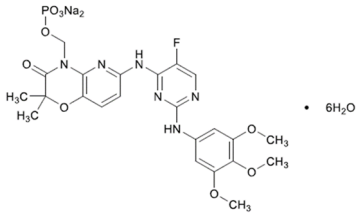
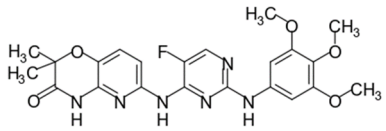
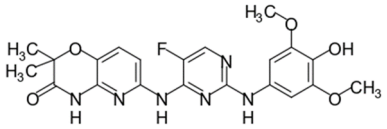
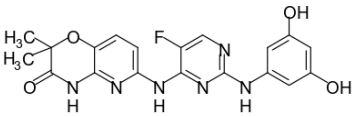
目次

2.4 非臨床に関する概括評価 6
2.4.1 非臨床試験計画概略 6
2.4.1.1 薬理試験 6
2.4.1.2 薬物動態試験 7
2.4.1.3 毒性試験 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 *In vitro* 試験 8
2.4.2.1.2 *In vivo* 試験 8
2.4.2.2 副次的薬理試験 8
2.4.2.2.1 *In vitro* 試験 8
2.4.2.2.2 *In vivo* 試験 9
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.3.1 分析法 12
2.4.3.2 吸収 12
2.4.3.3 分布 13
2.4.3.4 代謝 14
2.4.3.5 排泄 14
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 15
2.4.4 毒性試験 17
2.4.4.1 単回投与毒性試験 19
2.4.4.2 反復投与毒性試験 19
2.4.4.3 遺伝毒性試験 20
2.4.4.4 がん原性試験 20
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 21
2.4.4.6 新生児を用いた試験 21
2.4.4.7 その他の毒性試験 21
2.4.5 総括及び結論 23
2.4.5.1 薬理試験 23
2.4.5.1.1 効力を裏付ける試験 23
2.4.5.1.2 副次的薬理試験 23
2.4.5.1.3 安全性薬理試験 24
2.4.5.2 薬物動態試験 24
2.4.5.2.1 吸収 24
2.4.5.2.2 分布 25

2.4.5.2.3 代謝 25
2.4.5.2.4 排泄 25
2.4.5.2.5 薬物動態学的薬物相互作用 25
2.4.5.3 毒性試験 26
2.4.5.4 ヒト及び主要な反復投与毒性試験における曝露量 28
2.4.6 参考文献 30

化合物一覧

略号・一般名	化学名	構造式	由来
R788 ホスタマチニブナトリウム水和物 R935788	Disodium (6-{[5-fluoro-2-(3,4,5-trimethoxyanilino)pyrimidin-4-yl]amino}-2,2-dimethyl-3-oxo-2,3-dihydro-4*H*-pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazin-4-yl)methyl phosphate hexahydrate		原薬
R406 R940406	—		活性本体
R529 R949529	—		代謝物 R406 のパラ-O-脱メチル体
R567 R949567	—		代謝物 （R406 の 3,5-ベンゼンジオール体）
ホスタマチニブカルシウム塩	—	—	R788 遊離酸のカルシウム塩

略号一覧

略号	略していない表現	内容
ACE	Angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ADP	Adenosine 5'-diphosphate	アデノシン 5'-二リン酸
AKT	Serine/threonine-protein kinase（Protein kinase B）	セリン/スレオニン蛋白質キナーゼ（プロテインキナーゼ B）
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
APOE	Apolipoprotein E	アポリポ蛋白 E
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
$AUC_{0\text{-}24}$	Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours	0～24 時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	Area under the plasma concentration-time curve from 0 to infinity	0～無限大時間の血漿中濃度-時間曲線下面積
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳がん耐性蛋白質
bid	bis in die	1 日 2 回投与
Btk	Bruton's tyrosine kinase	ブルトン型チロシンキナーゼ
BP	Blood pressure	血圧
CAC	Carcinogenicity Assessment Committee	がん原性評価委員会
Caco-2 細胞	Human Caucasian colon adenocarcinoma cells	ヒト結腸癌由来細胞株

略号	略していない表現	内容
CD	Cluster of differentiation	分化抗原群
CD62P	Cluster of differentiation 62 platelet	血小板に発現する CD62
CL	Clearance	クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CMC	Carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
CYP	Cytochrome P450	シトクローム P450
dP/dt max	Maximum rate of rise of left ventricular pressure	左室圧最大変化率
EC_{50}	Half maximal effective concentration	50%効果濃度
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	内皮型一酸化窒素合成酵素
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
FcγR	Fc gamma receptor	Fc 受容体γ鎖
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の非臨床試験の安全性に関する信頼性を確保するための基準
GP	Glycoprotein	糖タンパク質
HPLC, LC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
ITP	Idiopathic thrombocytopenic purpura Immune thrombocytopenia	特発性血小板減少性紫斑病 免疫性血小板減少症
iv	Intravenous administration	静脈内投与
JAN	Japanese Accepted Names	日本医薬品一般的名称
Kd	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
Ki	inhibition constant	阻害定数
K_I	Concentration of the inhibitor that yields a 50% rate of the maximum inactivation	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_{inact}	Maximum inactivation rate constant	最大不活性化速度定数
KLH	Keyhole limpet haemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
Km	Michaelis constant	ミカエリス定数
Lyn	Lck/Yes-related tyrosine kinase	Lyn キナーゼ
MATE	Multidrug and toxin extrusion	多剤及び毒素排出
MDR-MDCK 細胞	Multidrug-resistance Madin-Darby canine kidney	多剤排出トランスポーター発現イヌ腎臓尿細管上皮細胞株
MS/MS	Tandem mass spectrometry	タンデム質量分析法
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No observed effect level	無影響量
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PG	Propylene-glycol	プロピレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QWBA	Quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
Ret	Rearranged during transfection proto-oncogene	トランスフェクション時に再構成したがん原遺伝子
SK-N-SH	human neuroblastoma	ヒト神経芽細胞腫
Syk	Spleen tyrosine kinase	脾臓チロシンキナーゼ
$t_{1/2}$	Terminal elimination half-life	終末相の消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス

略号	略していない表現	内容
T_{max}	Time to reach maximum concentration or maximum response	最高濃度又は最大反応到達時間
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TPGS	Tocopheryl polyethylene glycol succinate	トコフェリルポリエチレングリコールコハク酸
TT	medullary thyroid cancer	甲状腺髄様癌
UGT	Uridine 5'-diphosphate-glucuronosyl transferase	UDP-グルクロン酸転移酵素
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態の分布容積

2.4 非臨床に関する概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

ITP は、免疫的機序により血小板減少を来す後天性疾患であり、主に血小板膜糖蛋白［GPIIb/IIIa（αIIbβ3、CD41/CD61）、GPIb/IX（CD42b）など］を標的とする抗血小板自己抗体によりオプソニン化された血小板が、脾臓等の網内系細胞によって貪食・破壊されることにより生じる [1)]。ITP 患者慢性期の抗血小板自己抗体産生メカニズムとして、網内系マクロファージが提示した血小板膜糖蛋白由来潜在性ペプチドを認識することで、当該ペプチド反応性 $CD4^+$T 細胞が活性化され、ヘルパー活性を介して B 細胞の抗血小板自己抗体産生が誘導される。抗血小板自己抗体によりオプソニン化された血小板は、FcγR を介して網内系マクロファージに貪食・破壊される病的ループにより、抗血小板自己抗体産生が長期に渡って持続するとされる [2)]。

R788 は経口 Syk 阻害剤であり、活性本体 R406 のメチレンリン酸プロドラッグ製剤である。R788 は小腸の ALP によりリン酸基が切断され、R406 に変換される。R406 は、FcγR の活性化と BCR のシグナル伝達に関与する Syk を阻害することで、マクロファージによる血小板の貪食・破壊を抑制する。また、R406 の B 細胞に対する作用が、抗血小板自己抗体産生を抑制する可能性が考えられる。

R788 がこのような作用機序により、ITP の病的ループを断ち切ることで有効性を発揮し得ることを薬理学的に評価するとともに、その生体内における薬物動態、並びに毒性を明らかにした。開発初期の非臨床試験及び臨床試験は R406 を用いて実施されたが、R406 は製剤学的特徴（難溶解性）から商業的開発には不向きであると判断した。一方、プロドラッグである R788 は、より優れた製剤学的特徴を有し、経口投与後に速やかに R406 に変換される。国内第 III 相臨床試験は、成人 ITP 患者（20 歳以上）を対象に R788 の 100 mg 又は 150 mg を 1 日 2 回経口投与して実施した。本薬の臨床使用における影響を評価するために実施した安全性薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験は、それぞれ関連する ICH ガイドラインに準拠した。

2.4.1.1 薬理試験

ITP に対する R788 及び R406 の効力を裏付ける試験として、各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。ヒト Syk 活性に対する R406 の Ki 値、並びにヒト、マウス及びラット Syk 活性に対する阻害作用を検討するための *in vitro* 試験を実施した。また、作用機序を検討するため、初代培養マクロファージにおける FcγR シグナルの活性化指標である TNFα 分泌及び B 細胞における BCR シグナルの活性化指標である B 細胞表面の CD69 の発現量上昇を *in vitro* 試験により評価した。*In vivo* 試験での有効性を評価するために、マウス ITP モデル [3), 4)] における R788 の有効性を検討した [5)]。

副次的薬理試験として、R406 の血小板及び自然免疫への影響、並びに各種酵素、受容体、イオンチャネル、トランスポーター及びキナーゼに対する作用を *in vitro* 試験で検討した。また、R788 及び R406 の止血機能、出血時間、並びに血栓に対する作用を *in vivo* 試験で検討した。

安全性薬理試験として、R406 ベシル酸塩を用いたコアバッテリー試験を実施し、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を評価した。また、R788 及び R406 の血圧への影響を精

査するため、探索的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

ITP モデルマウスを用いた試験は申請資料の信頼性の基準に従って実施した。また、主要な安全性薬理試験は GLP 適用下で実施した。

2.4.1.2 薬物動態試験

ホスタマチニブの吸収、分布、代謝及び排泄を明らかにするためにマウス、ラット、ウサギ及びサルを用いて薬物動態試験を実施した。主に薬理試験及び毒性試験と同じ系統の動物を用いて検討した。*In vivo* 試験で用いた R788 又はホスタマチニブカルシウム塩の投与液は、主要な毒性試験で用いたものと同一又は同様の媒体を用いて調製した。また、開発初期の *in vivo* 試験では、有機溶媒を媒体として R406 ベシル酸塩を投与した。*In vitro* 試験では、ホスタマチニブ及び R406 について検討した。

