアカラブルチニブの約 3 倍以内であった（表 5）。

これに対し、イブルチニブはすべての 3F-Cys キナーゼを阻害し、これらのうち 9 種のキナーゼに対する $IC_{50}$ 値が 10 nM 未満であった。特に、アカラブルチニブは ITK 及び EGFR に対して活性を示さなかったが、イブルチニブはこれら両方を強力に阻害した。また、イブルチニブは最も広範に発現する Tec ファミリーキナーゼの 1 つである TEC に対しても活性を示した（$IC_{50}$=10 nM）。一方、アカラブルチニブの TEC に対する阻害作用は、その 1/10 以下で、$IC_{50}$ 値は 100 nM を超えていた。

血漿中濃度がイブルチニブより高いため、イブルチニブの代謝物 M37 についても評価した（Scheers et al 2015）。代謝物 M37 は、アクリロイル基のエポキシ化のため BTK と非共有結合性に相互作用し、その反応部位を喪失した。その結果、結合したキナーゼの阻害が可逆的となり、未変化体と比較して 3F-Cys キナーゼに対する阻害作用が低下したと考えられる。しかしながら、代謝物 M37 は BTK、BLK、TEC、BMX 及び ERBB4 に対して阻害作用を示し、$IC_{50}$ 値は 100 nM 未満であった（表 5）。

Spebrutinib は、BMX、JAK3 及び TXK を強力に阻害し（$IC_{50}$ 値：10 nM 未満）、イブルチニブと同様に TEC 及び ITK も阻害した（$IC_{50}$ 値：100 nM 未満）。アカラブルチニブの TEC に対する阻害作用は spebrutinib と比較して低かった（表 5）。

表 5　　アカラブルチニブ及び他の BTK 阻害薬の 3F-Cys キナーゼに対する阻害作用

| Kinase | $IC_{50}$ (nM) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Acalabrutinib (ACP-196) Exp 1 | Acalabrutinib (ACP-196) Exp 2 | ACP-5862 (M27) Exp 2 | Ibrutinib (ACP-2001) Exp 1 | Ibrutinib M37 (ACP-5009)[a] Exp 1 | Spebrutinib (ACP-4006) Exp 1 |
| BTK[b] | 5.1 ± 1.0 | 3.0 ± 0.7 | 5.0 ± 1.0 | 1.5 ± 0.2 | 14 ± 2 | 2.3 ± 0.5 |
| TEC | 126 ± 11 | 139 ± 16 | 345 ± 34 | 10 ± 2 | 16 ± 1 | 16 ± 4 |
| ITK[b] | >10,000 | >10,000 | >10,000 | 4.9 ± 1.2 | 1340 ± 411 | 24 ± 2 |
| BMX | 46 ± 12 | 58 ± 8 | 15 ± 2 | 0.8 ± 0.1 | 15 ± 4 | 1.6 ± 0.4 |
| TXK | 368 ± 141 | 352 ± 118 | 567 ± 174 | 2.0 ± 0.3 | 258 ± 145 | 9.1 ± 2.7 |
| EGFR | >1,000 | >10,000 | >10,000 | 5.3 ± 1.3 | >1000 | 199 ± 35 |
| ERBB2 | ~1,000 | 413 ± 79 | 552 ± 166 | 6.4 ± 1.8 | >1000 | >1,000 |
| ERBB4 | 16 ± 5 | 19 ± 1.0 | 343 ± 23 | 3.4 ± 1.4 | 83 ± 4 | 49 ± 12 |
| BLK | >1,000 | 1763 ± 356 | 6170 ± 3348 | 0.1 ± 0.0 | 4.8 ± 0.2 | 131 ± 27 |
| JAK3 | >1,000 | >10,000 | >10,000 | 32 ± 15 | >1000 | 5.4 ± 1.1 |

BLK=BLK proto-oncogene, Src family kinase; BMX=BMX non-receptor tyrosine kinase; BTK=Bruton tyrosine kinase; EGFR=epidermal growth factor receptor; ERBB2=erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; ERBB4=erb-b2 receptor tyrosine kinase 4; Exp=experiment; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; IMAP=ion affinity-based fluorescence polarization; ITK=interleukin 2 inducible T-cell kinase; JAK3=Janus kinase 3; TEC=tec protein tyrosine kinase; TXK=TXK tyrosine kinase.

**Note**: Mean and SD from 3 independent assay runs.　Experiment 1 used a top concentration of 1000 nM and Experiment 2 used a top concentration of 10,000 nM.

a　ACP-5009 is the R,R enantiomer of ibrutinib M37.　Similar results were obtained for both possible enantiomers.

b　BTK and ITK kinase activities were measured using the IMAP assay.　For BMX, TXK, EGFR, ERBB2, ERBB4, BLK and JAK3 kinase activity was measured at ThermoFisher using the Z'-LYTE™ assay.　TEC kinase activity was determined in a LanthaScreen™ assay.

**Source**: Report R20[redacted]002A (Experiment 1), Report R20[redacted]001 (Experiment 2).

## 広範なキノームを用いたアカラブルチニブ及び ACP-5862 の選択性の評価

市販のキナーゼパネルを用いて（ThermoFisher 社：282 種類の哺乳類キナーゼからなるパネル、DiscoveRx 社：384 又は 392 種類の野生型哺乳類キナーゼからなるパネル）、アカラブルチニブ、イブルチニブ及びこれらの主代謝物のキノーム・スクリーニングを実施した。

ThermoFisher のプロファイリングは、Z'-LYTE™、LanthaScreen®又は[redacted]テクノロジーを用いて、高濃度（10 μM）のスクリーニングとして実施した。LanthaScreen は結合アッセイのプラットフォームであり、他の 2 つ（Z'-LYTE™、[redacted]）は酵素の組換えキナーゼ又はキナーゼ部位を用いて酵素活性を測定するプラットフォームである。濃度 10 μM で阻害率が 80%を超えるキナーゼの数を評価したところ、アカラブルチニブ、イブルチニブ及び spebrutinib の全般的なキナーゼ選択性には大きな違いがみられた。アカラブルチニブは 12 種類のみ、イブルチニブは 41 種類、spebrutinib は 45 種類のキナーゼを阻害した。イブルチニブの標的として確認されたキナーゼは、SRC 癌原遺伝子、非受容体型チロシンキナーゼ（SRC）、fms 関連チロシンキナーゼ 1（FLT）及び線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）キナーゼファミリーメンバーであり、spebrutinib の標的は、Aurora、FLT 及び FGFR キナーゼファミリーメンバーであった。

アカラブルチニブ及び ACP-5862 のキナーゼ選択性をさらに評価するため、選択基準を 10 μM で阻害率 70%以上と設定し（また、表 5 に示す 3F-Cys キナーゼを除いて）、最初のスクリーニングで同定された 32 種類のキナーゼに対する $IC_{50}$ 値を求めた。アカラブルチニブ又は ACP-5862 で $IC_{50}$ 値が 1 μM 未満であった全キナーゼの結果を表 6 に示す。アカラブルチニブのこれらのキナーゼに対する活性は、BTK に対する活性と比較して 1/100 以下であった。ACP-5862 は PTK6 に対して異なる選択性を示し、$IC_{50}$ 値は 61 nM であった。

**表 6　　280 種類のキナーゼの ThermoFisher スクリーニングにおける阻害作用**

| Kinase | $IC_{50}$ (nM) | |
|---|---|---|
| | Acalabrutinib | ACP-5862 |
| CDK8 /cyclin c[a] | 1280 | 445 |
| FGR | 1660 | 973 |
| PTK5 | 964 | 2770 |
| PTK6 | 626 | 61 |
| RIPK2 | 418 | 732 |

CDK8=cyclin dependent kinase 8; FGR=FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; PTK5=protein tyrosine kinase 5; PTK6=protein tyrosine kinase 6; RIPK2=receptor interacting serine/threonine kinase 2.

**Note**: $IC_{50}$ values for kinases tested over a 10-point dose curve at ThermoFisher.

a　LanthaScreen assay was used for CDK8 and RIPK2, Z'-LYTE was used for FGR, PTK5 and PTK6.

**Source**: Report R20[redacted]001.

2 回目の広範なキノーム・プロファイリングは、DiscoveRx KINOMEscan®プラットフォームを用いて 1 μM で実施した。DiscoveRx KINOMEscan®は、固定化リガンドとの結合の阻害に基づきキナーゼとの相互作用を検出する。試験の時点で得られているすべてのキナーゼを用いて評価を実施した（384 又は 392 種類の野生型哺乳類キナーゼ、表 7 参照）。評価の結果を図 2 に図示した。

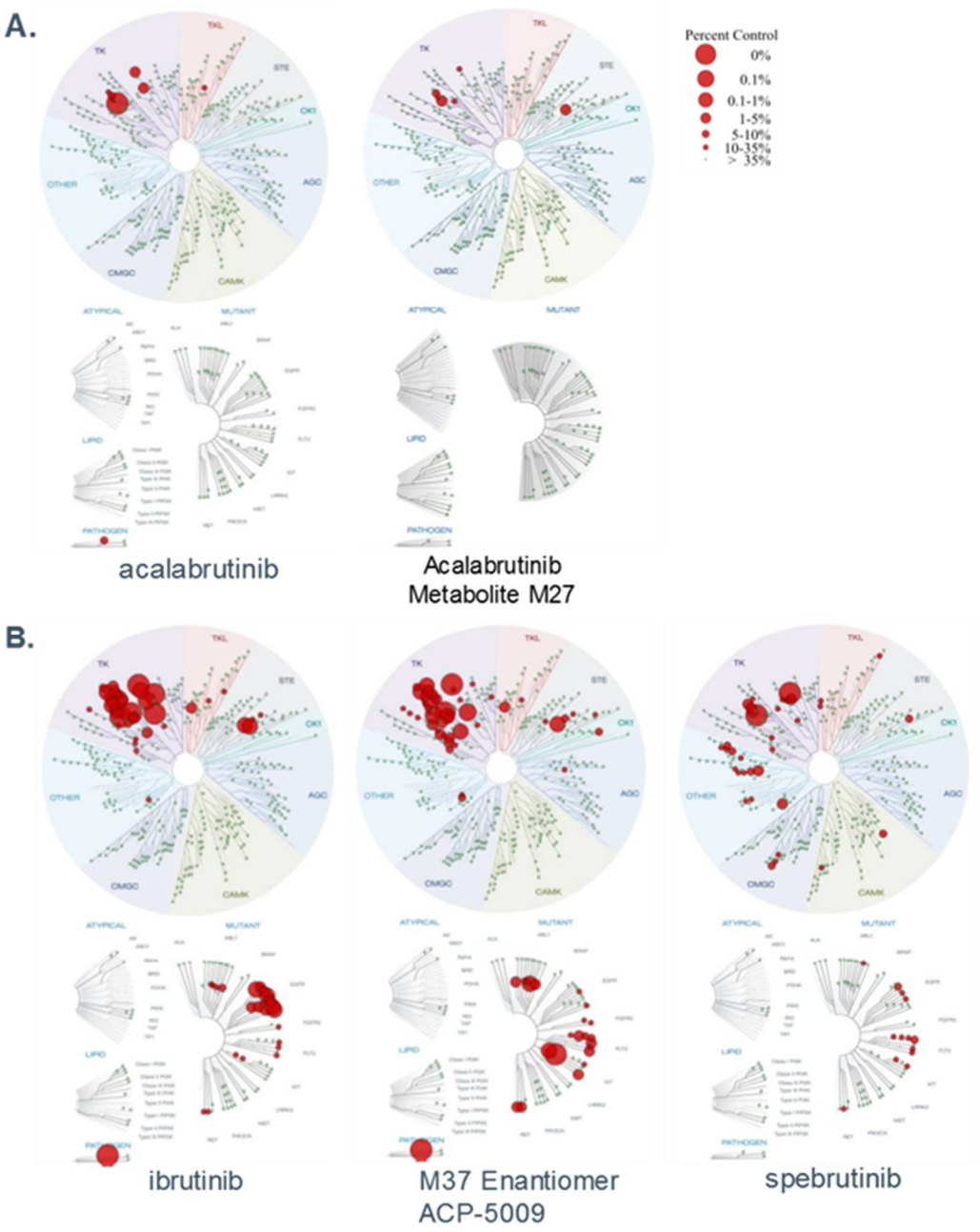
ThermoFisher のキナーゼ阻害に基づくスクリーニングの結果と同様に、KINOMEscan スクリーニングでもアカラブルチニブと他の BTK 阻害薬のプロファイルに違いがみられ、また、未変化体とその代謝物のプロファイルには類似性が認められた。アカラブルチニブと ACP-5862 は、全体的に他剤よりもキナーゼに対する選択性が高く、65%を超える阻害率を示したのは、それぞれ 7 種類及び 5 種類の野生型哺乳類キナーゼとのみであった（表 7）。これに対し、イブルチニブ、その代謝物 M37 及び spebrutinib は、それぞれ 37 種類、44 種類及び 33 種類のキナーゼで 65%を超える阻害率を示した。

表 7　DiscoveRx KINOMEscan によるプロファイリング結果の要約（1 μM におけるスクリーニング）

| Compound | Kinases Tested (WT) | Number of Hits Giving Inhibition at the Following Levels | | |
|---|---|---|---|---|
| | | >65% | >90% | >99% |
| Acalabrutinib* | 384 | 7 | 4 | 1 |
| ACP-5862 | 384 | 5 | 2 | 1 |
| Ibrutinib | 384 | 37 | 25 | 13 |
| Ibrutinib M37 (ACP-5009) | 384 | 44 | 26 | 10 |
| Spebrutinib | 384 | 33 | 14 | 2 |

BTK=Bruton tyrosine kinase; WT=wild type.
**Note**: Table summarizes the hit score from DiscoveRx Kinome profiling. The hit score represents the number of kinases that bound to compound giving % inhibition > value listed.
*For acalabrutinib, the only kinase that was inhibited >99% was BTK.+
**Source:** Reports R20[redacted]002A, R20[redacted]001.

図 2　　1 μM における化合物の KINOMEscan プロファイリング




STE=mitogen-activated protein kinase signaling cascade.
Note: [redacted] representation of kinome screens.　Kinases are arranged within homology groups and displayed as nodes in the dendrogram.　Kinases that bind are marked with red circles.　Larger circles indicate higher-affinity binding (ie, low % of control ligand binding remaining).　Most activities are within the Tyrosine Kinase and STE groups of kinases.　A) Profiles of acalabrutinib and its metabolite ACP 5862 (M27).　B) Profiles of, ibrutinib, its metabolite ACP-5009 and spebrutinib.　Mutant and non-mammalian kinases are shown for completeness.
Source: Reports R20[redacted]002A, R20[redacted]001.

アカラブルチニブ又は ACP-5862 で結合活性が 65%を超えた 9 種類のキナーゼは、顕著な相互作用を示すキナーゼとみなされた。すでに検討した 3F-Cys キナーゼに属するキナーゼに加え、LIMK1 がアカラブルチニブの標的として特定された。ACP-5862 については、さらに 2 種類のキナーゼ（PTK6 及び MEK5）で阻害率が 65%を超える相互作用が示された。

アカラブルチニブ及び ACP-5862 の $IC_{50}$ 値を直接比較した結果を示した（表 8）。なお、本アッセイ形式で求めた 3F-Cys キナーゼの $IC_{50}$ 値は、表 5 に示す酵素アッセイ法で算出した $IC_{50}$ 値よりも頑健性が低いと考えられることに留意する。

表 8　　KINOMEscan で濃度 1 μM において阻害率が 65%を超えたキナーゼ

| | % Inhibition at 1 μM | | $IC_{50}$ (nM) | |
|---|---|---|---|---|
| Kinase | Acalabrutinib | ACP-5862 | Acalabrutinib | ACP-5862 |
| BTK* | 99.95% | 98.4% | 15 | 29 |
| BMX* | 66% | 76% | 570 | 190 |
| PTK6 | 21% | 76% | 1600 | 150 |
| ERBB2* | 97.9% | 89% | 56 | 120 |
| ERBB4* | 95.7% | 51% | 140 | 970 |
| LIMK1 | 87% | 58% | 190 | 400 |
| MEK5 | 35% | 96.3% | 930 | 69 |
| TEC* | 93.6% | 93.5% | 16 | 40 |
| TXK* | 76% | 40% | 540 | 1100 |

BMX=BMX non-receptor tyrosine kinase; BTK=Bruton tyrosine kinase; ERBB2=erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; ERBB4=erb-b2 receptor tyrosine kinase 4; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; LIMK1=LIM domain kinase 1; MEK5=mitogen-activated protein kinase kinase 5; PTK6=protein tyrosine kinase 6; TEC=tec protein tyrosine kinase; TXK=TXK tyrosine kinase.

