

TABLE OF CONTENTS

1. 緒言.....	2
------------	---

1. 緒言

アブロシチニブ（開発番号：PF-04965842，化学名：N-{cis-3-[Methyl(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino]cyclobutyl}propane-1-sulfonamide，分子量：323.4）は ATP との結合を遮断することにより，JAK1 を選択的かつ可逆的に阻害する経口投与が可能な低分子である。他の 3 種類の JAK アイソフォーム（JAK2，JAK3 および TYK2）よりも JAK1 に対する選択性が高く（それぞれ 28 倍，340 倍超，43 倍），また，広範なキナーゼ群と比較しても選択性が高い。2 分子の JAK アイソフォームが介在してシグナル伝達が行われる細胞内では，JAK1 を介するサイトカインのシグナル伝達を選択的に阻害し（JAK1/TYK2 を介した IFN α のシグナル伝達 [IC₅₀：32.5 nmol/L] など），JAK2 のみが介在する受容体あるいは JAK2/TYK2 が介在する受容体に対するよりも阻害活性が高い（JAK2/JAK2 を介した EPO のシグナル伝達の IC₅₀：794 nmol/L，JAK2/TYK2 を介した IL-23 のシグナル伝達の IC₅₀：2130 nmol/L）。アブロシチニブは B 細胞，単球およびケラチノサイトにおける IL-4 および IL-13，T 細胞における IL-4 ならびに THP-1 細胞における IL-31，ケラチノサイトにおける IL-22 などのアトピー性皮膚炎（AD）の発症に関与する JAK1 依存性のサイトカインのシグナル伝達を阻害する。また，アブロシチニブのヒト循環血中代謝物 2 種（M1 [PF-06471658] および M2 [PF-07055087]）は，アブロシチニブと同様に JAK1 依存性経路を介したサイトカイン阻害プロファイルを示した。

ガイダンス（ICH M3[R2]，2009；EMA/CHMP/SWP/28367/07 Rev 1，2017）に従い，また，市販の JAK 1/3 阻害薬であるトファシチニブで実施された非臨床試験の動物種であり，JAK に対する薬理学的阻害に感受性を示したことから，ラット（Wistar Han あるいは Sprague Dawley）およびカンクイザルを安全性薬理試験および一般毒性試験の動物種として選択した。また，In vitro ヒト免疫細胞機能をアブロシチニブとトファシチニブの免疫毒性の比較試験で評価した。

今回の申請にあたり，アブロシチニブの有効性および安全性に関する特徴を明らかにする目的で，薬理，薬物動態および毒性の各非臨床試験を実施した。

アブロシチニブの効能・効果および用法・用量ならびに化学構造式は添付文書（案）（CTD 1.8.1）に記載した。

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES.....	2
本項で使用する用語・略語.....	3
1. まとめ.....	5
2. 効力を裏付ける試験.....	6
2.1. 効力を裏付ける試験 (In vitro)	7
2.1.1. 単離酵素に対する活性および選択性.....	7
2.1.1.1. アブロシチニブ	7
2.1.1.2. 代謝物.....	8
2.1.2. ヒト末梢血単核球および CD34 陽性前駆細胞に対する活性.....	8
2.1.3. ヒト全血細胞に対する活性.....	9
2.1.4. ヒト全血における TSLP 誘発性 STAT5 リン酸化に対する作用.....	9
2.1.5. 細胞における IL-4, IL-13, IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に對する作用.....	9
2.1.6. ヒト巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 誘発性 STAT リン酸化に對する作用.....	10
2.1.7. ヒト血小板による TPO の消失	10
2.1.8. ヒト末梢血単核球を用いたインターフェロン α 遺伝子に対する作用	10
2.1.9. ヒト形質細胞様樹状細胞における全身性エリテマトーデス血清誘発性ステロイド節約効果の阻害	10
2.1.10. アブロシチニブ代謝物の細胞レベルでの阻害活性	11
2.2. 効力を裏付ける試験 (In vivo)	12
2.2.1. ラットアジュバント誘発関節炎 (AIA) モデルにおける薬効.....	12
3. 副次的薬理試験.....	12
3.1. アブロシチニブの in vitro 薬理試験 (100002108, PF-04965842-00-0005 pVEGFR_4-26-20, 概要表 2.6.3.3)	13
3.2. アブロシチニブのモノアミン酸化酵素 A (MAO-A) およびモノアミン酸化酵素 B (MAO-B) 阻害能の検討 (CYP1503_R4, 概要表 2.6.3.3)	13
3.3. アブロシチニブによる MAO-A 阻害の可逆性の検討 (100042990, 概要表 2.6.3.3)	13
4. 安全性薬理試験.....	14
4.1. チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO 細胞) を用いた Nav1.5 ナトリウム電流に対するアブロシチニブの作用 (GR348, 概要表 2.6.3.4)	14
4.2. CHO 細胞を用いた hERG カリウム電流に対するアブロシチニブの影響 (GR347, 概要表2.6.3.4))	15

4.3. ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK 細胞) を用いた hERG カリウムチャネルに対するア ブロシチニブの影響 [160820.QHJ (MA090) , 概要表 2.6.3.4]	15
4.4. ラットを用いたアブロシチニブの神経機能および肺機能の評価 (GR320) , 概 要表 2.6.3.4)	15
4.5. テレメトリーを用いた雄ラットにおけるアブロシチニブの心血管系評価 (GR135, 概要表 2.6.3.4)	16
4.6. テレメトリーを用いたカニクイザルにおけるアブロシチニブの心血管系評価 (GR321, 概要表 2.6.3.4)	16
5. 薬力学的薬物相互作用試験.....	17
6. 考察および結論.....	17

LIST OF TABLES

Table 1. 効力を裏付ける非臨床薬理試験の要約.....	7
Table 2. アブロシチニブおよびヒト代謝物の <i>in vitro</i> 酵素阻害活性の比較.....	8
Table 3. アブロシチニブおよびヒトでの活性代謝物の細胞レベルでの阻害活性	12
Table 4. アブロシチニブの副次的薬理試験の概要	13
Table 5. アブロシチニブの安全性薬理試験の概要	14

本項で使用する用語・略語

略号および用語の定義一覧	
AD	atopic dermatitis : アトピー性皮膚炎
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
BP	blood pressure : 血圧
BT	body temperature : 体温
CD	cluster of differentiation : 表面抗原分類
CHO	Chinese hamster ovary : チャイニーズハムスター卵巣
C _{max}	maximum plasma concentration : 最高血漿中濃度
EC _{av50}	50% effective average concentration : 50%有効平均濃度
EC _{av80}	80% effective average concentration : 80%有効平均濃度
ECG	electrocardiogram : 心電図
E _{max}	maximum effect : 最大効果
EPO	erythropoietin : エリスロポエチン
FOB	functional observational battery : 機能観察総合評価法
GBP1	guanylate binding protein 1 : グアニル酸結合蛋白 1
GLP	Good Laboratory Practice : 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK	human embryonic kidney : ヒト胎児由来腎臓
hERG	human ether-à-go-go related gene : ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HPMCAS-HF	hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate grade HF : ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート grade HF
HPMCAS-MF	hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate grade MF : ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート grade MF
HPMCAS-MG	hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate grade MG : ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート grade MG
HR	heart rate : 心拍数
IC ₅₀	50% inhibitory concentration : 50%阻害濃度
IFN	interferon : インターフェロン
IL	interleukin : インターロイキン
JAK	Janus kinase : ヤヌスキナーゼ
KDR	kinase insert domain receptor
K _m	Michaelis Menton constant : ミカエリス・メンテン定数
LA	locomotor activity : 自発運動量
LOEL	lowest observed effect level : 最小影響量
M#	metabolite identification : 代謝物番号
MAO	monoamine oxidase : モノアミン酸化酵素
MPL	thrombopoietin receptor : トロンボポエチン受容体
MV	minute volume : 分時換気量
NA	not applicable : 該当なし
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development : 経済協力開発機構
PBMC	peripheral blood mononuclear cell : 末梢血単核球
pDC(s)	plasmacytoid dendritic cells : 形質細胞様樹状細胞
PK/PD	pharmacokinetic/pharmacodynamic : 薬物動態/薬力学
pSTAT	phosphorylated signal transducer and activator of transcription : リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子

略号および用語の定義一覧	
QD	once daily : 1 日 1 回
QTc	corrected QT interval : 補正 QT 間隔
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
SDD	spray dried dispersion
SLE	systemic lupus erythematosus : 全身性エリテマトーデス
STAT	signal transducer and activator of transcription : シグナル伝達兼転写活性化因子
THP-1	human leukemia monocytic cell line : ヒト単球性白血病細胞株
TK	toxicokinetic : トキシコキネティクス
TPO	thrombopoietin : トロンボポエチン
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
TV	tidal volume : 1 回換気量
TYK2	tyrosine-kinase 2 : チロシンキナーゼ 2
USP18	ubiquitin specific peptidase 18 : ユビキチン特異的ペプチダーゼ 18
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor : 血管内皮増殖因子受容体

1. まとめ

アブロシチニブは ATP との結合を遮断することにより、JAK1 を選択的かつ可逆的に阻害する経口投与が可能な低分子である。他の 3 種類の JAK アイソフォーム (JAK2, JAK3 および TYK2) よりも JAK1 に対する選択性が高く (それぞれ 28 倍, 340 倍超, 43 倍), また, 広範なキナーゼ群と比較しても選択性が高い。2 分子の JAK アイソフォームが介在してシグナル伝達が行われる細胞内では, JAK1 を介するサイトカインのシグナル伝達を選択的に阻害し