2.4.1.3 毒性試験

主要な毒性試験は GLP 適用下で実施し、用量設定試験及び探索的試験は GLP 非適用にて実施した。

急性毒性は、マウス小核試験のための用量設定試験の結果を用いて評価した。反復投与毒性試験では、主要な試験で回復群を設け、作用の可逆性を検討した。遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験は標準的な組み合わせで実施した。がん原性試験では、FDA の CAC に試験計画書を提出して評価（Special Protocol Assessment）を受けるとともに、高用量群の死亡の増加に伴った用量変更及び早期の試験終了に関して CAC と合意した [6), 7)]。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

様々な濃度の R406 及び ATP 存在下において、Syk によって生成したリン酸化ペプチドの量と時間の関係から反応速度及び Km を評価し、R406 の Ki 値を算出した。R406 は ATP 競合的にヒト Syk 活性を阻害し、その Ki 値は 30 nmol/L であった（2.6.2.2.1.1）。

蛍光標識されたペプチドを用いて、ヒト、マウス及びラット Syk 活性に対する R406 の阻害作用を評価した。R406 は蛍光ペプチドのリン酸化を阻害し、その IC_{50} 値はヒト、マウス及びラットでそれぞれ 25、20 及び 30 nmol/L であった（2.6.2.2.1.2）。

R406 はヒト末梢血単核細胞由来の初代培養マクロファージにおいて、ヒト IgG による FcγR の架橋刺激を与えた際の TNFα の産生を抑制し、その EC_{50} 値は 111 nmol/L であった（2.6.2.2.1.3）。

R406 はヒト末梢血より単離した初代培養 B 細胞において、抗ヒト IgM 抗体による BCR の架橋刺激を与えた際の B 細胞表面における CD69 の発現量上昇を抑制し、その EC_{50} 値は 216 nmol/L であった（2.6.2.2.1.4）。

R406 はヒト全血に抗ヒト IgG/IgM 抗体を添加し、BCR の架橋刺激を与えた際の B 細胞表面における CD69 の発現量上昇及び Syk の活性化を抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ 5.0 及び 3.5 μmol/L であった（2.6.2.2.1.5、2.6.2.2.1.6）。

2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

マウスに血小板膜糖蛋白［GPIIb/IIIa（CD41/CD61）又は GPIb/IX（CD42）］に対する抗体を投与することで、ITP にみられる血小板数の大幅な減少が誘導されることが知られている[3),4)]。マウスに抗 CD41 抗体又は抗 CD42 抗体を投与することで ITP モデルを作製し、R788 の血小板数の減少に対する有効性を検討した（2.6.2.2.2.1、2.6.2.2.2.2）。その結果、R788 の単回経口投与は、抗 CD41 抗体又は抗 CD42 抗体により誘発される血小板数の減少を用量依存的に抑制し、40 及び 80 mg/kg では、媒体対照に対して有意な血小板数減少抑制作用を示した。

2.4.2.2 副次的薬理試験

2.4.2.2.1 *In vitro* 試験

ヒト末梢血から採取した多血小板血漿を用いて、血小板活性化に対する R406 の作用を血小板活性化マーカーである CD62P を指標に検討した。R406（5 μmol/L）はコラーゲンによる CD62P の発現量上昇に弱い阻害作用を示した。一方、ADP による CD62P の発現量上昇には作用を示さなかった（2.6.2.3.1.1）。

自然免疫に対する R406 の影響を検討した。R406（1～50 μmol/L）はヒト好中球の遊走、ヒト白血球による細菌の食作用、細菌による白血球酸化バースト及び好中球の殺菌活性に明らかな影響を与えなかった（2.6.2.3.1.2）。

R406 の選択性及び特異性を評価するため、140 種類の各種酵素、受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する R406 の作用を結合親和性試験で検討した。アデノシン A3 受容体、アデノシントランスポーター及びモノアミントランスポーターに対して R406 の 10 μmol/L

は 50%以上の阻害率を示し、その中で最も強い阻害作用を示したアデノシン A3 受容体に対する IC_{50} 値は 80.6 nmol/L であった（2.6.2.3.2.1）。

さらに、R406 の選択性及び特異性を評価するため、203 種類の各種酵素、受容体、トランスポーター及び 8 種類のイオンチャネルを含む多様な分子標的に対する R406 の作用を結合親和性、酵素活性及び電気生理学的試験で検討した。R406 は 17 の分子標的に対して IC_{50} 値が算出され、特にアデノシン A3 受容体に対する IC_{50} 値は 18 nmol/L と強い阻害作用を示した（2.6.2.3.2.2）。

R406 のキナーゼに対する選択性及び特異性を評価するため、388 種類のキナーゼに対する R406 の作用を競合結合親和性試験で検討した。197 種類のキナーゼに対して R406 の 10 μmol/L は 80%以上の阻害率を示し、192 種類のキナーゼに対しては 1 μmol/L 以下の Kd 値を示した（2.6.2.3.2.3）。

さらに、R406 のキナーゼに対する選択性及び特異性を評価するため、139 種類のキナーゼに対する R406 の作用をキナーゼ活性試験で検討した。R406 は 120 種類のキナーゼに対して 3～3490 nmol/L の範囲で IC_{50} 値を示した（2.6.2.3.2.4）。

95 種類のプロテインキナーゼに対する R406 の作用をキナーゼ活性試験で検討した。ATP 濃度が 10 μmol/L において、R406 の 0.3、1 及び 3 μmol/L はそれぞれ 28、54 及び 66 種類のプロテインキナーゼの活性を 50%以上阻害した。また、R406 は Syk に対して生化学アッセイ及び細胞アッセイにおいて同等の阻害作用を示したが、Lyn、Aurora 及び Btk では生化学アッセイと比較し、細胞アッセイにおいて阻害作用が低下した（2.6.2.3.2.5）。

腫瘍の血管新生に重要な役割を果たす VEGF 受容体 2 に対する R406 の作用を検討した。R406 は VEGF 受容体 2 活性を阻害し、生化学アッセイにおいて IC_{50} 値は 43 nmol/L、HUVEC 細胞を用いたアッセイにおいて EC_{50} 値は 333 nmol/L であった（2.6.2.3.2.6）。

神経系や腎臓の発達に重要な Ret のキナーゼ活性に対する R406 の作用を検討した。R406 は Ret のキナーゼ活性を強力に阻害し、生化学アッセイにおいて IC_{50} 値は 5 nmol/L、SK-N-SH 細胞及び TT 細胞を用いたアッセイにおいて EC_{50} 値は 80 nmol/L であった（2.6.2.3.2.7）。

2.4.2.2.2 *In vivo* 試験

マウスを用いて止血機能に対する R406 の作用を検討した。R406 ベシル酸塩（10～100 mg/kg）を経口投与したマウスにおいて、25 μmol/L までの血漿中濃度で出血時間に影響を与えなかった（2.6.2.3.3.1）。

ラットを用いて作製した血栓症モデルにおいて、R788 の血栓及び出血時間に対する作用を検討した。R788（10～100 mg/kg）は経口投与によりラット血栓症モデルにおいて弱い抗血栓作用を示したが、出血時間の延長は認められなかった（2.6.2.3.3.2）。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験の概要を表 2.4.2.3-1 に示す。R406 ベシル酸塩を用いた安全性薬理コアバッテリー試験を実施し、呼吸系、中枢神経系及び心血管系に及ぼす影響を評価した。サルの心血管系試験では 50 mg/kg で心拍数の軽度な減少及び血圧の上昇傾向が認められ、ラットの中枢神経系試験では 50 mg/kg で軽度な活動性低下が認められた。呼吸系も含め、その他検討した用量範囲において特記すべき影響は認められず、R406 ベシル酸塩の忍容性は良好であった。

表 2.4.2.3-1　　安全性薬理試験の概要

Study Number/ Study Type	Test System/ Method of Administration	Number/ Group (Total No.)	Doses	Results
Core Battery Studies				
N-940406-0003/ hERG Screen (non-GLP)	hERG transfected HEK293 cells/ *in vitro*	4	R406: 2 µmol/L	No inhibition of hERG tail current.
G-940406-0001/ Cardiovascular Safety Pharmacology (GLP)	Cynomolgus Monkeys/ Oral (gavage)	4 male (Latin Square Design)	R406 besylate: 0, 5, 15, 50 mg/kg	Well tolerated; slight reduction in heart rate at 50 mg/kg (max decrease of ~ 30 bpm at 180 min post-dose). And trend for increased BP was also seen at 50 mg/kg. NOEL: 15 mg/kg
G-940406-0002/ Central Nervous System Safety Pharmacology (GLP)	Sprague Dawley Rats/ Oral (gavage)	6 male (30)	R406 besylate: 0, 5, 15, 50 mg/kg Pos. control: Chlorpromazine	Well tolerated; slight reduction in activity at 50 mg/kg (reduced touch response at all time points with a peak effect at 120 min post-dose; decreased startle response, decreased locomotion and decreased grooming at 90 min post-dose). NOEL: 15 mg/kg
G-940406-0003/ Pulmonary Safety Pharmacology (GLP)	Sprague Dawley Rats/ Oral (gavage)	8 male (40)	R406 besylate: 0, 5, 15, 50 mg/kg Pos. control: Baclofen	Well tolerated NOEL: 50 mg/kg
Investigative Studies (non-GLP)				
3228[redacted]/ The Effects of R940406 on Isolated Rat Heart	Rat heart/ *in vitro*	6	R406: Up to 300 nmol/L	R406 had no effects on coronary flow, heart rate or cardiac contractility.
1083[redacted]/ Investigative Studies in Endothelial Cell Cultures	Human endothelial cells/ *in vitro*	NA	R406: Up to 1 µmol/L	R406 inhibited VEGF-stimulated nitric oxide production, and inhibited VEGF-stimulated phosphorylation of eNOS, AKT and ERK.
3164[redacted]/ Effects on Blood Pressure, Heart Rate, and Core Body Temperature in Male Sprague-Dawley Rats	Sprague Dawley Rats/ Oral (gavage)	6	R788: 10, 30, 100 mg/kg	Dose-dependent elevation in BP that also reverses within approximately 10 h of dosing. A close relationship between free R406 plasma concentration and BP, with an EC_{50}～ 20 nM.
3249[redacted], Lengel et al, 2015 [8]/ The Effects of Anti-Hypertensive Drugs on Fostamatinib-Induced BP Elevation in Conscious Rats	Sprague Dawley Rats/ Oral (gavage)	6	R788: 100 mg/kg	R788-induced BP elevation was reversed by a calcium channel blocker (nifedipine), a β receptor blocker (atenolol) and an ACE inhibitor (captopril). The renin-angiotensin system did not make a significant contribution to R788-induced BP elevation.
3150[redacted], 3232[redacted]/ The Effects of R940406 on the Cardiovascular System in Anesthetized Rats	Sprague Dawley Rats/ iv infusion	4 – 8	R406: 0, 1, 3, 5, 10 mg/kg	R406 caused an increase in arterial BP and femoral artery resistance and a decrease in dP/dt_{max} (an index of cardiac contractility).
3488[redacted]/ Endothelial Function Tests in the Anaesthetized Sprague Dawley Rat	Sprague Dawley Rats/ iv infusion	5 – 6	R406: 0, 4.5 mg/kg	R406 inhibited VEGF-induced hypotension, but did not inhibit acetylcholine- or hyperaemia-induced vascular responses.
3391[redacted]/ Effect of Fostamatinib on Cardiovascular Parameters Following 28-Day Dosing in Conscious Rats	Sprague Dawley Rats/ Oral (gavage)	6 – 7	R788: 0, 8.5, 30 mg/kg *bid*	R788-induced BP elevation was maintained throughout 28 days of dosing but does not persist following drug withdrawal.