**Note**: DiscoveRx scanMAX™ profiling at a single dose (1 μM) on >450 available kinases (including mutant kinases). Kinases inhibited >65% were considered to have significant interactions and were followed with $IC_{50}$ determinations on the same platform. Kinases marked* indicate 3F-Cys kinase family members.

**Source**: Report R20[redacted]001.

### SRC ファミリーキナーゼに対する選択性

ThermoFisher 及び DiscoveRx スクリーニングにおいて、イブルチニブは一部の Src ファミリーの癌原遺伝子非受容体蛋白チロシンキナーゼを強力に阻害した。Src ファミリーキナーゼは広く発現しており、造血器系由来細胞の多くの機能で重要な役割を担っているため、Z'-LYTE アッセイ法を用いて、BTK 阻害薬及びイブルチニブの代謝物 M37 のヒトの Src ファミリーメンバーキナーゼに対する阻害作用を評価した。

表 9 に示すように、アカラブルチニブはヒトの Src キナーゼには作用しない。イブルチニブ及び代謝物 M37 は同様の阻害活性を示し、共に 7 種類すべての Src キナーゼに対する $IC_{50}$ 値が 50 nM 未満であった。FGR 癌原遺伝子、Src ファミリーチロシンキナーゼ（FGR）及び SRC に対する spebrutinib の阻害活性は非常に小さかった（$IC_{50}$：100 nM 未満及び 1 μM 未満）。

表 9 Src ファミリーキナーゼを用いた機能試験：アカラブルチニブ、イブルチニブ、spebrutinib 及びイブルチニブの代謝物 M37

| Kinase | $IC_{50}$ (nM) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Acalabrutinib (ACP-196) | Ibrutinib (ACP-2001) | Spebrutinib CC-292 (ACP-4006) | Ibrutinib M37 R, R Enantiomer (ACP-5009)[a] |
| FGR | >1000 | 3.3 ± 1.1 | 348 ± 93 | 2.0 ± 0.2 |
| FYN | >1000 | 29 ± 0 | >1000 | 37 ± 6 |
| HCK | >1000 | 29 ± 0 | >1000 | 32 ± 3 |
| LCK | >1000 | 6.3 ± 1.3 | >1000 | 3.9 ± 0.1 |
| LYN | >1000 | 20 ± 1 | >1000 | 19 ± 1 |
| SRC | >1000 | 19 ± 1 | 699 ± 302 | 28 ± 8 |
| YES1 | >1000 | 4.1 ± 0.2 | ~1000 | 5.2 ± 1.3 |

FGR=FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; FYN=FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; HCK=HCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; LCK=LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; LYN=LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; SD=standard deviation; SRC=SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase; YES1=YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase.

**Note**: Kinase activity was measured using the Z'-LYTE assay (ThermoFisher). Results are mean ± SD of 2 independent assay runs.

a ACP-5009 is the R, R enantiomer of ibrutinib M37. Comparable results obtained from both possible enantiomers.

**Source**: Report R20[redacted]002A.

全体として、キナーゼの生化学検討及び広範なキノーム・スクリーニングの結果から、アカラブルチニブ及び ACP-5862 は強力で選択性の高い共有結合型の BTK 阻害活性を有し、その活性特性は非常に類似しており、相互作用を示す標的外のキナーゼは比較的少ないことが確認された。イブルチニブ及び spebrutinib と比較して、アカラブルチニブ及び ACP-5862 は、TEC、EGFR 及び ITK を含む 3F-Cys キナーゼに対する選択性が高く、Src ファミリーキナーゼに対して活性を示さなかった。このように、より高い選択性を示すアカラブルチニブは、開発候補として適切であると考えられた。

## 2.6.2.2.2.3 B 細胞及び非標的細胞における BTK 阻害薬の活性

（試験 R20[redacted]003A 及び試験 R20[redacted]002 及び AZ Pharmacology Reports 01 並びに P23328［参考資料］参照）

アカラブルチニブ、ACP-5862、イブルチニブ及び spebrutinib の細胞を用いた試験を実施し、BTK に対する生化学的効力が生理学的に関連性のある細胞系でどのように作用するかを評価した。腫瘍細胞株、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）及びヒト全血を用いた機能試験を実施し、酵素測定試験で認められた効力及び選択性の結果を確認した。

B 細胞の活性化は、B 細胞における CD69 のアップレギュレーション（BCR 刺激後の BTK を介したシグナルの下流における細胞イベント）によって測定した。PBMC におけるアカラブルチニブの活性はイブルチニブの 1/5、spebrutinib の 2.5 倍であった。一方、ヒト全血においては、アカラブルチニブとイブルチニブは、B 細胞活性化に対し同程度の活性を示し、spebrutinib の活性はその 1/15 未満であった（表 10）。

表 10　　ヒト PBMC 及び全血中の B 細胞における BCR 刺激後の CD69 発現に対する阻害活性

| Test Article | $EC_{50}$ (nM) | |
|---|---|---|
| | PBMC | WB |
| Acalabrutinib | 2.9 ± 0.2 | 9.2 ± 4.4 |
| Ibrutinib | 0.58 ± 0.04 | 5.8 ± 3.0 |
| Spebrutinib | 7.4 ± 0.7 | 140 ± 85 |

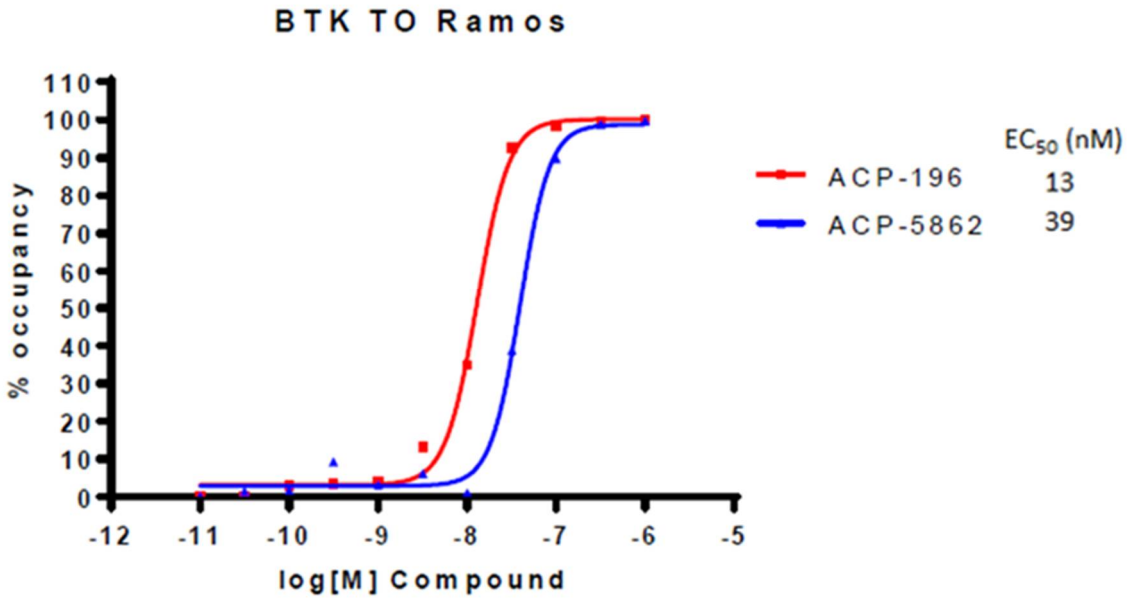
BCR=B-cell receptor; $EC_{50}$=effective concentration causing half maximal inhibition; PBMC=peripheral blood mononuclear cells; WB=whole blood.

**Note**: Results are mean ± SD of at least three independent experiments.

Source: 20[redacted]003A.

ACP-5862 についても同様の測定試験を実施し、細胞内での活性をアカラブルチニブと比較した。まず、BTK 占有率を Ramos バーキットリンパ腫細胞株で確認した（図 3）。アカラブルチニブの最大値の 50%の効果が得られる濃度（$EC_{50}$）は 13 nM であったのに対し、ACP-5862 の $EC_{50}$ は 39 nM であり、アカラブルチニブの活性は約 3 倍高いことが示された。この結果から、アカラブルチニブの BTK 阻害作用は ACP-5862 と比較して約 2 倍高いという生化学試験における所見が妥当であることが確認された（表 4）。

図 3　　Ramos 細胞におけるアカラブルチニブ及び ACP-5862 の BTK 占有率




BTK=Bruton tyrosine kinase; $EC_{50}$=effective concentration causing half maximal inhibition; ELISA=enzyme linked immunosorbent assay.

Note: Ramos cells were incubated for 2 hours with different concentrations of acalabrutinib and ACP-5862 and then cell lysates were subjected to a BTK occupancy ELISA. Relative percentage occupancy was measured with the aid of a biotinylated acalabrutinib analogue probe.

Source: Report R20[redacted]002.

BCR 刺激による CD69 のアップレギュレーションに対する阻害作用に差がみられた。PBMC 中の B 細胞では、アカラブルチニブの効力は ACP-5862 の 4 倍であった（表 11）。いずれの化合物でも、BCR 刺激前に、2 時間のプレインキュベーション後、ウォッシュアウトした場合、効力に 2 倍の変化がみられた。本試験で認められた CD69 のアップレギュレーションに対する持続的な阻害は、共有結合による BTK 阻害と合致するものであった。

全血でも、アカラブルチニブは PBMC 試験と同様の効力を示した。ACP-5862 の効力は PBMC と比較して全血で低下した。全血試験では、アカラブルチニブの効力は ACP-5862 の 7 倍であった（表 11）。この結果は、ヒト血漿における ACP-5862 の非結合率がアカラブルチニブと比較して低いことが一部関係している可能性がある（ACP-5862 の非結合率 1.4%、アカラブルチニブの非結合率 2.5%）（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項の表 12 参照）。

**表 11　　BCR 刺激後の CD69 発現に対するアカラブルチニブ及び ACP-5862 の阻害活性**

| Cellular Assay | $EC_{50}$ (nM) | |
|---|---|---|
| | Acalabrutinib | ACP-5862 |
| PBMC[a] | 6.2 ± 2.3 | 26 ± 16 |
| PBMC with washout[a] | 13 ± 3 | 51 ± 19 |
| WB[b] | 8.8 ± 0.8 | 64 ± 6 |

$EC_{50}$=effective concentration causing half maximal inhibition; PBMC=human peripheral blood mononuclear cells; WB=whole blood.

**Note**: Data are from a head-to-head comparison of acalabrutinib and ACP-5862 in the same experiments.

a　Data are mean ± SD for 3 independent assay runs.

b　Data are mean ± SD for 4 donors.

**Source**: Report R20[redacted]002.

### T 細胞及び上皮細胞におけるアカラブルチニブの作用

初代細胞及び固定化細胞を用いた *in vitro* 試験を実施し、T 細胞、NK 細胞及び上皮細胞に対するアカラブルチニブ、イブルチニブ及び spebrutinib の作用を評価した。

T 細胞の活性化は、Jurkat（急性 T 細胞性白血病）細胞における抗 CD3／抗 CD28 抗体刺激による IL-2 産生及びゲーティングしたヒト初代 T 細胞における抗 CD3 抗体で誘導した CD25 の発現で測定した（表 12）。アカラブルチニブは、T 細胞活性化に関わるこれらの機能評価項目のいずれに対しても作用を示さなかった。一方、イブルチニブ及び spebrutinib は、これらの試験で T 細胞活性化を阻害した。

A431 類表皮癌細胞を用いて上皮成長因子（EGF）刺激による EGFR のリン酸化を測定し、EGFR 阻害の可能性を評価した。アカラブルチニブ及び spebrutinib は、EGFR のリン酸化を阻害しなかったが、イブルチニブは EGFR を阻害し、$EC_{50}$ は 71 nM であった（表 12）。この結果から、BTK 阻害薬の間で EGFR に対する活性に違いがあるとする生化学試験の結果の妥当性が確認された。

表 12　T 細胞活性化及び EGFR シグナル伝達におけるアカラブルチニブ、イブルチニブ及び spebrutinib の作用の評価

| Compound | Anti-CD3/CD28-Induced IL-2 Production Jurkat T Cells $EC_{50}$ (nM)[a] | Anti-CD3-Induced CD25 Expression PBMCs $EC_{50}$ (nM)[a] | EGF-Induced EGFR Phosphorylation A431 Carcinoma $EC_{50}$ (nM)[b,c] |
|---|---|---|---|
| Acalabrutinib | >10,000 | >10,000 | >10,000 |
| Ibrutinib | 99 ± 17 | 257 ± 71 | 71 ± 14 |
| Spebrutinib | 150 ± 22 | 575 ± 60 | 4680 ± 720 |

$EC_{50}$=effective concentration causing half maximal inhibition; EGF=epidermal growth factor; EGFR=epidermal growth factor receptor; IL=interleukin; PBMC=peripheral blood mononuclear cells.

a Results presented are the mean ± SD of three independent experiments.

b Results presented are the mean with ± range of two independent experiments.

c Similar results were obtained using the HT-1376 cell line.

**Source**: Report 20[redacted]003A.

また、初代 CD8 陽性 T 細胞を用いて、T 細胞増殖に対するアカラブルチニブ及びイブルチニブの作用の可能性についても評価した（表 13）。アカラブルチニブは、10 μM の濃度までマウス及びヒト T 細胞に対し増殖抑制作用を示さなかった。一方、イブルチニブはマウス及びヒトのいずれにおいても CD8 陽性 T 細胞の増殖を阻害することが示され、$IC_{50}$ 値は約 400 nM であった。

表 13　ヒト又はマウス由来の CD8 陽性 T 細胞を用いた増殖試験

| Compound | Human $IC_{50}$ [nM] | Murine $IC_{50}$ [nM] |
|---|---|---|
| Acalabrutinib | >10,000 | >10,000 |
| Ibrutinib | 410 | 405 |

$IC_{50}$=inhibitory concentration causing half-maximal inhibition; PBMC=peripheral blood mononuclear cells.

**Note**: 72-hour proliferation assays were conducted in CD8+ T cells enriched from human PBMC preparations (n=2 replicate assays from a single donor) and from mouse spleens (n=2 replicate assays). The IC50 in the table was derived from the dose response curve that was fitted from two data points per concentration.