(JAK1/TYK2 を介した IFN α のシグナル伝達 [IC₅₀: 32.5 nmol/L] など), JAK2 のみが介在する受容体あるいは JAK2/TYK2 が介在する受容体に対するよりも阻害活性が高い (JAK2/JAK2 を介した EPO のシグナル伝達の IC₅₀: 794 nmol/L, JAK2/TYK2 を介した IL-23 のシグナル伝達の IC₅₀: 2130 nmol/L)。アブロシチニブは B 細胞, 単球およびケラチノサイトにおける IL-4 および IL-13, T 細胞における IL-4 ならびにヒト単球性白血病細胞株 THP-1 細胞における IL-31 などのアトピー性皮膚炎 (AD) の発症に関与する JAK1 依存性のサイトカインのシグナル伝達を阻害する。また, アブロシチニブはケラチノサイトにおける IL-22, PBMC およびヒト全血における IFN α , IFN γ , IL-6 およびその他の JAK1 依存性サイトカインのシグナル伝達も阻害する。アブロシチニブのヒト循環血中代謝物 2 種 (M1 [PF-06471658] および M2 [PF-07055087]) は, アブロシチニブと同様に JAK1 依存性経路を介したサイトカイン阻害プロファイルを示したが, M4 [PF-07054874] は薬理活性を示さなかった。

広範な受容体, トランスポーター, イオンチャネルおよび酵素に対するアブロシチニブの作用を評価したところ, MAO-A および KDR キナーゼ (VEGFR2) に対する IC₅₀ は, 臨床用量 200 mg QD 投与の時のヒト非結合型 C_{max}^a のそれぞれ 4.8 倍および 1 倍であったが, これらを除き, リガンド結合や酵素活性に対する顕著な阻害 (50% 超) は認められなかった。VEGFR2 の機能に関する細胞レベルでの追加試験では, 30 μ mol/L (ヒト非結合型 C_{max} の 24 倍) 以下の濃度において, アブロシチニブは KDR キナーゼ活性に影響を及ぼさないことが示されたことから, 安全性に関する懸念は低いことが示唆された。アブロシチニブが MAO-A および MAO-B を阻害するか, また MAO-A の阻害が可逆的であるか否かを明らかにするため, *in vitro* 試験を実施したところ, アブロシチニブは MAO-A を可逆的に阻害し, IC₅₀ は 7.67 μ mol/L

(2480 ng/mL: ヒト非結合型 C_{max} の 6.1 倍) であった。また, アブロシチニブは 100 μ mol/L (32300 ng/mL: 臨床用量 200 mg QD 投与の時のヒト非結合型 C_{max} の 80 倍) 以下の濃度で MAO-B を阻害しなかった。

アブロシチニブならびにその活性代謝物である M1 および M2 について, hERG, Nav1.5 および Cav1.2 に対する阻害能を評価するため, *in vitro* 副次的薬理試験および安全性薬理試験を実施した。広範なリガンドプロファイルスクリーニングにおいて, アブロシチニブのカルシウムチャネルに対する結合阻害は 50% 未満であった。アブロシチニブの hERG および Nav1.5 阻害に対する IC₅₀ はそれぞれ, 臨床用量 200 mg QD 投与時のヒト非結合型 C_{max} の 76 倍および 240 倍超であった。また, M1 および M2 については, IC₅₀ は臨床用量 200 mg QD 投与時のヒト非結合型 C_{max} の 80 倍超 (Nav1.5 および Cav1.2) および 240 倍超 (hERG) であった (CTD 2.6.6.2,

^a 曝露量比はヒトに 200mg QD 投与したときの C_{max} (1123 ng/mL) に非結合型分率 (fu) の 0.36 を掛けたときの非結合型 C_{max} (404 ng/mL) を基に算出した (PMAR-EQDD-B745d- DP4-962 Table 13)

2.6.6.9.6)。これらの *in vitro* イオンチャネル評価は ICH S7A および ICH S7B ガイドラインを充足していると考ええる。

In vivo 安全性薬理試験では、ICH M3 (R2) ガイドラインに従い、また、既承認のJAK 1/JAK3阻害薬であるトファシチニブの非臨床試験に用いられた動物種であり、JAKの薬理的阻害に感受性を示したことから、ラットおよびカンクイザルを使用し、神経系、心血管系および呼吸器系に及ぼす影響を評価した。アブロシチニブは、ラットにおいて自発運動量（水平行動および垂直行動）および体温を低下させ、カンクイザルにおいて心拍数および拡張期血圧を上昇させた。ラットまたはカンクイザルを用いた心血管系安全性薬理試験において、FOBパラメータまたはテレメトリーに基づく自発運動量に対する影響は認められなかった。カンクイザルを用いた心血管系評価の安全性薬理試験では、QTc延長を含むQT間隔に変化は認められなかった。

以上のように、アブロシチニブまたはその活性代謝物（M1 および M2）の試験成績からは、一般的に QT 延長のリスク評価において最も重要と考えられる主要な心臓イオンチャネル（hERG, Nav1.5 または Cav1.2）に対して、臨床用量で重大な影響を及ぼす懸念はないと考える。

2. 効力を裏付ける試験

臨床開発を支持するいくつかの非臨床薬理試験において、アブロシチニブの評価を行った。これらの試験を概要表 2.6.3.1 と Table 1 に要約し、詳細を概要表 2.6.3.2 に要約する。

Table 1. 効力を裏付ける非臨床薬理試験の要約

試験	用量および 投与頻度	試験番号
In vitro 試験		
活性測定	NA	PF-04965842-██████_083448
キナーゼ選択性	NA	PF-04965842-██████_072404
PF-06471658 (M1) , PF-07055087 (M2) および PF-07054874 (M4) の in vitro 活性：組換え型 JAK ファミリーのキナーゼ活性に対する作用	NA	PF-04965842-██████_081001
ヒト PBMC におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-04965842-██████_083721
ヒト全血におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-04965842-██████_083613
ヒト全血における TSLP 誘発性 STAT リン酸化 の阻害	NA	PF-06700841-██████_104100
細胞アッセイにおける IL-4, IL-13, IL-22 およ び IL-31 誘発性 STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06700841-██████_090414
ヒトケラチノサイトにおける IL-22 誘発性 STAT3 リン酸化の阻害	NA	PF-04965842-██████_131447
巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 シグナ ル伝達ならびに CD41 陽性細胞増殖に対するア ブロシチニブの影響	NA	CP-699550-██████_094745
血小板による TPO の消失に及ぼすアブロシチニ ブの影響	NA	CP-690550-██████_033455
SLE 免疫複合体刺激アッセイにおける活性	NA	PF-04965842-██████_083816
アブロシチニブの代謝物：ヒト全血中における サイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-04965842-██████_094349
PF-06471658 (M1) および PF-07055087 (M2) の細胞活性：IL-4, IL-13, IL-22, IL-31 および TSLP で処理したケラチノサイト, IFN γ 刺激 THP-1 細胞または全血における STAT リン酸化 の阻害	NA	PF-04965842-██████_083618
In vivo 試験		
AIA ラットモデルにおける薬効	50, 15 また は 5 mg/kg/日 7 日間, 強制 経口投与	PF-04965842-██████_135545

2.1. 効力を裏付ける試験 (In vitro)

2.1.1. 単離酵素に対する活性および選択性

2.1.1.1. アブロシチニブ

効力を裏付ける in vitro 試験 (PF-04965842-██████_083448) では、4 種類の JAK アイソフォームに対するアブロシチニブの阻害能を測定した。アブロシチニブは JAK1 の強力な阻害薬であ

り、1 mmol/L の ATP 存在下での JAK1, JAK2, JAK3 および TYK2 に対する IC₅₀ はそれぞれ 29.2 nmol/L, 803 nmol/L, 10,000 nmol/L 超および 1250 nmol/L であり、JAK1 選択性は JAK2 に対して 28 倍、JAK3 に対して 340 倍超、TYK2 に対して 43 倍であった。(Table 2)。また、Invitrogen 社のパネルを用いて、40 種類にわたるキナーゼのパネルでキナーゼに対するアブロシチニブの選択性も検討した (PF-04965842, [REDACTED] 072404)。この試験では、K_m 値付近の ATP 濃度下で各キナーゼの検討を行った。1000 nmol/L のアブロシチニブを用いたところ、検討したキナーゼのうち 30.2%を超える阻害を示したものはなかったが、例外的に JAK3 では 60.6%阻害が認められ、これは前述の試験において K_m 値付近の ATP 濃度下で得られた値 (IC₅₀ = 493 nmol/L) と一致するものであった。

2.1.1.2. 代謝物

アブロシチニブのヒト循環血中の主代謝物 [PF-06471658 (M1), PF-07055087 (M2) および PF-07054874 (M4)] の阻害能を、1 mmol/L ATP 存在下で評価した (PF-04965842, [REDACTED] 081001)。M1 および M2 の IC₅₀ は、JAK1 に対してそれぞれ 43.4 および 17.9 nmol/L であり、JAK2 に対してそれぞれ 1140 および 886 nmol/L であった。M1 および M2 のいずれについても、TYK2 に対する IC₅₀ は 1200 nmol/L 超であり、JAK3 に対しては 10,000 nmol/L 超であった。すべての JAK アイソフォームに対する M4 の IC₅₀ は 10,000 nmol/L 超であった。概して、M1 および M2 は JAK2 または TYK2 よりも JAK1 に対してより強力であり、JAK3 に対しては阻害を示さなかった。したがって、M1 および M2 はアブロシチニブの薬理作用に寄与するが、M4 は薬理活性を示さなかった。サイトカインアッセイを用いて、アブロシチニブおよびそのヒト代謝物の酵素阻害活性を比較した結果を Table 2 に示す。