bpm = beats per minute, BP = Blood pressure, Pos. control = positive control, NA = not applicable, R406 = R940406

R788 投与に起因する血圧上昇の機作解析を目的に、GLP 非適用下で探索的な心血管系試験を実施した。麻酔下ラット試験の結果から、R788 誘発性の血圧上昇は血管抵抗の増加に起因することが示唆された。また、ヒト血管内皮細胞を用いた試験では、VEGF 誘発性の内皮からの一酸化窒素放出が R788 により抑制されることで血管弛緩が阻害され、血圧に影響を与えている可能性が示唆された。覚醒下ラットのテレメトリー試験では、血圧は投与期間を通じて持続的に上昇するとともに、休薬後にベースライン値に帰したことから、血漿中の R406 濃度と血圧上昇との間に直接的な相関性が認められた。なお、R788 誘発性の血圧上昇は、標準的な降圧剤であるニフェジピン（カルシウムチャネル阻害薬）、アテノロール（選択的 β1 受容体拮抗薬）及びカプトプリル（ACE 阻害薬）により回復することが確認された。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト血漿中のホスタマチニブ及び R406 濃度は、バリデートされた分析法（LC-MS/MS）により測定した。GLP 適用下で実施した毒性試験で使用した分析法において、ホスタマチニブ及びR406の定量下限濃度はそれぞれ1.0及び1.0～18.8 ng/mLであった。マウス、ラット、ウサギ及びサル血漿中において、ホスタマチニブ及び R406 は室温で少なくとも 4 時間安定であった。

2.4.3.2 吸収

R788 又はホスタマチニブカルシウム塩を経口投与したときのホスタマチニブの全身及び門脈内曝露量がわずかであることから、生体内においてホスタマチニブから R406 への変換は門脈血流に入る前に起こっており、大部分のホスタマチニブが速やかに R406 に変換されることが示唆された。*In vitro* 試験において、ホスタマチニブはヒト小腸ミクロソーム及び精製 ALP により速やかに R406 に変換されたことから、生体内では小腸の ALP により変換されると考えられた。

MDR-MDCK 細胞及び Caco-2 細胞において、R406 の頂端側から側底側方向の膜透過係数（$P_{app\ A/B}$）は、それぞれ 9.60 及び 2.63～6.09×10^{-6} cm/s であり、いずれの細胞においても高い膜透過性を示した。したがって、小腸内で生成した R406 は速やかに吸収されると考えられ、ホスタマチニブを経口投与したときの R406 のバイオアベイラビリティは高いことが推察された。

サルに[^{14}C]R788 を経口投与したとき、尿中及び胆汁中に投与放射能の 73.5%が回収された。また、ラットに[^{14}C]R406 を経口投与したとき、尿中及び胆汁中に投与放射能の 52.7%が回収された。ラット又はサルにホスタマチニブカルシウム塩を経口投与したときの血漿中 R406 濃度は、ホスタマチニブ相当量の R406 を経口投与したときの血漿中 R406 濃度より高値又は同等であった。例えば、ラットにホスタマチニブカルシウム塩の 0.25% CMC 懸濁液を経口投与（5 mg/kg）したときの R406 の曝露量は R406 の 40% TPGS/60% PG 溶液を経口投与（5 mg/kg）したときよりも高く、$AUC_{0-\infty}$及び C_{max} はそれぞれ 52%及び 34%高値であった。R788 又はホスタマチニブカルシウム塩を経口投与したときの R406 のバイオアベイラビリティは、マウス、ラット、ウサギ及びサルにおいて 39.7%～80.0%であった。そのため、薬理試験及び毒性試験において、R788 又はホスタマチニブカルシウム塩の経口投与により十分な R406 の曝露量が達成されていると考えられた。

マウス、ラット、ウサギ及びサルに R788 又はホスタマチニブカルシウム塩を経口投与、若しくは R406 を静脈内投与し、R406 の薬物動態を検討した。これらの試験から得られた R406 の薬物動態パラメータを表 2.4.3.2-1 に示す。

表 2.4.3.2-1　R788 又はホスタマチニブカルシウム塩を経口投与、若しくは R406 を静脈内投与したときの R406 の薬物動態パラメータ

Route of Administration	PK Parameters of R406	Species			
		Mouse[a]	Rat[b]	Rabbit[b]	Monkey[b]
Oral: fostamatinib[c]	Dose (mg/kg)[f]	10	5	6.25	15
	T_{max} (h)	0.25	0.69	2.0	1.75
	C_{max} (ng/mL)	2090	1090	2580	2960
	$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	1360	2920	20800	15400

Route of Administration	PK Parameters of R406	Species			
		Mouse[a]	Rat[b]	Rabbit[b]	Monkey[b]
	% R406 available in systemic circulation	60.1	57.0[d]	39.7	80.0[d]

Route of Administration	PK Parameters of R406	Nonclinical Species			
		Mouse	Rat	Rabbit	Monkey
iv: R406[e]	Dose (mg/kg)[f]	1	1	1	1
	CL (mL/min/kg)	73.5	16.9	1.99	13.4
	V_{ss} (L/kg)	0.96	1.10	0.32	1.16
	$t_{1/2}$ (h)	0.58	1.51	3.41	3.09

[a] R788 was dosed.
[b] Fostamatinib Ca salt was dosed.
[c] Fostamatinib in 0.1% or 0.25% CMC suspension was dosed orally ([redacted]0205, [redacted]0003, P-935788-0047, and P-935788-0046 for female mice, male rats, female rabbits, and mixed gender monkeys, respectively).
[d] % available values were calculated based on cross-study comparisons.
[e] R406 besylate in 100% PEG400 solution was dosed intravenously ([redacted]0205, [redacted]0223, P-935788-0047, and N-940406-0017 for female mice, male rats, female rabbits, and female monkeys, respectively).
[f] Dose expressed as R406 free base equivalent.

R406 を静脈内投与したとき、いずれの動物種においても R406 の $t_{1/2}$ は短く（0.58～3.41 時間）、消失速度は肝血流量よりも低値であった。マウスでは CL が最も高く、$t_{1/2}$ が最も短かった。すべての動物種の V_{ss} から R406 の血管外分布が示唆された。

マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける R788 の反復投与毒性試験の TK の結果から、R406 の薬物動態の投与回数依存性及び用量依存性を評価した。R788 を反復経口投与（2.5～150 mg/kg）したとき、ホスタマチニブの血漿中濃度はいずれの動物種及び投与量においてもほとんどの時点で定量下限濃度未満であり、ホスタマチニブの速やかな R406 への変換が示唆された。また、R406 の血漿曝露量には用量依存的な増加が認められた。R406 濃度は速やかに（初回又は 2 回目の投与後 2 時間以内）C_{max} に到達し、その後、速やかに低下した。R788 を経口投与後のマウス（低用量）、ラット、ウサギ及びサルの R406 の $AUC_{0\text{-}24}$ には用量比を上回る増加が認められた。また、マウス、ラット及びウサギにおいて、1 日 2 回反復投与したときの $AUC_{0\text{-}24}$ の蓄積率は 1.0～2.6 であった。一方、サルにおいて、39 週間 1 日 2 回反復経口投与したときの R406 の $AUC_{0\text{-}24}$ に蓄積性は認められず、R406 の薬物動態に投与回数に依存した変化は認められなかった。雄マウス及び雌ラットではそれぞれ雌マウス及び雄ラットよりも R406 濃度が高値であり、マウス及びラットにおいて R406 の薬物動態に性差が認められた。一方、サルにおいて性差は認められなかった。

2.4.3.3 分布

In vitro 蛋白結合試験において、R406 のマウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおける血漿蛋白結合率はそれぞれ 98.6%、97.9%、99.5%、98.5%及び 98.3%であり、R406 の血漿蛋白結合率は高かった。ヒト血清アルブミン及び α_1-酸性糖蛋白質に対する[^{14}C]R406 の結合率は、100～4000 ng/mL の濃度範囲でそれぞれ 96.3%及び 75.5%であった。*In vitro* 試験において、ヒトの[^{14}C]R406 の血液/血漿中濃度比は 2.6 であり、[^{14}C]R406 は主に赤血球に分布し、単球への分布はわずかであった。

ラットの QWBA 試験において、[^{14}C]R788 を経口投与（20 mg/kg）したとき、アルビノラット及び有色ラットのいずれの系統においても[^{14}C]R788 由来の放射能は投与後 4 時間までに中枢神経系を除いた組織に広く分布した。ほとんどの組織において、組織中放射能濃度は投与後 1 時間に C_{max} に到達し、投与後 24 時間には定量下限濃度未満に低下した。一方、有色ラットに

おいて、投与後 168 時間の眼（ブドウ膜）、肝臓及び小腸内容物に低濃度の放射能が検出された。投与後 168 時間の有色ラットのブドウ膜に放射能が検出されたことから、R406 及び/又は代謝物にはメラニン親和性があると考えられた。

2.4.3.4 代謝

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトに[^{14}C]R406 又は[^{14}C]R788 を経口投与したとき、いずれも血漿中には主に活性本体である R406 が存在し、血漿中に R406 の総曝露量の 10%を超える代謝物は認められなかった。また、血漿中の主要な代謝物として R406 のパラ-O-脱メチル体（R529）のグルクロン酸抱合体及び/又は硫酸抱合体が存在した。マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において、いずれの肝ミクロソーム中にも、R529 が主要な代謝物として生成されたことから、R406 の主要な代謝経路はパラ-O-脱メチル化であると考えられた。また、この代謝に関与する主要なヒト CYP 分子種は CYP3A4 であると同定された。ラット及びマウス肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において、R406 の代謝に明らかな性差が認められ、*in vivo* 試験で認められた R406 曝露量の性差と矛盾しない結果であった。一方、サル肝ミクロソームでは、R406 の代謝に性差は認められなかった。ラット、サル及びヒト血漿中には R406 の N-グルクロン酸抱合体も認められた。*In vitro* 試験において、主に UGT1A9 により R406 の N-グルクロン酸抱合体が生成された。なお、いずれの動物種においても、血漿中ホスタマチニブ濃度は低値かつ散発的であったため、肝ミクロソーム中におけるホスタマチニブの代謝安定性は確認していない。