**Source**: AZ Pharmacology Report 01.

### NK 細胞に対するアカラブルチニブの作用

B 細胞性悪性腫瘍は抗 CD20 抗体医薬品で治療されることが多いため、Fc を介した NK 細胞及び他のエフェクター細胞による腫瘍細胞クリアランスの役割について広範に検討した（Wang et al 2015）。過去の試験で、イブルチニブは NK 細胞の活性化を阻害し、リツキシマブによる NK 細胞を介した抗体依存性細胞傷害（ADCC）を拮抗すると報告された（Kohrt et al 2014、Da Roit et al 2015）。イブルチニブは NK 細胞機能の重要なモジュレーターである 3F-Cys キナーゼ ITK（Khurana et al 2007）を阻害した（表 5）。腫瘍細胞殺傷に関わる NK 細胞機能を阻害する可能性について、アカラブルチニブとイブルチニブを直接比較した。

健康被験者 6 例から採取したヒト NK 細胞を用いて、アカラブルチニブ又はイブルチニブ存在下でトラスツズマブによる ADCC を検討する試験を実施した（表 14）。本試験において、イブルチニブは ADCC を阻害し、$EC_{50}$ は 80～1540 nM の間であった（表 14）。アカラブルチニブの $EC_{50}$ は 6 例全例で 4 μM を超えていた。

表 14　　SKBr3 細胞に対するトラスツズマブによる ADCC

| Donor | Acalabrutinib | | Ibrutinib | |
|---|---|---|---|---|
| | $EC_{50}$ (nM) | % Inhibition at 1 µM | $EC_{50}$ (nM) | % Inhibition at 1 µM |
| 1 | 5440 | 21% | 80 | 87% |
| 2 | 8790 | 15% | 170 | 81% |
| 3 | >10,000 | 10% | 690 | 63% |
| 4 | >10,000 | 9% | 1540 | 5% |
| 5 | 4430 | 3% | 100 | 93% |
| 6 | 6260 | 4% | 290 | 84% |

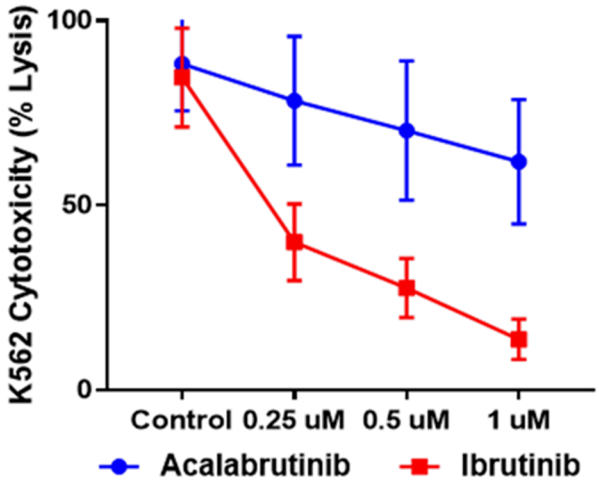
ADCC=antibody dependent cellular cytotoxicity; $EC_{50}$=effective concentration causing half maximal inhibition; NK=natural killer; PBMC=peripheral blood mononuclear cells.

**Note**: Human NK cells enriched from PBMCs in 10 concentration point assay in half-log dilutions from 10 µM [acalabrutinib] or 1µM [ibrutinib] were incubated with Eu-labelled SKBr3 target cells. Each measurement was performed in triplicate and the averages are the basis of the calculations

**Source**: AZ Pharmacology Report 01.

細胞傷害活性試験で、イブルチニブは NK 細胞による K562 細胞破壊を濃度依存的に強く阻害した。一方、アカラブルチニブによる阻害は弱かった（1 µM で 30%の減少）（図 4）。

図 4　　K562 細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性




ANOVA=analysis of variance; NK=natural killer cell, SD=standard deviation.

Note: Peripheral blood mononuclear cells were cultured with 51Cr labelled K562 targets at an E:T ratio of 100:1 for 4 hours.　Cytotoxicity was evaluated by scintillation counting of supernatants.　Treatment, dose, and interaction effect were significant in 2-way ANOVA (n=5 healthy donors; ibrutinib v. acalabrutinib $p < 0.0001$; all ibrutinib doses $p < 0.0001$ compared with control; $p = 0.0117$ for control versus acalabrutinib 1 µM, other acalabrutinib doses not statistically different from control condition). The error bar indicates SD.

Source: Report P23328.

## 2.6.2.2.3 *In vivo* 試験

動物モデルを用いた一連の試験を実施し、経口投与したときのアカラブルチニブの活性を検討した。幾つかの試験で、薬力学に基づき効力及び効果持続期間を評価した。他の試験では、マウス B 細胞性悪性腫瘍モデル、ラット関節リウマチモデル及びコンパニオンドッグ自然発症 B 細胞リンパ腫モデルを用いて BTK 阻害作用を評価した。非臨床代謝試験の結果、評価した全動物種において、アカラブルチニブの主代謝物 ACP-5862 の存在が確認された（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）。これらの試験から、関連する非臨床試験系における薬理学的有効性のエビデンスが得られた。

マウス、ラット及びイヌに経口投与したときアカラブルチニブは 0.25～2 時間以内に Cmax に達した（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）。各動物種に経口投与したときのアカラブルチニブの BTK 標的占有率も検討した。結果として、標的部位は完全に飽和し、その状態はアカラブルチニブが血漿から消失した後も持続していた（品質に関する概括資料 2.3 項参照）。

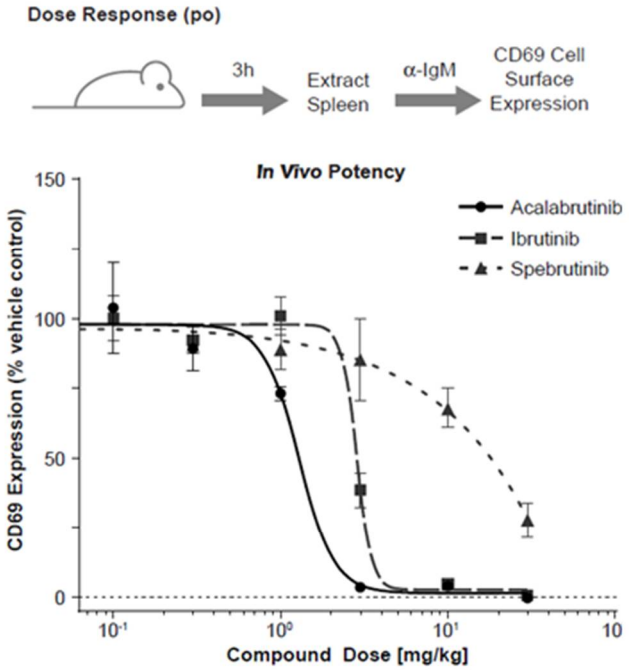
### 2.6.2.2.3.1 マウスにおける単回投与時の作用：イブルチニブとの用量-反応関係の比較

（試験 R20[redacted]004A 参照）

*In vivo* における BTK 阻害作用を *ex-vivo* における B 細胞機能試験で検討した。マウス（各群 5 匹）にアカラブルチニブ、イブルチニブ、spebrutinib 又は溶媒を所定の濃度範囲で強制投与した（図 5）。3 時間後に脾臓を摘出し、脾細胞を抗免疫グロブリン M(IgM)で 18 時間刺激した。フローサイトメトリーを用いて、ゲーティングした B 細胞における B 細胞活性化マーカーCD69 の発現レベルを測定した。50%有効量（$ED_{50}$）の測定結果において、*in vivo* で最も強力な BTK 阻害薬はアカラブルチニブ（1.3 mg/kg）であり、次いでイブルチニブ（2.9 mg/kg）及び spebrutinib（20 mg/kg）であることが示された。

これらの所見から、マウスにおけるアカラブルチニブの *in vivo* BTK 阻害作用は、他の 2 化合物と同等以上であることが示された。このように、細胞を用いた試験と *in vivo* 試験で同様の効力がみられ、細胞を用いた試験の結果の妥当性が確認された（表 10）。

図 5　　用量反応関係：BCR 刺激による CD69 のアップレギュレーションに対する阻害




| | ACALA | IBT | SPE |
|---|---|---|---|
| $ED_{50}$ (mg/kg) | 1.3 | 2.9 | 20 |

Acala=acalabrutinib; α-IgM=anti immunoglobulin type M; BCR=B-cell receptor; ED50=effective dose level causing half maximal effect; IBT=ibrutinib; SPE=spebrutinib, SE=standard error.
Note: The focus of this study was to obtain a more precise potency determination for acalabrutinib, ibrutinib and spebrutinib by using 5 mice per group. Expression of CD69: BCR stimulation (α-IgM) of splenocytes harvested from mice treated with a single administration of acalabrutinib, ibrutinib, or spebrutinib by oral gavage at doses up to 30 mg/kg. Data are expressed as % of control median fluorescence intensity. The error bar indicates SE.
Source: Report R20[redacted]004A.

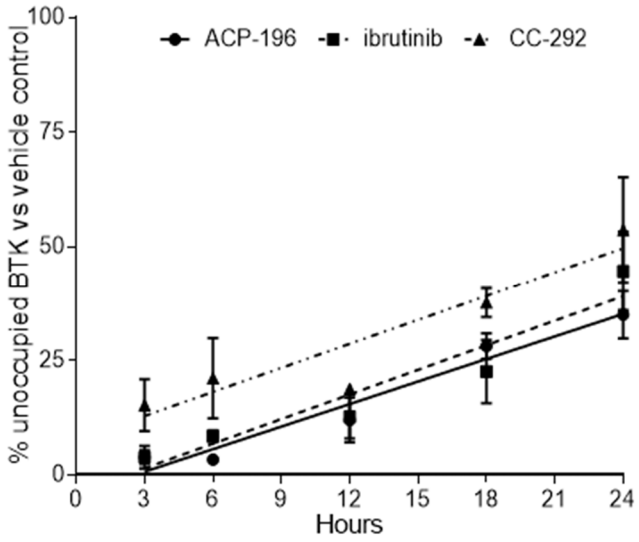
## 2.6.2.2.3.2　マウスにおける単回投与後の BTK 占有率及び BCR シグナル伝達機能の回復

（試験 R20[redacted]005A 参照）

試験 R20[redacted]005A で、脾細胞を用いてアカラブルチニブを高用量で単回経口投与後の BTK 占有率及び *in vivo* における BTK 阻害作用の持続性を評価した。アカラブルチニブ及びイブルチニブは、投与 3 時間後に BTK をほぼ完全に占有し（図 6）、B 細胞において抗 IgM で誘導した CD69 発現を完全に阻害した（図 7）。これらの結果は図 5 に示す CD69 発現データと一致するものである。一方、spebrutinib 25 mg/kg を投与したマウスでは、BTK の占有は不完全であり（非結合 BTK の割合は溶媒対照の約 15%）、B 細胞における CD69 発現の阻害率も低かった（残存活性は溶媒対照の約 25%）。これは、*in vivo* 効力モデルにおける spebrutinib の $ED_{50}$ 値が 20 mg/kg と高かったことと一致する（図 5）。

共有結合型 BTK 阻害薬アカラブルチニブ又はイブルチニブを投与したマウスでは、投与 24 時間後も BTK 占有及び B 細胞活性化阻害が持続していた。動物における投与 24 時間後の BTK 非占有率は約 35%、B 細胞活性は対照動物と比較して約 40%であった。一方、spebrutinib（CC-292）では、同じ時点の BTK 非占有率は約 55%、脾細胞における B 細胞活性（抗 IgM で誘導した CD86 及び CD69 発現）は 75%であった。

**図 6　　アカラブルチニブ 25 mg 単回投与後のマウス脾細胞における BTK 標的占有率の推移**

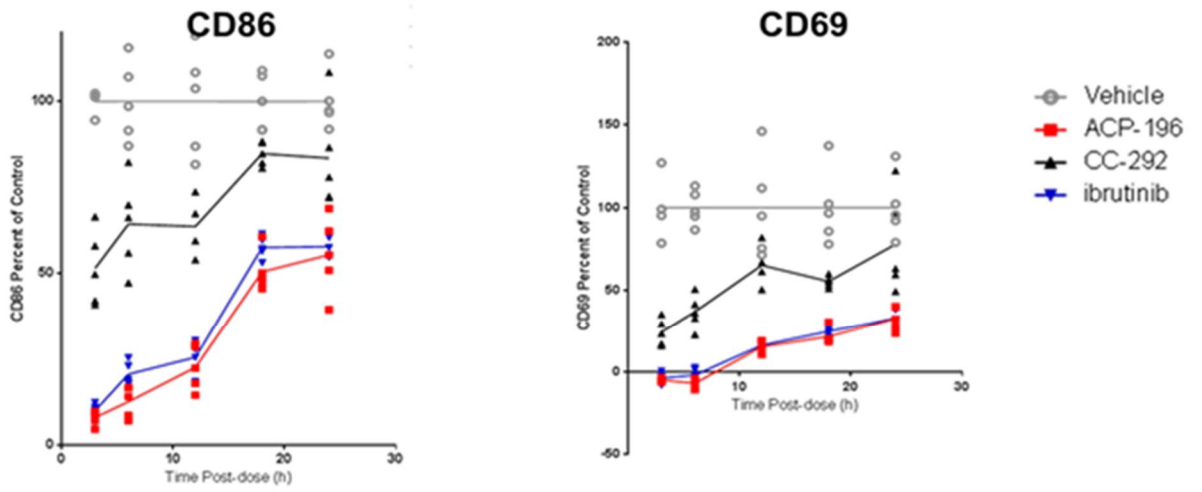



BTK=Bruton tyrosine kinase; CC-292=spebrutinib, SD=Standard deviation.

Note: Mice (5 per group) received a single, oral, 25 mg/kg dose of acalabrutinib, ibrutinib, spebrutinib, or vehicle.　Spleens were extracted at 3, 6, 12, 18, or 24 hours postdose and BTK occupancy was determined by an ELISA-based method (Module 5.3.1.4.5).　Unoccupied BTK (% free BTK versus vehicle control) was calculated at various time points after dosing. The error bar indicates SD.

Source: R20[redacted]005A.

図 7　　BTK 阻害薬を投与したマウスから採取した脾細胞（B 細胞）における BCR 刺激による CD86 及び CD69 アップレギュレーションに対する阻害動態




**Mean CD86 % of Inhibition**

| | 3 hr | 6 hr | 12 hr | 18 hr | 24 hr |
|---|---|---|---|---|---|
| ACP-196 | 92.1 | 87.4 | 77.5 | 49.4 | 44.5 |
| CC-292 | 48.5 | 35.6 | 36.3 | 15.1 | 16.4 |
| Ibrutinib | 90.1 | 79.4 | 74.5 | 42.4 | 42.1 |

**Mean CD69 % of Inhibition**

| | 3 hr | 6 hr | 12 hr | 18 hr | 24 hr |
|---|---|---|---|---|---|
| ACP-196 | 104.9 | 106.9 | 84.7 | 78.4 | 67.3 |
| CC-292 | 75.6 | 63.2 | 34.8 | 44.7 | 22.1 |
| Ibrutinib | 103.7 | 101.9 | 83.7 | 75.3 | 67.0 |

BTK=Bruton tyrosine kinase; CC-292=spebrutinib.

Note: Mice received a single, oral, 25 mg/kg dose of acalabrutinib, ibrutinib, or spebrutinib or vehicle.　Spleens were extracted at 3, 6, 12, 18, or 24 h postdose and BCR-stimulated up-regulation of CD69 in B cells was measured by flow cytometry. Data were normalized as a percent of control (POC), with the control (100%) being the average of BCR-stimulated splenocytes of the mice in the vehicle control (n=5) for each time point. Lines represent the average of five mice in each group, with individual data plotted for each mouse. Tables transform the data to percent inhibition (100%-POC%= % Inhibition) for the average of 5 mice in each group.Data are expressed as percentage of the BCR-stimulated up-regulation observed in splenoctyes from vehicle-treated control mice.

Source: Report R20[redacted]005A.