Table 2. アブロシチニブおよびヒト代謝物の *in vitro* 酵素阻害活性の比較

サイトカイン アッセイ	IC ₅₀ (nmol/L) ^a			
	アブロシチニブ	M1	M2	M4
JAK1	29.2	43.4	17.9	>10,000
JAK2	803	1140	886	>10,000
JAK3	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
TYK2	1250	3190	1210	>10,000

a. 1 mmol/L ATP 存在下で測定した IC₅₀

2.1.2. ヒト末梢血単核球および CD34 陽性前駆細胞に対する活性

ヒト PBMC 中のリンパ球を用いて、初代培養細胞におけるアブロシチニブの *in vitro* 活性を測定した (PF-04965842, [REDACTED] 083721)。リンパ球において、アブロシチニブの IL-15 による JAK1/JAK3 依存性 STAT5 リン酸化に対する IC₅₀ は 90.3 nmol/L であり、IFNα および IL-10 による JAK1/TYK2 依存性 STAT3 リン酸化に対する IC₅₀ はそれぞれ 32.5 nmol/L および 142 nmol/L、IL-27 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性 STAT3 リン酸化に対する IC₅₀ は 58.1 nmol/L であった。JAK1 に依存しないシグナル伝達経路に対するアブロシチニブの阻害作用ははるかに弱く、IL-23 による JAK2/TYK2 依存性 STAT3 リン酸化に対する IC₅₀ は 2130 nmol/L であった。

CD34 陽性前駆細胞では、EPO 依存性 STAT5 リン酸化に対するアブロシチニブの IC₅₀ は 794 nmol/L であった。

2.1.3. ヒト全血細胞に対する活性

ヒト全血中のリンパ球を用いて、種々のサイトカインによる刺激後の STAT リン酸化の阻害を測定した (PF-04965842_083613)。リンパ球において、アブロシチニブは IL-15 および IL-21 による JAK1/JAK3 依存性 STAT5 および STAT3 リン酸化を阻害し、IC₅₀ はそれぞれ 537 nmol/L および 525 nmol/L であった。また、IFN α および IL-10 による JAK1/TYK2 依存性 STAT3 リン酸化の IC₅₀ は、それぞれ 183 nmol/L および 576 nmol/L であった。IL-23 による JAK2/TYK2 依存性 STAT3 リン酸化に対するアブロシチニブの IC₅₀ は 16300 nmol/L 超であり、IFN γ による JAK1/JAK2 依存性 STAT1 リン酸化および IL-27 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性 STAT3 リン酸化に対する IC₅₀ はそれぞれ 1690 nmol/L および 234 nmol/L であった。CD3 陽性 T リンパ球および CD14 陽性単球において、IL-6 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性 STAT1 リン酸化に対するアブロシチニブの IC₅₀ はそれぞれ 354 nmol/L および 167 nmol/L であった。ヒト全血に添加した CD34 陽性前駆細胞では、アブロシチニブは EPO による STAT5 リン酸化阻害した (IC₅₀ : 7780 nmol/L)。

2.1.4. ヒト全血における TSLP 誘発性 STAT5 リン酸化に対する作用

ヒト全血中で CD3 陽性細胞を炎症性サイトカインである TSLP で刺激した時の STAT リン酸化の阻害を指標として、アブロシチニブの細胞レベルでの活性を評価した

(PF-06700841_104100)。TSLP はアトピー性皮膚炎、喘息および鼻炎等の複数のヒトアレルギー性炎症性疾患に関連しており¹、細胞表面受容体結合を介して JAK1 および JAK2 を活性化させる。JAK2 と会合している活性化 JAK1 は、受容体をリン酸化し、転写因子の STAT ファミリー (STAT5 等) の結合ドメインとなる。STAT がリン酸化されると、ホモ二量体またはヘテロ二量体の STAT 複合体は核内に移行して特異的結合部位に結合し、様々な標的遺伝子の転写を調節する。アブロシチニブは TSLP 誘発性 STAT5 リン酸化を阻害した (IC₅₀ : 1020 nmol/L)。

2.1.5. 細胞における IL-4, IL-13, IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する作用

AD の発症に関与するサイトカインで刺激した様々な種類の細胞を用いて、アブロシチニブの阻害作用を評価した (PF-06700841_090414)。IL-4 は、造血細胞に発現する JAK1/JAK3 依存性 I 型受容体または主に非造血細胞に発現する JAK1 依存性 II 型受容体という 2 つの異なる受容体のいずれかを介してシグナル伝達を開始する²。I 型受容体または II 型受容体のいずれかの活性化により、STAT6 のリン酸化が生じる。アブロシチニブは、ヒト全血中の B 細胞、T 細胞および単球において IL-4 誘発性 STAT6 リン酸化を阻害し (IC₅₀ : 185~503 nmol/L)、B 細胞および単球においては IL-13 誘発性 STAT6 リン酸化を阻害した (IC₅₀ はそれぞれ 285 nmol/L および 351 nmol/L)。刺激された初代培養ヒトケラチノサイトにおいて、アブロシチニブは IL-4 および IL-13 誘発性 STAT6 リン酸化ならびに IL-22 誘発性 STAT3 リン酸化を阻害した (IC₅₀ はそれぞれ 77.0, 81.9 および 420 nmol/L^a)。また、IFN γ で前処理して IL-31 シグナル伝達をアッ

^aアブロシチニブは刺激したヒト初代培養ケラチノサイトにおいて IL-22 誘発性 STAT3 リン酸化を阻害した (IC₅₀ : 486 nM) (PF-04965842_131447)。

プレギュレートさせた THP-1 細胞において、アブロシチニブは IL-31 誘発性 STAT3 リン酸化を阻害した (IC_{50} : 40 nmol/L)。これら一連の実験において、アブロシチニブはケラチノサイトにおける IL-22 シグナル伝達を阻害し (IC_{50} : 420 nmol/L)、ヒト初代培養腸管上皮細胞における IL-22 シグナル伝達を阻害した (IC_{50} : 1240 nmol/L)。これらのことから、アブロシチニブは乾癬、アトピー性皮膚炎およびその他の皮膚疾患に関与する重要な経路を阻害することが示された。

2.1.6. ヒト巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 誘発性 STAT リン酸化に対する作用

TPO および IL-6 (いずれも JAK-STAT 経路活性化を誘発可能なサイトカインであるが、TPO は JAK2 のみに依存している) 誘発性 STAT リン酸化を介して巨核球前駆細胞に分化誘導したヒト骨髄 CD34 陽性前駆細胞を用いて、アブロシチニブの活性を検討した

(CP-690550_094745)。ヒト巨核球前駆細胞において、TPO 誘発性 STAT5 リン酸化および IL-6 誘発性 STAT3 リン酸化 (直接的または間接的に血小板産生に重要³) をアブロシチニブは阻害した (IC_{50} はそれぞれ 1060 nmol/L および 83.7 nmol/L)。さらに、CD34 陽性前駆細胞から巨核球前駆 CD41a (血小板および巨核球ならびにそれらの前駆細胞のマーカー) 陽性細胞への分化増殖に対する影響を検討したところ、IL-6 を介した CD34 陽性前駆細胞からの巨核球前駆細胞への分化増殖をアブロシチニブは抑制した (IC_{50} : 5670 nmol/L)。

2.1.7. ヒト血小板による TPO の消失

健康人から単離したヒト多血小板血漿に曝露後の残存 TPO を測定することにより、TPO の内在化を介したヒト血小板による TPO 消失に対するアブロシチニブの作用を評価した (CP-690550_033455)。アブロシチニブは JAK2 の活性を阻害する (IC_{50} : 803 nmol/L, PF-04965842_083448) が、一方で、TPO の内在化はトロンボポエチン受容体 (MPL) を介して行われ、この TPO の内在化には JAK2 への結合が関与していることが知られている⁴。ヒト血小板による TPO の消失に対して、アブロシチニブの阻害作用は弱かった (IC_{50} : 10,800 nmol/L, 非結合型濃度で 4970 nmol/L)。血小板を介した TPO 消失に対するこの弱い阻害は、アブロシチニブの JAK2 の阻害活性の弱さと関連していた (IC_{50} : 803 nmol/L)。なお、この実験で評価したより強力な JAK2 阻害薬 (例: バリシチニブ, 110 倍) では、消失に対する影響は最大で 10%であったことから、血小板の内在化による TPO 消失の 90%は JAK2 阻害に影響されないことが示唆された。

2.1.8. ヒト末梢血単核球を用いたインターフェロン α 遺伝子に対する作用

SLE 免疫複合体で刺激した正常ヒト PBMC を用いて、I 型 IFN 誘導遺伝子に対するアブロシチニブの阻害活性を評価した (PF-04965842_083816)。ヒト血液ドナー 5 名から得た PBMC を用いて、3 種類の IFN 誘導遺伝子について検討したところ、アブロシチニブが RSAD2, USP18, GBP1 の誘導を阻害した時の IC_{50} はそれぞれ 82 ± 95 nmol/L, 114 ± 132 nmol/L, 107 ± 120 nmol/L (平均値 \pm 標準偏差) であった。

2.1.9. ヒト形質細胞様樹状細胞における全身性エリテマトーデス血清誘発性ステロイド節約効果の阻害

ヒト全血から単離したヒトの形質細胞様樹状細胞 (pDC) を、SLE 患者血清から精製した IgG および U937 細胞からのアポトーシス抽出物の存在下で培養した (PF-

04965842_083816)。10 $\mu\text{mol/L}$ のプレドニゾロンにより、5 ng/mL の組換え型 IL-3 (生存促進因子) の存在下で培養した pDC の細胞死が再現性良く誘発された。U937 細胞からの抽出物の存在下では、プレドニゾロン濃度が高いときに SLE 患者血清は対照の血清と比較して細胞死を低下させた。この SLE 血清の作用は、アブロシチニブの存在下では消失することから、アブロシチニブがステロイド節約薬となる可能性を示すものと考えられた。