ラット及びサル胆汁中において、R529 のグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体、並びに R406 の N-グルクロン酸抱合体が主要な代謝物であった。尿中において、サル及びヒトでは R406 の N-グルクロン酸抱合体が主要な代謝物であったが、ラット、マウス及びウサギでは、R529 のグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体が主要な代謝物であった。

ヒト及びサルの糞中において、R406 の 3,5-ベンゼンジオール体（R567）が主要な代謝物であった。R567 はヒト血漿及び尿、並びにサル血漿、尿及び胆汁中には認められず、嫌気性条件下で腸内細菌により R529 から生成される可能性が示唆された。一方、R567 はマウス、ラット及びウサギの糞中には認められず、ラット糞中の主要な代謝物は R529 であった。また、マウス糞中では 2 種類の [redacted] が主要な代謝物であり、ウサギ糞中では、R406 の [redacted]（*m/z* 871）と推定される代謝物が主要な代謝物であった。

いずれの動物種においても CYP を介したパラ-O-脱メチル化が R406 の主要な代謝経路であり、ラット、サル及びヒトでは N-グルクロン酸抱合も R406 の代謝に寄与していた。R406 の代謝はすべての動物種において類似しており、ヒト特異的代謝物は検出されなかった。以上の結果から、すべての動物種において生体内で生成した R406 はほとんどが代謝され、その代謝物は主に胆汁中に排泄され、わずかに尿中にも排泄されることが示された。R406 は尿又は胆汁中にほとんど排泄されなかった。

2.4.3.5 排泄

ラットでは[^{14}C]R406 を用いて、マウス、ウサギ、サル及びヒトにおいては[^{14}C]R788 を用いて経口又は静脈内投与後の排泄経路を検討した。いずれの動物種においても、放射能の主要な排泄経路は糞中排泄であった（投与量の 78.5%～84.4%）。尿中排泄はヒトで最も高く、投与量

の 19.3%であり、他の動物種では投与量の 3.1%～10.3%であった。胆管にカニューレを施したラット及びサルにおいて、胆汁中排泄率は投与量のそれぞれ 46.7%及び 68.9%であった。ヒトマスバランス試験における投与後 192 時間までの放射能の総回収率は 99.3%であり、放射能の大部分（97.9%）は投与後 144 時間までに回収された。すべての動物種において放射能の回収率は約 90%以上であった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

R406 は主に CYP3A4 により代謝されることから、臨床薬物相互作用試験により R406 の薬物動態に及ぼす CYP3A 阻害剤（ケトコナゾール及びベラパミル）の影響を検討した（2.7.2.2.2.4.1、2.7.2.2.2.4.2）。強い CYP3A 阻害剤であるケトコナゾールとの併用投与により、R406 の $AUC_{0-\infty}$及び C_{max} はそれぞれ 102%及び 37%上昇した。中等度の CYP3A 阻害剤であるベラパミルとの併用投与では、R406 の $AUC_{0-\infty}$及び C_{max} はそれぞれ 39%及び 6%上昇した。

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において、R406 は CYP3A に対して中等度の可逆的阻害作用（Ki 値：12～13 µmol/L）を示した。さらに、R406 が CYP3A に対する時間依存的阻害作用も有することが示された（K_I：1.0～2.3 µmol/L、k_{inact}：0.022～0.024 min^{-1}）。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与により CYP3A 基質であるミダゾラムの AUC_{0-24} 及び C_{max} はそれぞれ 23%及び 9%上昇した（2.7.2.2.2.4.6）。さらに、R788 の併用投与により、シンバスタチン酸の $AUC_{0-\infty}$及び C_{max} はそれぞれ 66%及び 83%上昇し、シンバスタチンの $AUC_{0-\infty}$及び C_{max} はそれぞれ 64%及び 113%上昇した（2.7.2.2.2.4.11）。

R406 はヒト肝細胞において CYP2C8 活性を誘導し、10 µmol/L において陽性対照であるリファンピシンの誘導倍率の 75%であった。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与により CYP2C8 基質であるピオグリタゾンの $AUC_{0-\infty}$は 18%上昇し、C_{max} は 17%減少した（2.7.2.2.2.4.9）。

In vitro 試験の結果から、CYP2C8 及び CYP3A 以外の CYP 分子種の阻害又は誘導を介して R406 が薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられた。

ヒト肝ミクロソーム及び発現系ヒト UGT1A1 ミクロソームにおける R406 の UGT1A1 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.4 及び 0.5 µmol/L であり、R406 は UGT1A1 の強い阻害薬であると考えられた。しかしながら、臨床試験において、少数の被験者において非抱合型ビリルビン（UGT1A1 の内因性基質）の血漿中濃度の軽微な増加が観察されたのみであったことから、R406 の UGT1A1 阻害に起因した薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられた。また、ヒトで生成した R406 の N-グルクロン酸抱合体は、いずれのヒト CYP 分子種にも阻害作用を示さなかった。

Caco-2 細胞単層膜を用いた検討において、R406 は P-gp の基質であったが、P-gp を介した[^{3}H]ジゴキシン輸送に阻害作用を示さなかった。一方、ホスタマチニブは P-gp を介した[^{3}H]ジゴキシン輸送に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 3.2 µmol/L であった。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与によりジゴキシンの AUC_{ss} 及び $C_{max,ss}$ がそれぞれ 37%及び 70%上昇した（2.7.2.2.2.4.10）。

BCRP 発現膜ベシクルを用いた検討において、ホスタマチニブ及び R406 はヒト BCRP の基質ではなかった。しかしながら、ホスタマチニブ及び R406 は BCRP を介した[^{3}H]エストロン-3-サルフェート輸送に対して強い阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 0.050 及び 0.031 µmol/L で

あった。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与により、BCRP の基質であるロスバスタチンの $AUC_{0-\infty}$及び C_{max} がそれぞれ 96%及び 88%上昇した（2.7.2.2.2.4.11）。

トランスポーターを発現させた培養細胞又は卵母細胞を用いた *in vitro* 試験において、R406 は OCT2 基質ではなく、OCT2 を介した[^{14}C]メトホルミン輸送に対し阻害作用を示さなかった。また、R406 は OAT1 及び OAT3 の基質ではなく、阻害作用を示さなかった。R406 は OATP1B1 の基質ではないが、OATP1B1 に対して弱い阻害作用を示し、IC_{50} 値は 40 µmol/L 超であった。また、R406 は OATP1B3 の基質ではなく、阻害作用を示さなかった。R406 は MRP2 に対し弱い阻害作用を示し、IC_{50} 値は 40 µmol/L 超であった。R406 は MATE1 及び MATE2-K を介した基質輸送に対し阻害作用を示した。しかしながら、臨床試験における MATE 基質との併用投与時の安全性情報から、MATE 阻害による安全性上の懸念は認められなかった（2.7.2.3.5.2.2.6）。

以上の結果から、ホスタマチニブ及びその活性本体である R406 の薬物動態特性により、R788 を経口投与することで薬理学的及び毒性学的評価に十分な R406 の曝露量が達成されたと考えられた。*In vitro* 及び *in vivo* 試験により、非臨床における R406 の代謝経路が明らかになり、R406 の主要な代謝経路は動物種間で異なっていたが、検討したすべての動物種で共通した代謝経路が存在することが示唆された。非臨床及びヒト血漿中代謝物検索試験の結果から、ヒト血漿中に R406 の総曝露量の 10%を超える代謝物及びヒト特異的代謝物は認められなかった。*In vitro* 代謝試験及びトランスポーター試験の結果から、臨床薬物相互作用試験を実施する必要性が示唆されたため、それらの試験を実施したが、いずれの試験においても曝露量が単独投与時の 2 倍を超えることはなかった。

2.4.4 毒性試験

R788 の非臨床毒性試験は、ITP 治療での臨床用量及び治療期間を考慮し、その毒性を検索するに十分な用量及び投与期間にて実施した。主要な毒性試験の概要を表 2.4.4-1 に示す。

R788 の主な毒性標的として、リンパ造血系、肝機能パラメータ、幼若動物の軟骨形成、胎児及び出生児の主要血管、泌尿生殖器及び骨格への影響が明らかとなった。

表 2.4.4-1　　R788、ホスタマチニブカルシウム塩又は R406 ベシル酸塩を用いた主要な毒性試験の概要

Study Number /Study Type and Duration	**Test System/ Method of Administration**	**Dose (mg/kg/day)[a]**	**Results**
Repeat-Dose Toxicity:			
G-935788-0010[b]/ 13 weeks	Mouse/ Oral	R788: 0, 10, 30, 100, 300	NOAEL: 100 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 91 AUC_{0-24} M: 56063 ng•hr/mL F: 36944 ng•hr/mL C_{max} M: 6460 ng/mL F: 2960 ng/mL
G-940406-0004[b]/ 4 weeks (2-week recovery)	Rat/ Oral	R406 besylate: 0, 10, 30, 100	NOAEL: 10 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 28 AUC_{0-24} M: 5527 ng•hr/mL F: 6605 ng•hr/mL C_{max} M: 677 ng/mL F: 911 ng/mL
G-935788-0001[b] / 4 weeks (2-week recovery)	Rat/ Oral	Fostamatinib Ca salt [c]: 0, 2.5, 10, 30, 100 (50)	NOAEL: 10 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 28 AUC_{0-24} M: 7752 ng•hr/mL F: 10199 ng•hr/mL C_{max} M: 1070 ng/mL F: 1320 ng/mL
G-935788-0004[b] / 4 weeks (2-week recovery)	Rat/ Oral	R788: 0, 5, 17, 60	NOAEL: 17 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 28 AUC_{0-24} M: 13199 ng•hr/mL F: 18761 ng•hr/mL C_{max} M: 1590 ng/mL F: 2881 ng/mL
G-935788-0003[b] / 13 and 26 weeks (4-week recovery)	Rat/ Oral	R788[c]: 0, 5, 17, 60 (40M/30F)	NOAEL: 17 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 182 AUC_{0-24} M: 11738 ng•hr/mL F: 28956 ng•hr/mL C_{max} M: 1414 ng/mL F: 2900 ng/mL
G-940406-0005[b] / 4 weeks (2-week recovery)	Monkey/ Oral	R406 besylate: 0, 10, 30, 100	NOAEL: 100 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 28 AUC_{0-24} M: 23094 ng•hr/mL F: 27582 ng•hr/mL C_{max} M: 2897 ng/mL F: 2669 ng/mL

Study Number /Study Type and Duration	**Test System/ Method of Administration**	**Dose (mg/kg/day)[a]**	**Results**
G-935788-0005[b] / 13 and 39 weeks (4-week recovery)	Monkey/ Oral	R788[c]: 0, 5, 17, 60 (34)	NOAEL: 17 mg/kg/day R406 at NOAEL on Day 273 AUC_{0-24} M: 9853 ng•hr/mL F: 10251 ng•hr/mL C_{max} M: 1422 ng/mL F: 1613 ng/mL
Genotoxicity:			
G-935788-0009[b] / Bacterial reverse mutation test	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	R788: 1.5 – 5000 µg/plate	Not mutagenic
G-935788-0002[b] / Bacterial reverse mutation test	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	Fostamatinib Ca salt: 1.5 – 5000 µg/plate	Not mutagenic
G-940406-0006[b] / Bacterial reverse mutation test	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	R406 besylate: 1.5 – 5000 µg/plate	Not mutagenic
G-940406-0007[b] / Mammalian chromosome aberration test	Human peripheral blood lymphocytes/ *in vitro*	R406 besylate: 50 – 500 µg/mL	Not clastogenic
G-940406-0008[b] / Bone marrow micronucleus test	Mouse/ Oral	R406 besylate: 0, 20, 60, 200	Not clastogenic
Carcinogenicity:			
G-935788-0015[b] / 104 weeks	Mouse/ Oral	R788[c]: 0 (water), 0, 50, 150, 500 (250), 1200	Not carcinogenic
G-935788-0013[b] / 104 weeks	Rat/ Oral	R788: M: 0, 10, 25, 45, 80 F: 0, 5, 12, 24, 40	Not carcinogenic
Reproductive Toxicology:			
G-935788-0008[b] / Female fertility and early embryonic development	Rat/ Oral	R788: M: 0, 5, 14, 40; 28 days prior to mating to day before necropsy F: 0, 5, 11, 25; 15 days prior to mating to GD7	NOAEL: M: 40 mg/kg (general toxicity and reproductive function) F: 25 mg/kg (general toxicity), 11 mg/kg (reproductive function)
G-935788-0007[b] / Embryo-fetal development	Rat/ Oral	R788: 0, 5, 12.5, 25; GD6 to 17	NOAEL: 12.5 mg/kg (maternal toxicity, embryo/fetal viability) 5 mg/kg (developmental toxicity)
G-935788-0006[b] / Embryo-fetal development	Rabbit/ Oral	R788: 0, 10, 22, 50; GD7 to 19	NOAEL: 22 mg/kg (maternal toxicity) 10 mg/kg (developmental toxicity)
G-935788-0014[b] / Developmental and perinatal/postnatal reproduction	Rat/ Oral	R788: 0, 2.5, 12.5, 25; GD7 to DL20	NOAEL: 12.5 mg/kg (maternal toxicity and reproductive function) 2.5 mg/kg (development and reproductive function of offspring)
Studies in Juvenile Animals:			
0306[redacted][b] / 4 weeks (from 9 weeks of age)	Rabbit/ Oral	R788: 0, 10, 30, 60	NOAEL: < 10 mg/kg/day

Study Number /Study Type and Duration	Test System/ Method of Administration	Dose (mg/kg/day)[a]	Results
Other Studies:			
G-940406-0009[b] / *In vitro* phototoxicity	BALB/c 3T3 fibroblasts/ *in vitro*	R406 besylate: 0.06 – 10 mg/L	No phototoxic potential
N-935788-0009/ Streptococcus host resistance model	Mouse/ Oral	R788: 0, 20, 50, 80	No reduction in immune response
N-935788-0013/ Influenza virus host resistance model	Mouse/ Oral	R788: 0, 20, 50, 80	At the high dose, small effect on viral clearance on Day 6 only
N-935788-0007/ Listeria host resistance model	Mouse/ Oral	R788: 0, 10, 30, 60	No reduction in immune response
2590[redacted]/ Bacterial reverse mutation test (impurities)	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	不純物B[#] : 16 – 5000 µg/plate	不純物B[#] was mutagenic for TA100 in the presence of S9 mix when tested up to 5000 µg/plate.
2607[redacted]/ Bacterial reverse mutation test (impurities)	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	不純物D[#]: 0.5 – 5000 µg/plate	Not mutagenic
2923[redacted]/ Bacterial reverse mutation test (impurities)	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	不純物E[#]: 0.16 – 2300 µg/plate	Not mutagenic
2924[redacted]/ Bacterial reverse mutation test (impurities)	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	不純物F[#]: 0.16 – 1600 µg/plate	Not mutagenic
G-935788-0017/ Bacterial reverse mutation test (impurities)	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	不純物G[#] : 10 – 5000 µg/plate	Not mutagenic
G-935788-0018/ Bacterial reverse mutation test (impurities)	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 *uvrA*/ *in vitro*	不純物H[#]: 10 – 5000 µg/plate	Not mutagenic
0934[redacted]/ Statin combination 5 days	Mouse (ApoE*3 Leiden)/ Food Administration (Western Type Diet)	R788: ~330 Rosuvastatin: ~5	The cause of morbidity in the Western Type Diet + R788 + rosuvastatin treated group was functional hepatic failure, primarily the consequence of increased systemic exposure to rosuvastatin.

Note: All toxicology studies included toxicokinetic determinations.
DL = day of lactation; GD = gestation day; M = male; F = female; R406 = R940406; R788 = R935788.
[a]: Unless otherwise specified. All daily doses administered bid with the exception of the bone marrow micronucleus study in mice (G-940406-0008).
[b]: All these studies have been conducted according to the Food and Drug Administration, United States Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
[c]: High dose(s) terminated early and/or lowered during study due to adverse clinical effects and decreased body weight and/or mortality (exceeded MTD).

2.4.4.1 単回投与毒性試験

急性毒性試験は実施しなかった。R406 ベシル酸塩を用いたマウス小核試験の用量設定試験において、400 mg/kg（200 mg/kg を 3 時間間隔で 2 回投与）では毒性症状及び 1/6 例に死亡が認められたが、200 mg/kg の単回投与では忍容性が確認された。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

サル又はラットに R788、R406 ベシル酸塩又はホスタマチニブカルシウム塩の 100 mg/kg/日

新薬承認情報提供時に置き換え

までを 4 から 39 週間反復経口投与した結果、骨髄細胞密度の中等度の減少、末梢リンパ球数の減少、その他の血液学的パラメータの軽度変動、脾臓及び胸腺重量の低値、並びに肝臓の病理変化を伴わないトランスアミナーゼの中等度の上昇が認められたが、いずれも回復性を有することを確認した。

ラットを用いた 4 から 26 週間の反復投与試験では、R788、R406 ベシル酸塩又はホスタマチニブカルシウム塩の 60 から 100 mg/kg/日の高用量投与により、R406 の $AUC_{0\text{-}24}$ として 100000 ng•h/mL を超える高い全身曝露が確認され、特に雌で高かった。この結果、死亡を含む過度な毒性が高用量群で認められたため、R788 の 13 及び 26 週間反復投与試験の雄では 60 から 40 mg/kg/日に、雌では 60 から 30 mg/kg/日に投与期間中に減量し、ホスタマチニブカルシウム塩の 4 週間反復投与試験の雌では 100 から 50 mg/kg/日に投与期間中に減量した。サルを用いた R788 の 39 週間反復投与試験では、高用量の 60 mg/kg/日の 2 例が重度の貧血を呈したため切迫屠殺した。この結果、投与 14 週以降より投与量を 34 mg/kg/日に減量した。

マウス 13 週間がん原性用量設定試験では、R788 の 300 mg/kg/日（R406 の $AUC_{0\text{-}24}$ として 150000 ng•h/mL）までおおむね良好な忍容性を示し、高用量ではリンパ球の減少、骨髄細胞密度の減少及び肝機能パラメータの変動がいずれも軽度に認められたのみであった。

上記の毒性所見に加え、大腿骨頭の軟骨形成異常が、R788 及びホスタマチニブカルシウム塩それぞれのラット 4 週間反復投与試験及び R788 の 26 週間反復投与試験の高用量で認められた。この所見は 2 週間の回復期間終了時までに完全には回復しなかった。軟骨異形成は、R788 のラット 13 及び 26 週間反復投与試験、並びにラット及びマウスがん原性試験の高用量でも認められた。軟骨異形成に関連して、ラット 26 週間反復投与試験及びがん原性試験では、切歯の歯牙形成異常も認められた。ラットで認められた長管骨成長板の肥厚による骨への影響及び歯に対する影響より、本薬は小児患者において骨格発育に影響を及ぼす可能性が考えられた。

R406 ベシル酸塩のラット 4 週間反復投与試験で実施したリンパ球のイムノフェノタイピングでは、末梢血において、多くのリンパ球サブセットの用量依存的な減少が認められた。また、骨髄細胞密度の減少、並びに脾臓及び胸腺の重量低値が認められた。これらの所見は本薬の薬理作用に基づくものと考えられ、回復性が認められた。本試験では CD3 及び CD45RA 細胞の減少が認められたが、KLH 感作による抗体産生応答に影響は認められなかった。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験では、細菌を用いる復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験、並びに *in vivo* マウス小核試験のいずれにおいても R788、R406 ベシル酸塩又はホスタマチニブカルシウム塩は陰性の結果を示し、遺伝毒性を有しないと判断した。

2.4.4.4 がん原性試験

マウスがん原性試験では、R788 の 50、150 及び 500 mg/kg/日（250 mg/kg/日に減量）を 2 年間経口投与した結果、対照群及び背景値の発生頻度を超える腫瘍は認められなかった。同様に、ラットがん原性試験では、雄に R788 の 10、25 及び 45 mg/kg/日を、雌に 5、12、24 及び 40 mg/kg/日を 2 年間経口投与した結果、対照群及び背景値の発生頻度を超える腫瘍は認められなかった。以上より、R788 はがん原性を有しないと判断した。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

受胎能及び初期胚発生に関する試験では、R788 の高用量を投与した雌ラットで受胎率のわずかな低下と着床後胚死亡率の増加が認められた。受胎能試験では、雄の生殖能に影響は認められなかった。また、胚・胎児発生に関する試験では、胎児の腎臓及び尿管の発育遅延あるいは無発生を含む奇形が認められ、さらに主要血管及び骨格発生における変異あるいは奇形も認められた。R788 の活性本体である R406 は Ret のキナーゼ活性を阻害することが *in vitro* 試験で確認されており（2.6.2.3.2.7）、また、このキナーゼ阻害作用は、ウサギ及びラットの発生毒性試験で同様の変化（泌尿器及び主要血管の欠損）を生じさせることが報告されている[10)-14)]。ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、受胎能試験で認められた受胎率の低値、胚・胎児発生に関する試験で認められた着床後胚死亡の高値、並びに発育遅延及び奇形と一致する毒性所見が認められた。加えて、出生後の出生児の生存率低下、並びに下部正中線の白色化及び浮腫が哺育中に観察された。これらの所見は Syk 阻害に起因するものと考えられた[15)]。R406 の母乳中濃度は母体血漿中濃度よりも高濃度であった。また、F1 動物で性成熟遅延及び生殖器発達の遅延が認められたが、学習行動及び免疫学的な影響は認められず、F2 胎児に対しても潜在的な毒性所見は認められなかった。生殖発生毒性試験で認められたすべての異常所見は、F1 動物が R406 に曝露されたことに起因すると判断した。

2.4.4.6 新生児を用いた試験

幼若ウサギを用いた 4 週間試験では、R788 の 30 及び 60 mg/kg/日で、大腿骨近位部及び大腿脛骨関節の成長板の異形成、並びに大腿骨及び胸骨の骨髄細胞密度の減少が認められた。げっ歯類及びウサギで認められた軟骨の形成異常又は成長板異形成は、VEGF 受容体の抑制作用に基づくもの[9)]と考えられ、活発な成長段階にある成長板閉鎖前の骨にのみ影響が及んだものと考えられた。したがって、本所見は成長板が閉鎖した成人患者には影響が及ばないと判断した。その他、幼若ウサギを用いた試験では、卵胞の変性又は壊死、血液生化学検査における肝機能パラメータの変動、リンパ球数の減少、並びに脾臓、胸腺及び副腎の臓器重量の低値が認められた。

2.4.4.7 その他の毒性試験

免疫学的宿主抵抗モデル（連鎖球菌、インフルエンザウイルス及びリステリア菌）では、R788 はこれら病原体に対する免疫応答能を阻害しなかった。また、光毒性に関しては、R406 は BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 試験で陰性を示した。

原薬中の不純物及び分解物について、反復投与試験及びがん原性試験の一部で使用した原薬を用いて原薬中の不純物を特定した。臨床第 III 相試験で使用した原薬バッチは、毒性試験で使用した原薬バッチに比して不純物及び分解物が少なく、また、市販用原薬では臨床試験で使用したバッチよりもさらに低い含量下での管理が行われている（3.2.S.4）。

原薬及び製剤中の不純物及び分解物の変異原性について、出発物質とその不純物、中間体、並びに製造工程で生成する不純物及び分解物を評価した。その結果、ICH M7 ガイドラインで定義されるクラス 1 あるいはクラス 2 に分類される化合物として、出発物質である 不純物I# 及び 不純物B# 、出発物質の 不純物J# の不純物である 不純物K# 、並びに原薬規格に設定した不純物である

不純物L#が該当した。クラス 1 に分類された不純物K#及び不純物I#は、原薬まで 2 回以上の単離工程がある段階において、それぞれの許容摂取量である [redacted] ppb 及び [redacted] ppm 以下まで除去されることを確認している。また、開発後期に使用した原薬バッチでは、製造工程不純物として[redacted]を有する不純物L# が [redacted]% w/w 以下で確認されている。生体において不純物L#が活性本体である R406 に変換される際に、クラス 1 に分類される 不純物M# が生成することから、不純物L#をクラス 1 に分類した。しかしながら、 不純物M# は食品や内因性代謝に由来して恒常的に一定程度が曝露されており（ICH M7 ガイドライン）、R788 投与により生じる 不純物M# の曝露量はかなり低く、生体への影響はほとんどないと考えられた。したがって、不純物である不純物L# は ICH Q3A ガイドラインに従った原薬規格に基づき管理する。不純物B#は、クラス 2 に分類されるが、原薬まで 2 回の単離工程がある段階において、TTC（毒性学的懸念の閾値）である 5 ppm（最大臨床推奨用量 300 mg/日を一生涯服用した場合の許容摂取量 1.5 µg/日より算出）以下にまで除去されることを確認している（3.2.S.3.2）。

変異原性に対して構造上の懸念があり、変異原性のデータがない不純物については、細菌を用いる復帰突然変異試験での評価（2.6.6.8.3.1）、あるいは、原薬まで少なくとも 2 回の単離工程がある段階において、TTC 以下まで除去されることを確認している。

トランスジェニックマウスに R788 とロスバスタチンを併用投与した薬理試験 [16] では、薬物相互作用に関連した死亡及び肝毒性が認められた。追加で実施した毒性機作解析試験（2.6.6.8.4）の結果から、ロスバスタチンの全身曝露の増加に伴う肝機能障害（血液生化学パラメータの変動、肝臓重量の高値、並びに肝臓の肉眼的及び病理組織学的所見）が死亡の原因と考えられた。その毒性発現機序として、R788 がロスバスタチンの排泄に関与するトランスポーターである BCRP を阻害することで、ロスバスタチン濃度を著しく上昇させたことに起因すると推察された（2.6.4.7.2）。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

2.4.5.1.1 効力を裏付ける試験

In vitro 試験において、R406 は ATP 競合的にヒト Syk 活性を阻害し、ヒト、マウス及びラットにおいてほぼ同等に Syk 活性を阻害することが明らかになった（2.6.2.2.1.1、2.6.2.2.1.2）。また、マクロファージ及び B 細胞を用いた検討から、R406 はマクロファージの FcγR を介したシグナル伝達及び B 細胞の BCR を介したシグナル伝達を阻害することが明らかとなった（2.6.2.2.1.3、2.6.2.2.1.4、2.6.2.2.1.5、2.6.2.2.1.6）。さらに、マウス ITP モデルを用いた *in vivo* 試験において、R788 は抗 CD41 抗体又は抗 CD42 抗体により誘発された血小板数の減少に対して抑制作用を示した（2.6.2.2.2.1、2.6.2.2.2.2）。

以上より、R406 はマクロファージ上の FcγR を介した Syk シグナルの活性化を阻害することで、マクロファージによる血小板の貪食・破壊を抑制し、ITP の病態を改善すると考えられた。さらに、R406 は B 細胞において BCR を介した Syk シグナルの活性化を阻害することから、R406 は B 細胞の抗血小板自己抗体産生を抑制することで ITP の病態改善に寄与する可能性が考えられた。

2.4.5.1.2 副次的薬理試験

Syk は造血系細胞の全般に発現していることから、血小板及び自然免疫に対する R406 の作用を *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験により検証した。

ヒト多血小板血漿を用いた *in vitro* 試験において、R406 の 5 μmol/L は、ADP による CD62P の細胞表面の発現量上昇に対して阻害作用を示さなかったが、コラーゲンによる発現量上昇に対しては弱い抑制作用（約 42%阻害）を示した（2.6.2.3.1.1）。マウスを用いた *in vivo* 試験において、R406 はコラーゲンを介した血小板の活性化を抑制したが、25 μmol/L までの血漿中濃度において、マウスの出血時間の延長は確認されなかった（2.6.2.3.3.1）。同様に、ラット血栓症モデルを用いた *in vivo* 試験においても R788 は出血時間の延長作用を示さなかった（2.6.2.3.3.2）。また、R788 の第 I 相試験において、R406 が薬理作用を上回る血漿中濃度に達した健常人において、コラーゲン又は ADP が誘発する血小板凝集に対する影響は認められなかった（2.7.2.2.2.1.1）。これらのデータは、R406 は Syk シグナル経路を介した血小板の活性化、並びにコラーゲン受容体を介した Syk シグナル経路の活性化を阻害するが、血小板凝集及び血液凝固を活性化する多くの重複経路で代償されることで、出血時間に影響を与えないことを示唆すると考えられた。

また、R406 は好中球の遊走、白血球による細菌の食作用、細菌による白血球酸化バースト及び好中球の殺菌活性に明らかな影響を与えなかったことから、細菌性又はウイルス性病原体に対して過度の免疫抑制を引き起こさないと考えられた（2.6.2.3.1.2）。

以上のことから、R406 は自然免疫反応に影響を与えることなく治療効果を発現し、血小板数の減少に関係なく出血及び血栓塞栓症リスクを有する ITP 患者に対しても使用が可能であると考えられた [17), 18)]

薬理学的特性を評価するために、R406 の様々なオフターゲット作用について、生化学アッセイ及び細胞アッセイで評価した。キナーゼ類を除くと、R406 が阻害作用を有する標的は少

なかった（2.6.2.3.2.1、2.6.2.3.2.2）。R406 はアデノシン A3 受容体に対して強い阻害作用を示したが、この生理的意義は不明である。

生化学アッセイにおいて R406 は多くのキナーゼに阻害活性を示したが、Syk と同等以上の IC_{50} 値を示したのは 24 種類であった（2.6.2.3.2.3、2.6.2.3.2.4）。一方、Syk に対しては生化学アッセイと細胞アッセイで R406 の阻害作用は同等であったが、その他の Lyn、Aurora、Btk、VEGF 受容体 2 及び Ret では細胞アッセイにおいて阻害作用の減弱が確認された（2.6.2.3.2.5、2.6.2.3.2.6、2.6.2.3.2.7）。また、細胞アッセイで評価した標的において、Syk 以上に R406 が阻害作用を有する標的は存在せず、Ret のみが Syk と同等であった（2.6.2.3.2.5、2.6.2.3.2.6、2.6.2.3.2.7）。

以上のことから、生化学アッセイで確認された R406 の多くのキナーゼへの阻害作用は、細胞アッセイにおいては Syk を除いて減弱するため、Syk 以外の標的に対する R406 の阻害作用は生体内に影響を及ぼす可能性は低いと推察された。

なお、R788 の胚・胎児発生への影響を評価した毒性試験において、腎臓の無発生を含む奇形、並びに主要血管及び骨格発生における変異あるいは奇形が観察された（2.4.4.5）。これらの所見は、R406 が Ret のキナーゼ活性を強力に阻害することに起因したものと考えられた（2.6.2.3.2.7）。

2.4.5.1.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験の結果、R788 が血圧上昇作用を有することが示された。各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験において、この血圧上昇は、血管内皮からの VEGF 誘発性の一酸化窒素利用能が低下することにより、血管抵抗が増加したためと推察された。これは R406 と薬理作用が類似する他のキナーゼ阻害薬の血圧上昇機序（VEGF 受容体 2 の阻害作用など）とも一致する[19),20)]。なお、R788 の血圧に対する影響は中等度であり、毒性試験では関連する病理組織学的変化や毒性所見は認められなかった。また、休薬によって完全な回復性を示すとともに、標準的な降圧剤により回復することも確認された。

2.4.5.2 薬物動態試験

2.4.5.2.1 吸収

R788 又はホスタマチニブカルシウム塩を経口投与したときのホスタマチニブの全身曝露量がわずかであることから、ホスタマチニブは小腸においてその大部分が速やかに膜透過性の良好な R406 に変換され、その変換には ALP が関与していると考えられた。

ラット又はサルにホスタマチニブカルシウム塩を経口投与したときの血漿中 R406 濃度は、ホスタマチニブ相当量の R406 を経口投与したときの血漿中 R406 濃度より高値又は同等であり、薬理試験及び毒性試験において、R788 又はホスタマチニブカルシウム塩の経口投与により十分な R406 の曝露量が達成されていると考えられた。R406 を静脈内投与したとき、いずれの動物種においても R406 の $t_{1/2}$ は短く、消失速度は肝血流量よりも低値であった。

マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける R788 の反復投与毒性試験の TK の結果から、いずれの動物種においても R788 の 1 日 2 回投与による R406 の蓄積は認められず、R406 の薬物動態に反復投与による変化は生じないと考えられた。

2.4.5.2.2 分布

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおいて、R406 の血漿蛋白結合率はいずれも 98%以上であり、R406 の血漿蛋白結合率は高く、種差は認められなかった。また、ヒトにおける結合蛋白種を検討した結果、R406 の主要な結合蛋白質はアルブミンであると考えられた。R406 には血球移行性が認められ、主に赤血球へ分布し、単球への分布はわずかであった。マウス、ラット、ウサギ及びサルの V_{ss} から R406 の血管外分布が示唆された。ラット QWBA 試験において、[^{14}C]R788 由来の放射能はほとんどの組織において投与後 1 時間に C_{max} に到達し、投与後 24 時間には定量下限濃度未満に低下した。投与後 168 時間の有色ラットのブドウ膜に放射能が検出されたことから、R406 及び/又は代謝物にはメラニン親和性があると考えられた。

2.4.5.2.3 代謝

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトに[^{14}C]R406 又は[^{14}C]R788 を経口投与したとき、いずれも血漿中には主に活性本体である R406 が存在し、血漿中に R406 の総曝露量の 10%を超える代謝物は認められなかった。尿中において、サル及びヒトでは R406 の N-グルクロン酸抱合体が主要な代謝物であったが、ラット、マウス及びウサギでは、R529 のグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体が主要な代謝物であった。ラット及びサル胆汁中において、R529 のグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体、並びに R406 の N-グルクロン酸抱合体が主要な代謝物であった。ヒト及びサルの糞中において、R567 が主要な代謝物であった。一方、R567 はマウス、ラット及びウサギの糞中には認められなかった。胆汁及び糞中に R406 がほとんど認められなかったことから、R406 は生体内でほとんど代謝されると考えられた。

マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において、いずれの肝ミクロソーム中にも、R529 が主要な代謝物として生成された。また、この代謝に関与する主要なヒト CYP 分子種は CYP3A4 であると同定された。また、*in vitro* 試験において、R406 の N-グルクロン酸抱合体の生成には主に UGT1A9 が関与すると考えられた。

いずれの動物種においても CYP を介したパラ-O-脱メチル化が R406 の主要な代謝経路であると考えられた。R406 の代謝はすべての動物種において類似しており、ヒト特異的代謝物は検出されなかった。また、すべての動物種において生体内で生成した R406 はほとんどが代謝され、R406 は尿又は胆汁中にほとんど排泄されなかった。

2.4.5.2.4 排泄

[^{14}C]R406 又は[^{14}C]R788 を用いたマウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト排泄試験において、いずれの動物種においても、放射能の主要な排泄経路は糞中排泄であった。また、胆管にカニューレを施したラット及びサルにおいて、胆汁中排泄率は投与量の 46.7%以上であったことから、いずれの動物種においても。放射能は胆汁を介して糞中に排泄されると考えられた。

2.4.5.2.5 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験により、R406 は主に CYP3A4 により代謝されることが示された。臨床薬物相互作用試験により R406 の薬物動態に及ぼす CYP3A 阻害剤（ケトコナゾール及びベラパミル）の影響を検討した結果（2.7.2.2.2.4.1、2.7.2.2.2.4.2）、最大で 2 倍までの R406 の曝露量の上昇が認められた。*In vitro* 試験により、R406 の CYP3A4 に対する中等度の可逆的及び時間依存的阻害作用が認められた。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用により CYP3A4 基質である

ミダゾラム及びシンバスタチンの曝露量に最大で 2 倍までの上昇が認められた。また、ヒト肝細胞において、R406 は CYP2C8 に対する誘導作用を示したが、臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与により CYP2C8 基質であるピオグリタゾンの曝露量に認められた影響はわずかであった。*In vitro* 試験の結果から、CYP2C8 及び CYP3A 以外の CYP 分子種の阻害又は誘導を介して R406 が薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられた。また、R406 は UGT1A1 に対し強い阻害作用を示したが、臨床試験において少数の患者で非抱合型ビリルビン（内因性基質）の血漿中濃度に軽微な上昇が認められたのみであった。

Caco-2 細胞単層膜を用いた検討において、ホスタマチニブは P-gp に対して阻害作用を示した。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与により P-gp 基質であるジゴキシンの曝露量にわずかな上昇（2 倍未満）が認められた（2.7.2.2.2.4.10）。BCRP 発現膜ベシクルを用いた検討において、ホスタマチニブ及び R406 は BCRP に対して強い阻害作用を示した。臨床薬物相互作用試験において、R788 の併用投与により BCRP 基質であるロスバスタチンの曝露量にわずかな上昇（2 倍未満）が認められた（2.7.2.2.2.4.11）。また、R406 は MATE2-K に対し阻害作用を示した。しかしながら、臨床試験における MATE2-K 基質との併用投与時の安全性情報から、MATE2-K 阻害による安全性上の懸念は認められなかった（2.7.2.3.5.2.2.6）。

以上の *in vitro* 代謝試験及びトランスポーター試験の結果から、併用が懸念される阻害剤又は基質薬を用いた臨床薬物相互作用試験を実施したが、いずれも曝露量が単独投与時の 2 倍を超えることはなかった。

2.4.5.3 毒性試験

毒性試験ではリンパ造血系及び肝機能パラメータの軽度な変動が認められたが、いずれも完全な回復性が確認された。ラットの反復投与試験及び幼若ウサギを用いた試験では軟骨形成異常が認められた。生殖発生毒性試験ではラット及びウサギの雌で受胎率の低値、着床後胚死亡率の高値、並びに胎児の発育遅延及び奇形が認められたが、雄ラットの生殖能に影響は認められなかった。遺伝毒性試験では、R788 の変異原性及び染色体異常誘発性は認められなかった。ラット及びマウスがん原性試験では、いずれもがん原性は認められなかった。免疫毒性学的評価及び免疫学的宿主抵抗性モデル（連鎖球菌、リステリア菌及びインフルエンザウイルス）では、R788 は免疫機能に対する毒性を示さなかった。

毒性試験で認められた主な所見及び潜在的なリスク評価を以下に列記する。

1) 骨への影響

軟骨形成異常として、成長板肥厚がマウス、ラット及びウサギを用いた毒性試験で認められており、本薬の小児への使用はリスクを伴うことが明らかとなった。大腿骨頭及び胸骨の軟骨形成異常は、R788 及びホスタマチニブカルシウム塩のラット 4 週間反復投与試験、R788 のラット 26 週間反復投与試験、並びにマウス及びラットがん原性試験の高用量で認められ、回復期間を設けた試験においては回復期間中に完全な回復を確認することができなかった。軟骨形成異常又は成長板異形成は、幼若ウサギ 4 週間試験でも認められた。また、切歯の歯牙形成異常に関連した所見が、ラットの 26 週間反復投与試験及びがん原性試験で認められた。これら軟骨形成異常の発現機序として、本薬の VEGF 受容体抑制作用の関与が考えられ [9]、その影響は成長板閉鎖前の活発な成長段階にある骨のみに留まるものと考えられた。また、本薬と同様

に VEGF 阻害作用を有する多種の薬剤により、複数の動物種の骨成長板に同様な変化が生じることが報告されている[9), 21)-28)]。したがって、本事象は成長板が閉鎖した成人患者の使用には懸念がないものの、成長板が活発な成長段階にある小児に対しては、骨格発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。

2) リンパ造血系への影響

サル又はラットに R788、R406 ベシル酸塩又はホスタマチニブカルシウム塩の 100 mg/kg/日までを 4 から 39 週間反復経口投与した結果、骨髄細胞密度の中等度の減少、末梢リンパ球数の減少、その他の血液学的パラメータの軽度変動、並びに脾臓及び胸腺重量の低下が認められた。しかしながら、いずれの所見も軽度かつ経時的な悪化を示さず、休薬による明らかな回復性が示されている。本薬がリンパ造血系に影響を及ぼす作用機序の詳細は不明ではあるが、本薬のキナーゼ阻害作用が部分的に関与していると考えられた[15)]。

3) 肝臓への影響

肝臓のトランスアミナーゼの上昇が、げっ歯類及びサルのすべての反復投与毒性試験で認められた。しかしながら、その程度はおおむね軽度で経時的な悪化も示さず、回復性が確認されている。ビリルビンに変動は認められず、げっ歯類のがん原性試験及びサルの 39 週間反復投与試験においても関連する病理組織所見は認められなかった。トランスアミナーゼ上昇はチロシンキナーゼ阻害薬に共通する副作用として知られており[29)]、本薬の臨床試験においても、主として ALT 及び AST の高値が認められている（2.5.5.6.4）。

4) 生殖発生への影響

受胎能及び初期胚発生に関する試験では、R788 の高用量を投与した雌ラットで受胎率のわずかな低下と着床後胚死亡率の増加が認められた。受胎能試験では、雄の生殖能に影響は認められなかった。また、胚・胎児発生に関する試験では、胎児の腎臓及び尿管の変異あるいは無発生を含む奇形、並びに主要血管及び骨格発育における変異あるいは奇形が認められた。R788 の活性本体である R406 は Ret のキナーゼ活性を阻害することが *in vitro* 試験で確認されており、また、このキナーゼ阻害作用はウサギ及びラットの発生毒性試験で同様の変化（泌尿器及び主要血管の欠損）を生じさせることが報告されている[10)-12), 14)]ことから、上記所見は本薬の副次的薬理作用に起因すると考えられた。ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、受胎能試験で認められた受胎率の低値、胚・胎児発生に関する試験で認められた着床後胚死亡の増加、並びに発育遅延及び奇形と一致する所見が認められた。また、出生児の生存率の低下、並びに下部正中線白色化及び浮腫が哺育中に観察され、これらの所見は Syk 阻害に起因すると考えられた[15)]。R406 の母乳中濃度は母体血漿中濃度よりも高濃度であった。F1 動物では性成熟遅延及び生殖器発達の遅延が認められたが、学習行動及び免疫学的な影響は認められず、F2 胎児に対しても潜在的な毒性所見は認められなかった。上述したすべての生殖毒性及び発生毒性は、F1 動物が R406 に曝露されたことに起因すると判断した。これらのラット及びウサギの生殖発生に及ぼす影響から、ヒトの妊娠初期又は授乳期に R788 を投与すると、胎児あるいは小児に影響を及ぼす可能性があると判断した。

5) 遺伝毒性及びがん原性

遺伝毒性試験では、細菌を用いる復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験、並びに *in vivo* マウス小核試験において、R788、R406 ベシル酸塩又はホスタマチニブ

カルシウム塩はいずれも陰性の結果を示し、遺伝毒性を有しないと判断した。マウス及びラットのがん原性試験では腫瘍発生の増加は認められず、また、R788 投与により認められた非腫瘍性病変はいずれも本薬の薬理作用に起因したものであった。以上の結果から、R788 は明らかながん原性を有しないと判断した。マウスがん原性試験では、500/250 mg/kg/日における R406 の曝露量は、74 週まで投与された雄で 64000～219000 ng•h/mL、64 週まで投与された雌で 59000 ～ 150000 ng•h/mL であり、104 週まで投与された 150 mg/kg/日の雄で 22000～78000 ng•h/mL、雌で 14000～76000 ng•h/mL であった。ITP 患者に R788 の 150 mg を 1 日 2 回投与した時の R406 の曝露量（約 11000 ng•h/mL）とマウスがん原性試験における最大耐量の曝露量を比較すると、500/250 mg/kg/日では約 5～20 倍、150 mg/kg/日では約 1.2～7.1 倍の安全域があると推定された。また、ラットがん原性試験では、45 mg/kg/日の雄及び 24 mg/kg/日の雌における R406 の曝露量は、それぞれ 8000～16000 ng•h/mL 及び 12000～15000 ng•h/mL であった。ITP 患者に R788 を投与した時の R406 の曝露量とラットがん原性試験における最大耐量の曝露量を比較すると、約 0.7～1.4 倍と推定された。

6) 免疫機能

R406 は FcγR のシグナル伝達に重要な働きをする Syk 活性阻害（Ki=30 nmol/L）を主たる作用機序とする。R788 の免疫機能に及ぼす影響について、免疫学的宿主抵抗性モデルを用いて評価するとともに、一般毒性試験及び生殖発生毒性試験でもその影響を評価した。結果として、R788 はがん原性試験では腫瘍発生率に変化を認めず、毒性試験に供したげっ歯類、ウサギ及びサルに対しても、R788 は日和見感染を増加させなかった。したがって、R788 が免疫機能に対して影響を及ぼす可能性はほとんどないものと考えられた。

結論として、非臨床毒性試験では、ラット及びサルのリンパ造血系及び肝機能に軽度かつ完全な回復性を有する影響が認められ、ヒト臨床推奨用量/曝露量において、その影響が及ぶ可能性が示唆された。また、ラット及びウサギの胎児及び出生児における泌尿生殖器、主要血管及び骨格等への影響、並びにげっ歯類及びウサギの幼若動物における軟骨形成異常が認められたことから、ヒトの妊娠初期又は授乳期に R788 を投与すると、胎児あるいは小児に影響を及ぼす可能性が示唆された。

2.4.5.4 ヒト及び主要な反復投与毒性試験における曝露量

ITP 患者に R788 の 150 mg を 1 日 2 回反復経口投与したときの R406 の C_{max} 及び AUC_{ss} はそれぞれ 810 ng/mL 及び 11000 ng•hr/mL であった（2.7.2.2.2.2.4）。

臨床試験における曝露量と、主要な反復投与毒性試験の NOAEL における R406 の曝露量（いずれも投与末期における平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$）を用いて安全域を求めた。なお、これらの安全域は、R406 の血漿蛋白結合率（マウス：98.6%、ラット：97.9%、サル：98.5%及びヒト：98.3%）を加味して算出した。ラット及びサルの反復投与試験では、ヒトと動物間の安全域はおおむね 1 倍であった。

表 2.4.5.4-1　　各動物種の曝露量に基づく安全域

Study Number/ Study Type	Species	Dose (mg/kg/day)	Margins to NOAEL*			
			C_{max} (C_{max} free) (ng/mL)	Margin (free margin)	AUC (AUC free) (ng•h/mL)	Margin (free margin)
G-935788-0010/ 13-week dose ranging study for carcinogenicity study	CD1 mouse	R788: 0, 10, 30, 100, 300 NOAEL = 100	4710 (65.9)	5.81 (4.79)	46504 (651)	4.23 (3.48)
G-940406-0004/ 28-day with 14-day recovery, with immunotoxicology	Sprague Dawley rat	R406 besylate: 0, 10, 30, 100 NOAEL = 10	794 (16.7)	0.98 (1.21)	6066 (127)	0.55 (0.68)
G-935788-0001/ 28-day with 14-day recovery	Sprague Dawley rat	Fostamatinib calcium: 0, 2.5, 10, 30, 100 (50) NOAEL = 10	1195 (25.1)	1.48 (1.82)	8976 (188)	0.82 (1.01)
G-935788-0004/ 28-day with 14-day recovery	Sprague Dawley rat	R788: 0, 5, 17, 60 NOAEL = 17	2236 (47.0)	2.76 (3.41)	15980 (336)	1.45 (1.79)
G-935788-0003/ 13-week and 26-week with 4-week recovery	Sprague Dawley rat	R788: 0, 5, 17, 60 (40/30, M/F) NOAEL = 17	2157 (45.3)	2.66 (3.29)	20347 (427)	1.85 (2.28)
G-940406-0005/ 28-day with 14 day recovery	Cynomolgus monkey	R406 besylate: 0 (vehicle), 0 (water), 10, 30, 100 NOAEL = 100	2783 (41.7)	3.44 (3.03)	25338 (380)	2.30 (2.03)
G-935788-0005/ 13-week and 39-week with 4-week recovery	Cynomolgus monkey	R788: 0, 5, 17, 60 (34) NOAEL = 17	1518 (22.8)	1.87 (1.65)	10052 (151)	0.91 (0.81)

M = male; F = female.

* Human exposure is determined based on plasma levels of R406 in C-935788-049 with average C_{max} (810 ng/mL) and AUC_{ss} (～11000 ng•hr/mL) compared with average plasma level data in animal studies determined at the end of study for C_{max} and AUC_{0-24}. Plasma protein binding: mouse 98.6%, rat 97.9%, monkey 98.5%, and human 98.3%

2.4.6 参考文献

1) 柏木浩和, 桑名正隆. 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019 改訂版. 臨床血液 2019;60(8):877-96.

2) 桑名正隆. 免疫性血小板減少症. 最新医学 2013;68(6):170-8.

3) Nieswandt B, Bergmeier W, Rackebrandt K, et al. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. Blood. 2000;96(7):2520-7.

4) Webster ML, Sayeh E, Crow M, et al. Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIbIIIa versus GPIbalpha antibodies. Blood. 2006;108(3):943-6.

5) Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, et al. Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. Blood. 2009;113(14):3154-60.

6) Rigel 社 社内資料 マウスがん原性試験の米国食品医薬品局との Special Protocol Assessment に関する資料.

7) Rigel 社 社内資料 ラットがん原性試験の米国食品医薬品局との Special Protocol Assessment に関する資料.

8) Lengel D, Lamm Bergström E, Barthlow H, et al., Prevention of fostamatinib-induced blood pressure elevation by antihypertensive agents. Pharmacol Res Perspect. 2015;3(5):e00176.

9) Hall AP, Westwood FR, Wadsworth PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. Toxicol Pathol. 2006;34(2):131-47.

10) Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, et. al., Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. Nature. 1994;367(6461):380-3.

11) Schuchardt A, D'Agati V, Pachnis V, et al. Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development. Development. 1996;122(6):1919-29.

12) Batourina E, Choi C, Paragas N, et al., Distal ureter morphogenesis depends on epithelial cell remodeling mediated by vitamin A and Ret. Nat Genet. 2002;32(1):109-15.

13) Allen JA, Adlakha A, Bergethon PR. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome after bevacizumab/FOLFIRI regimen for metastatic colon cancer. Arch Neurol. 2006;63(10):1475-8.

14) Clemens GR, Schroeder RE, Magness SH, et al., Developmental toxicity associated with receptor tyrosine kinase Ret inhibition in reproductive toxicity testing. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2009;85(2):130-6.

15) Turner M, Mee PJ, Costello PS, et al., Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. Nature. 1995;378(6554):298-302.

16) Rigel 社 社内資料 Evaluation of the effects of different doses of the SYK inhibitor fostamatinib disodium alone and on top of a statin, on PK, plasma lipids and atherosclerosis development in APOE*3Leiden Study No. 051.02149, 2013.

17) 柏木浩和, 西浦伸子. 慢性 ITP 患者における血小板機能. 血栓止血誌. 2020;31(5):498-504.

18) Langeberg WJ, Schoonen WM. Eisen M, et al. Thromboembolism in patients with immune thrombocytopenia(ITP): a meta-analysis of observational studies. Int J Hematol. 2016;103(6):655-64.

19) Anderson M., Messner MB., Green WT. DISTRIBUTION OF LENGTHS OF THE NORMAL FEMUR AND TIBIA IN CHILDREN FROM ONE TO EIGHTEEN YEARS OF AGE. J Bone Joint Surg Am. 1964;46:1197-202.

20) Feldesman MR. Femur/stature ratio and estimates of stature in children. Am J Phys Anthropol. 1992;87(4):447-59.

21) Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al., VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med. 1999;5(6):623-8.

22) Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, et al., Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol. 1999;27(1):78-86.

23) Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, et al., ZD4190: an orally active inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling with broad-spectrum antitumor efficacy. Cancer Res. 2000;60(4):970-5.

24) Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, et al., ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. Cancer Res. 2002;62(16):4645-55.

25) Beebe JS, Jani JP, Knauth E, et al., Pharmacological characterization of CP-547,632, a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy. Cancer Res. 2003;63(21):7301-9.

26) Brown AP, Courtney CL, King LM, et al., Cartilage dysplasia and tissue mineralization in the rat following administration of a FGF receptor tyrosine kinase inhibitor. Toxicol Pathol. 2005;33(4):449-55.

27) Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, et al., AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. Cancer Res. 2005;65(10):4389-400.

28) Patyna S, Arrigoni C, Terron A, et al., Nonclinical safety evaluation of sunitinib: a potent inhibitor of VEGF, PDGF, KIT, FLT3, and RET receptors. Toxicol Pathol. 2008;36(7):905-16.

29) Bunchorntavakul C, Reddy KR. Drug Hepatotoxicity: Newer Agents. Clin Liver Dis. 2017 ;21(1):115-134.