## 2.6.2.2.3.3　ヒト CLL 異種移植マウスモデル

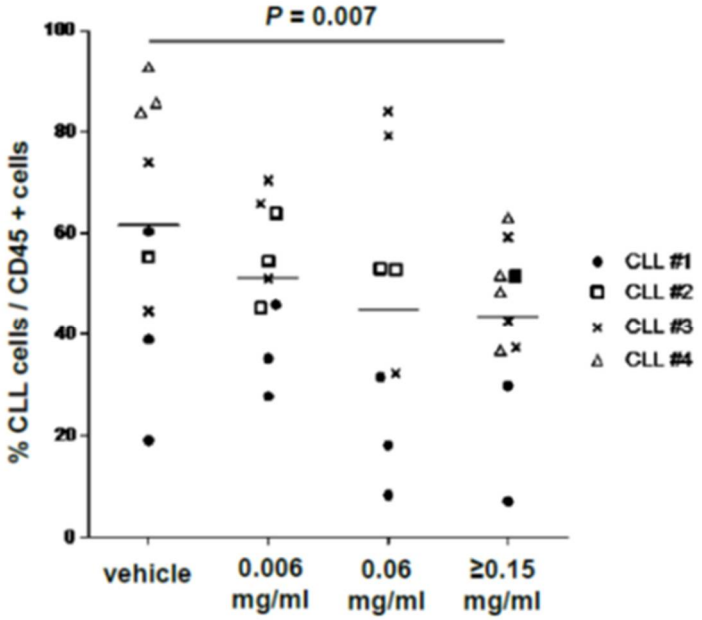
（試験 ACE-NC-002 参照）

試験 ACE-NC-002 では、CLL 患者から採取した初代 PBMC を非肥満糖尿病、重症複合免疫不全症、γcnull（NSG）マウスに移植して作製したヒト初代 CLL 異種移植モデルを用いて評価した。尾静脈内投与後、CLL 細胞は、主に CLL 細胞と微小環境との相互作用がヒトのリンパ節と類似することが示されているマウスの脾臓にコロニーを形成した。このモデルを用いて、ヒト CLL 細胞に対するイブルチニブの作用を評価した（Herman et al 2013）。

用量設定試験において、*in vivo* における腫瘍増殖の指標として、CLL の脾臓へのコロニー形成に対するアカラブルチニブの作用を評価した。アカラブルチニブ 0.006 mg/mL、0.06 mg/mL 及び 0.15 mg/mL（コホート 5 のみ）又は 0.3 mg/mL を飲料水に混ぜ、マウスに 3 週間投与した。平均的な水摂取量及び動物の体重を考慮すると、高用量でのアカラブルチニブの摂取量は約 50 mg/kg/日となると推定される。3 週間後に脾細胞を採取し評価したところ、腫瘍量及び細胞増殖が明確

に減少していた（図 8 及び図 9）。脾臓の腫瘍量を脾臓重量及びフローサイトメトリーによるヒト CLL 細胞の計数で確認したところ、用量に依存して減少していた（図 8）。

図 8　　脾臓における CLL 細胞の割合 － 溶媒 vs アカラブルチニブ



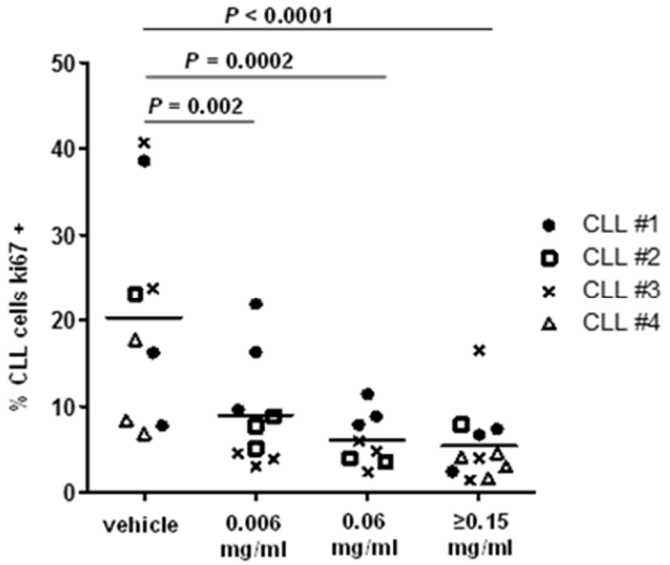

CLL=chronic lymphocytic leukemic; NSG= non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency (NOD SCID)/γcnull.

Note: Assessment the number of CLL cells in the spleen as a fraction of the viable, the number of CLL cells in the spleen as a fraction of the viable, human xenografted (CD45+) cells that were isolated from the spleens of mice treated at the different dose levels. NSG mice were engrafted with primary CLL cells and treated with acalabrutinib in drinking water at the indicated concentrations.　At the end of 3 weeks, spleen-resident human CD5+/CD19+ cells were evaluated by flow cytometry, as the fraction of total human CD45+ cells. The bar indicates Mean. Statistical significance was evaluated using t-test.

Source: Report ACE-NC-002.

アカラブルチニブは、用量依存的に CLL 細胞の増殖を抑制し、用量間で抑制作用に明確な差がみられた（図 9）。増殖抗原 Ki-67（Ki67）発現減少の平均値は、0.006 mg/mL 群、0.06 mg/mL 群及び高用量群統合群（ 0.15 mg/mL 以上）でそれぞれ 58%、70%及び 73%であった。

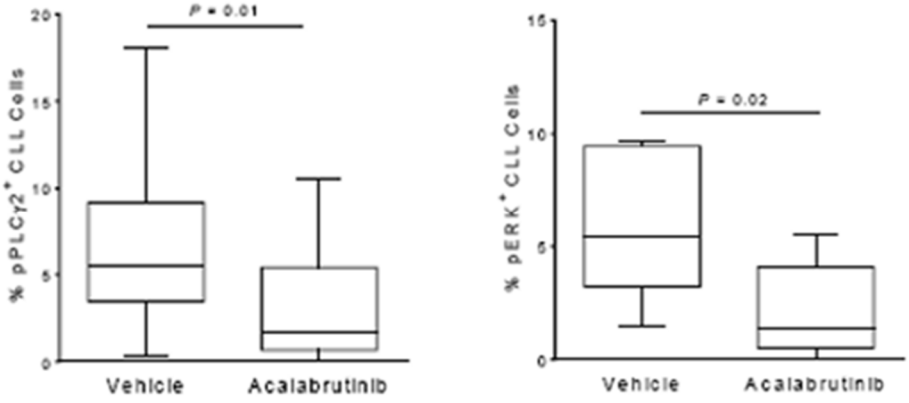
図 9　　患者由来異種移植マウスモデルにおける CLL 細胞の増殖率に対するアカラブルチニブの阻害作用




CLL=chronic lymphocytic leukemic; Ki67=proliferation antigen Ki-67.
Note: Assessment of the effect of ACP-196 on CLL cell proliferation. Proliferating spleen-resident CLL cells were harvested from mice and evaluated for Ki67 staining by flow cytometry at the end of the dosing period (3 weeks). The bar indicates Mean. Statistical significance was evaluated using Student unpaired T-test..
Source: Study ACE-NC-002.

CLL 細胞に対するアカラブルチニブの増殖抑制作用は、on-target 効果である BCR シグナル伝達の阻害と直接関連していた（図 10）。

図 10　　患者由来異種移植マウスモデルにおける CLL 細胞に対するアカラブルチニブの on-target 効果－ pPLCγ2 及び pERK



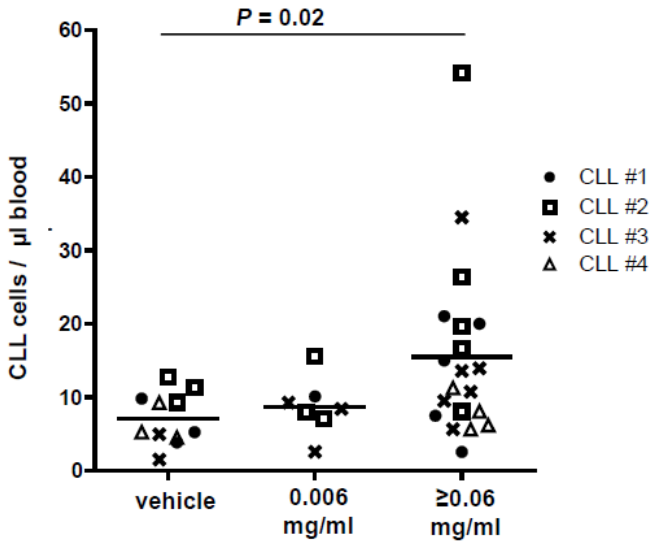

BCR=B-cell receptor; CLL=chronic lymphocytic leukemia; NSG= non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency (NOD SCID)/γcnull; pERK=phospho-extracellular signal regulated kinase; pPLCγ2=phosphor phosphoinositide phospholipase C gamma 2.

Note: Phospho (p)-PLCγ2 and pERK analysis of human CLL cells from NSG mice, showing basal phosphorylation of downstream mediators of BCR signaling, after 14 days of treatment in ACE-NC-002. (N=6) Results shown are median ± interquartile range.

Source: Herman et al 2016.

リンパ球増加症は、BCR シグナル阻害薬に対する生物学的反応として報告されており、B 細胞性悪性腫瘍患者に BTK 阻害薬を投与した後に認められている（Advani et al 2013、Byrd et al 2014、Byrd et al 2016）。マウス CLL 異種移植モデルにアカラブルチニブを投与した 14 日後に、末梢血中 CLL 細胞数の一時的な増加が認められた。これは BTK が媒介するリンパ球増加症と一致する作用である（図 11）。

図 11　　患者由来異種移植モデルにおける CLL 細胞の絶対数




CLL=chronic lymphocytic leukemia.
Note: Assessement of an increase in absolute CLL cell counts from peripheral blood occurred during ACP-196 treatment. Quantitative flow cytometry showing number of human CLL cells in peripheral blood of NSG mice in ACE-NC-002, after 14 days of acalabrutinib treatment. The bar indicates Mean.
Source: Study ACE-NC-002.

## 2.6.2.2.3.4　ヒト DLBCL 及び MCL 異種移植マウスモデルを用いたアカラブルチニブ及びイブルチニブの有効性評価

（AZ Pharmacology Report 02 参照）

再発又は難治性 MCL 患者において、イブルチニブの単独療法としての有意な有効性が示されている。現在、MCL の一次療法として、イブルチニブを含む併用療法についても評価が行われている（Wang et al 2013、Wang et al 2018、Tucker and Rule 2015）。近年、イブルチニブが活性化 B 細胞型（ABC 型）DLBCL（分子的に定義された NFκB 活性が高い DLBCL サブセット）に対し有意な臨床活性を示したと報告された（Wilson et al 2015）。そのため、ヒト MCL 及び DLBCL を異種移植したマウスモデルを用いてアカラブルチニブの *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。

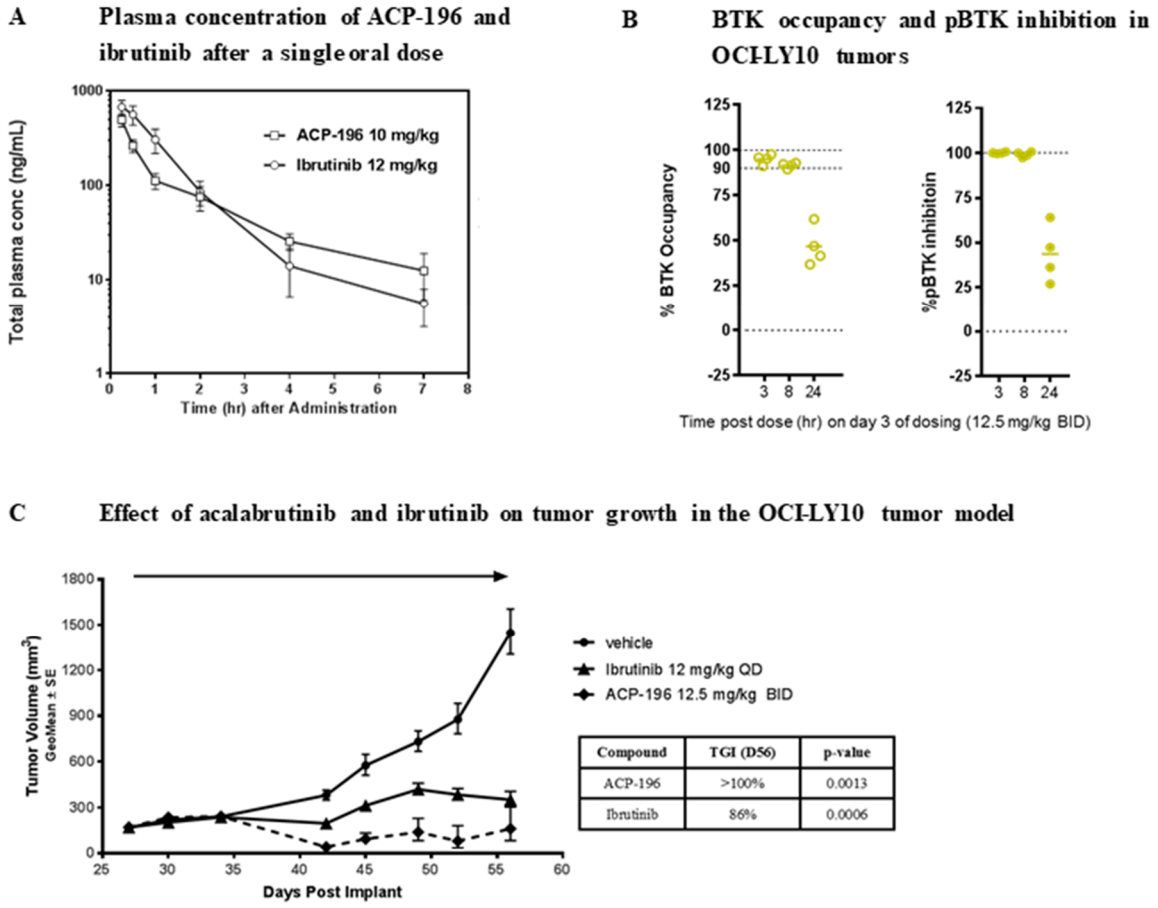
雌 CB.17 SCID マウスに OCI-Ly10 ヒト DLBCL 又は Jeko-1 ヒト MCL 細胞（$5\times10^6$/マウス）を皮下移植した。本試験は臨床的に関連のある曝露量が得られるレジメンで比較を行うようデザインされていたため、各製剤の予定臨床用量を使用した。すなわち、アカラブルチニブは 12.5 mg/kg 1 日 2 回、イブルチニブは 12 mg/kg 1 日 1 回で投与した。各製剤の急性経口投与後の総血漿中濃度を図 12 の A に示す。

24 時間投与サイクル中のアカラブルチニブの BTK 占有率を評価するため、投与 3 日目の朝の投与 3 時間後及び 8 時間後、4 日目の投与直前の 24 時間後に腫瘍の評価を実施した。午後の投与は朝の投与の 8 時間後に実施したため、翌日の朝の投与までに 16 時間の間隔があった。十分な標的占有（90%超と定義）が得られ、8 時間維持された後、2 回目の投与を実施した。トラフ時点（投与日内の 2 回目の投与の 16 時間後）の BTK 占有率を測定したところ、約 50%に低下しており、投与間隔を通して十分な標的占有率を維持するには投与スケジュールのさらなる最適化が必

要であると考えられた（図 12 の B）。同じ腫瘍サンプルで測定した pBTK 阻害率は、BTK 標的占有率と同様の推移を示した。ピーク時の pBTK の阻害は 100%に達し、投与後 8 時間にわたって維持され、その後投与日内の 1 回目投与の 24 時間後（2 回目投与の 16 時間後）には約 50%まで低下した（図 12 の B）。動物におけるイブルチニブ 12 mg/kg 1 日 1 回投与後の血漿中濃度及び BTK 阻害率は、患者における血漿中濃度及び BTK 占有率と同程度であることが報告されている（Advani et al 2013）。

OCI-Ly10 腫瘍を皮下移植したマウスにアカラブルチニブ又はイブルチニブを 4 週間投与したときの有効性を評価したところ、単剤で有意な活性が示され、腫瘍増殖抑制率（TGI）はそれぞれ 100%超及び 86%であった（図 12 の C）。

図 12　　OCI-Ly10 DLBCL 移植マウスモデルにおける腫瘍増殖に対するアカラブルチニブ及びイブルチニブの作用




| Compound | TGI (D56) | p-value |
|---|---|---|
| ACP-196 | >100% | 0.0013 |
| Ibrutinib | 86% | 0.0006 |

BID=twice daily; hr=hour; D=day; DLBCL=diffuse large B-cell lymphoma; QD=once daily; SE=standard error; TGI=tumor growth inhibition.