2.1.10. アブロシチニブ代謝物の細胞レベルでの阻害活性

単離酵素に対する活性を評価した試験で JAK1 阻害を示したアブロシチニブの酸化的代謝物 (M1 および M2) の細胞レベルでの活性を評価するため、ヒト全血におけるサイトカイン誘発性 STAT リン酸化の阻害を評価した (PF-04965842_094349)。様々なサイトカインに対して全血におけるサイトカイン誘発性 STAT リン酸化に対する阻害活性を評価したところ、アブロシチニブおよびこれらの代謝物による阻害は類似していた。また、M1 および M2 はヒトケラチノサイト、インターフェロン- γ で刺激した THP-1 細胞またはヒト全血における IL-4, IL-13, IL-22, IL-31 および TSLP 誘発性 STAT リン酸化に対しても阻害活性を示した (PF-04965842_083618)。特に、これらの代謝物は JAK1 非依存性経路を介してシグナルを伝達するサイトカインよりも、JAK1 依存性経路を介してシグナルを伝達するサイトカインを強力に阻害したことから、これらの代謝物は主に JAK1 への作用を介してアブロシチニブの薬理活性に寄与する可能性が高い。同様のシグナル伝達経路におけるアブロシチニブおよびこれらの代謝物の細胞レベルの阻害活性の比較を Table 3 に示す。

Table 3. アブロシチニブおよびヒトでの活性代謝物の細胞レベルでの阻害活性

ヒト由来材料を用いた アッセイ	キナーゼシグナル 伝達ペア	IC ₅₀ (nmol/L)		
		アブロシチニブ ^a	M1	M2
IFN γ 誘発性 pSTAT1	JAK1/JAK2	1690	1950	2160
IL-4 誘発性 pSTAT6	JAK1/JAK2/TYK2	77.0	433	134
IL-6 誘発性 pSTAT1	JAK1/JAK2/TYK2	354	171	136
IL-13 誘発性 pSTAT6	JAK1/JAK2/TYK2	81.9	236	84.1
IL-27 誘発性 pSTAT3	JAK1/JAK2/TYK2	234	382	234
IL-31 誘発性 pSTAT3	JAK1/JAK2	40.0	79.6	56.0
TSLP 誘発性 pSTAT5	JAK1/JAK2	1020	785	271
IL-15 誘発性 pSTAT5	JAK1/JAK3	537	558	353
IL-21 誘発性 pSTAT3	JAK1/JAK3	525	844	487
IL-22 誘発性 pSTAT3	JAK1/TYK2	420	703	198
IL-10 誘発性 pSTAT3	JAK1/TYK2	576	675	233
IFN α 誘発性 pSTAT3	JAK1/TYK2	183	296	90.5
EPO 誘発性 pSTAT5	JAK2/JAK2	7780	9750	9470
IL-23 誘発性 pSTAT3	JAK2/TYK2	>16,300	26,200	6210

a. 未変化体のデータ：試験報告書 PF-04965842_135545, PF-06700841_090414 および PF-06700841_104100

2.2. 効力を裏付ける試験 (In vivo)

2.2.1. ラットアジュバント誘発関節炎 (AIA) モデルにおける薬効

ラット AIA モデルを用いて、アブロシチニブの JAK1 阻害による抗炎症作用を in vivo で評価した (PF-04965842_135545)。完全フロイントアジュバントで免疫した雌 Lewis ラットにおいて、プレチスモグラフィーを用いた後肢容積により発症を確認後、5, 15 または 50 mg/kg/日のアブロシチニブまたは溶媒を 7 日間連日経口投与した。7 日間投与の終了時に、アブロシチニブ 50 mg/kg 投与により有意かつ最大の炎症（後肢の腫脹）の抑制に加え、ex vivo で刺激した全血でのサイトカイン依存性 STAT リン酸化の顕著な阻害が認められた。5 および 15 mg/kg を投与した動物の炎症は有意に抑制されたものの、程度は中等度であったことから、最高用量の 50 mg/kg と比較して低用量での炎症抑制作用が弱いことが示唆された。

さらに、最小有効量を明らかにするため、0.5, 1, 5 および 15 mg/kg/日の用量でアブロシチニブを 7 日間経口投与した。その結果、炎症抑制作用には用量依存性が認められ、1 mg/kg/日以上用量で有意であった。また、アブロシチニブを投与した動物において、ex vivo で刺激した全血のサイトカイン依存性 STAT リン酸化が用量依存的に阻害された。

また、PK/PD モデリング (E_{max} モデル) により解析したところ、EC_{av50} は約 2.7 μ mol/L (870 ng/mL) [非結合型：1.0 μ mol/L (331 ng/mL)]、EC_{av80} は約 11 μ mol/L (3560 ng/mL) [非結合型：4.2 μ mol/L (1350 ng/mL)] と算出された。

3. 副次的薬理試験

Table 4 ならびに概要表 2.6.3.1 および 2.6.3.3 に要約した一連の副次的薬理試験において、アブロシチニブを評価した。

Table 4. アブロシチニブの副次的薬理試験の概要

In vitro 試験	試験番号	濃度 (μmol/L)	GLP 適用	概要表
広範なリガンド結合	100002108	10	非適用	2.6.3.3
VEGFR2 機能アッセイ	PF-04965842-00-0005 pVEGFR_4-26-20	30 以下	非適用	2.6.3.3
MAO-A および MAO-B 阻害	CYP1503_R4	0.1~100	非適用	2.6.3.3
MAO-A 阻害の可逆性	100042990	100 以下	非適用	2.6.3.3

3.1. アブロシチニブの in vitro 薬理試験 (100002108, PF-04965842-00-0005 pVEGFR_4-26-20, 概要表 2.6.3.3)

受容体, トランスポーター, イオンチャネル (カルシウムチャネルを含む) および酵素の広範なパネルを用いたリガンド結合スクリーニング試験において, 10 μmol/L の単一濃度にて検討を行ったところ, 臨床用量 200 mg 投与時のヒト非結合型 C_{max} (404 ng/mL) のそれぞれ 4.8 倍および 1 倍の曝露比を示した MAO-A (IC_{50} = 6 μmol/L, 1940 ng/mL) および KDR キナーゼ (VEGFR2) (IC_{50} = 1.2 μmol/L, 388 ng/mL) を除き, アブロシチニブの結合阻害または酵素活性阻害は 50%未満であった。

KDR キナーゼの追加試験として実施した, 細胞レベル (KDR 遺伝子を発現させたブタ大動脈内皮細胞) での機能試験では, 30 μmol/L (9700 ng/mL : 臨床用量 200 mg におけるヒト非結合型 C_{max} の 24 倍) 以下の濃度において, アブロシチニブは KDR キナーゼ活性に影響を及ぼさないことが示された。

3.2. アブロシチニブのモノアミン酸化酵素 A (MAO-A) およびモノアミン酸化酵素 B (MAO-B) 阻害能の検討 (CYP1503_R4, 概要表 2.6.3.3)

アブロシチニブが MAO-A および MAO-B を阻害するか否かを明らかにするため, 組換え型 MAO-A または MAO-B を用いて 0.1~100 μmol/L のアブロシチニブ濃度範囲で検討した。アブロシチニブは MAO-A を阻害し, IC_{50} は 7.67 μmol/L (2480 ng/mL : ヒト非結合型 C_{max} の 6.1 倍) であったが, MAO-B は阻害せず, 最高濃度 100 μmol/L (32300 ng/mL : ヒト非結合型 C_{max} の 80 倍) で 98.8%の MAO-B 活性を示した。

3.3. アブロシチニブによる MAO-A 阻害の可逆性の検討 (100042990, 概要表 2.6.3.3)

アブロシチニブによる MAO-A 酵素阻害の可逆性を評価したところ, アブロシチニブは濃度依存的に MAO-A 酵素活性を阻害し, IC_{80} は 10 μmol/L (3230 ng/mL : ヒト非結合型 C_{max} の 8 倍) であった。アブロシチニブによる MAO-A 阻害は透析による薬物除去後に可逆性を示し, 酵素活性は透析 24 時間後までに完全に回復した。

4. 安全性薬理試験

一連の安全性薬理試験において、アブロシチニブを評価した。In vivo 試験では、臨床投与経路である経口投与を選択し（Table 5）、ラットおよびカニクイザルにおける非結合型分率をそれぞれ 0.38 および 0.37^aとして非結合型 C_{max} を算出した。

Table 5. アブロシチニブの安全性薬理試験の概要

試験	試験番号	濃度または用量 ^a	GLP 適用	概要表
In vitro 試験				
hERG パッチクランプ試験	GR347	3, 10, 30, 100 µmol/L	非適用	2.6.3.4
Nav1.5 パッチクランプ試験	GR348	30, 100, 300 µmol/L	非適用	2.6.3.4
hERG パッチクランプ試験	160820.QHJ	10, 30, 100, 300 µmol/L	適用	2.6.3.4
In vivo 試験				
肺機能 – ラット				
RR, TV, MV	GR320	0, 75, 200, 600 mg/kg	適用	2.6.3.4
神経機能 – ラット				
FOB, BT, LA	GR320	0, 75, 200, 600 mg/kg	適用	2.6.3.4
心血管系 – 覚醒ラット				
HR, BT, BP, 身体活動	GR135	0, 100 mg/kg	非適用	2.6.3.4
心血管系 – 覚醒カニクイザル				
ECG, HR, BP, 身体活動	GR321	0, 15, 40, 80, 150 mg/kg	適用	2.6.3.4

a. 単回投与

すべての GLP 試験は、GLP 省令（米国連邦規則集 21 CFR Part 58）を遵守して実施した。米国は経済協力開発機構（OECD）と GLP データの相互受入れを行っている。