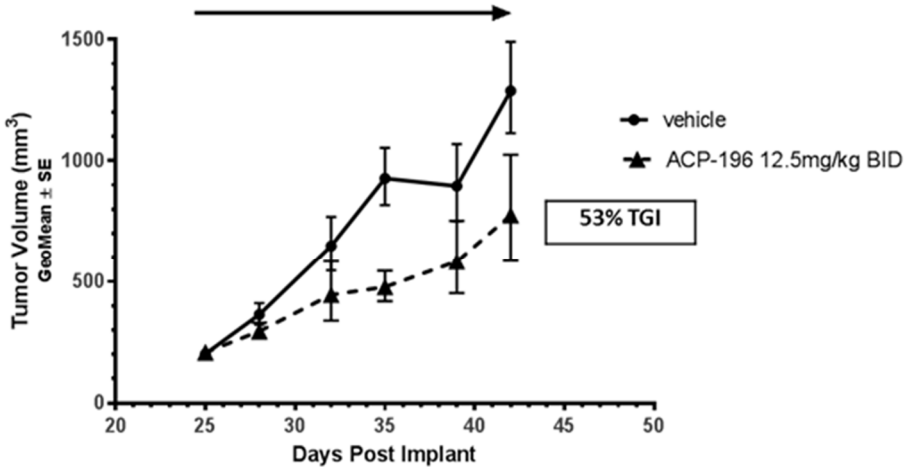
Note: (A) Total acalabrutinib plasma concentration ± SD; N=3 female CB-17 SCID mice per time point.　Drug levels were below detectable levels at the 24 h time point.　(B) BTK occupancy and pBTK was measured in OCI LY10 tumors (4 per group) following 3 days of dosing at 12.5 mg/kg BID (second dose was administered 8 hours following first dose).　BTK occupancy was determined by an ELISA-based method; pBTK (Y223) was quantified from Western Blots where 0% inhibition was the median of vehicle treated tumors at 3 hours, and 100% inhibition was 0 signal for pBTK (Y223).　(C) Mice were randomized into groups of 10 based on established tumor volumes of 150 to 200 mm3 and treated with vehicle, acalabrutinib (12.5 mg/kg BID) or ibrutinib (12 mg/kg QD) for 4 weeks.　Treatment period is indicated by arrow.　Tumor growth is shown as geometric mean ± SE.　Data were log transformed to remove any size dependency before statistical evaluation. Statistical significance was evaluated using a one-tailed, 2 sample Student t-test.

Source: AZ Pharmacology Report 02.

Jeko-1 マントル細胞異種移植モデルにおいても、アカラブルチニブの腫瘍増殖に対する作用を評価した（図 13）。腫瘍が約 150～200 $mm^3$ となった時点で 12.5 mg/kg 1 日 2 回の経口投与を開始した。悪性度の高いモデルでは定着腫瘍の増殖速度が速いため投与期間は 17 日と短かった。

アカラブルチニブは本モデルで有効性を示し、最終投与日の TGI は 53%であった。経口投与 8 日目の血漿中アカラブルチニブの薬物動態を評価したところ（図 14）、想定通りの曝露量がみられた。

図 13　　Jeko-1 MCL モデルにおける腫瘍増殖に対するアカラブルチニブの作用

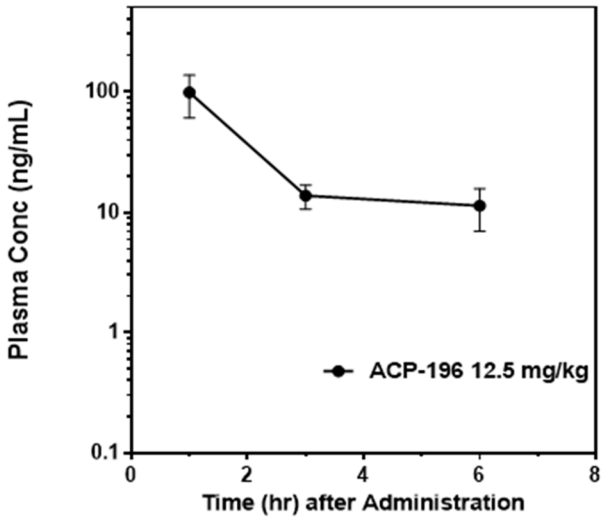



BID=twice daily; MCL=mantle cell lymphoma; SE=standard error; TGI=tumor growth inhibition.

Note: Mice were randomized based on tumor volumes using stratified sampling and enrolled into control and treatment groups. The mice were randomized into groups of 10, based on tumor volume and treated with either vehicle, ACP-196.Dosing began when mean tumor size reached approximately 150 to 200 mm3.　Tumor growth is shown as geometric mean ± SE.　Treatment period is indicated by arrow.

Source: AZ Pharmacology Report 02.

図 14　　Jeko-1 腫瘍移植マウスにアカラブルチニブを 8 日間投与した後の血漿中アカラブルチニブ濃度




Conc=concentration; SD=standard deviation.
Note: Total plasma concentration ± SD; N=3 animals per time point.　Micro samples (20 µl) were obtained from tail vein bleeds at 30, 180, and 360 minutes postdose.
Source: AZ Pharmacology Report 02.

## 2.6.2.2.3.5　　血栓形成に対するアカラブルチニブ及びイブルチニブの作用

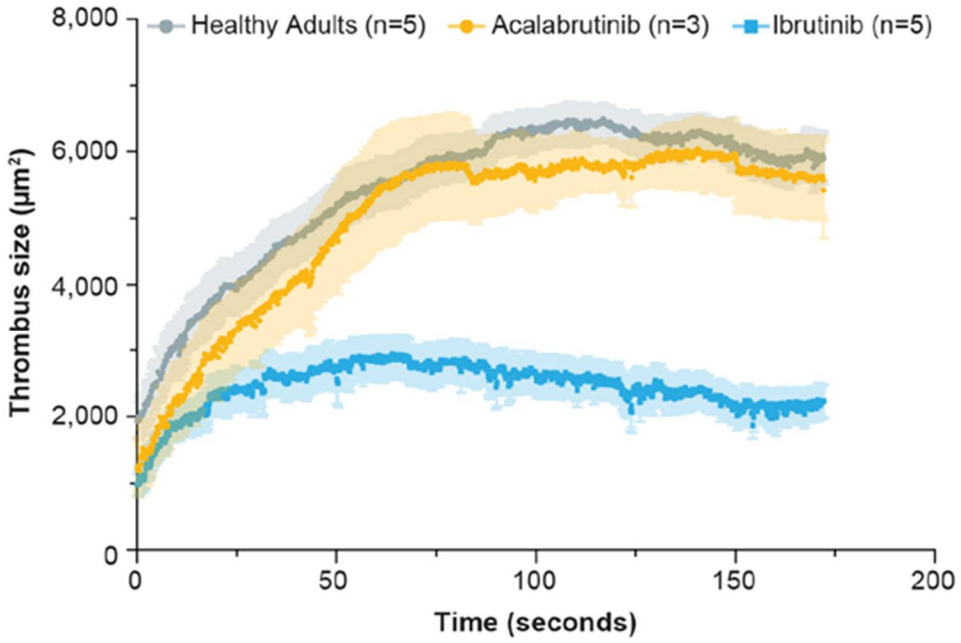
（Byrd et al 2016 及び試験 R20[redacted]005 参照）

血小板は、BTK 及び TEC の両方を発現する造血器系由来の細胞である。これらのキナーゼは、血小板コラーゲン受容体 GPVI 及び C 型レクチン様受容体 2 を含む幾つかの血小板膜貫通型受容体の下流シグナル伝達に関わっている（Quek et al 1998、Manne et al 2015）。GPVI は、コラーゲン及びコラーゲン関連ペプチドへの曝露で誘導される血小板活性化において重要な役割を果たしている。BTK が不活化されている環境では TEC シグナル伝達が血小板凝集を制御する（Atkinson et al 2003）。生化学試験で、アカラブルチニブ及びイブルチニブが TEC を阻害することが示されたため（イブルチニブはアカラブルチニブよりも強い効力を示す［表 5 参照］）、*in vitro* 及び *ex vivo*/*in vivo* 血小板機能試験を実施し、血栓形成に対する作用を検討した。

フォン・ヴィレブランド因子（VWF）$^{HA1}$ マウスモデルを用いて、健康被験者（5 例）、イブルチニブ 420 mg を 1 日 1 回投与した CLL 患者（5 例）又はアカラブルチニブ 100 mg を 1 日 2 回投与した CLL 患者（3 例）の血液から分離した血小板の *in vivo* における機能を評価した（Chen et al 2008）。病院で患者にアカラブルチニブ又はイブルチニブを投与し、定常状態に達した 1 時間後にサンプルを採取した。調製した血小板を $VWF^{HA1}$ マウスに継続注入し、レーザー照射により血管損傷を誘導した後、2 チャンネル型生体内共焦点顕微鏡を用いて血栓の形成をリアルタイムにモニタリングした（Furie and Furie 2005）。アカラブルチニブ投与例から採取した血小板による血栓サイズは対照健康被験者と同程度であったが、イブルチニブ投与例では血栓形成が阻害

された（図 15）（Byrd et al 2016）。これらのデータから、アカラブルチニブはイブルチニブよりも選択性が高いため、血小板活性の機能阻害作用が弱いことが示唆された。

図 15　　*Ex Vivo / In Vivo* 血栓形成試験




BID=twice daily; QD=once daily; VWF=von Willebrand factor.
Note: Platelets from patients treated with ibrutinib 420 mg QD (n=5) or acalabrutinib 100 mg BID (n=3) were evaluated for their ability to support thrombus formation in laser injured arterioles of VWFHA1 mice.　Freshly isolated platelets from healthy volunteers (n=5) were used as non-drug treated controls.　A minimum of 4 arterioles per mouse was used to assess thrombus formation for each patient/volunteer sample.　The size of resulting thrombi is shown, as a function of time (shading denotes standard error of the median).
Source: Byrd et al 2016; additional detail can be found in R20[redacted]005.

## 2.6.2.2.3.6　ラットのアジュバント誘発関節炎モデルにおけるアカラブルチニブの薬理活性

（試験 RAIA-LA-ACP-1 参照）

ラットでは、確立された B 細胞性悪性腫瘍モデルは一般的ではないため、ラットにおけるアカラブルチニブの薬理活性の確認には炎症モデルを使用した。造血器系由来の細胞のうち、骨吸収を司る破骨細胞は BTK 及び TEC の両キナーゼを発現する。破骨細胞は正常な骨恒常性及び骨粗鬆症や関節リウマチ等の骨障害において重要な役割を担っている。BTK 阻害薬は、関節炎を誘導した薬理学的モデルにおいて破骨細胞の分化及び機能を阻害し、破骨細胞による骨吸収を抑制することが示されている（Shinohara et al 2014）。

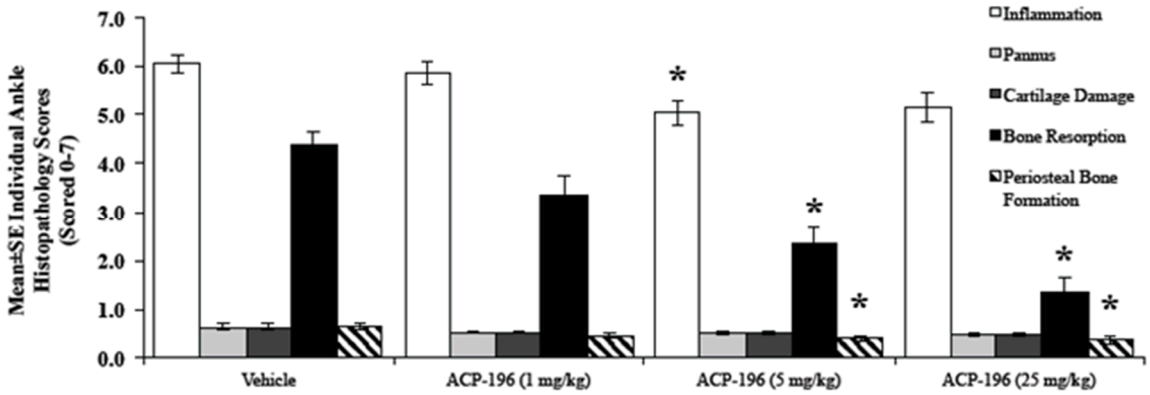
本試験では、ラットのアジュバント誘発関節炎（AIA）モデルを用いて、アカラブルチニブの作用を評価した。関節炎誘導後 6 日目から、アカラブルチニブを 1、5 及び 25 mg/kg の用量で 1 日 1 回強制経口投与した。投与は 8 日間継続し、14 日目の最終投与 3 時間後にラットを安楽死さ

せた。足関節の病理組織学を評価し、主要パラメータについて疾患の重症度をスコア化することでアカラブルチニブの有効性を評価した。

14 日目の最終投与 3 時間後に採取した脾細胞を用いて BTK 占有率の薬力学的評価も実施した。ラットにアカラブルチニブを経口投与したときの薬物動態に基づき、この時点で BTK 占有率は最大に達すると予測された（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）。BTK 占有率は、1 mg/kg 投与ラットで 96%、5 mg/kg 及び 25 mg/kg 投与ラットで 99%以上であったことから、反復投与により高い標的占有が得られることが示された（試験 R2017007 参照）。

溶媒を投与した足関節の病理組織学的評価を 14 日目に実施したところ、本多発性関節炎モデル特有の関節の病理学的特性（重度の滑膜炎及び骨吸収等）が認められたが、他の評価パラメータ（パンヌス、軟骨障害、骨膜骨形成）の重症度は軽微であった。アカラブルチニブの投与は、足関節の炎症に対し中程度の軽減作用を示したが、有効性は 5 mg/kg で最大となり（阻害率 17%）、3 用量間で用量反応関係はみられなかった。

**図 16　　AIA ラットの足関節における個々の病理組織学的スコア**




AIA=adjuvant induced arthritis; SE=standard error.

Note: Inflammation was induced by injection of complete Freund's adjuvant containing 6 mg lipoidal amine into male Lewis rats (n=10/group). Animals were dosed from Day 6 to 14. Joint histopathology was assessed after terminal sacrifice on Day 14.

*p<0.05 Kruskal-Wallis test versus Vehicle Controls.

Source: Report RAIA-LA-ACP-1.

一方、アカラブルチニブは足関節の骨吸収を用量依存的に有意に減少させ、阻害率は 1 mg/kg で 24%から 25 mg/kg で 69%の範囲であった（図 16、表 15）。これらの結果は、ラット AIA モデルで、アジュバント接種により滑膜炎症が誘発され、次いで関節内の破骨細胞数及び活性の増加により骨侵食に至る所見と合致する（Schett et al 2005）。本試験では、アカラブルチニブは骨吸収を阻害した。この作用は、BTK 依存性の破骨細胞分化の阻害によるものと考えられ、また、高用量では TEC の阻害が関与している可能性がある。

表 15　　足関節骨吸収の病理組織学的評価

| Treatment | Dose | Bone Resorption Mean (SE) | % Inhibition (to vehicle) |
|---|---|---|---|
| Vehicle Control | PO QD | 4.40 (0.23) | 0% |
| ACP-196 | 1 mg/kg PO QD | 3.35 (0.41) | 24% |
| ACP-196 | 5 mg/kg PO QD | 2.35 (0.33)* | 47% |
| ACP-196 | 25 mg/kg PO QD | 1.35 (0.30)* | 69% |

AIA=adjuvant induced arthritis; PO=oral; QD=once daily; SE=standard error.