4.1. チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO 細胞）を用いた Nav1.5 ナトリウム電流に対するアブロシチニブの作用（GR348, 概要表 2.6.3.4）

ヒト Nav1.5 遺伝子を安定的に遺伝子導入した CHO 細胞を用いて、Nav1.5 イオン電流に対するアブロシチニブの影響を検討した。30, 100 および 300 µmol/L の濃度のアブロシチニブに 5 分間曝露し、パッチクランプ法を用いて CHO 細胞の Nav1.5 電流を記録した。陽性対照にはプロパフェノンを用いた。

30, 100 および 300 µmol/L の濃度で、アブロシチニブは Nav1.5 ナトリウム電流の振幅をそれぞれ 6.0%, 13.8% および 30.7% 阻害した。Nav1.5 電流に対する IC₅₀ は 300 µmol/L（97,000 ng/mL）超であり、臨床用量 200 mg 投与時のヒト非結合型 C_{max}（404 ng/mL）の 240 倍超の曝露比であった。

^a 報告書 ADME-2000-001-0021

4.2. CHO 細胞を用いた hERG カリウム電流に対するアブロシチニブの影響 (■GR347, 概要表 2.6.3.4)

カリウムチャネルをコードする hERG を安定的に遺伝子導入した CHO 細胞に、アブロシチニブを 3, 10, 30 および 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で 5 分間曝露し、パッチクランプ法を用いて hERG イオン電流に対する影響を評価した。陽性対照にシサプリドを用いた。

アブロシチニブは 3, 10, 30 および 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で、hERG 電流の振幅をそれぞれ 1.4%, 5.2%, 16.6% および 41.8% 阻害した。30 $\mu\text{mol/L}$ および 100 $\mu\text{mol/L}$ では統計学的に有意な阻害が認められた。hERG 電流に対する IC_{50} は 100 $\mu\text{mol/L}$ (32,300 ng/mL) 超であり、臨床用量 200 mg 投与時のヒト非結合型 C_{max} (404 ng/mL) の 80 倍超の曝露比であった。

4.3. ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK 細胞) を用いた hERG カリウムチャネルに対するアブロシチニブの影響 [160820.QHJ (■MA090), 概要表 2.6.3.4]

HEK 細胞に安定的に発現させた hERG カリウムイオンチャネルに及ぼすアブロシチニブの影響を 10, 30, 100 および 300 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でパッチクランプ法を用い、生理的温度付近 (33°C ~ 35°C) で評価した。陽性対照にテルフェナジンを用いた。

アブロシチニブは 10, 30, 100 および 300 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で、hERG 電流の振幅を有意にそれぞれ 11%, 21.9%, 50.9% および 77.9% 阻害した。アブロシチニブの hERG カリウム電流に対する IC_{50} は 94.7 $\mu\text{mol/L}$ (30,600 ng/mL) であり、臨床用量 200 mg 投与時のヒト非結合型 C_{max} である 404 ng/mL に対して 76 倍の曝露比であった。

4.4. ラットを用いたアブロシチニブの神経機能および肺機能の評価 (■GR320), 概要表 2.6.3.4)

神経系については、FOB, 体温および自発運動量の定量的測定を、呼吸器系については、呼吸数, 1 回換気量および分時換気量を評価した。

アブロシチニブを 0 (0.5% (w/v) メチルセルロースおよび 0.1% (v/v) ポリソルベート 80 含有精製水), 75, 200 または 600 mg/kg の用量で、雄の Wistar Han ラット (6 匹/群) に単回強制経口投与した。投与約 1 時間後に FOB および体温測定を実施し、その直後にラットを活動モニタリングケージに入れ、自発運動量 (水平および垂直行動) を 30 分間記録した。加えて、雄 Wistar Han ラット (6 匹/群) に、0, 75, 200 または 600 mg/kg を同様に投与し、全身プレチスモグラフィを用いて投与後 240 分間の呼吸数, 1 回換気量および分時換気量を評価した。サテライト群 (雄 3 匹) に 600 mg/kg を投与し、投与後 1, 3, 7 および 24 時間に、採血して血漿中薬物濃度を測定した。

600 mg/kg まで、呼吸数, 1 回換気量および分時換気量に対する影響は認められなかった。 C_{max} は 35800 ng/mL (非結合型として 13600 ng/mL) であり、臨床用量 200 mg 時のヒト非結合型 C_{max} (404 ng/mL) の 34 倍の曝露比であった。

200 mg/kg 以上で平均体温の低下 (-0.6°C), 75 mg/kg 以上で自発運動量の低下が認められた。対照群と比較して、75, 200 および 600 mg/kg 群における自発運動量は、水平行動でそれぞれ -40%, -46% および -49%, 垂直行動でそれぞれ -46%, -48% および -59% であった。FOB パラメータに対する影響は認められなかった。自発運動量に対する最小影響量 (LOEL) は 75 mg/kg

であり、この時の非結合型 C_{\max} [ラット 1 ヶ月間毒性試験 (12GR318) の投与 1 日の値] 4070 ng/mL は臨床用量 200 mg 投与時のヒト非結合型 C_{\max} である 404 ng/mL の 10 倍の曝露比であった。

4.5. テレメトリーを用いた雄ラットにおけるアブロシチニブの心血管系評価 (■ GR135, 概要表 2.6.3.4)

アブロシチニブを 0 (0.5% (w/v)メチルセルロースおよび 0.1% (v/v)ポリソルベート 80 含有精製水) または 100 mg/kg の用量で、雄 Wistar Han ラット (4 匹/群) に単回強制経口投与した。約 72 時間後にクロスオーバーデザインで用量を変更した。心拍数、平均血圧、収縮期血圧、拡張期血圧、体温および自発運動量を投与前から投与後 24 時間まで記録した。投与後 0.5, 1, 3, 7 および 24 時間にサテライト群の雄 3 匹 (100 mg/kg) から採血し、血漿中アブロシチニブ濃度を測定した。

アブロシチニブ投与後 0~4 時間に心拍数の一過性の増加 (17~26 bpm) が認められたが、ばらつきが大きく、有意な変化ではなかった。また、投与後 4~8 時間に一過性の有意な体温低下 (-0.21°C) が認められた。心拍数、血圧または自発運動量には影響は認められなかった。

100 mg/kg 投与時の C_{\max} (投与後 0.5 時間) の平均値は 8980 ng/mL (非結合型として 3410 ng/mL) であり、臨床用量 200 mg 投与時のヒト非結合型 C_{\max} (404 ng/mL) の 8.4 倍の曝露比であった。

4.6. テレメトリーを用いたカニクイザルにおけるアブロシチニブの心血管系評価 (■ GR321, 概要表 2.6.3.4)

24.3% アブロシチニブおよび 75.7% HPMCAS-MG 含有溶媒 [0.5% (w/v)メチルセルロースおよび 0.5% (w/v) HPMCAS-HF 含有 20 mmol/L トリス緩衝精製水] の SDD 製剤を調製し、テレメトリーを埋め込んだ雄カニクイザル (8 匹) に 0 (45 mg/mL HPMCAS-MF 含有溶媒), 15, 40, 80 および 150 mg/kg の用量でクロスオーバーデザインを用いて単回強制経口投与した。投与前約 1 時間から投与後約 22 時間まで記録を行った。投与前および投与 4 時間後に採血し、血漿中アブロシチニブ濃度を測定した。心血管系評価の後、すべての動物に 15 mg/kg の用量で単回投与し、投与前ならびに投与後 0.5, 1, 2, 4, 7 および 24 時間後に採血し、血漿中アブロシチニブ濃度を測定した。

15, 40, 80 および 150 mg/kg 投与時の投与後 0.5~3.5 時間に用量依存的な心拍数の増加 (それぞれ+9, +15, +21 および+30 bpm) が、15 および 150 mg/kg 投与時の投与後 5~7.75 時間でも心拍数の増加 (それぞれ+6 および+15 bpm) が認められた。15~150 mg/kg 投与時の投与後 0.5~3.5 時間に RR 間隔の短縮 (-20~-82 msec) が認められ、これは心拍数の増加に伴うものであった。15~150 mg/kg 投与時には PR 間隔の短縮 (投与後 0.5~3.5 時間に-3~-8 msec) および QT 間隔の短縮 (投与後 0.5~3.5 時間に-8~-26 msec, 投与後 5~7.75 時間に-15 msec) が認められた。これらの RR 間隔および PR 間隔の短縮は、心拍数増加に伴う二次的変化と考えられた。

150 mg/kg 投与時には拡張期血圧が上昇した (投与後 0.5~3.5 時間に平均 4 mmHg の上昇)。程度は小さいものの、8 例中 4 例で上昇が認められ、溶媒群と比較して 4~8 mmHg の範囲であったことから、この血圧上昇はアブロシチニブ投与に関連すると考えられた。自発運動量または QTc 間隔に対する影響は認められなかった。いずれのパラメータも 22 時間以内に回復した。

0, 40, 80 および 150 mg/kg 投与時に、それぞれ 1, 1, 3 および 6 例に嘔吐が認められた。嘔吐は 80 mg/kg 投与時の 1 例および 150 mg/kg 投与時の 1 例では投与後 4~22 時間に認められたが、その他は投与後 4 時間以内にみられた。

心血管系評価時の TK 評価では、投与後 4 時間の血漿中アブロシチニブ濃度は用量増加に伴い増加し、15, 40, 80 および 150 mg/kg でそれぞれ 427, 2230, 3370 および 3680 ng/mL であった。その後に行った 15 mg/kg 投与では、 C_{max} は 1030 ng/mL (非結合型として 381 ng/mL) であり、 T_{max} は 2.2 時間、投与後 4 時間における血漿中アブロシチニブ濃度は 600 ng/mL であり、前述の 15 mg/kg 投与時の値と同等であった。

最小影響量の 15 mg/kg での非結合型 C_{max} は 381 ng/mL であり、これは臨床用量 200 mg QD 投与時のヒト非結合型 C_{max} である 404 ng/mL の 0.9 倍であった。なお、150 mg/kg における C_{max} は、カニクイザルを用いた単回投与毒性試験 (12MA052) における非結合型 C_{max} (4960 ng/mL) であり、臨床用量 200 mg QD 投与時のヒト非結合型 C_{max} の 12 倍であった。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

アブロシチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察および結論

効力を裏付ける試験として、各 JAK ファミリーの阻害、細胞増殖の阻害およびヒト全血/PBMC での STAT リン酸化阻害によるアブロシチニブの *in vitro* 特性の確認ならびに関節炎モデル動物での *in vivo* 試験を実施した。

副次的薬理試験として、広範な受容体、トランスポーター、イオンチャネルおよび酵素に対するアブロシチニブの作用を評価した。

安全性薬理試験として、心血管系への影響を *in vitro* 試験 (hERG/Nav1.5 電流に対する検討) および *in vivo* 試験で心血管系、呼吸系、中枢神経系に対する影響を検討した。hERG 電流に対する検討、心血管系、呼吸系、中枢神経系に対する検討は GLP を遵守して実施した。また、アブロシチニブの活性代謝物である M1 および M2 について、hERG, Nav1.5 および Cav1.2 に対する阻害能を評価した。

アブロシチニブは ATP との結合を遮断することにより、JAK1 を選択的かつ可逆的に阻害する経口投与が可能な低分子である。他の 3 種類の JAK アイソフォーム (JAK2, JAK3 および TYK2) よりも JAK1 に対する選択性が高く (それぞれ 28 倍, 340 倍超, 43 倍)、また、広範なキナーゼ群と比較しても選択性が高い。2 分子の JAK アイソフォームが介在してシグナル伝達が行われる細胞内では、JAK1 を介するサイトカインのシグナル伝達を選択的に阻害し

(JAK1/TYK2 を介した IFN α のシグナル伝達 [IC_{50} : 32.5 nmol/L] など)、JAK2 のみが介在する受容体あるいは JAK2/TYK2 が介在する受容体に対するよりも阻害活性が高い (JAK2/JAK2 を介した EPO のシグナル伝達の IC_{50} : 794 nmol/L, JAK2/TYK2 を介した IL-23 のシグナル伝達の IC_{50} : 2130 nmol/L)。この JAK1 阻害に比べて比較的弱い JAK2 阻害は臨床用量での EPO や TPO 阻害あるいは JAK2 の二量体依存性受容体に関連する貧血や血小板減少などの作用を軽減すると考えられる。アブロシチニブのヒト循環血中代謝物 2 種 (M1 および M2) は、アブロシ

チニブと同様に JAK1 依存性経路を介したサイトカイン阻害プロファイルを示したが、同様にヒト循環血中に認められる M4 は薬理活性を示さなかった。

副次的薬理試験では MAO-A および KDR キナーゼ (VEGFR2) に対する阻害作用がみられた。MAO-A に対する阻害は可逆的であった。カニクイザルの反復投与毒性試験では VEGF に関連する影響はみられなかった。以上のように、検討した受容体、トランスポーター、イオンチャネルおよび酵素が関与する安全性上の懸念は無いと考えられた。

アブロシチニブ、M1 および M2 について、心筋イオンチャネル (hERG, Nav1.5, Cav1.2) には臨床用量での影響はないと考えられた。

In vivo の安全性薬理試験ではラットで自発運動量および体温低下、カニクイザルで心拍数および拡張期血圧の上昇がみられた。QTc 延長を含む QT 間隔の変化は認められなかった。

以上の包括的な非臨床薬理試験成績は、AD 患者へのアブロシチニブ投与の妥当性を裏付けているものとする。

参考文献

- ¹ Zhang Y, Zhou B. Functions of thymic stromal lymphopoietin in immunity and disease. Immunol Res. 2012; 52 (3):211-23.
- ² Keegan AD, Johnston JA, Tortolani PJ, et al. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: Analysis of Janus kinase activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(17):7681-5.
- ³ Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. Blood. 2001; 98(9):2720-25.
- ⁴ Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. J Biol Chem. 1995; 270(10):4979-82.

TABLE OF CONTENTS


2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW.....	2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS.....	5
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS	12
2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY	13

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Abrocitinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics				
Cellular potency of abrocitinib: Inhibition of JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2 kinases	Human recombinant enzymes	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-083448
Activity of abrocitinib in kinase selectivity panel assays	Human recombinant enzymes	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-072404
Cellular potency of abrocitinib metabolites; M1 (PF-06471658), M2 (PF-07055087), M3 (PF-07055090), and M4 (PF-07054874): inhibition of JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2 kinases	Human recombinant enzymes	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-081001
Cellular potency and selectivity of abrocitinib: effect on cytokine-dependent STAT phosphorylation	Human PBMCs	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-083721
Cellular potency and selectivity of abrocitinib: effect on cytokine-dependent STAT phosphorylation	Human whole blood and CD34 ⁺ progenitor cells	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-083613
Effect of abrocitinib on TSLP induced STAT 5 phosphorylation	Human whole blood	In Vitro	PWRDM	PF-06700841-[REDACTED]-104100
Effect of abrocitinib on IL-4, IL-13, IL-22, and IL-31 induced STAT phosphorylation in cellular assays	HT-29 and THP-1 cells, human whole blood, primary keratinocytes, and primary intestinal epithelial cells	In Vitro	PWRDM	PF-06700841-[REDACTED]-090414
Effects of abrocitinib on IL-22 induced pSTAT3	Human keratinocytes	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-131447
Effect of abrocitinib on thrombopoietin, IL-6 signaling, and CD41 ⁺ cell expansion	Megakaryocyte precursor cells	In Vitro	PWRDM	CP-699550-[REDACTED]-094745
Effects of abrocitinib on clearance of thrombopoietin	Human platelets	In Vitro	PWRDM	CP-690550-[REDACTED]-033455
Effects of abrocitinib on SLE serum- and complex-induced steroid sparing and interferon gene expression	Human SLE serum and PBMCs	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-083816
Cellular potency and selectivity of abrocitinib metabolites; M1 (PF-06471658), M2 (PF-07055087), and M3 (PF-07055090): effect on cytokine-dependent STAT phosphorylation	Human whole blood	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-094349
Cellular potency of two abrocitinib metabolites, M1 (PF-06471658) and M2 (PF-07055087): inhibition IL-4, IL-13, IL-22, IL-31 and TSLP induced STAT phosphorylation	Human keratinocytes, IFN γ primed THP-1 cells or human whole blood	In Vitro	PWRDM	PF-04965842-[REDACTED]-083618

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW**Test Article: Abrocitinib**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Efficacy, biomarker identification, and pharmacodynamic evaluation in rats	Rat AIA Model	Oral Gavage	PWRDM	PF-04965842  135545

CD = cyclin dependent; HT-29 = human colonic epithelial cells; IFN = interferon; IL = interleukin; JAK = Janus kinase; M = metabolite; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; pSTAT = phosphorylated STAT; PWRDM = Pfizer Worldwide Research, Development & Medical; SLE = systemic lupus erythematosus; STAT = signal transducer and activator of transcription; THP-1 = human leukemia monocytic cell line; TSLP = thymic stromal lymphopoietin; TYK2 = tyrosine kinase 2.

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Abrocitinib

Type of Study	Species/Strain or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number (Sponsor Reference Number)
Secondary Pharmacodynamics					
Broad Ligand Binding	GPCR receptors, transporters, ion channels, and enzyme targets	In Vitro	No	CEREP ^a	100002108
VEGFR2 Functional Assay	PAE cells transfected with KDR gene	In Vitro	No	NovaScreen Biosciences Corporation ^b	PF-04965842-00-0005 pVEGFR_4-26-20
MAO-A and MAO-B Inhibition	Isolated enzyme	In Vitro	No	Cyprotex US, LLC ^c	CYP1503_R4
Reversibility MAO-A of Inhibition	Isolated enzyme	In Vitro	No	Eurofins Cerep ^a	100042990
Safety Pharmacology					
Patch-clamp	CHO cells stably expressing Nav1.5 sodium current	In Vitro	No	PWRDM	GR348
Patch-clamp	CHO cells stably expressing hERG potassium current	In Vitro	No	PWRDM	GR347
Patch-clamp	HEK293 cells stably expressing hERG potassium current	In Vitro	Yes	ChanTest Corporation ^d	160820.QHJ (MA090)
Pulmonary/Neurofunctional	Rat/Wistar Han	Oral Gavage	Yes	PWRDM	GR320
Cardiovascular	Rat/Wistar Han	Oral Gavage	No	PWRDM	GR135
Cardiovascular	Monkey/Cynomolgus	Oral Gavage	Yes	PWRDM	GR321
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Studies not conducted					

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practice; GPCR = G protein coupled receptors; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; KDR = kinase insert domain receptor; MAO = monoamine oxidase; PAE = porcine aortic endothelial; PWRDM = Pfizer Worldwide Research, Development & Medical; VEGFR2 = vascular endothelial growth factor receptor-2.

a. Celle l'Evescault, France.

b. Hopkinton, MA.

c. Watertown, MA.

d. Cleveland, OH.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Gender	Noteworthy Findings		
Report Number: PF-04965842		083448					
Cellular potency of abrocitinib: kinase inhibition using recombinant enzymes	Human	In Vitro	0.0001 to 10 μM	N = 13 to 15	Abrocitinib		
					IC₅₀ nM (ng/mL)		
					K_m for ATP	1 mM ATP	
					JAK1	3.27 (1.06)	29.2 (9.44)
					JAK2	30.3 (9.80)	803 (260)
					JAK3	493 (159)	>10000 (>3230)
TYK2	53.8 (17.4)	1250 (404)					
Report Number: PF-04965842		072404					
Activity of abrocitinib in kinase selectivity panel assays using recombinant enzymes	Human	In Vitro	1 μM	40 kinases	No inhibition >30.2% for all kinases evaluated except for JAK3 (60.6%)		
Report Number: PF-04965842		081001					
Biochemical potency of M1 (PF-06471658), M2 (PF-07055087), and M4 (PF-07054874): kinase inhibition using recombinant enzymes	Human	In Vitro	100 pM to 10 μM	N = 3	Abrocitinib Metabolites		
					IC₅₀ nM (ng/mL)^a		
					M1 (PF-06471658)	M2 (PF-07055087)	
					JAK1	43.4 (14.7)	17.9 (6.08)
					JAK2	1140 (387)	886 (301)
					JAK3	>10000 (3390)	>10000 (3390)
TYK2	3190 (1080)	1210 (411)					
NOTE: The IC ₅₀ values for M4 (PF-07054874) for JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2 were all >10000 nM (3390 ng/mL).							