**Note**: Assessment of key histology features was conducted after sacrifice on Day 14. Scoring was on a scale of 0-5 (0=normal, 5=severe). N = 4 for vehicle control, N=10 for dose groups *p<0.05 ANOVA or Kruskal-Wallis test versus Vehicle.

**Source**: Report RAIA-LA-ACP-1.

## 2.6.2.2.3.7　コンパニオンドッグ自然発症 B 細胞リンパ腫モデルにおけるアカラブルチニブの評価

（試験 R2015001 及び Harrington et al 2016 参照）

本試験（Harrington et al 2016）では、コンパニオンドッグの自然発症リンパ腫モデルを用いてアカラブルチニブの評価を実施した。20 匹のイヌを用量漸増コホートに割り当て、アカラブルチニブカプセルを 2.5 mg/kg、5.0 mg/kg 及び 20 mg/kg の用量で 1 日 1 回、又は 10 mg/kg 及び 15 mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与した。腫瘍進行のモニタリングを最初の 4 週間は週 1 回、その後は 2 週間に 1 回実施した。14 日目に各コホート 2 匹を用いて薬物動態解析を実施した。1 日目及び 7 日目の PBMC 及びリンパ節の穿刺吸引細胞診（FNA）検体を用いて BTK 占有を評価し、全用量コホートの標的結合の程度を評価した。

14 日目のアカラブルチニブの曝露量は、評価したイヌ 7 匹（各用量群 1～2 匹）の間で大きくばらついていた。曝露量は投与量に比例しなかった。イヌの例数が少なかったため、曝露量の個体間変動の評価はできなかった。$t_{max}$ にも個体間でばらつきがみられ、投与後 3～8 時間の間であった。投与量で補正した $AUC_{(0\text{-}12)}$ は 278～1560 hr•ng/mL の間であり、投与量で補正した $C_{max}$ は 76～324 ng/mL の間であった。

投与 3 時間後に、すべてのコホートで末梢 B 細胞における十分な BTK 占有（BTK 占有率 90%と定義）が認められた。7 日目のトラフ時（投与前）においても、末梢 B 細胞において高い BTK 占有率（90%超）が維持されており、標的阻害が定常状態であることが示された（表 16）。また、投与 3 時間後に腫瘍を有するリンパ節で高い BTK 占有率が認められており（表 17）、腫瘍組織に速やかに分布することが示された。トラフ時の BTK 占有率は穿刺吸引細胞診検体でわずかに低下したが、評価した全コホートで 80%を超えていた。

表 16　末梢 B 細胞における 1 日目の投与 3 時間後及び 7 日目の投与前のアカラブルチニブの薬力学的作用

| Peripheral B Cells | BTK Occupied by Drug (% versus predose) | |
|---|---|---|
| Treatment | Day 1, 3 Hours Postdose | Day 7, Predose |
| 2.5 mg/kg QD | 92.9 (n=6) | 90.4 (n=5) |
| 10 mg/kg BID | 99.4 (n=2) | 91.9 (n=2) |
| 15 mg/kg BID | 97.0 (n=4) | 95.8 (n=2) |
| 20 mg/kg QD | 91.4 (n=3) | 93.0 (n=2) |

BID=twice daily; BTK=Bruton tyrosine kinase; QD=once daily.

**Note**: Overview percent BTK target occupancy (TO) in peripheral B-cells at 3 hr and 7 day predose for the 2.5 and 20 mg/kg QD cohorts (24 hr after last dose) and the 10 and 15 mg/kg BID cohorts(12 hr after last dose). Data were the average of BTK occupancy in each cohort. The 5mg/kg QD cohort was excluded from analysis due to poor sample quality.

**Source**: Report 2015001.

表 17　リンパ節の穿刺吸引細胞診検体における投与 3 時間後及び 7 日目の投与前のアカラブルチニブの薬力学的作用

| Fine-Needle Aspirates | BTK Occupied by Drug (% versus predose) | |
|---|---|---|
| Treatment | 3 hours | 7 days |
| 10 mg/kg BID | 99.5 (n=2) | 82.2 (n=2) |
| 15 mg/kg BID | 95.2 (n=3) | 83.6 (n=1) |
| 20 mg/kg QD | 98.1 (n=3) | 84.7 (n=2) |

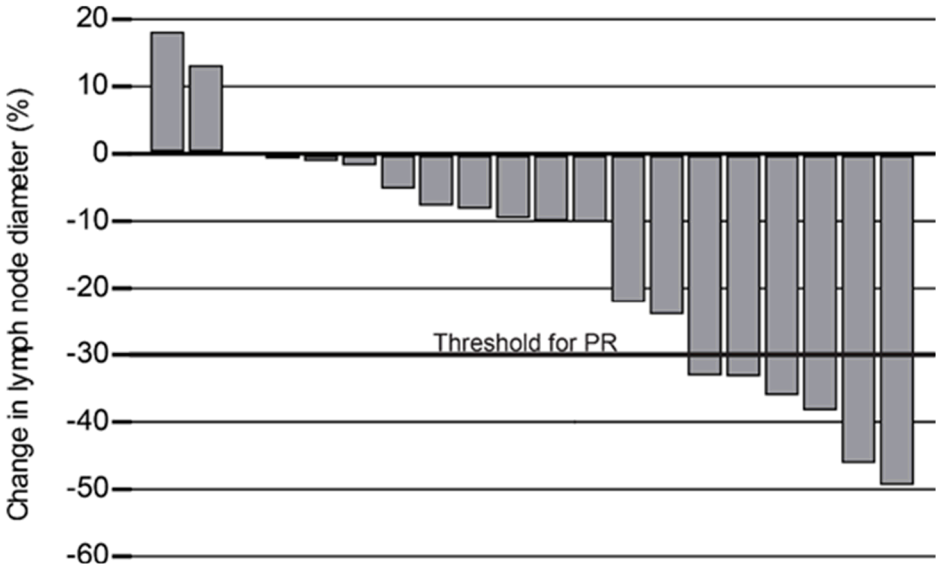
BID=twice daily; BTK=bruton tyrosine kinase; QD=once daily.

**Note**: Overview percent BTK target occupancy (TO) in FNAs (fine needle aspirates) of Lymph Nodes at 3 hr and 7 day for the 20 mg/kg QD cohort (24 hr after last dose) and the 10 and 15 mg/kg BID cohorts (12 hr after last dose). Data were the average of BTK occupancy in each cohort. Biopsies were not obtained from the 2.5 mg/kg QD cohort. The 5mg/kg QD cohort was excluded from analysis due to poor sample quality.

**Source**: Report 2015001.

アカラブルチニブの忍容性は概ね良好で、主な有害作用は、グレード 1 又は 2 の摂食障害、体重減少、嘔吐、下痢及び嗜眠であった。全奏効率は 25%（5/20 例）で無増悪生存期間の中央値は 22.5 日であった。30%（6/20 例）のイヌで臨床的ベネフィットが認められた（図 17）。

図 17　　イヌにアカラブルチニブを投与したときの標的病変サイズの縮小




PR=partial response.
Note: Waterfall plot showing percentage decrease (best response) in mean sum of longest diameter of index lymph nodes as compared to baseline measurements.
Source: Harrington et al 2016.

本試験から、ヒト ABC DLBCL と類似する高悪性度 B 細胞リンパ腫の自然発症非げっ歯類モデルにおけるアカラブルチニブ単独投与の生物学的活性が示された（Harrington et al 2016）。さらに、本試験では、末梢血 B 細胞及び投与前及び投与後のリンパ節穿刺吸引細胞診検体を用いて、投与間隔時の BTK 占有率評価について概念実証を行った。なお、アカラブルチニブ初回投与の 3 時間後に、血液及びリンパ節において十分な BTK 占有率が認められ、生物学的に関連のある標的への組織移行性が示された。また、トラフ濃度でも BTK 占有率は高く、BTK 標的占有が定常状態であることが示された。

## 2.6.2.3　副次的薬理試験

アカラブルチニブ及び ACP-5862 の副次的薬理作用を評価するため、80 種の受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含む多様な標的分子の放射性リガンド結合試験を実施した。標的外相互作用を特定するため、10 μM のアカラブルチニブ又は ACP-5862 を用いてスクリーニングを実施した。特異的リガンド結合を 50%以上阻害する相互作用をその化合物の重要な作用とみなし、用量反応関係によるスクリーニングを実施して $K_i$ 値及び $IC_{50}$ 値を求めた。また、特異的リガンド結合の阻害率が 25～50%であった一部の標的分子についても、用量反応関係の評価の対象とした（試験 840290, 840327、試験 100032432 及び試験 100033052 参照）。

### 2.6.2.3.1　アカラブルチニブの *in vitro* 薬理試験

（試験 840290［参考資料］及び試験 840327［参考資料］参照）

80 種類中 79 種類の標的分子で、50%以上のアカラブルチニブ活性は認められなかった。相互作用（特異的リガンド結合の阻害が 42.9%）は A3 でのみ検出され、$K_i$ 値は 2.7 μM であった。また、アデノシン A2A 受容体（A2A、阻害率 35.1%、$K_i$=17 μM）、及び 10 μM のスクリーニングでアカラブルチニブによる阻害が認められなかったイブルチニブ関連の他の 4 種の標的分子についても、アカラブルチニブの活性を評価した。A3 又は A2A 受容体との相互作用については、患者における非結合形 $C_{max}$（0.060 μM）がアカラブルチニブの $K_i$ 値を大きく下回ることから生理学的に関連した作用が生じる可能性は低いと考えられる。

## 2.6.2.3.2 アカラブルチニブ及び ACP-5862 の *in vitro* 薬理試験

（試験 100032432 及び試験 100033052 参照）

80 種類の受容体結合試験で、アカラブルチニブ及びその主代謝物 ACP-5862 の薬理学的結合特性を 10 μM の濃度で評価した。その結果からアカラブルチニブの方がやや高い親和性（$K_i$ = 0.91 μM）で A3 に結合することが確認された。この差は放射性リガンド結合試験における許容可能な変動の範囲内に収まっていた。患者への予定治療量におけるアカラブルチニブの非結合形 $C_{max}$ は、A3 に対する $K_i$ 値の 1/15 であった。このことから、患者において、生理学的に重要な A3 受容体との相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

ACP-5862 の薬理学的相互作用はアカラブルチニブの薬理学的相互作用と同様であった。80 種類中 77 種類の受容体で相互作用が認められなかった。10 μM のスクリーニングにおいて、A2A、A3 及びニューロキニン 2（NK2）の特異的リガンド結合の阻害率が 50%以上であった。ACP-5862 の $K_i$ 値は A2A で 12μM, A3 で 4.8μM,、 NK2 で 5.8μM であった。ヒトにアカラブルチニブ 100 mg を経口投与したときの ACP-5862 の曝露量と比較すると、A3 に対する阻害の $K_i$ 値は ACP-5862 の非結合形 $C_{max}$ 推定値よりも 267 倍高かった。

特定されたすべての標的外受容体阻害の $K_i$ 値は、ヒトで認められるアカラブルチニブ及び ACP-5862 の最高濃度よりも大幅に高かった。この結果から、予定する臨床用量・用法でアカラブルチニブを投与した患者で生理学的に関連性のある作用がみられる可能性は低いと考えられる。

## 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ガイドライン（ICH S7A 2000 及び ICH S7B 2005）に従い、アカラブルチニブの安全性薬理コアバッテリー試験（GLP 適用）を実施し、生命維持に重要な影響を及ぼす器官系に対する作用を評価した。ラットを用いて神経行動作用、体温及び呼吸器系への影響を評価し、hERG 試験及び覚醒イヌを用いたテレメトリー試験（パイロット試験及び GLP 適用試験）において、心血管系パラメータへの影響を評価した。また、アカラブルチニブと ACP-319（選択的 PI3Kδ 阻害薬）との併用についても、心血管系パラメータの評価（*in vitro* 及び *in vivo*）を実施した（以下参照）。特に記載のない限り、*in vivo* 試験では強制経口投与液（0.2% Tween 80 含有 0.4%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液）を使用した。

安全性薬理試験の結果は、薬理試験概要表 2.6.3.4 項に要約した。

## 2.6.2.4.1 中枢神経系

### 雄 Sprague-Dawley ラットにアカラブルチニブ単回経口投与後の Irwin 変法試験（試験 503222 参照）

雄 Sprague-Dawley ラットを用いて、アカラブルチニブを単回経口投与したときの神経行動作用（Irwin 変法試験）及び体温への影響を評価した。動物（各群 8 例）に、溶媒、アカラブルチニブ 30、100 又は 300 mg/kg、或いはクロルプロマジン（対照物質）20 mg/kg を単回強制経口投与した。投与前、投与 1、2、4、6 及び 24 時間後に動物の評価を実施した。各評価は、飼育ケージ内での観察の後、アリーナ上で個々の詳細な観察を行い、その後すぐに直腸温を測定した。試験期間中、一般状態の観察及び直腸温の測定を 6 時点で行った。体重は投与前に測定し、生存状況は 1 日 2 回確認した。

アカラブルチニブを 300 mg/kg まで単回経口投与したところ、神経行動作用及び直腸温への影響は認められなかった。陽性対照群（クロルプロマジン投与動物）で認められた一般状態及び直腸温変化の程度は鎮静状態であることを示すものであり、本試験で使用した方法の妥当性が示された。

## 2.6.2.4.2 心血管系

### 2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験

#### hERG を安定的に発現させた HEK-293 細胞を用いた hERG テール電流に対するアカラブルチニブの作用（試験 503219 参照）

hERG を安定的に発現させたヒト胎児腎臓（HEK）細胞を用いて、*in vitro* における hERG チャネル活性に対するアカラブルチニブの作用を評価した。5 つの細胞を用いて hERG テール電流に対する濃度 10 μM のアカラブルチニブの作用を測定した。

アカラブルチニブは濃度 10 μM で、Tyrode 液灌流期間終了時と比較してピーク振幅を 25.1 ± 1.3%阻害した。アカラブルチニブによる阻害は、溶媒と比較して統計学的に有意であった（対応のある片側 t 検定、$p < 0.05$）。陽性対照（0.1 μM E-4031）で有意な阻害（94.4 ± 0.4%）が認められたことから、本試験の信頼性が確認された。

以上のように、hERG を安定的に発現させた HEK-293 細胞において、10 μM のアカラブルチニブは hERG テール電流を 25.1 ± 1.3%阻害した。

#### hERG を安定的に発現させた CHO 細胞における hERG テール電流に対するアカラブルチニブ及び AMG-319（ACP-319）の作用（試験 794950 参照）

hERG を安定して発現させた CHO-K1（チャイニーズハムスター卵巣）細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法（電気生理学的手法）により、アカラブルチニブ単剤及び ACP-319（選択的 PI3Kδ 阻害薬）との併用時の hERG チャネルに対する阻害作用を検討した。CHO-K1-hERG 細胞にアカラブルチニブ及び ACP-319 をそれぞれ単独及び併用で曝露した。また、本試験で使用する溶媒（0.1% DMSO、v/v）にも曝露した。さらに、強力な hERG チャネル阻害薬であるシサプリド 1 μM を陽性対照として使用した。

アカラブルチニブ 1 μM 及び 10 μM は、hERG テール電流をそれぞれ 8.2 ± 3.7%及び 24.9 ± 6.9%阻害した。アカラブルチニブ単独の無影響濃度は 0.9 μM（測定値）であった。hERG テール電流に対する阻害作用は試験のバラツキの限界値内であると考えられた（$p=0.048$）。ACP-319 単独の無影響濃度 0.9 μM（測定値）と判断された。ACP-319 は 1～30 μM の濃度で評価

した。ACP-319 の $IC_{50}$ 値は単独使用時には 14.8 μM であったが、アカラブルチニブ単独 1 μM 及び 10 μM 併用下ではそれぞれ 13.9 μM 及び 10.3 μM に低下した。

### 2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験

**雄ビーグル犬における Org 300196-0（アカラブルチニブ）単回経口投与後の心血管系テレメトリー試験（非 GLP）（試験 491868［参考資料］参照）**

試験 491868 は、アカラブルチニブの開発決定前に実施したパイロット試験であり、イヌを用いてアカラブルチニブの心血管系作用を確認することが目的であった。ビーグル犬 4 匹を用いて、アカラブルチニブを 10 及び 30 mg/kg の用量で投与する 1.5 時間前（摂食 0.5 時間前）から 24 時間後まで心電図及び血圧パラメータを評価した。

その結果として、ラジオテレメトリーを埋め込んだ雄ビーグル犬にアカラブルチニブを 10 及び 30 mg/kg の用量で経口投与したとき、投与 24 時間後まで心電図パラメータ、心拍数及び平均動脈圧に変化はなかった。

そのため、本試験の無作用量は最高用量の 30 mg/kg と判断された。

**イヌにおけるアカラブルチニブ経口投与後の心血管系作用（試験 594019 参照）**

その後、GLP 適用下で、ラジオテレメトリーを埋め込んだ覚醒雄ビーグル犬にアカラブルチニブを強制経口投与したときの急性心血管系作用を評価した。4 群（各群雄ビーグル犬 4 匹）に溶媒又はアカラブルチニブ溶液を 0、3、10 又は 30 mg/kg の用量で単回強制経口漸増投与した。溶媒又はアカラブルチニブ溶液の投与約 1 時間前から投与約 24 時間後まで、拍数、動脈圧、脈圧、体温及び心電図波形のデータを継続的に収集した。分析用の血液検体は、各投与日の投与約 3 時間後に採取した。一般状態は、各投与日の投与約 3 時間後及び 24 時間後に評価した。

本試験の結果において、アカラブルチニブを 3、10 又は 30 mg/kg の用量で単回強制経口投与したとき、イヌの心血管系、体温、心電図間隔及び全身状態に有意な影響を及ぼさなかった。投与 3 時間後のアカラブルチニブの全血中濃度の平均値は、3、10 又は 30 mg/kg でそれぞれ 188、679 及び 3442 ng/mL であった。

そのため、本試験の無作用量は最高用量の 30 mg/kg と判断された。

**イヌにおけるアカラブルチニブ及び ACP-319 単回経口併用投与後の心血管系作用（試験 2219-015［参考資料］参照）**

合計 4 匹の雄ビーグル犬に溶媒又は被験物質をゼラチンカプセルで投与した。被験物質は、最初の 3 投与期に ACP-319 単剤を 0、8、25 mg/kg の用量で用量漸増投与した後、併用期にアカラブルチニブ 30 mg/kg との併用で ACP-319 8 mg/kg 及び 25 mg/kg を用量漸増投与した。ラテン方格法を用い、同じ 4 匹に 5 種類のすべての投与を 7 又は 8 日間の休薬期間をおいて実施した。体温、血圧（収縮期、拡張期及び平均）及び心電図は、投与の 2 時間以上前から投与 24 時間以上後まで継続的にモニタリングした。本試験では、アカラブルチニブは ACP-319 との併用でのみ投与した（アカラブルチニブ単独投与期はなかった）。

雄ビーグル犬に ACP-319 を 25 mg/kg までの用量で単独単回経口投与又はアカラブルチニブ 30 mg/kg との併用投与したとき、体重、血圧又は所定の心電図パラメータ（PR、RR、QRS、補正を行わない QT 間隔）に重要な変化はみられなかった。いずれの投薬でも投与 24 時間後まで糞の変化が認められた。ACP-319 投与後に用量依存的で軽微な体温の増加が認められた。アカラブルチニブ 30 mg/kg との併用投与後は、その変化の程度が増加し、作用期間が延長した。8 及び 25 mg/kg 投与後 3 時間まで、わずかな用量依存的な QTc 間隔の変化（最大 4%）が認められた。

ACP-319 とアカラブルチニブ 30 mg/kg を併用投与したとき、QTc 間隔の延長が増加し（最大 7%）、作用期間が延長した（投与後最大 11 時間）。

体温及び QTc 間隔の変化はいずれもわずかであり、回復がみられたことから、有害作用とは考えられなかった。このように、ビーグル犬に ACP-319 を 8 又は 25 mg/kg の用量で単独又はアカラブルチニブ 30 mg/kg と併用経口投与したとき、心血管系の機能に対する有害作用は認められなかった。

ACP-319 を単独又はアカラブルチニブ 30 mg/kg と併用投与したときの無作用量（NOEL）は最高用量である 25 mg/kg と判断された。

## 2.6.2.4.3 呼吸器系

**雄 Sprague-Dawley ラットにおけるアカラブルチニブ単回経口投与後のヘッドアウト式プレチスモグラフィ（試験 503221 参照）**

本試験では、4 群の雄 Sprague-Dawley ラット（各群 10 匹）に溶媒、アカラブルチニブ 30、100 及び 300 mg/kg を強制経口投与した。また、1 群に陽性対照としてバクロフェン 40 mg/kg を投与した。投与前及び投与後 4 時間までの呼吸器パラメータ（呼吸数、一回換気量、分時換気量及び最大呼気流量、最大吸気流量）を記録した。

溶媒対照群と比較して、アカラブルチニブ投与群の各投与間隔時の呼吸器系パラメータに統計学的有意な変化はみられなかった。採用した実験条件において、覚醒ラットにアカラブルチニブを 30、100 及び 300 mg/kg の用量で経口投与したとき、投与後 4 時間において溶媒投与と比較して統計学的又は生物学的に有意な呼吸器パラメータの変化はみられなかった。

本試験での無毒性量（NOAEL）は評価した最高用量である 300 mg/kg と判断された。

## 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的作用に基づく薬物相互作用を評価する試験は実施しなかった。

## 2.6.2.6 考察及び結論

## 2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

アカラブルチニブは、強力で選択性の高い共有結合型の BTK 阻害薬であり、標的外に対する活性は限られている。アカラブルチニブは、BTK 阻害薬として初めて上市されたイブルチニブと比較して BTK 選択性が高かった。*In vitro* 試験で初代 B 細胞及び Ramos 細胞における on-target 効果が確認され、アカラブルチニブ及び ACP-5862 は B 細胞シグナル伝達経路を不活性化し、B 細胞活性化の機能的マーカーを阻害することが示された。*In vivo* 試験で、マウス、ラット及びイヌへの投与後に BTK 標的占有が認められたことから、これらの非臨床試験系で共有結合により BTK が阻害されることが確認された。

アカラブルチニブは、B 細胞機能試験で強力な活性を示したが、イブルチニブと異なり、T 細胞、上皮細胞、NK 細胞及び血小板の機能に対し強い作用を示さなかった。非悪性細胞種に対する作用は、標的外薬理作用により、有害事象発現につながる可能性があるため望ましいものではない。T 細胞、上皮細胞及び血小板をアカラブルチニブで処理したとき、いずれの細胞でも機能の阻害はみられなかった。NK 細胞試験では、アカラブルチニブの臨床における曝露量の濃度範囲で NK 細胞の機能は保持され、1 μM（非結合形 $C_{max}$ が 0.060 μM を超える濃度）での阻害はわ

ずか（30%以下）であった。細胞に対する効力の結果から、キナーゼ生化学的試験で認められた選択性の結果の妥当性が確認された。多くの B 細胞性悪性腫瘍患者が、オプソニン化細胞の細胞媒介クリアランスが作用機序に部分的に関与するモノクローナル抗体で治療されるため、NK 細胞のエフェクター機能を保持することが重要である。

広範なキノーム・スクリーニングにおいて、アカラブルチニブと ACP-5862 は同様の選択性を示した。ACP-5862 だけが活性を示したキナーゼ（MEK5 及び PTK6）に対する $IC_{50}$ 値は、治療用量の非結合形 $C_{max}$ の 4.6 倍及び 10 倍であった。標的外活性が代謝物と未変化体で非常に類似していることから予期しない薬理活性が生じるリスクは低いと考えられる。

アカラブルチニブの薬力学を解釈するには、共有結合により BTK を阻害する活性代謝物の生成を考慮する必要がある。ACP-5862 は、アカラブルチニブと比較して量が多く、血漿中半減期が長いこと、及びその生成速度を考えると、体内循環中に薬理作用に寄与する可能性がある。PBPK モデルを構築し、未変化体と代謝物の相対曝露量及び相対薬理作用を推測した。通常、ヒトでの ACP-5862 の曝露量はアカラブルチニブの 2 倍以上であるが、活性で補正した PBPK モデルを用い、蛋白結合を考慮して予備的モデル解析を実施したところ、ヒト血漿中 BTK 阻害全体に対する ACP-5862 の薬理作用への寄与は、投与間隔時の標的占有率全体の約 1/3 と推測された（臨床薬理試験 2.7.2 項参照）。

*In vivo* 有効性試験において、MCL、CLL 及び DLBCL を含む複数の B 細胞性悪性腫瘍非臨床モデルにおける抗腫瘍効果が示された。薬理活性は、用量反応性、標的結合及び BCR 経路阻害に基づいて評価した。ヒト CLL 患者由来の脾臓コロニー形成異種移植モデルを用いて評価を行ったところ、アカラブルチニブの増殖抑制作用と、PLCγ2 及び細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）リン酸化阻害を含む BCR シグナル伝達に関わる BTK 阻害（on-target 阻害）は直接関連していた。イヌ B 細胞リンパ腫モデルを用いた試験では、アカラブルチニブの高い標的結合及び悪性部位への速やかな組織移行性が示された。非臨床薬力学的試験及び疾患モデルで認められたアカラブルチニブの効力は、低選択性の BTK 阻害薬と同程度以上であり、選択的 BTK 阻害が治療における作用機序に寄与していることが確認された。また、これらの結果から、マウス、ラット及びイヌの動物種における BTK の生物学的特性の関連性も示された。

総合すると、効力を裏付ける試験の結果から、アカラブルチニブは強力で選択性の高い共有結合型 BTK 阻害薬であることが示され、正常マウス及び非臨床 B 細胞性悪性腫瘍モデルでその活性が確認されている。ACP-5862 の評価の結果、アカラブルチニブと同等の効力及び選択性を有することが示されたことから、標的占有に寄与している可能性が考えられるが、標的外作用に対する大きな寄与はないと考えられる。これらのデータは、B 細胞性悪性腫瘍患者に選択的 BTK 阻害薬としてアカラブルチニブを使用することを支持するものである。

## 2.6.2.6.2 副次的薬理試験及び安全性薬理試験

副次的薬理試験で 80 種類の標的分子の評価を行ったところ、アカラブルチニブ及び ACP-5862 の標的外結合相互作用は限られていた。アカラブルチニブは A3 に結合し、$K_i$ 値は 0.91 とヒトに 100 mg を投与したときの定常状態の非結合形 $C_{max}$（0.060 μM）の 15 倍であった。ACP-5862 は、パネル中のいずれの標的分子とも結合せず、$K_i$ 値はヒトでの代謝物の推定非結合形 $C_{max}$（0.018 μM）の 100 倍未満であった。ヒトにおいて標的外相互作用の機能的関連性はないと考えられる。

ラットの神経行動又は呼吸器系試験において、300 mg/kg までの用量でアカラブルチニブに関連する作用が認められなかった。これらの試験で TK 評価は実施しなかったが、雄 Sprague-Dawley ラットを用いた一般毒性試験のデータを比較することは可能である。雄ラットにアカラブルチニブ 300 mg/kg を経口投与した後、1 日目の $C_{max}$ はヒトに治療量を投与したときの

定常状態の $C_{max}$ の 1.0 倍以上であった。アカラブルチニブの総 $AUC_{(0-t)}$は、ヒトでの総 $AUC_{(24h,ss)}$ と比較して 7.7 倍であった（毒性試験概要表 2.6.7.7.2 項参照）。この結果から、臨床用量で神経行動、体温又は呼吸器系への影響が生じる可能性は低いと考えられる。

*In vitro* における hERG 阻害作用を評価したところ、アカラブルチニブは、高濃度においてのみカリウム電流に対して阻害作用を示した（10 μM で阻害率 25%）。アカラブルチニブの無作用量は 0.9 μM（名目値：1 μM）と判断された。この濃度は、ヒトに 100 mg を投与したときの定常状態における非結合形 $C_{max}$（0.060 μM）の 15 倍である。

イヌの心血管系安全性試験で、30 mg/kg までアカラブルチニブの影響はみられなかった。また、イヌの 28 日間及び 13 週間の一般毒性試験で心電図パラメータに対する薬剤関連の影響は認められなかった（毒性試験の概要文 2.6.6 項参照）。イヌの 9 か月試験（試験 2219-098 参照）で、イヌに 30 mg/kg を投与したときの $C_{max}$ 及び $AUC_{(0-t)}$は、ヒトに治療量を投与したときの定常状態の $C_{max}$ 及び $AUC_{(24h,ss)}$のそれぞれ 4.4 倍及び 6.4 倍であった。hERG 評価を総合すると、治療量を投与した患者において心血管系作用又は QTc 延長がみられる可能性は非常に低いことが示唆された。これらのデータは、健康被験者を対象に治療用量（100 mg）及び治療用量を超える高用量（400 mg）のアカラブルチニブとプラセボ及びモキシフロキサシン（陽性対照）を比較検討した QT 評価試験（ACE-HV-005 試験）で確認された無影響量と整合している（臨床薬理試験 2.7.2 項参照）。

ラット及びイヌに[$^{14}$C]-アカラブルチニブを投与したマスバランス試験、並びにマウス肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験において、ACP-5862 が生成されることが確認された（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）。これらの結果から、マウス、ラット及びイヌは代謝物の薬理活性の評価に適したモデルであることが示された。安全性薬理試験では、ACP-5862 がアカラブルチニブの主代謝物として特定されたヒト・マスバランス試験前に実施したため、ACP-5862 の測定は実施されなかった。しかしながら、ラット及びイヌにおけるマスバランス試験では、ラットにアカラブルチニブを 100 mg/kg で（安全性薬理試験の中用量）及びイヌに 30 mg/kg で（心血管系安全性試験の高用量）経口投与したときの ACP-5862 を定量した。これらの用量を投与したときの ACP-5862 の $C_{max}$ は、健康被験者にアカラブルチニブを 100 mg の用量で経口投与したときの ACP-5862 の $C_{max}$ の幾何平均値と比較してラットで 5.8 倍及びイヌで 1.7 倍であった。これらの用量を投与したときの総 $AUC_{(0-t)}$は、アカラブルチニブ 100 mg を 1 日 2 回投与したときの ACP-5862 の総 $AUC_{(0-24)}$の推定値と比較してラットで 5.8 倍及びイヌで 0.8 倍であった（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項の表 19 参照）。これらのデータは、安全性薬理試験で ACP-5862 を十分に評価できることを示すものである。

結論として、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の結果から、アカラブルチニブの良好な非臨床薬理プロファイルを示すものであり、予定している適応症での使用を支持するものである。

## 2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

## 2.6.2.8 参考文献

Advani et al 2013

Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI 32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. J Clin Oncol 2013;31:88–94.

Andreotti et al 2010

Andreotti AH, Schwartzberg PL, Joseph RE, Berg LJ. T-cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(7):a002287.