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 083721

Cellular potency and selectivity of abrocitinib: effect on cytokine-dependent pSTAT in PBMCs

Human In Vitro 0.001 to 20 μ M N = 1 to 4

Abrocitinib	
Cytokine	IC ₅₀ nM (ng/mL)
JAK1/TYK2 Signaling Pair	
IFN α	32.5 (10.5)
IL-10	142 (45.9)
JAK1/JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-27	58.1 (18.8)
JAK1/JAK3 Signaling Pair	
IL-15	90.3 (29.2)
JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-23	2130 (689)
JAK2/JAK2 Signaling Pair	
EPO	794 (257)

Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 083613

Cellular potency and selectivity of abrocitinib: effect on cytokine-dependent pSTAT in whole blood and CD34⁺ progenitor cells

Human In Vitro 0.001 to 20 μ M N = 4 to 9

Abrocitinib	
Cytokine	IC ₅₀ nM (ng/mL)
JAK1/TYK2 Signaling Pair	
IFN α	183 (59.2)
IL-10	576 (186)
JAK1/JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-27	234 (75.7)
IL-6 (CD3 ⁺ cells)	354 (114)
IL-6 (CD14 ⁺ cells)	167 (54.0)
JAK1/JAK2 Signaling Pair	
IFN γ (lymphocyte)	161 (52.1)
IFN γ (CD14 ⁺ cells)	1690 (547)
JAK1/JAK3 Signaling Pair	
IL-15	537 (174)
IL-21	525 (170)
JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-12	9730 (3150)
IL-23	>16300 (>5270)
JAK2/JAK2 Signaling Pair	
EPO	7780 (2520)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Report Number: PF-06700841	<div></div>	104100				
Effect of abrocitinib on STAT5 phosphorylation in TSLP stimulated whole blood	Human	In Vitro	0.0003 to 20 μM	N = 3	TSLP IC50 = 1020 nM (330 ng/mL)	
Report Number: PF-06700841	<div></div>	090414				
Effect of abrocitinib on STAT phosphorylation in IL-4, IL-13, IL-22, and IL-31 induced whole blood, primary keratinocytes, primary intestinal epithelial, HT-29, and THP-1 cells	Human	In Vitro	0.0003 to 30 μM	N = 2 to 7	Abrocitinib	
					Whole Blood Cell Type	IC50 nM (ng/mL)
					B Cells^c	
					IL-4	503 (163)
					IL-13	285 (92.2)
					T Cells^c	
					IL-4	266 (86.0)
					Monocytes^c	
					IL-4	185 (59.8)
					IL-13	351 (114)
					Primary Keratinocytes^c	
					IL-4	77.0 (24.9)
					IL-13	81.9 (26.5)
					IL-22 ^d	420 (136)
					Primary Intestinal Epithelium^d	
IL-22	1240 (401)					
HT-29 Cells^c						
IL-4	118 (38.2)					
IL-13	111 (35.9)					
THP-1 Cells^d						
IL-31	40.0 (12.9)					
Report Number: PF-04965842	<div></div>	131447				
STAT3 phosphorylation in IL-22 treated keratinocytes	Human	In Vitro	0.0003 to 20 μM	N = 5	IL-22 IC50 = 486 nM (157 ng/mL)	

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Report Number: CP-699550 [REDACTED] 094745					
Effect of abrocitinib on TPO and IL-6 signaling, and CD41a ⁺ cell expansion in megakaryocyte precursor cells	Human	In Vitro	0.0003 to 20 µM	N = 2	<u>TPO-induced pSTAT5</u> IC ₅₀ = 1060 nM (343 ng/mL) <u>IL-6-induced pSTAT3</u> IC ₅₀ = 83.7 nM (27.1 ng/mL) <u>Expansion of CD41a⁺ cells</u> IC ₅₀ = 5670 nM (1830 ng/mL)
Report Number: CP-690550 [REDACTED] 033455					
Effects of abrocitinib on clearance of TPO by platelets	Human	In Vitro	0.003 to 20 µM	N = 3 donors	Dose-dependent TPO clearance IC ₅₀ = 10800 nM (3490 ng/mL) which correlates with the inhibition of JAK2 kinase activity (IC ₅₀ = 803 nM ^b).
Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 083816					
Effects of abrocitinib on SLE complex-induced steroid sparing and INF gene expression in serum and PBMCs	Human	In Vitro	1 µM	N = 5	PF-04965842 reverses SLE serum-induced desensitization of cultured pDCs to steroid killing. <u>Gene Expression Inhibition</u> RSAD2 IC ₅₀ = 82.0 nM (26.5 ng/mL) USP18 IC ₅₀ = 114 nM (36.9 ng/mL) GBP1 IC ₅₀ = 107 nM (34.6 ng/mL)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 094349

Cellular potency and selectivity of M1 (PF-06471658) and M2 (PF-07055087): effect on cytokine-dependent pSTAT in whole blood

Human

In Vitro

0.0003 to
60 μ M

N = 2

M1 (PF-06471658)

Cytokine	IC ₅₀ nM (ng/mL)
JAK1/TYK2 Signaling Pair	
IFN α	296 (100)
IL-10	675 (229)
JAK1/JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-27	382 (130)
IL-6 (STAT1)	171 (58.0)
IL-6 (STAT3)	2770 (940)
JAK1/JAK2 Signaling Pair	
IFN γ (CD14 ⁺ cells)	1950 (662)
JAK1/JAK3 Signaling Pair	
IL-15	558 (189)
IL-21	844 (286)
JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-12	33400 (11300)
IL-23	26200 (8890)
JAK2/JAK2 Signaling Pair	
EPO	9750 (3310)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 094349

Cellular potency and selectivity of M1 (PF-06471658) and M2 (PF-07055087): effect on cytokine-dependent pSTAT in whole blood

Human In Vitro 0.0003 to 60 μ M N = 2

M2 (PF-07055087)	
Cytokine	IC ₅₀ nM (ng/mL)
JAK1/TYK2 Signaling Pair	
IFN α	90.5 (30.7)
IL-10	233 (79.1)
JAK1/JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-27	234 (79.4)
IL-6 (STAT1)	136 (46.2)
IL-6 (STAT3)	2260 (767)
JAK1/JAK2 Signaling Pair	
IFN γ (CD14 ⁺ cells)	2160 (733)
JAK1/JAK3 Signaling Pair	
IL-15	353 (120)
IL-21	487 (165)
JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-12	5170 (1750)
IL-23	6210 (2110)
JAK2/JAK2 Signaling Pair	
EPO	9470 (3210)

Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 083618

Cellular potency of M1 (PF-06471658) and M2 (PF-07055087): STAT phosphorylation in IL-4, IL-13, IL-22, IL-31 and TSLP treated keratinocytes, IFN γ primed THP-1 cells or whole blood.

Human In Vitro 0.0003 to 20 μ M N = 2 to 7

Abrocitinib Metabolites		
	IC ₅₀ nM (ng/mL)	
	M1 (PF-06471658)	M2 (PF-07055087)
IL-4 (STAT6)	433 (147)	134 (45.5)
IL-13 (STAT6)	236 (80.1)	84.1 (28.5)
IL-22 (STAT3)	703 (239)	198 (67.2)
IL-31 (STAT3)	79.6 (27.0)	56.0 (19.0)
TSLP (STAT5)	785 (266)	271 (92.0)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Report Number: PF-04965842 [REDACTED] 135545

Efficacy, biomarker identification, and PD evaluation in rats	Lewis Rat (AIA Model)	Oral Gavage	50, 15, 5, 1 or 0.5 mg/kg QD for 7 days	Female (n = 10)	Abrocitinib inhibited paw swelling in a dose dependent manner following 7 days of treatment. Significant dose-dependent reductions in paw swelling and GM-CSF dependent pSTAT5 were observed in all treatment groups compared to vehicle control.
---	-----------------------	-------------	---	-----------------	---

Abrocitinib Plasma Concentrations (Mean ± SD)

Dose (mg/kg)	Peak (ng/mL)	Trough (ng/mL)
0.5	350 ± 77.5	0.806 ± 1.80
1	1600 ± 222	2.34 ± 0.968
15	8700 ± 1110	45.0 ± 15.1
Peak = 15 minutes post dosing. Trough = 24 hours post dosing.		

Note: None of these studies are GLP compliant. A molecular weight of 323.41 g/mol for abrocitinib and 339.41 g/mol for PF-06471658 (M1), PF-07055087 (M2), and PF-07054874 (M4) were used to convert nM to ng/mL where noted.

AIA = Adjuvant-induced arthritis; ATP = Adenosine triphosphate; CD = Cyclin dependent; EPO = Erythropoietin; GBP1 = Guanylate binding protein 1; GLP = Good laboratory practice; GM-CSF = Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor; HT-29 = Human colonic epithelial cells; IC₅₀ = 50% inhibitive concentration; IFN = interferon; IL = Interleukin; JAK = Janus kinase; K_m = Michaelis-Menten constant; M = Metabolite; PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells; PD = Pharmacodynamic; pDCs = Plasmacytoid dendritic cells; pSTAT = Phosphorylated STAT; QD = Once per day; RSAD2 = Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2; SLE = Systemic lupus erythematosus; STAT = Signal transducer and activator of transcription; THP-1 = human leukemia monocytic cell line; TPO = Thrombopoietin; TSLP = Thymic stromal lymphopoietin; TYK2 = Tyrosine kinase 2; USP18 = Ubiquitin specific peptidase 18.

a. IC₅₀ determined at 1 mM ATP.

b. Value obtained from Study Report: PF-04965842 [REDACTED] 083448.

c. Value determined from phosphorylation of STAT6.

d. Value determined from phosphorylation of STAT3.

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Abrocitinib

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (μM)	Results	GLP Compliance	Study Number
Broad Ligand Binding	GPCR receptors, transporters, ion channels, and enzyme targets	10	KDR kinase (VEGFR2): 93.8% Inhibition; IC ₅₀ value of 1.2 μM	No	100002108
VEGFR2 Functional Assay	PAE cells transfected with KDR gene	up to 30	MAO-A: 67.0 % Inhibition; IC ₅₀ value of 6 μM VEGFR2: IC ₅₀ value of >30 μM	No	PF-04965842-00-0005 pVEGFR 4-26-20
MAO-A and MAO-B Inhibition	Isolated enzyme	0.1 to 100	MAO-A: Inhibitor against MAO-A with IC ₅₀ value of 7.67 μM. 15.1% MAO-A activity at 100 μM. MAO-B: Not inhibitor against MAO-B with IC ₅₀ value of >100 μM. 98.8% MAO-B activity at 100 μM.	No	CYP1503_R4
Reversibility of MAO-A Inhibition	Isolated enzyme	up to 100	MAO-A: Concentration-dependent inhibition with IC ₈₀ value of 10 μM. Inhibition was reversible after dialysis (maximum recovery of activity by 24 hours).	No	100042990

GLP = Good Laboratory Practice; GPCR = G protein coupled receptors; IC₅₀ = 50% inhibition concentration; IC₈₀ = 80% inhibition concentration; KDR = kinase insert domain receptor; MAO = monoamine oxidase; PAE = porcine aortic endothelial; VEGFR2 = vascular endothelial growth factor receptor-2.

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Abrocitinib

In Vitro					
Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (μM)	Results	GLP Compliance	Study Number (Sponsor Reference Number)
Patch-clamp	CHO cells stably expressing Nav1.5 sodium current	30, 100, 300	6.0%, 13.8%, and 30.7% inhibition of Nav1.5 current at 30, 100, and 300 μM, respectively IC ₅₀ was >300 μM	No	■ GR348
Patch-clamp	CHO cells stably expressing hERG potassium current	3, 10, 30, 100	1.4%, 5.2%, 16.6%, and 41.8% inhibition of hERG current at 3, 10, 30, and 100 μM, respectively IC ₅₀ was >100 μM	No	■ GR347
Patch-clamp	HEK293 cells stably expressing hERG potassium current	10, 30, 100, 300	11%, 21.9%, 50.9%, and 77.9% inhibition of hERG current at 10, 30, 100 and 300 μM, respectively IC ₅₀ was 94.7 μM	Yes	160820.QHJ (■ MA090)

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; IC₅₀ = 50% inhibition concentration.

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Abrocitinib

In Vivo							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses ^a (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Pulmonary RR, TV, MV	Rat/ Wistar Han	Oral gavage, 10 mL/kg (0.5% Methylcellulose [w/v] and 0.1% polysorbate 80 [v/v]) Lot GR06528	0, 75, 200, 600	6M	None	Yes	GR320
Central Nervous System FOB, BT, LA ^b			0, 75, 200, 600	6M	75 mg/kg: ↓ LA (40% horizontal; 46% vertical) 200 mg/kg: ↓ BT (0.6°C), ↓ LA (46% horizontal; 48% vertical) 600 mg/kg: ↓ BT (0.6°C), ↓ LA (49% horizontal; 59% vertical)		
Toxicokinetic Parameters ^c (GR320):							
Dose (mg/kg)		600					
C _{max} (ng/mL)		35800					
AUC ₂₄ (ng•h/mL)		689000					
T _{max} (h)		4.3					

AUC₂₄ = area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours; BT = body temperature; C_{max} = maximum observed concentration; FOB = functional observational battery; GLP = Good Laboratory Practice; LA = locomotor activity; MV = minute volume; RR = respiratory rate; T_{max} = time to reach C_{max}; TV = tidal volume.

a. Single dose unless specified otherwise.

b. Vertical and horizontal movements.

c. A separate satellite group of 3 males was utilized for toxicokinetic evaluation.

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Abrocitinib

In Vivo							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain (Model)	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses ^a (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular HR, BT, Activity ^b Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP	Rat/ Wistar Han (telemetry implanted)	Oral gavage, 10 mL/kg (0.5% [w/v] Methylcellulose and 0.1% [v/v] polysorbate 80 in purified water) Lot PF-04965842-00-0008	0, 100	4M	100 mg/kg: ↓ Body temperature (0.21°C; 4-8 hours postdose)	No	GR135
Toxicokinetic Parameters ^c (GR135):							
Dose (mg/kg)		100					
C _{max} (ng/ml)		8980					
AUC ₂₄ (ng•h/mL)		117000					
T _{max} (h)		0.5					

AUC₂₄ = area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours; BP = blood pressure; BT = body temperature; C_{max} = maximum observed concentration; DBP = diastolic BP; GLP = Good Laboratory Practice; HR = heart rate; M = male; MBP = mean BP; SBP = systolic BP; T_{max} = time to reach C_{max}.

a. Single dose unless specified otherwise; animals were dosed in a cross-over study design.

b. Derived from telemetry signal strength; animal movements previously described as locomotor activity were also inclusive of all general physical activity measured in arbitrary units; therefore, the term “physical activity” is a considered a more appropriate designation for the purpose of this study.

c. A separate satellite group of 3 males was utilized for toxicokinetic evaluation.

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Abrocitinib

In Vivo							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain (Model)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Doses ^a (mg/kg)	Number/ Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular ECG: RR-I, PR-I, QRS-I, QT-I, QTc, HR, Physical activity Systemic Arterial BP: SBP, DBP, MBP	Monkey/ Cynomolgus (ambulatory telemetry)	Oral gavage, 10 mL/kg (HPMCAS-HF in 20 mM Tris buffer in purified water, approximately pH 7.4/SDD ^b) Lot 3623-101	0, 15, 40, 80, 150	8M	15 mg/kg: ↑ HR (6-9 bpm; 0.5-7.75 HPD) ↓ RR-I (20 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ PR-I (3 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ QT-I (8 msec; 0.5-3.5 HPD) 40 mg/kg: ↑ HR (15 bpm; 0.5-3.5 HPD) ↓ RR-I (44 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ PR-I (5 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ QT-I (11 msec; 0.5-3.5 HPD) 80 mg/kg: Emesis ↑ HR (21 bpm; 0.5-3.5 HPD) ↓ RR-I (60 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ PR-I (7 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ QT-I (16 msec; 0.5-3.5 HPD) ↑ DBP (3 mmHg; 0.5-3.5 HPD) 150 mg/kg: Emesis ↑ HR (15-30 bpm; 0.5-7.75 HPD) ↓ RR-I (46-82 msec; 0.5-7.75 HPD) ↓ PR-I (8 msec; 0.5-3.5 HPD) ↓ QT-I (15-26 msec; 0.5-7.75 HPD) ↑ DBP (4 mmHg; 0.5-3.5 HPD)	Yes	GR321
Toxicokinetic Parameters (GR321):							
Dose (mg/kg)		0	15	40	80	150	15 ^c
C _{max} (ng/ml)		NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d	1030
AUC ₂₄ (ng•h/mL)		NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d	4980
T _{max} (h)		NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d	NA ^d	2.2
Plasma Concentrations (ng/mL) – 4 HPD		NA ^e	427	2230	3370	3680	600

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Abrocitinib

In Vivo							
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain (Model)	Method of Administration (Vehicle/ Formulation) Test Article Lot Number	Doses ^a (mg/kg)	Number/ Sex/ Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Study █ GR321 – Continued							

AUC₂₄ = area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours; BP = blood pressure; C_{max} = maximum observed concentration; DBP = diastolic BP; ECG = electrocardiogram; GLP = Good Laboratory Practice; HPD = hours postdose; HPMCAS-HF = hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-high fine; HR = heart rate; M = male; MBP = mean BP; NA = not applicable; QTc = corrected QT interval; SBP = systolic BP; SDD = spray dried dispersion; T_{max} = time to reach C_{max}.

- a. Single dose unless specified otherwise; animals were dosed in a cross-over study design during cardiovascular portion of the study.
- b. Formulated as an SDD with 24.3% PF-04965842 and 75.7% HPMCAS-medium granular.
- c. Plasma samples obtained for toxicokinetic analyses during the toxicokinetic leg of the study.
- d. Parameter not measured during the cardiovascular leg of the study.
- e. All samples below limit of quantitation (1.00 ng/mL).