Atkinson et al 2003

Atkinson BT, Ellmeier W, Watson SP. Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. Blood. 2003;102(10):3592–9.

Bao et al 2012

Bao Y, Zheng J, Han C, Jin J, Han H, Liu Y. Tyrosine kinase Btk is required for NK cell activation. J Biol Chem. 2012;287(28):23769–78.

Barf and Kaptein 2012

Barf T, Kaptein A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. J Med Chem 2012;55:6243–62.

Buggy and Elias 2012

Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. Int Rev Immunol. 2012;31(2):119–32.

Byrd et al 2014

Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. NEJM 2014;371:213–23.

Byrd et al 2016

Byrd JC, Harrington BK, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S. Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. NEJM 2016; 374:323-32 and supplementary appendix available online [cited 30 April 2017]: http://www.nejm.org/doi/suppl/10.1056/NEJMoa1509981/suppl_file/nejmoa1509981_appendix.pdf.

Chen et al 2008

Chen J, Tan K, Zhou H, Lo HF, Tronik-Le Roux D, Liddington RC. Modifying murine von Willebrand factor A1 domain for in vivo assessment of human platelet therapies. Nat Biotechnol 2008;26:114–19.

Da Roit et al 2015

Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij EC, Gritti G, Rambaldi A. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. Haematologica. 2015;100(1):77–86.

De Bruijn et al 2017

de Bruijn MJ, Rip J, van der Ploeg EK, van Greuningen LW, van Greuningen LW, Ta VT, Kil LP. Distinct and Overlapping Functions of TEC Kinase and BTK in B Cell Receptor Signaling. J Immunol. 2017;198(8):3058–68.

Ellmeier et al 2011

Ellmeier W, Abramova A, Schebesta A. Tec family kinases: regulation of FcεRI-mediated mast-cell activation. FEBS J. 2011;278(12):1990–2000.

FDA 2016

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry. Safety testing of drug metabolites. [document on the internet]. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration; 2016, revision 1 [cited 12 April 2017]. Available from https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm079266.pdf.

Furie and Furie 2005

Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. J Clin Invest 2005;115:3355–62.

ICH S7A 2000

International Council on Harmonisation (ICH). Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A; 2000, [cited 18 April 2017]. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf.

ICH S7B 2005

International Council on Harmonisation (ICH). The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) S7B; 2005, [cited 18 April 2017]. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf.

Harrington et al 2016

Harrington BK, Gardner HL, Izumi R, Hamdy A, Rothbaum W, Coombes KR. Preclinical evaluation of the novel BTK inhibitor acalabrutinib in canine models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. PLoS One. 2016;11(7):e0159607.

Hata et al 1998

Hata D, Kitaura J, Hartman SE, Kawakami Y, Yokota T, Kawakami T. Bruton's tyrosine kinase-mediated interleukin-2 gene activation in mast cells. Dependence on the c-Jun N terminal kinase activation pathway. J Biol Chem. 1998;273(18):10979–87.

Hendriks et al 2014

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

Herman et al 2013

Herman SEM, Sun X, Hsieh MM, Hsieh MM, Pittaluga S, Raffeld M. Modeling tumor–host interactions of chronic lymphocytic leukemia in xenografted mice to study tumor biology and evaluate targeted therapy. Leukemia 2013;27:2311–21.

Herman et al 2016

Herman SE, Montraveta A, Niemann CU, Mora-Jensen H, Gulrajani M, Krantz F. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor acalabrutinib demonstrates potent on-target effects and efficacy in two mouse models of chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res. 2016;Nov 30;.CCR-16-0463.

Kenny et al 2013

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;8(8):e74103.

Khurana et al 2007

Khurana D, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. Differential regulation of human NK cell-mediated cytotoxicity by the tyrosine kinase Itk. J Immunol. 2007;15;178(6):3575–82.

Kohrt et al 2014

Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, Herman SE, Butchar JP, Cheney C. Ibrutinib antagonized rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. Blood 2014;123(12):1957–60.

Köprülü et al 2013

Köprülü AD, Kastner R, Wienerroither S, Lassnig C, Putz EM, Majer O. The tyrosine kinase Btk regulates the macrophage response to Listeria monocytogenes infection. PLoS One. 2013;8(3):e60476.

Krippendorff et al 2009

Krippendorff BF, Neuhaus R, Lienau P, Reichel A, Huisinga W. Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. J Biomol Screen. 2009;14(8):913–23.

Lougaris et al 2014

Lougaris V, Baronio M, Vitali M, Tampella G2, Cattalini M2, Tassone L. Bruton tyrosine kinase mediates TLR9-dependent humandendritic cell activation. J Allergy Clin Immunol. 2014;133(6):1644–50.e4.

Maas and Hendriks 2001

Maas A, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cell development. Dev Immunol. 2001;8(3-4):171–81.

MacGlashan et al 2011

MacGlashan D Jr, Honigberg LA, Smith A, Buggy J, Schroeder JT. Inhibition of IgE mediated secretion from human basophils with a highly selective Bruton's tyrosine kinase, Btk, inhibitor. Int Immunopharmacol. 2011;11(4):475–9.

Manne et al 2015

Manne BK, Badolia R, Dangelmaier C, Eble JA, Ellmeier W, Kahn M. Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets. J Biol Chem. 2015;290(18):11557–68.

Mueller et al 2010

Mueller H, Stadtmann A, Van Aken H, Hirsch E, Wang D, Ley K. Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. Blood. 2010;115(15):3118–27.

Podoll et al 2019

Podoll T, Pearson PG, Evarts J, Ingallinera T, Bibikova E, Sun H. Bioavailability, biotransformation, and excretion of the covalent Bruton tyrosine kinase inhibitor acalabrutinib in rats, dogs, and humans. Drug Metab Dispos. 2019;47(2):145–54.

Quek et al 1998

Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. Curr Biol. 1998;8(20):1137–40.

Scheers et al 2015

Scheers E, Leclercq L, de Jong J, Bode N, Bockx M, Laenen A. Absorption, metabolism, and excretion of oral [1]C radiolabeled ibrutinib: an open-label, phase I, single dose study in healthy men. Drug Metab Dispos. 2015;43(2):289–97.

Schett et al 2005

Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. Nat Clin Pract Rheumatol. 2005;1(1):47–54.

Shinohara et al 2008

Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H. Tyrosine kinases Btk Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. Cell 2008;132(5):794–806.

Shinohara et al 2014

Shinohara M, Chang BY, Buggy JJ, Nagai Y, Kodama T, Asahara H. The orally available Btk inhibitor ibrutinib (PCI-32765) protects against osteoclast-mediated bone loss. Bone. 2014;60:8–15.

Smith et al 1994

Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. J Immunol. 1994;152(2):557–65.

Tucker and Rule 2015

Tucker DL, Rule SA. A critical appraisal of ibrutinib in the treatment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Ther Clin Risk Manag. 2015;11:979–90.

Wang et al 2013

Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. NEJM 2013;369:507–16.

Wang et al 2015

Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2015;6:368.

Wang et al 2018

Wang M, Rule S, Zinzani PL, Goy A, Casasnovas O, Smith S. Acalabrutinib in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (ACE-LY-004): in a single-arm, multicentre, phase 2 trial. Lancet. 2018;391:659–67.

Wilson et al 2015

Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. 2015;21(8):922–6.

Winkelstein et al 2008

Winkelstein JA, Conley ME, James C, Howard V, Boyle J. Adults with X-linked agammaglobulinemia: impact of disease on daily lives, quality of life, educational and socioeconomic status, knowledge of inheritance, and reproductive attitudes. Medicine (Baltimore). 2008;87(5):253–8.

**第 2 部　CTD の概要**

一般名：アカラブルチニブ

版番号：[redacted]

# 2.6.3　薬理試験概要表
# カルケンス®カプセル

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

# 目次

目次 ..... 2
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 ..... 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 ..... 5
2.6.3.4 安全性薬理試験 ..... 5
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 7

## 2.6.3.1 薬理試験：一覧表

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | CTD Volume Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Primary Pharmacodynamics | | | | | |
| Kinase activity and selectivity[a] | Enzymatic activity | In vitro | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands and San Carlos, CA, US [redacted], US [redacted], UK | R20[redacted]002A | 4.2.1.1 |
| Kinase activity and selectivity (major metabolite ACP-5862) | Enzymatic activity | In vitro | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands [redacted], US [redacted], UK | R20[redacted]001 | 4.2.1.1 |
| Kinase cellular activity[a] | Human cells | In vitro | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands and San Carlos, CA, US | R20[redacted]003A | 4.2.1.1 |
| Kinase cellular activity (major metabolite ACP-5862) | Human cells | In vitro | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands | R20[redacted]002 | 4.2.1.1 |
| NK-cell and T-cell functions[a] | Human cells and Mouse (BALB/c) | In vitro | AstraZeneca, Waltham, MA, US and Cambridge, UK | 003525108 | 4.2.1.1 |
| NK-cell and T-cell functions[a] | Human cells and Mouse (C57BL/6) | In vitro | [redacted], US | P23328 (参考資料) | 4.2.1.1 |
| In vivo potency[a] | Mouse (BALB/c) | Oral | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands and San Carlos, CA, US | R20[redacted]004A | 4.2.1.1 |
| In vivo kinetics and return of BTK function[a] | Mouse (female BALB/c) | Oral | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands and San Carlos, CA, US | R20[redacted]005A | 4.2.1.1 |
| CLL xenograft proliferative inhibition | Mouse (NSG, with human cells) | Oral in drinking water | [redacted], US and [redacted], US | ACE-NC-002 (Herman et al 2016) | 4.2.1.1 |
| Lymphoma xenograft MCL and DLBCL models | Mouse (female C.B-17 SCID) | Oral | AstraZeneca, Waltham, MA, US | 003526233 | 4.2.1.1 |

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | CTD Volume Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Platelet function[a] | Human (primary cells) in mouse (VWFHA1) | Ex vivo/in vivo | [redacted], US | R20[redacted]005 (Byrd et al 2016) | 4.2.1.1 |
| Adjuvant-induced arthritis (AIA) | Rat (male Lewis) | Oral | [redacted], US | RAIA-LA-ACP-1 | 4.2.1.1 |
| BTK occupancy in rat AIA model | Rat (male Lewis) | Oral | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands | R2017007 | 4.2.1.1 |
| PK/PD in dogs with spontaneous lymphoma | Dog (companion) | Oral | Acerta Pharma, Oss, The Netherlands and [redacted], US | R2015001 (Harrington et al. 2016) | 4.2.1.1 |
| Secondary Pharmacodynamics | | | | | |
| Off-target binding[a] | Human cell membranes | In vitro | [redacted], France | 840327 (参考資料) | 4.2.1.2 |
| Off-target binding[a] | Human cell membranes | In vitro | [redacted], France | 840290 (参考資料) | 4.2.1.2 |
| Off-target binding (major metabolite ACP-5862) | Human cell membranes | In vitro | [redacted], France | 100032432 | 4.2.1.2 |
| Off-target binding (major metabolite ACP-5862) | Human cell membranes | In vitro | [redacted], France | 100033052 | 4.2.1.2 |
| Safety Pharmacology | | | | | |
| Effects on hERG channel activity | Human cells | In vitro | [redacted], The Netherlands | 503219 | 4.2.1.3 |
| Effects on hERG channel activity (±ACP-319) | Human cells | In vitro | [redacted], UK | 794950 | 4.2.1.3 |
| Effects on respiratory system | Rat (Sprague-Dawley, male) | Oral gavage | [redacted], The Netherlands | 503221 | 4.2.1.3 |
| Effects on central nervous system | Rat (Sprague-Dawley, male) | Oral gavage | [redacted], The Netherlands | 503222 | 4.2.1.3 |
| Effects on cardiovascular system | Dog (Beagle, male) | Oral gavage | [redacted], The Netherlands | 491868 (参考資料) | 4.2.1.3 |

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | CTD Volume Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Effects on cardiovascular system | Dog (Beagle, male) | Oral gavage | [redacted], [redacted], [redacted], US | 594019 | 4.2.1.3 |
| Effects on cardiovascular system (combination with ACP-319) | Dog (Beagle, male) | Oral gavage | [redacted], [redacted], [redacted], US | 2219-015 (参考資料) | 4.2.1.3 |
| Pharmacodynamic Drug Interactions (NA) | | | | | |

AIA=Adjuvant-induced arthritis; BTK=Bruton tyrosine kinase; CLL=chronic lymphocytic leukemia; DLBCL=diffuse large B cell lymphoma; hERG=human ether-a-go-go-related gene; MCL=mantel cell lymphoma; NA=not applicable; NK=natural killer; NSG=non-obese diabetic, SCID, interferon-γ deficient (-/-) mouse; PD=pharmacodynamic; PK=pharmacokinetic; SCID=severe combined immune-deficiency; VWF=von Willebrand factor.

a Ibrutinib and/or other BTK inhibitors were included for comparison.

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.1 項を参照。

## 2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.1 項を参照。

## 2.6.3.4 安全性薬理試験

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Administration | Doses [a] | Sex and No per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular | Human | In vitro hERG channel current | 10 μM | NA | ACP-196 at 10 μM inhibited the hERG tail current by 25.1 ± 1.3%. | Yes | 503219 |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Administration | Doses [a] | Sex and No per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular | Human | In vitro hERG channel current | ACP-196: 1, 10 μM ACP-319: 1, 3, 10, and 30 μM | NA | ACP-196 at 1 μM and 10 μM inhibited the hERG tail current by 8.2 ± 3.7% and 24.9 ± 6.9%, respectively. The $IC_{50}$ for ACP-319 decreased from 14.8 to 13.9 μM and 10.3 μM in the presence of ACP-196 at 1 μM and 10 μM, respectively. | Yes | 794950 |
| Respiratory | Rat/ Sprague-Dawley | Oral gavage | ACP-196: 0, 30, 100, 300 mg/kg | Male/10 | There were no statistically or biologically significant changes in respiratory parameters. No significant changes in respiratory parameters were observed at any dose. | Yes | 503221 |
| Nervous | Rat/ Sprague-Dawley | Oral gavage | ACP-196: 0, 30, 100, 300 mg/kg | Male/8 | No neurobehavioral effects and no effects on rectal temperature were noted. The NOEL was 300 mg/kg. | Yes | 503222 |
| Cardiovascular | Dog/ Beagle | Oral gavage | ACP-196: 0, 10, 30 mg/kg | Male/4 (same 4 used in each group) | There were no changes in the ECG, the heart rate and the mean arterial blood pressure up to 24 hours after administration of ACP-196 at either dose. | No | 491868 |
| Cardiovascular | Dog/ Beagle | Oral gavage | ACP-196: 0, 3, 10, 30 mg/kg | Male/4 (same 4 used in each group) | ACP-196 at doses of 3, 10, or 30 mg/kg did not significantly affect the cardiovascular system, body temperature, ECG intervals, or physical condition of the animals. | Yes | 594019 |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Administration | Doses [a] | Sex and No per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular | Dog/ Beagle | Oral gavage | ACP-196: 30 mg/kg (comb only) ACP-319: 0, 8, 25 mg/kg | Male/4 (same 4 used in partial Latin squares design) | ACP-319 minimally increased body temperature; ACP-196 increased and prolonged this effect. Dose-dependent slight ACP-319 related QTc changes (up to 3 h postdose, up to 4% increase), were greater (up to 7%) and prolonged (up to 11 h postdose) with ACP-196 coadministration. At all doses, levels for both test articles, no adverse effects on CV function were observed. | Yes | 2219-015 |

CNS=central nervous system; CV=cardiovascular; ECG=electrocardiogram; GLP=Good Laboratory Practice; h=hour(s); hERG=human ether-a-go-go-related gene; $IC_{50}$=inhibitory concentration causing half maximal inhibition; M=male; NA=not applicable; NOEL=no-observed-effect-level; $QT_c$=corrected QT interval.

a Single dose

## 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし。