目次

2.6.1 緒言 2
2.6.1.1 背景 2

2.6.1 緒言

2.6.1.1 背景

R788（ホスタマチニブナトリウム水和物）は、プロドラッグであり、生体内で活性本体である R940406（R406）に代謝され、強力かつ比較的選択的な脾臓チロシンキナーゼ（Syk）阻害作用を有する。R406 は Fcγ 受容体及び B 細胞受容体シグナル伝達経路を阻害する免疫調節薬と位置付けられる。

本薬は、持続性又は慢性の特発性血小板減少性紫斑病（以下、ITP）の成人患者（18 歳以上）に対する治療薬として承認申請され、生涯にわたり断続的に投与することが可能であるが、ラット及びウサギの毒性試験で認められた潜在的な安全性上のリスクのため、小児には（成長板閉鎖まで）使用すべきではない。本薬の主要な薬理作用及び薬物動態的特徴、並びに毒性評価がなされており、開発用の塩型としてホスタマチニブ二ナトリウム六水和物を選択した（図 2.6.1.1-1）。

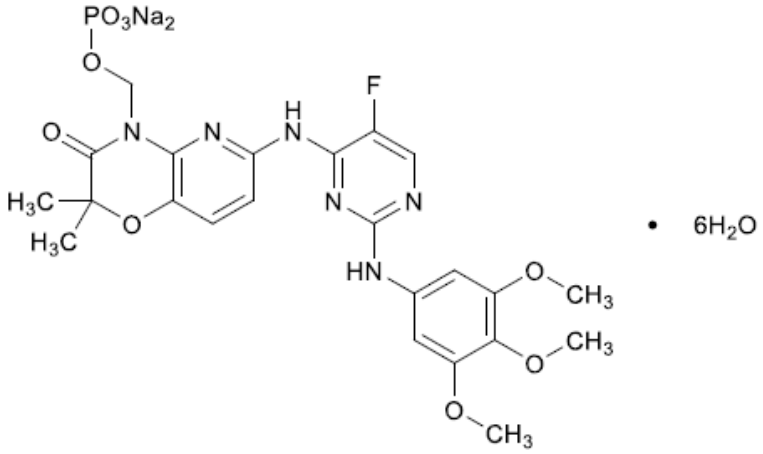


図 2.6.1.1-1　　R788 の構造

本薬は、100 mg 又は 150 mg を 1 日 2 回、長期的に服用可能であり、100 mg 及び 150 mg の薄い黄赤色のフィルムコーティング錠（それぞれ円形又は楕円形）として提供される。

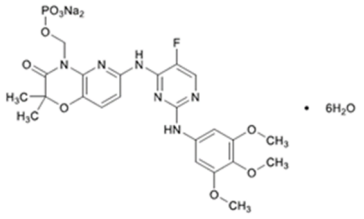
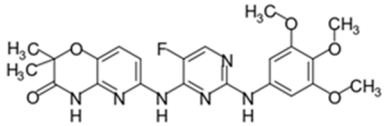
初期の非臨床試験は R406 を用いて実施されたが、R406 の薬剤学的特徴（難溶解性）により、商業開発には不向きであった。R406 の経口投与可能なプロドラッグ製剤として R788 が開発され、経口投与後は速やかに R406 に変換される特徴を有する。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.1.1 概略 5
2.6.2.1.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.1.2.1 *In vitro* 試験 5
2.6.2.1.2.2 *In vivo* 試験 6
2.6.2.1.3 副次的薬理試験 6
2.6.2.1.3.1 *In vitro* 試験 6
2.6.2.1.3.2 *In vivo* 試験 7
2.6.2.1.4 安全性薬理試験 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験 8
2.6.2.2.1.1 ヒト Syk 活性に対する阻害定数 8
2.6.2.2.1.2 Syk 阻害活性の種差 8
2.6.2.2.1.3 FcγR シグナルに対する阻害作用 8
2.6.2.2.1.4 BCR シグナルに対する阻害作用 9
2.6.2.2.1.5 B 細胞表面の CD69 の発現量に対する阻害作用 9
2.6.2.2.1.6 B 細胞における Syk の活性化に対する阻害作用 9
2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験 10
2.6.2.2.2.1 抗 CD41 抗体誘発マウス ITP モデルに対する作用 10
2.6.2.2.2.2 抗 CD42 抗体誘発マウス ITP モデルに対する作用 11
2.6.2.2.3 作用機序 13
2.6.2.3 副次的薬理試験 14
2.6.2.3.1 血小板及び自然免疫への影響 14
2.6.2.3.1.1 血小板活性化に対する作用 14
2.6.2.3.1.2 自然免疫に対する作用 14
2.6.2.3.2 各種酵素、受容体、イオンチャネル及びトランポーターへの影響 15
2.6.2.3.2.1 各種酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する作用（1） 15
2.6.2.3.2.2 各種酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する作用（2） 15
2.6.2.3.2.3 各種キナーゼに対する作用（1） 16
2.6.2.3.2.4 各種キナーゼに対する作用（2） 16
2.6.2.3.2.5 各種プロテインキナーゼに対する作用 17
2.6.2.3.2.6 VEGF 受容体 2 に対する作用 17
2.6.2.3.2.7 Ret に対する作用 17
2.6.2.3.3 出血リスク及び血栓に対する作用 18

2.6.2.3.3.1 R406 の止血機能に対する作用 18
2.6.2.3.3.2 血栓の形成及び出血時間に対する作用 18
2.6.2.4 安全性薬理試験 21
2.6.2.4.1 中枢神経系 21
2.6.2.4.1.1 R406 ベシル酸塩：Irwin 法によるラットの中枢神経系に及ぼす影響 21
2.6.2.4.2 呼吸系 21
2.6.2.4.2.1 R406 ベシル酸塩：ラットの呼吸数及び 1 回換気量に及ぼす影響 21
2.6.2.4.3 心血管系 21
2.6.2.4.3.1 R406：hERG チャネル安定発現 HEK293 細胞株の hERG 電流に及ぼす影響 21
2.6.2.4.3.2 R406 ベシル酸塩：テレメトリー法による覚醒下サルの心血管系に及ぼす影響 21
2.6.2.4.4 血圧に及ぼす影響に関する探索的試験 21
2.6.2.4.4.1 R788：テレメトリー法による覚醒下ラットの単回投与後の心血管系パラメータに及ぼす影響 22
2.6.2.4.4.2 R788：テレメトリー法による覚醒下ラットの 28 日間投与後の心血管系パラメータ及び深部体温に及ぼす影響 22
2.6.2.4.4.3 R406：麻酔下ラット静脈内投与後の心血管系への影響 22
2.6.2.4.4.4 R406：*In vitro* でのラット大動脈の血管機能への影響 23
2.6.2.4.4.5 R406：*In vitro* でのヒト皮下抵抗動脈の血管緊張に及ぼす影響 23
2.6.2.4.4.6 R406：*In vitro* でのラット摘出心臓に及ぼす影響 23
2.6.2.4.4.7 R406：麻酔下ラットでの血管内皮機能に及ぼす影響 23
2.6.2.4.4.8 R406：*In vitro* でのヒト内皮細胞における VEGF 誘発 NO 合成及びキナーゼシグナリングへの影響 24
2.6.2.4.4.9 R788：テレメトリー法を用いた降圧剤による覚醒下ラットの血圧への影響 24
2.6.2.4.4.10 R788：テレメトリー法を用いたニフェジピン併用による覚醒下ラットの心血管パラメータへの影響 24
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 25
2.6.2.6 考察及び結論 26
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験 26
2.6.2.6.2 副次的薬理試験 26
2.6.2.6.3 安全性薬理試験 27
2.6.2.7 図表 29
2.6.2.8 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

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
ASA	Acetyl salicylic acid	アセチルサリチル酸
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
Btk	Bruton's tyrosine kinase	ブルトン型チロシンキナーゼ
CD	Cluster of differentiation	分化抗原群
CD62P	Cluster of differentiation 62 platelet	血小板に発現する CD62
CMC	Carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロース
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
Erk1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2	細胞外シグナル調節キナーゼ 1 及び 2
FcγR	Fc gamma receptor	Fc 受容体γ鎖
fMLP	Formyl-Met-Leu-Phe	N-ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン
GDNF	Glial cell line derived neurotrophic factors	グリア細胞株由来神経栄養因子
GP	Glycoprotein	糖蛋白質
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子
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
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
Kd	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
Ki	Inhibition constant	阻害定数
Km	Michaelis constant	ミカエリス定数
Lyn	Lck/Yes-related tyrosine kinase	Lyn キナーゼ
NO	Nitric oxide	一酸化窒素

略号	略していない表現	内容
NOEL	No observed effect level	無影響量
PD	Pharmacodynamics	薬力学
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
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PR interval	PR interval	P 波の始まりから QRS 波の始まりまでの時間
PS	Polystyrene	ポリスチレン
QA interval	QA interval	心筋収縮性の間接的な指標
QRS interval	QRS interval	QRS 波の初めから終りまでの時間
QT interval	QT interval	QRS 波の始まりから T 波の終わりまでの時間
QTcB	QTcB	Bazett の補正方法により心拍数で補正した QT 間隔
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
RTBF	Relative thrombosis blood flow	エッチング時のピーク血流と測定時の最終 50 分間の平均血流を相対比較したもの（%）
SD	Sprague Dawley	Sprague Dawley 系（ラット）
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
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TT	medullary thyroid cancer	甲状腺髄様癌
TTO	Time to occlusion	閉塞に至るまでの時間
UDP	Uridine diphosphate	ウリジン二リン酸
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 概略

R788 は新規の経口 Syk 阻害剤であり、プロドラッグ製剤である [1)]。小腸の ALP によって、R788 のリン酸基が切断され、R406 に変換される。R406 は ATP 競合的に Syk を阻害する。

ITP における血小板数の減少は、主にマクロファージの FcγR を介したシグナルの活性化によって引き起こされる [2), 3)]。FcγR シグナルの活性化は、オプソニン化された血小板上の抗血小板自己抗体の Fc 部分がマクロファージの FcγR に結合することにより生じ、さらにその下流の Syk を活性化させる [4)]。Syk の活性化は、オプソニン化された血小板のマクロファージによる貪食・破壊に重要な役割を担うとともに、抗血小板自己抗体の産生に関与する B 細胞の活性化にも寄与している [5)-9)]。Syk を阻害することは、マクロファージによる血小板の貪食・破壊及び B 細胞における抗血小板自己抗体の産生を抑制すると考えられるため、R788 は ITP における新たな治療薬として期待される。

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 [10), 11)] における R788 の有効性を検討した [12)]。

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、R406 の中枢神経系、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。

2.6.2.1.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.2.1 *In vitro* 試験

R406 は ATP 競合的に Syk 活性を阻害し、その Ki 値は 30 nmol/L であった。また、R406 はヒト、マウス及びラットの Syk 活性を阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 25、20 及び 30 nmol/L であった。

ヒト末梢血単核細胞由来の初代培養マクロファージを用いた TNFα 産生試験において、R406 はヒト IgG により惹起された TNFα の産生を抑制し、その EC_{50} 値は 111 nmol/L であった。

ヒト末梢血から単離したヒト初代培養 B 細胞を用いた CD69 の発現量評価試験において、R406 は抗 IgM 抗体による B 細胞表面の CD69 の発現量上昇を抑制し、その EC_{50} 値は 216 nmol/L であった。

ヒト全血を用いたCD69の発現量評価試験において、R406は抗ヒトIgG/IgM抗体によるB細胞表面のCD69の発現量上昇を抑制し、そのIC_{50}値は5.0 μmol/Lであった。

また、ヒト全血を用いたSykの活性化評価試験において、R406は抗ヒトIgG/IgM抗体によるSykの活性化を抑制し、そのIC_{50}値は3.5 μmol/Lであった。

2.6.2.1.2.2 *In vivo* 試験

マウスを用いて作製したITPモデルにおいて、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。

2.6.2.1.3 副次的薬理試験

2.6.2.1.3.1 *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抑制作用を示したが、ADPによるCD62Pの発現量上昇には作用を示さなかった。

自然免疫に対するR406の影響を検討した。R406（1～50 μmol/L）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。

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おいてR406の10 μmol/Lで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。

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。

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%以上の阻害作用を示し、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。

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の120種類のキナーゼに対するIC_{50}値は3～3490 nmol/Lであった。

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て、細胞アッセイにおいて阻害作用が低下した。

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。

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。

2.6.2.1.3.2 *In vivo* 試験

マウスを用いて止血機能に対する作用を検討した。R406（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。

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。

2.6.2.1.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験（中枢神経系、呼吸系及び心血管系）において、ラット中枢神経系試験では、R406 ベシル酸塩の 50 mg/kg で軽度な行動異常として活動性低下が認められ、サルの心血管系試験では、R406 ベシル酸塩の 50 mg/kg で心拍数の軽度な減少、並びに血圧の上昇傾向が認められた。呼吸系に対する影響も含め、R406 ベシル酸塩の忍容性は良好であった。

R788 による血圧上昇の機作解析を目的に、探索的な心血管系試験を実施した。麻酔下ラット試験では、R788 誘発性の血圧上昇が血管抵抗の増加に起因することが示唆された。その他の探索的試験の結果から、VEGF 誘発性の血管内皮からの NO 放出が R788 により抑制されることで血管弛緩を阻害し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、R406 の血漿中濃度と血圧上昇との間に直接的な関連性が認められた。血圧上昇は 28 日間の投与期間を通して持続し、休薬後にベースライン値に戻った。また、血圧上昇はニフェジピン（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（アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬）などの標準的な降圧剤投与により回復した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1 ヒト Syk 活性に対する阻害定数

添付資料 4.2.1.1.1

目的：ヒト Syk 活性に対する R406 の Ki 値を検討した。

方法：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生成物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。

結果：ヒト Syk 活性に対して R406 は ATP 競合的な阻害作用を示し、その Ki 値は 30 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-1）。

結論：R406 は ATP 競合的にヒト Syk 活性を阻害し、Ki 値は 30 nmol/L であった。

表 2.6.2.2.1.1-1　ヒト Syk 活性に対する R406 の Ki 値

Concentrations Tested（μmol/L）	ATP Concentrations（μmol/L）	Ki（nmol/L）
2, 0.5, 0.125, 0.031, 0.008	200 - 1.56	30
0.125, 0.062, 0.031, 0.016, 0.008	200 - 1.56	30

2.6.2.2.1.2 Syk 阻害活性の種差

添付資料 4.2.1.1.2、4.2.1.1.3、4.2.1.1.4

目的：ヒト、マウス及びラット Syk 活性に対する R406 の阻害作用を検討した。

方法：キャピラリー電気泳動分析により、蛍光標識されたペプチドのヒト、マウス及びラット Syk によるリン酸化を酵素反応速度論的に測定した。R406 添加時（検討濃度：0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μmol/L）のヒト、マウス及びラット Syk 活性を測定し、初期線形速度を指標として、IC_{50} 値を算出した。

結果：R406 はヒト、マウス及びラット Syk による蛍光ペプチドのリン酸化を抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ 25、20 及び 30 nmol/L であった。

結論：R406 はヒト、マウス及びラット Syk 活性に対して強い阻害作用を示し、その阻害作用はヒト、マウス及びラットにおいて同等であった。

2.6.2.2.1.3 FcγR シグナルに対する阻害作用

添付資料 4.2.1.1.5

目的：ヒト初代培養マクロファージの FcγR シグナルに対する R406 の阻害作用を検討した。

方法：ヒト末梢血単核細胞由来の初代培養マクロファージに対して、ヒト IgG による FcγR の架橋刺激を与えた際の TNFα の産生量を、蛍光染色したマイクロビーズを用いた Luminex® アッセイで評価した。R406 添加時（検討濃度：0.003～10 μmol/L）の TNFα 産生量の阻害率から、EC_{50} 値を算出した。

結果：R406 はヒト IgG によるヒト初代培養マクロファージからの TNFα 産生を抑制し、その EC_{50} 値は 111 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.3-1）。

結論：R406 はヒト初代培養マクロファージにおいて FcγR シグナルの阻害作用を示した。

表 2.6.2.2.1.3-1　ヒト初代培養マクロファージにおける FcγR シグナルに対する R406 の阻害作用

Concentrations Tested (μmol/L)	Cell type	Stimulation	Signaling pathway	Evaluation item	EC_{50} (nmol/L)
0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10	Cultured human primary macrophages	Human IgG	FcγR	TNFα production	111

2.6.2.2.1.4 BCR シグナルに対する阻害作用

添付資料 4.2.1.1.5

目的：ヒト B 細胞の BCR シグナルに対する R406 の阻害作用を検討した。

方法：ヒト末梢血より単離した初代培養 B 細胞に対して、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 の発現量をフローサイトメトリー法で評価した。R406 添加時（検討濃度：0.0030～10 μmol/L）の CD69 の発現量の抑制率から EC_{50} 値を算出した。

結果：R406 は抗 IgM 抗体によるヒト初代培養 B 細胞表面の CD69 の発現量上昇を抑制し、その EC_{50} 値は 216 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.4-1）。

結論：R406 は B 細胞において BCR シグナルの阻害作用を示した。

表 2.6.2.2.1.4-1　R406 の BCR シグナルに対する阻害作用

Concentrations Tested (μmol/L)	Cell type	Stimulant	Signaling pathway	Evaluation item	EC_{50} (nmol/L)
Donor A : 0.0046, 0.014, 0.041, 0.12, 0.37, 1.11, 3.33, 10 Donor B, C : 0.0030, 0.0091, 0.027, 0.082, 0.25, 0.74, 2.2, 6.7	Human primary B cells	Anti-human IgM antibody	BCR	CD69 expression level	216

2.6.2.2.1.5 B 細胞表面の CD69 の発現量に対する阻害作用

添付資料 4.2.1.1.6

目的：ヒト B 細胞表面の CD69 の発現量に対する R406 の阻害作用を検討した。

方法：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 の発現量をフローサイトメトリーで評価した（R406 の検討濃度：0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/L）。

結果：R406 は抗ヒト IgG/IgM 抗体による CD69 の発現量上昇を抑制し、IC_{50} 値は 5.0 μmol/L であった。

結論：R406 はヒト血液中の B 細胞において、抗ヒト IgG/IgM 抗体が誘導する細胞表面の CD69 の発現量上昇を抑制した。

2.6.2.2.1.6 B 細胞における Syk の活性化に対する阻害作用

添付資料 4.2.1.1.7

目的：R406 の B 細胞における Syk の活性化に対する阻害作用を検討した。

方法：ヒト血液中の B 細胞に抗ヒト IgG/IgM 抗体を作用させた際の、Syk のリン酸化を Syk の活性化指標としてフローサイトメトリーで評価した（R406 の検討濃度：0.03、0.1、0.3、1、

3、10、30 µmol/L）。

結果：R406 は抗ヒト IgG/IgM 抗体による B 細胞の Syk のリン酸化を抑制し、IC_{50} 値は 3.5 µmol/L であった。

結論：R406 はヒト血液中の B 細胞において抗ヒト IgG/IgM 抗体による Syk の活性化を抑制した。

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

ITP の病態発症に関与する血小板膜糖蛋白である CD41 及び CD42 に対する抗体を用いて作製したマウス ITP モデルにおいて、R788 の有効性を評価した。

2.6.2.2.2.1 抗 CD41 抗体誘発マウス ITP モデルに対する作用

添付資料 4.2.1.1.8

目的：マウスに抗 CD41 抗体を投与するとヒトの ITP に類似した血小板数の減少が誘発されることが知られている。抗 CD41 抗体誘発マウス ITP モデルを用いて、血小板数減少に対する R788 の作用を評価した。

方法：表 2.6.2.2.2.1-1 のように試験群を設定した。図 2.6.2.2.2.1-1 に示すプロトコルに従って、マウスに抗 CD41 抗体を投与する 24 時間前にマウス IgG を、30 分前に媒体又は R788 をそれぞれ投与した。生理食塩液、Isotype Control 抗体又は抗 CD41 抗体投与 4 時間後に血液を採取し、血小板数を評価した。

結果：Normal 群及び Isotype control 群において、血小板数はそれぞれ 108.0±4.3 及び 111.9±4.2（$\times10^4$/µL）であり、Control-CD41 群の血小板数は 14.1±2.0（$\times10^4$/µL）であった。R788 の 20、40 及び 80 mg/kg 投与群の血小板数はそれぞれ 23.0±4.4、42.5±8.0 及び 46.1±4.6（$\times10^4$/µL）であったことから、R788 投与による血小板数の減少抑制作用が確認された。R788 の 40 及び 80 mg/kg 投与群の血小板数は、Control-CD41 群と比較して有意に多かった（図 2.6.2.2.2.1-2）。

結論：R788 は抗 CD41 抗体誘発マウス ITP モデルに対して有効性を示し、R788 の 40 及び 80 mg/kg において血小板数の減少を有意に抑制した。

表 2.6.2.2.2.1-1　試験群

Group	Test Substance	Dose（mg/kg）	Antibody
Normal	Vehicle*1	0	—*2
Isotype control	Vehicle*1	0	Isotype Control antibody
Control-CD41	Vehicle*1	0	Anti-CD41 antibody
R20-CD41	R788	20	Anti-CD41 antibody
R40-CD41	R788	40	Anti-CD41 antibody
R80-CD41	R788	80	Anti-CD41 antibody
Positive control-CD41	mouse IgG	200	Anti-CD41 antibody

*1 : 0.1% CMC Na-0.1%メチルパラベン-0.02%プロピルパラベン水溶液を投与した。
*2 : 生理食塩液を投与した。

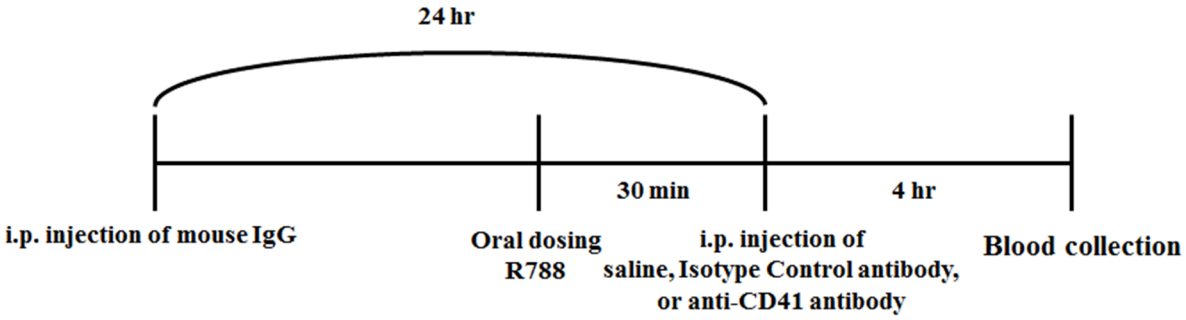


図 2.6.2.2.2.1-1　抗 CD41 抗体誘発マウス ITP モデル評価試験の流れ

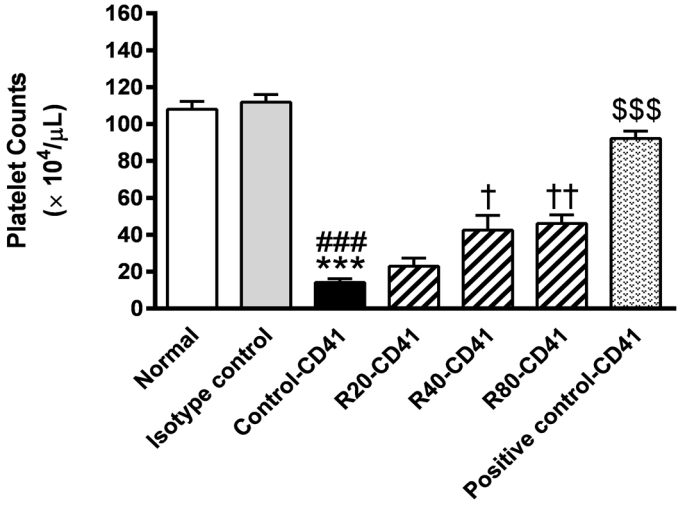


図 2.6.2.2.2.1-2　抗 CD41 抗体誘発マウス ITP モデルにおける R788 の単回経口投与作用

図中の各カラムは 12 例の平均値+標準誤差を示す。
*** p<0.001 : Normal 群との Aspin-Welch の t 検定
p<0.001 : Isotype control 群との Aspin-Welch の t 検定
† p<0.05、†† p<0.01 : Control-CD41 群との Steel 検定
$$$ p<0.001 : Control-CD41 群との Aspin-Welch の t 検定

2.6.2.2.2.2 抗 CD42 抗体誘発マウス ITP モデルに対する作用

添付資料 4.2.1.1.9

目的：マウスに抗 CD42 抗体を投与するとヒトの ITP に類似した血小板数の減少が誘発されることが知られている。抗 CD42 抗体誘発マウス ITP モデルを用いて、血小板数減少に対する R788 の作用を評価した。

方法：表 2.6.2.2.2.2-1 のように試験群を設定した。図 2.6.2.2.2.2-1 に示すプロトコルに従って、マウスに抗 CD42 抗体を投与する 24 時間前にマウス IgG を、30 分前に媒体又は R788 をそれぞれ投与した。生理食塩液、Isotype Control 抗体又は抗 CD42 抗体投与 4 時間後に血液を採取し、血小板数を評価した。

結果：Normal 群及び Isotype control 群において、血小板数はそれぞれ 114.4±3.6 及び 120.9±2.9（×10^4/μL）であり、Control-CD42 群の血小板数は 27.7±3.0（×10^4/μL）であった。R788 の 20、40 及び 80 mg/kg 投与群の血小板数はそれぞれ 36.6±3.9、50.0±5.8 及び 56.3±3.6（×10^4/μL）であることから、R788 投与による血小板数の減少抑制作用が確認された。R788 の 40 及び 80 mg/kg 投与群の血小板数は、Control-CD42 群と比較して有意に多かった（図 2.6.2.2.2.2-2）。

結論：R788 は抗 CD42 抗体誘発マウス ITP モデルに対して有効性を示し、R788 の 40 及び 80 mg/kg において血小板数の減少を有意に抑制した。

表 2.6.2.2.2.2-1　試験群

Group	Test Substance	Dose（mg/kg）	Antibody
Normal	Vehicle*1	0	—*2
Isotype control	Vehicle*1	0	Isotype Control antibody
Control-CD42	Vehicle*1	0	Anti-CD42 antibody
R20-CD42	R788	20	Anti-CD42 antibody
R40-CD42	R788	40	Anti-CD42 antibody
R80-CD42	R788	80	Anti-CD42 antibody
Positive control-CD42	mouse IgG	200	Anti-CD42 antibody

*1 : 0.1% CMC Na-0.1%メチルパラベン-0.02%プロピルパラベン水溶液を投与した。
*2 : 生理食塩液を投与した。

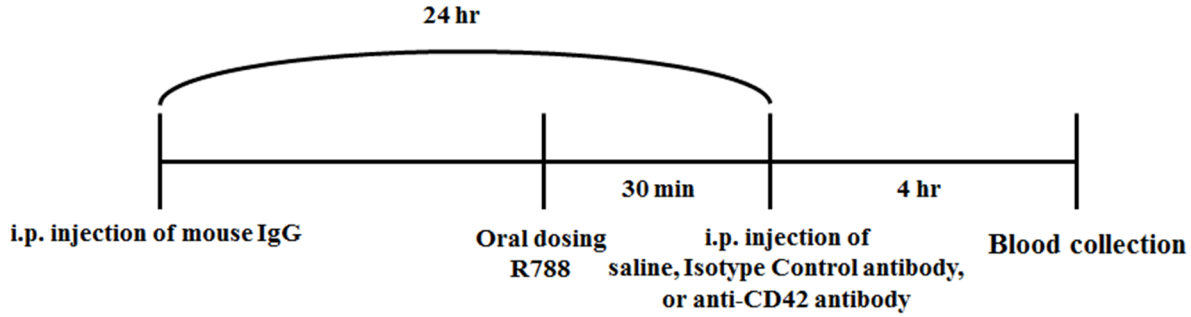


図 2.6.2.2.2.2-1　抗 CD42 抗体誘発マウス ITP モデル評価試験の流れ

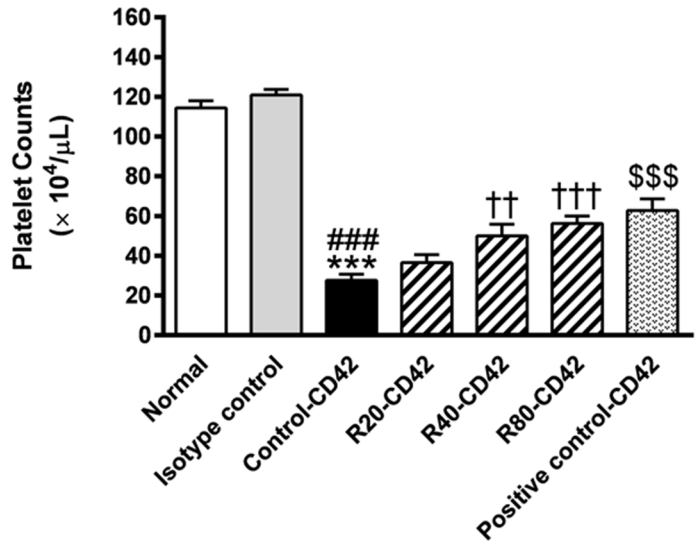


図 2.6.2.2.2.2-2　抗 CD42 抗体誘発マウス ITP モデルにおける R788 の単回経口投与作用

図中の各カラムは 12 例の平均値+標準誤差を示す。
***p<0.001 : Normal 群との間の Student の t 検定
###p<0.001 : Isotype control 群との間の Student の t 検定
††p<0.01，†††p<0.001 : Control-CD42 群との間のパラメトリック Dunnett 型多重比較検定
$$$p<0.001 : Control-CD42 群との間の Aspin-Welch の t 検定

2.6.2.2.3 作用機序

ITP は、血小板膜蛋白に対する自己抗体が発現し、血小板や巨核球に結合する結果、脾臓における網内系細胞での血小板破壊の亢進と骨髄での血小板産生の抑制が起こり、血小板減少を来す自己免疫疾患である [13)]。

この ITP における血小板数の減少は、主に血小板膜糖蛋白［GPIIb/IIIa（CD41/CD61）及び GPIb/IX（CD42）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、主に脾臓のマクロファージによって貪食・破壊されることにより生じる [14)]。また、抗血小板自己抗体は巨核球の成熟障害やアポトーシスを誘導し、血小板産生を障害する [14), 15)]。

オプソニン化された血小板の貪食・破壊は、主にマクロファージ上の FcγR の活性化によって引き起こされる。オプソニン化された血小板上の抗血小板自己抗体の Fc 部分が FcγR に結合するとその下流にある Syk シグナルが活性化される。この Syk シグナルの活性化が、オプソニン化された血小板の貪食・破壊において重要な役割を果たす [5), 6)]。また、Syk を欠損したマウスにおいて、B 細胞の分化、成熟及び生存が障害されることから、Syk シグナルの活性化は、抗血小板自己抗体産生に関与する B 細胞の活性化に関与していることが示唆されている [7)-9)]。

以上のように、Syk シグナルの活性化を抑制することは ITP の治療に有効であると考えられる [1)]。

In vitro 試験において、R406 は Syk を強力に阻害し、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した。また、R788 は ITP モデルにおいて血小板数の減少を有意に抑制した。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破壊を抑制し、ITP の病態を改善すると考えられる。さらに、R406 は B 細胞における Syk シグナルの活性化を阻害することから、R406 による ITP の病態改善には、B 細胞からの抗血小板自己抗体の産生抑制が関与する可能性が考えられる。

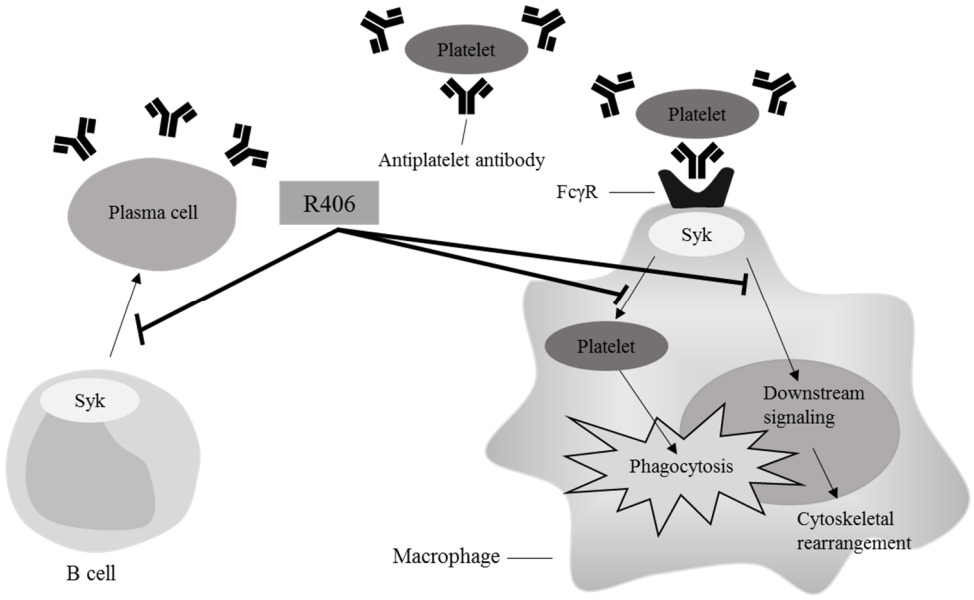


図 2.6.2.2.3-1　　R406 の作用機序

参考文献 [1)] より改変引用

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 血小板及び自然免疫への影響

2.6.2.3.1.1 血小板活性化に対する作用

添付資料 4.2.1.2.1

目的：R406 の血小板活性化に対する作用を検討した。

方法：ヒト末梢血から採取した多血小板血漿を用いた。コラーゲン又は ADP により惹起される、血小板の活性化指標である CD62P の発現量上昇に対する R406 の作用をフローサイトメトリーで評価した。

結果：R406 はコラーゲンによる CD62P の発現量上昇に対して弱い阻害作用を示した。一方、ADP による発現量上昇には作用を示さなかった（表 2.6.2.3.1.1-1）。

結論：R406 はコラーゲンを介した血小板の活性化に対して阻害作用を示したが、ADP を介した血小板の活性化には作用を示さなかった。

表 2.6.2.3.1.1-1　R406 の CD62P 細胞表面の発現量上昇に対する作用

Compound	Concentration (μmol/L).	Inducer	% inhibition
R406	5	Collagen	42
R406	5	ADP	0

2.6.2.3.1.2 自然免疫に対する作用

添付資料 4.2.1.2.2

目的：R406 の自然免疫に対する影響を検討した。

方法：以下の 4 試験において R406 の自然免疫への影響を評価した。

1)　走化性の細菌ペプチド fMLP に対する好中球の遊走をフローサイトメトリーで評価した。

2)　白血球による細菌（大腸菌）の食作用をフローサイトメトリーで評価した。

3)　細菌（大腸菌）による白血球酸化バーストをフローサイトメトリーで評価した。

4)　好中球の殺菌活性を細菌（黄色ブドウ球菌）の成長を指標に評価した。

結果：R406 は 10 μmol/L までヒト好中球の遊走に影響を与えなかった（表 2.6.2.3.1.2-1）。R406 は 50 μmol/L までヒト白血球による細菌の食作用に影響を与えなかった（表 2.6.2.3.1.2-2）。大腸菌による白血球酸化バーストに対して R406 の EC_{50} 値（μmol/L）は 30 μmol/L 以上であった（表 2.6.2.3.1.2-3）。また、R406 は 20 μmol/L においてヒト好中球の殺菌活性に影響を示さなかった（表 2.6.2.3.1.2-4）。

結論：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いことから、自然免疫に対する影響は小さいと考えられた。

表 2.6.2.3.1.2-1　R406 の好中球遊走に対する影響

Compound	Concentration (µmol/L).	% inhibition
R406	10	0
R406	10	0

表 2.6.2.3.1.2-2　R406 の白血球による細菌の食作用に対する影響

Compound	Particle	EC_{50} (µmol/L)
R406	*Escherichia coli*	>50
R406	*Escherichia coli*	>20

表 2.6.2.3.1.2-3　R406 の白血球酸化バーストに対する影響

Compound	Inducer	EC_{50} (µmol/L)
R406	*Escherichia coli*	>30
R406	*Escherichia coli*	Inactive

表 2.6.2.3.1.2-4　R406 の好中球の殺菌活性に対する影響

Compound	Inducer	Concentration	Microbicidal activity (%)
R406	*Staphylococcus aureus*	10, 2, 1 µmol/L	20 (10 µmol/L)
R406	*Staphylococcus aureus*	20, 5, 1.25 µmol/L	No inhibition (20 µmol/L).
R406	*Staphylococcus aureus*	25, 10, 4 µmol/L	27 (25 µmol/L) No inhibition (10 µmol/L).

2.6.2.3.2 各種酵素、受容体、イオンチャネル及びトランポーターへの影響

2.6.2.3.2.1 各種酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する作用（1）

添付資料 4.2.1.2.3

目的：R406 の選択性及び特異性を評価するため、酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含む 140 種類の分子標的に対する作用を検討した。

方法：放射性リガンドを用いた結合親和性試験により評価した。

結果：R406 はアデノシン 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おいて 10 µmol/L の濃度で 50%以上の阻害率を示した（表 2.6.2.3.2.1-1）。また、その中で最も強い阻害作用を示したアデノシン A3 受容体の IC_{50} 値は 80.6 nmol/L であった。

結論：R406 は 140 種類の分子標的に対して比較的選択性及び特異性を示した。

表 2.6.2.3.2.1-1　R406 の濃度が 10 µmol/L において 50%以上の阻害率を示した分子標的一覧

Molecular target	Species	IC_{50} (nmol/L)
Adenosine A_3	Human	80.6
Transporter, Adenosine	Guinea pig	1840
Transporter, Monoamine	Rabbit	2740

2.6.2.3.2.2 各種酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する作用（2）

添付資料 4.2.1.2.4

目的：R406 の選択性及び特異性を評価するため、酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含む多様な 211 種類の分子標的に対する作用を検討した。

方法：203 種類の分子標的に対する影響を放射性リガンドの結合親和性試験及び酵素の活性

試験により評価した。また、8 種類の心臓に発現する電位依存性イオンチャネルに対する影響を電気生理学的試験により評価した。

結果：R406 は 17 の分子標的に関して 50%以上の阻害率を示した（表 2.6.2.3.2.2-1）。そのうち、アデノシン A3 受容体に対する R406 の IC_{50} 値は 18 nmol/L と強い阻害作用を示した。また、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で Ki 値がそれぞれ 17、630 及び 1630 nmol/L となった。

結論：R406 は 17 の分子標的に対して 50%以上の阻害率を示し、特にアデノシン A3 受容体に対する阻害作用が強いことが示された。

表 2.6.2.3.2.2-1　R406 が 50%以上の阻害率を示した分子標的一覧

Molecular Target [a)]	R406 concentration (µmol/L)	IC_{50} (nmol/L)	Ki (nmol/L)
Adenosine A_3 receptor	10	18	17
Protein tyrosine kinase, FGFR1	10	46.1	nd [c)]
Protein tyrosine kinase, FLT1	10	69.8	nd [c)]
Protein tyrosine kinase, SRC	10	83.1	nd [c)]
UDP glucuronosyltransferase, UGT1A1	10	143	nd [c)]
Protein tyrosine kinase, YES1	10	191	nd [c)]
Phosphodiesterase 5	10	308	nd [c)]
Fatty acid amide hydrolase（rat）	10	1510	nd [c)]
Adenosine transporter	10	1860	630
Monoamine transporter（rabbit）	10	1960	1630
Protein serine / threonine kinase, ROCK1	10	2340	nd [c)]
Adenosine transporter（guinea pig）	10	2380	810
Protein tyrosine kinase, EGF receptor	10	5230	nd [c)]
5-lipoxygenase	10	5500	nd [c)]
Peptidase, cathepsin L	10	5930[b)]	nd [c)]
Peptidase, cathepsin S	10	11900[b)]	nd [c)]
$hNa_v1.5$	100	52300	—

a): All human except where noted
b): IC_{50} value should be treated as estimate only
c): Ki not determined for enzyme assays

2.6.2.3.2.3 各種キナーゼに対する作用（1）

添付資料 4.2.1.2.5

目的：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影響を検討した。

方法：DNA がタグ付けされたキナーゼを用いた競合結合親和性試験により評価した。

結果：R406 の 10 µmol/L は 388 種類のキナーゼのうち 197 種類において 80%以上の阻害作用を示し、192 種類に対して 1 µmol/L 以下の Kd 値を示した。一方、Syk と同等以上に小さい Kd 値を示したのは 16 種類であった。

結論：R406 は評価した 388 種類のキナーゼのうち 192 種類に対して 1 µmol/L 以下の Kd 値を示した。

2.6.2.3.2.4 各種キナーゼに対する作用（2）

添付資料 4.2.1.2.6

目的：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

する影響を検討した。

方法：放射線標識された ATP を用いてキナーゼ活性を評価することで、R406 の阻害作用を検討した（検討濃度：0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μmol/L）。

結果： 139 種類のキナーゼのうち 120 種類において R406 は阻害活性を示し、IC_{50} 値は 3～3490 nmol/L であった。一方、Syk と同等以上に小さい IC_{50} 値を示したのは 24 種類であった。

結論：放射線標識された ATP を用いたキナーゼ活性試験において、R406 は 139 種類のキナーゼのうち 120 種類に対して IC_{50} 値を示した。

2.6.2.3.2.5 各種プロテインキナーゼに対する作用

添付資料 4.2.1.2.7

目的：すべてのチロシンキナーゼのキナーゼドメインの構造はある程度類似しており、他のキナーゼに関しても R406 は少なからず阻害作用を示す可能性がある。そこで、95 種類のプロテインキナーゼに対して R406 の作用を検討した。

方法：ATP 濃度が 10 μmol/L において、各プロテインキナーゼに対する R406（0.3、1 又は 3 μmol/L）の阻害活性を評価した。Lyn、Aurora 及び Btk については生化学アッセイと細胞アッセイで阻害作用を比較した。

結果：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て、細胞アッセイにおいて阻害作用が低下した。

結論：Syk に対する R406 の阻害作用は生化学アッセイ及び細胞アッセイで同等であったが、一方、Lyn、Aurora 及び Btk は生化学アッセイと比較して、細胞アッセイで R406 の阻害作用が減弱した。細胞アッセイにおいて Syk に対する R406 の阻害作用が最も強かった。

2.6.2.3.2.6 VEGF 受容体 2 に対する作用

添付資料 4.2.1.2.8

目的：VEGF 受容体 2 は腫瘍の血管新生に重要な役割を果たすことから R406 の VEGF 受容体 2 に対する作用を評価した。

方法：ELISA により R406 の VEGF 受容体 2 活性に対する作用を評価した。

結果：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（検討濃度：0.00061、0.0024、0.0098、0.039、0.16、0.63、2.5、10 μmol/L）、HUVEC 細胞を用いたアッセイにおいて EC_{50} 値は 333 nmol/L（検討濃度：0.0091、0.027、0.082、0.25、0.74、2.2、6.7、20 μmol/L）であった。

結論：R406 は VEGF 受容体 2 活性を阻害した。

2.6.2.3.2.7 Ret に対する作用

添付資料 4.2.1.2.9

目的：Ret は神経系や腎臓の発達に重要な役割を果たすため、Ret のキナーゼ活性阻害は胎児の重大な毒性につながる可能性がある。そこで、R406 の Ret のキナーゼ活性に対する作用を評価した。

方法：蛍光偏光法により R406 の Ret のキナーゼ活性に対する作用を評価した（R406 の検討

濃度：0.017、0.051、0.15、0.46、1.4、4.1、12、37、111、333、1000 nmol/L）。また、SK-N-SH 細胞に GDNF を添加時の Ret のキナーゼ活性（R406 の検討濃度：0.003、0.016、0.08、0.4、2 μmol/L）及び TT 細胞で恒常的に活性化している Ret のキナーゼ活性（R406 の検討濃度：0.016、0.08、0.4、2 μmol/L）に対する R406 の作用をウエスタンブロットで評価した。

結果：R406 は Ret のキナーゼ活性を強力に阻害し、蛍光偏光法において IC_{50} 値は 5 nmol/L、ウエスタンブロットにおいていずれの細胞も EC_{50} 値は 80 nmol/L であった。

結論：R406 は Ret のキナーゼ活性を強力に阻害した。

2.6.2.3.3 出血リスク及び血栓に対する作用

2.6.2.3.3.1 R406 の止血機能に対する作用

添付資料 4.2.1.2.1

目的：血小板凝集及び血液凝固が関与する止血機能に対する R406 の作用を検討した。

方法：図 2.6.2.3.3.1-1 に示すプロトコルに従って R406 ベシル酸塩（10、30 及び 100 mg/kg）をマウスに経口投与した。投与 1 時間後に尾の先端を切断し、出血時間を最長 3 分間まで評価した。同時に同一個体から採血を行い、R406 の血漿中濃度と出血時間の関係を評価した。

結果：R406 投与群は、いずれの用量においても出血時間に影響を与えず、出血時間の延長が確認された個体もいなかった（表 2.6.2.3.3.1-1）。また、R406 投与により、用量依存的な血漿中濃度の増加が認められ、100 mg/kg における血漿中濃度は約 25 μmol/L であった。

結論：R406 は、高い血漿中濃度においても止血機能に対して影響を与えないことが示唆された。

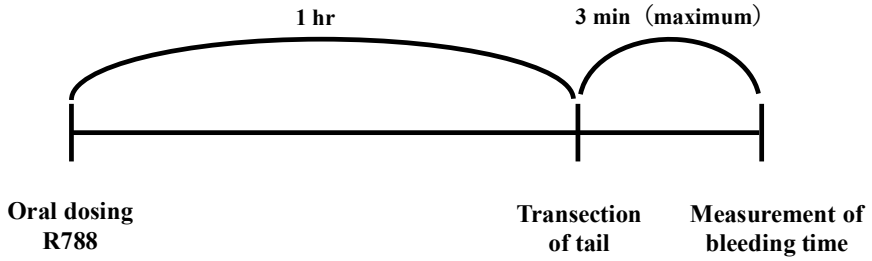


図 2.6.2.3.3.1-1　出血時間を評価する試験の流れ

表 2.6.2.3.3.1-1　R406 のマウス血漿中濃度及び出血時間に対する作用

Treatment	Dose (mg/kg)	Plasma concentration		Bleeding time	% Prolongation
		ng/mL mean ± SD	μmol/L mean ± SD	seconds mean ± SD	
Vehicle*	0	—	—	78 ± 29	—
R406	10	1048 ± 779	2.2 ± 1.7	57 ± 16	0
R406	30	4026 ± 739	8.6 ± 1.6	59 ± 12	0
R406	100	11756 ± 1268	25 ± 2.8	55 ± 20	0

*Vehicle: 70%PS80, 20%PEG-400, 10%PG

2.6.2.3.3.2 血栓の形成及び出血時間に対する作用

添付資料 4.2.1.2.10

目的：血栓の形成及び出血時間に対する R788 の影響をラット血栓症モデルで評価した。

方法：図 2.6.2.3.3.2-1 及び表 2.6.2.3.3.2-1 に従って塩化鉄（III）により誘発される血栓に対する R788 の影響を評価した。

–90 分 - R788 を経口投与した。

5 分 - ASA 又は媒体を静脈内投与した。

29 分 - 頸動脈から血流プローブを取り外した。

30 分 - 塩化鉄（III）処理により、血栓の形成を誘導した。

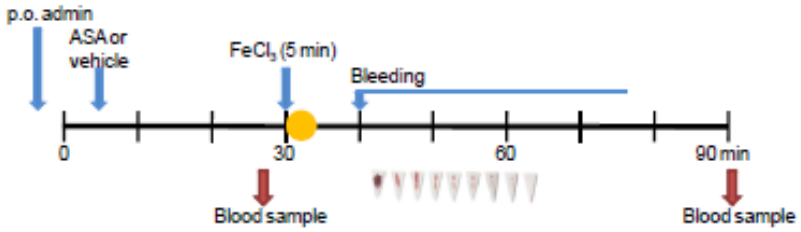
35 分 - 血流プローブを再設置した。

40 分 - 尾を深さ 1.2 mm、縦方向に 5 mm 切開した。傷口に綿を置き、出血が収まるまで 2.5 分ごとに綿（スワブ）の取り換えを行った。

90 分 - 頸動脈を切除し、血栓重量を測定した。

結果：R788 の最高用量では血栓形成を惹起した頸動脈の血流を有意に増加させた（表 2.6.2.3.3.2-2）。R788 は血栓重量に影響を与えなかったが、ASA と併用することで血栓重量はわずかに減少した（表 2.6.2.3.3.2-3）。R788 による出血時間の延長は認められなかった（表 2.6.2.3.3.2-4）。

結論：R788 は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、出血リスクの増加は認められなかった。



p.o. admin: 経口投与

図 2.6.2.3.3.2-1　血栓の形成及び出血時間を評価する試験の流れ

表 2.6.2.3.3.2-1　試験群

Group	Number	Dose of R788 mg/kg	Vehicle/ASA
1	9	Vehicle	Vehicle
2	6	10 (7.9)*	Vehicle
3	6	30 (24)*	Vehicle
4	6	100 (79)*	Vehicle
5	13	Vehicle	ASA
6	6	10 (7.9)*	ASA
7	6	30 (24)*	ASA
8	6	100 (79)*	ASA

* ()はホスタマチニブに換算した際の投与量を示す。
ホスタマチニブ 1 mg に相当する R788 の重量は 1.262 mg であるため、以下の式からホスタマチニブ換算量を算出した。
ホスタマチニブの投与量 ＝R788 の投与量÷1.262

表 2.6.2.3.3.2-2　RTBF 及び TTO

Dose of R788 mg/kg	Number	RTBF (%)		TTO (min)		TTO (closed/open)	
		− ASA	+ ASA	− ASA	+ ASA	− ASA	+ ASA
(vehicle/vehicle)	9	5.0 ± 2.34	—	12.9 ± 1.11	—	9/0	—
(vehicle/ASA)	13	—	26.1 ± 10.4	—	28.5 ± 6.10	—	13/4
10 (7.9)	6	16.6 ± 9.01	70.8 ± 16.8	29.1 ± 9.80	52.8 ± 7.25	4/2	1/5
30 (24)	6	30.4 ± 11.7	55.4 ± 18.0	37.0 ± 10.3	44.9 ± 9.54	3/3	2/4
100 (79)	6	38.2 ± 15.1*	46.3 ± 12.9	38.4 ± 9.65	52.8 ± 7.21	3/3	1/5
All doses	18	28.4 ± 6.96¥	57.5 ± 9.03¥	34.9 ± 5.47	50.2 ± 4.47	10/8#	4/14#

* Statistically significant difference vs vehicle/vehicle group, Oneway ANOVA
¥ Statistically significant difference vs vehicle/vehicle group or vehicle/ASA group, t-test
Statistically significant difference vs vehicle/vehicle group or vehicle/ASA group, Fisher's exact test

表 2.6.2.3.3.2-3　血栓重量

Dose of R788 mg/kg	Number	Weight (mg)		Antithrombotic effect (% inhibition)	
		– ASA	+ ASA	– ASA	+ ASA
(vehicle/vehicle)	9	4.2 ± 0.46	—	—	—
(vehicle/ASA)	13	—	3.6 ± 0.51	—	—
10 (7.9)	6	5.4 ± 0.48	2.5 ± 0.54	−29 ± 11.5	30 ± 14.9
30 (24)	6	3.7 ± 0.66	2.3 ± 0.35	11 ± 15.7	38 ± 9.7
100 (79)	6	3.9 ± 0.80	2.5 ± 0.60	8 ± 19	32 ± 16.4
All doses	18	4.3 ± 0.40	2.4 ± 0.28¥	−3 ± 9.6	33 ± 7.6

¥ Statistically significant difference vs vehicle/ASA group, t-test

表 2.6.2.3.3.2-4　出血時間

Dose of R788 mg/kg	Number	Bleeding time (min)		Bleeding time prolongation	
		– ASA	+ ASA	– ASA	+ ASA
(vehicle/vehicle)	9	17.2 ± 3.60	—	—	—
(vehicle/ASA)	13	—	19.4 ± 1.73	—	—
10 (7.9)	6	23.3 ± 0.83	23.8 ± 2.48	1.35 ± 0.048	1.22 ± 0.128
30 (24)	6	20.4 ± 3.32	17.1 ± 1.76	1.19 ± 0.193	0.88 ± 0.091
100 (79)	6	17.9 ± 2.18	13.3 ± 1.79	1.04 ± 0.127	1.69 ± 0.092
All doses	18	20.6 ± 1.38	18.1 ± 1.52	1.19 ± 0.08	0.93 ± 0.08

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 R406 ベシル酸塩：Irwin 法によるラットの中枢神経系に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.1

R406 による行動及び生理学的パラメータに及ぼす影響について、覚醒下 SD ラットの雄に R406 ベシル酸塩の 0（媒体対照）、5、15 及び 50 mg/kg を単回経口投与し、投与後 120 分まで Irwin 法により評価した。

5 及び 15 mg/kg では、投与後 120 分まで評価項目に特記すべき変化は認められなかった。50 mg/kg では、すべての観察時点で中枢神経系抑制の徴候が認められたが、いずれも軽度であったことから薬理学的意義は乏しいと判断した。それらの抑制徴候として、接触反応の低下が投与後 120 分を最大にすべての観察時点で認められた。また、驚愕反応の低下、自発運動の低下及び毛繕いの低下が投与後 90 分に認められ、さらに発声がすべての観察時点で数例の動物に認められた。NOEL は 15 mg/kg と判断された。

2.6.2.4.2 呼吸系

2.6.2.4.2.1 R406 ベシル酸塩：ラットの呼吸数及び 1 回換気量に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.2

R406 による呼吸数及び 1 回換気量に及ぼす影響について、SD ラットの雄に R406 ベシル酸塩の 0（媒体対照）、5、15 及び 50 mg/kg を単回経口投与し、投与後 4 時間までヘッドアウトプレチスモグラフィーを用いて評価した。R406 ベシル酸塩は投与後 4 時間まで呼吸数及び 1 回換気量に影響を及ぼさなかった。NOEL は 50 mg/kg と判断された。

2.6.2.4.3 心血管系

2.6.2.4.3.1 R406：hERG チャネル安定発現 HEK293 細胞株の hERG 電流に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.3

R406 による hERG チャネル由来のカリウムイオン電流に及ぼす影響について、2 μmol/L にて評価した。R406 は hERG 電流に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.3.2 R406 ベシル酸塩：テレメトリー法による覚醒下サルの心血管系に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.4

R406 による動脈圧、心拍数及び心電図に及ぼす影響を評価するため、覚醒下のカニクイザルの雄に、R406 ベシル酸塩の 0（媒体対照）、5、15 及び 50 mg/kg を単回経口投与し評価した。50 mg/kg では、心拍数の有意な減少と血圧の上昇傾向が認められた。50 mg/kg における血漿中 R406 濃度の平均 C_{max} は 4 μmol/L（1910 ng/mL、50 mg/kg の 4 例の平均値）であった。NOEL は 15 mg/kg と判断された。

2.6.2.4.4 血圧に及ぼす影響に関する探索的試験

R788 による血圧上昇の機序解析を目的に、探索的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。これら試験では、R788（又は R406）が心血管系全般に及ぼす影響を評価するとともに、血管機

能及びシグナル伝達への影響についても評価した。

2.6.2.4.4.1 R788：テレメトリー法による覚醒下ラットの単回投与後の心血管系パラメータに及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.5

血漿中 R406 濃度と心血管系パラメータ（血圧、心拍数及び心電図）との関連を評価するため、覚醒下 SD ラットの雄に、R788 の 10、30 及び 100 mg/kg を経口投与し、投与後 72 時間まで経時的に心血管パラメータを測定するとともに、薬物動態解析を行った。R788 の投与量に依存した血圧上昇が認められたが、投与後 10 時間までにベースライン値に戻った。血圧の経時変化は血漿中 R406 濃度と高い相関性を示しており、血圧上昇は本薬の直接的な薬理作用により誘発されることが示唆された。100 mg/kg では心拍数の減少傾向とともに、QA 間隔及び PR 間隔の延長が認められたことから、R788 は心臓の収縮力を低下させることが示唆された。

2.6.2.4.4.2 R788：テレメトリー法による覚醒下ラットの 28 日間投与後の心血管系パラメータ及び深部体温に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.6

R788 を反復投与した時の心血管系パラメータ（血圧、心拍数及び心電図）及び深部体温を評価するため、覚醒下 SD ラットの雄に、R788 の 0（媒体対照）、8.5 及び 30 mg/kg を 1 日 2 回、約 6 時間間隔で 28 日間経口投与し、心血管系パラメータを測定した。また、媒体のみを 4 日間投与する回復期間を設けた。

8.5 及び 30 mg/kg において、投与量及び投与期間に依存した血圧上昇が認められた。30 mg/kg では、投与 1 日目の 2 回目の投与後から顕著かつ持続的な血圧上昇が認められた。8.5 mg/kg では、投与 14 日目まで統計学的に有意な血圧上昇を示さなかったが、収縮期血圧は休薬後 4 日の媒体対照に比して大幅な上昇が認められた。心臓収縮力の低下を示唆する QA 間隔の延長が 30 mg/kg で投与 1 日目に認められたが、投与 14 日目までに QA 間隔は短縮に転じ、心臓収縮力の増加を示唆した。QA 間隔の短縮は、1 日 2 回投与における 2 回目の投与後のみに認められた。心拍数及び深部体温ともに、試験期間中を通じて散発的な変動が認められたが、その変動に一貫した傾向は認められなかった。

いずれのパラメータも、休薬後 4 日目（試験 32 日目）までに、媒体対照と同等の値まで回復した。投与 12 日目の定常状態における 8.5 及び 30 mg/kg の血漿中 R406 濃度の C_{max} は、それぞれ 1.270 ± 0.445 及び 5.049 ± 2.958 µmol/L であった。

2.6.2.4.4.3 R406：麻酔下ラット静脈内投与後の心血管系への影響

添付資料 4.2.1.3.7、4.2.1.3.8

R406 を投与したときの血圧、心拍数、左室圧、心電図（PR、QRS、QT 及び QTcB 間隔）及び血流量を評価するため、イソフルラン麻酔下の SD ラットの雄に、R406 の 0（媒体対照）、1、3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した。3 mg/kg 以上で血圧の上昇が認められるとともに、血流量の減少と大腿動脈の血管抵抗の増加も認められた。また、心臓収縮力の指標となる dP/dt_{max} は媒体投与により上昇したが、R406 投与によりその上昇が抑制された。

一方、上記試験では比較的高い投与容量（2.0 又は 1.5 mL/kg）を用いており、これが心収縮力に影響を及ぼした可能性が考えられた。そこで、投与容量を少なくする（1.0 mL/kg）とも

に、投与速度を抑えた 2 回目の試験を実施した。麻酔下 SD ラットの雄に R406 の 0（媒体対照）、3 及び 5 mg/kg を単回静脈内投与し、血圧、心拍数、左室圧、心電図及び血流量を測定した。3 mg/kg では血流量の減少が認められ、5 mg/kg では血圧の上昇と dP/dt_{max} の減少が認められた。3 及び 5 mg/kg における血漿中 R406 濃度の C_{max} はそれぞれ 3.90 ± 0.25 及び 6.02 ± 0.68 µmol/L であった。

2.6.2.4.4.4 R406：*In vitro* でのラット大動脈の血管機能への影響

参考文献 Skinner et al., 2014[16)]

R406 の血管に対する直接的な作用を検討するため、ラット摘出大動脈の血管収縮能に対する R406 の効果を検討した。媒体投与と比較して、R406 は 1 µmol/L までラット大動脈に対して収縮及び弛緩作用を示さなかった。また、フェニレフリン誘発血管収縮作用に対し、R406 の 0.3 µmol/L までの前処理は何ら影響を及ぼさなかった。以上より、R406 は血管の収縮性及び弛緩性に対して直接的に作用しないことが示唆された。

2.6.2.4.4.5 R406：*In vitro* でのヒト皮下抵抗動脈の血管緊張に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.9

R406 のヒト皮下抵抗動脈の血管緊張に対する影響を検討するため、R406 を 1 µmol/L まで漸増して摘出血管に曝露した条件下で評価した。また、フェニレフリン又はトロンボキサン A2 受容体作動薬の U46619 で誘発した血管収縮反応に対して、R406 の 1 µmol/L を前処理した時の影響について評価した。

その結果、R406 はヒト皮下動脈の血管緊張に直接的な影響を及ぼさず、また、フェニレフリン誘発性の血管収縮反応にも影響を及ぼさなかった。一方、R406 は U46619 誘発性の血管収縮反応を減弱させた。

2.6.2.4.4.6 R406：*In vitro* でのラット摘出心臓に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.10

R406 が冠血流量、心拍数及び心収縮力に及ぼす影響について、ラットのランゲルドルフ灌流心標本を用いて検討した。本試験は循環血行動態及び神経性調節などによる要因を排除した条件下において、R406 が心機能に及ぼす影響を検討した。R406 の 10、30、100 及び 300 nmol/L で検討した結果、R406 はいずれのパラメータにも影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.4.7 R406：麻酔下ラットでの血管内皮機能に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3.11

R406 が NO 依存性の血管内皮機能に及ぼす影響について、麻酔下ラットに R406 の 0（媒体対照）又は 4.5 mg/kg を単回静脈内投与し、大腿動脈閉塞による反応性充血後の血流増加、アセチルコリン誘発による血管弛緩、又は VEGF 誘発による血管弛緩及び血圧低下作用に対する影響を評価した。

R406 はすべての実験条件下において、収縮期及び拡張期血圧を上昇させた。R406 は動脈閉塞による反応性充血後の血流増加に対し、動脈血流量及び血管コンダクタンスの低下作用を示さず、アセチルコリン誘発性の血管弛緩も阻害しなかったことから、R406 は血管内皮機能に直接的な影響を及ぼさないことが示唆された。一方、R406 は VEGF 誘発性の血管弛緩作用を

阻害した。また、本試験と同一条件下で NO 合成酵素阻害剤である L-NAME の作用を検討した結果、反応性充血後の血流増加、アセチルコリン及び VEGF 誘発性の血管弛緩のすべてを阻害した（4.2.1.3.7）。したがって、R406 による血圧上昇作用は、恒常的に放出される VEGF の作用阻害に起因するものであり、R406 は血管内皮機能に直接的な影響を及ぼさないことが示唆された。なお、4.5 mg/kg における血漿中 R406 濃度の C_{max} は 7.24 ± 0.25 µmol/L であった。

2.6.2.4.4.8 R406：*In vitro* でのヒト内皮細胞における VEGF 誘発 NO 合成及びキナーゼシグナリングへの影響

添付資料 4.2.1.3.12

R406 のヒト微小血管内皮細胞における VEGF 誘発性の NO 合成に及ぼす影響について、*in vitro* で検討した。細胞を VEGF で刺激し、合成された NO を細胞内色素である 4-amino-5-methylamine 2,7-difluorescein の蛍光の増加量として測定した。R406 の処理により VEGF 誘発性の NO 合成が阻害され、その IC_{50} 値は 0.34 µmol/L であった。また、R406 は VEGF 誘発性の Erk1/2、eNOS 及び AKT のリン酸化を、同程度の効力で阻害した。

2.6.2.4.4.9 R788：テレメトリー法を用いた降圧剤による覚醒下ラットの血圧への影響

参考文献 Lengel et al., 2015[17)]

R788 誘発性の血圧上昇に対する適切な治療法の検討を目的に、R788 誘発性の血圧上昇に対する降圧剤の効果を覚醒下 SD ラットの雄で評価した。R788 の 100 mg/kg の単回経口投与では、媒体対照と比して血圧の上昇が投与後 20 時間まで持続的に認められた。一方、ニフェジピン（カルシウムチャネル阻害薬）の 10 mg/kg、カプトプリル（ACE 阻害薬）の 30 mg/kg 又はアテノロール（選択的 β1 受容体拮抗薬）の 15 mg/kg と R788 の併用投与では、R788 の単剤投与に比して血圧上昇の程度はわずかであった。

R788 の経口投与後に血漿中薬物濃度と相関した急激な血圧上昇が認められた。一方、カプトプリルを事前投与すると血圧の最大値は低下するものの、血圧の上昇幅は R788 単剤投与時と同程度であった。すなわち、カプトプリルの事前投与は血圧のベースライン値を低下させたが、R788 による血圧上昇を抑制しなかった。以上より、R788 誘発性の血圧上昇は、レニンアンジオテンシン系阻害により低下させることができるが、その機序は R788 の血圧上昇作用に直接作用するのではなく、血圧のベースライン値が低下することによるものと考えられた。

2.6.2.4.4.10 R788：テレメトリー法を用いたニフェジピン併用による覚醒下ラットの心血管パラメータへの影響

添付資料 4.2.1.3.13

ニフェジピン及び R788 を併用投与したときの心血管パラメータ（血圧、心拍数、心電図）及び深部体温への影響を検討するため、覚醒下 SD ラットの雄を用いて心血管系パラメータを測定するとともに、薬物動態解析を実施した。ニフェジピンの 10 mg/kg を R788 の 100 mg/kg と同時投与、又は同用量の R788 投与後 2 時間にニフェジピンを投与し、心血管パラメータを投与後 72 時間まで測定した。R788 とニフェジピンとの同時投与では、R788 による血圧上昇は認められなかった。また、R788 投与後 2 時間のニフェジピン投与においても、それ以上の R788 による血圧上昇は認められなかった。R788 とニフェジピンの併用投与による血漿中 R406 濃度の平均 C_{max} に影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

該当試験無し。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

ITP は主に血小板膜蛋白に抗血小板自己抗体が結合することで、マクロファージの FcγR シグナルが活性化し、血小板の貪食・破壊が誘導されることで生じる。FcγR シグナルの活性化には Syk が関与することが示唆されている[18]。また、Syk シグナルの活性化は、抗血小板自己抗体産生に関与する B 細胞の活性化に関与していることが示唆されている。

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 抗体及び抗 CD42 抗体により誘発される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。

2.6.2.6.2 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阻害作用（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 は出血リスクの増加作用を示さなかった（2.6.2.3.3.2）。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[19), 20)]。

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への作用について、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）。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において、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 が阻害作用を示すものは存在せず、Ret においてのみ 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（2.6.6.6.2）。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）

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、コアバッテリー試験としてカニクイザルを用いた心血管系試験、ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系試験、並びに *in vitro* hERG チャネルアッセイを実施した。サル心血管系試験では、R406 ベシル酸塩の 50 mg/kg で心拍数の軽度減少及び血圧の上昇傾向が認められ（2.6.2.4.3.2）、ラット中枢神経系試験では、R406 ベシル酸塩の 50 mg/kg で軽度な中枢神経抑制作用が認められた（2.6.2.4.1.1）が、安全性薬理試験における R406 ベシル酸塩の忍容性は良好であった。

R788 による血圧上昇の誘発機序を検討するため、各種の探索的試験を実施した。R788 又は R406 ベシル酸塩投与による血圧上昇は、カニクイザルに比してラットではより明確に認められたことから、R788 による血圧上昇の機序解析の評価種としてラットを選択した。

麻酔下ラットの心血管系影響試験では、R406 は血圧上昇とともに大腿動脈の血管抵抗も増加させた（2.6.2.4.4.3）。したがって、R788 による血圧上昇の潜在的な機序として、末梢血管での血管抵抗の増加が示唆された。加えて、覚醒下ラットのテレメトリー試験では、血漿中 R406 濃度の低下に伴って上昇した血圧が低下に転じ、血漿中 R406 濃度と血圧変化に直接的な関連性が示された（2.6.2.4.4.1）。この PK/PD 関係から、R788 による血圧上昇は薬理作用に起因することが示唆された。

一方、ラット摘出大動脈及びヒト摘出皮下動脈を用いた *in vitro* の血管機能試験では、R406 はこれら血管の血管収縮を直接的に誘発しなかった（2.6.2.4.4.4、2.6.2.4.4.5）。したがって、上述の麻酔下ラットの心血管系影響試験で認められた R406 による血管抵抗の増加は、*in vitro* 試験系では再現できないシグナル伝達経路の阻害により生じた可能性が示唆された。

VEGF は血管内皮からの NO 放出を介した血管弛緩作用により血圧調節に関与することが知られており、VEGF 受容体 2 の阻害によりヒト及び動物の両方で血圧が上昇することが報告されている [21]。そこで、R788 による VEGF シグナル伝達及び血圧調節に及ぼす影響について検

討した（2.6.2.4.4.7）。その結果、R406 は VEGF 受容体 2 のキナーゼ機能を阻害することに加えて、複雑な機序により VEGF のシグナル伝達を阻害する可能性が考えられた。これを示唆する所見として、R788 の毒性試験では VEGF を介した血管新生の阻害による骨の成長板異形成（軟骨形成異常）が認められている。また、ヒト血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験では、R406 が VEGF を介した NO 放出を阻害するとともに、VEGF 受容体 2 のシグナル伝達の下流にあるシグナル蛋白質のリン酸化を阻害することを示している（2.6.2.4.4.8）。さらに *in vivo* 試験においても、R788 は VEGF 誘発性の VEGF 受容体 2 のリン酸化を阻害することを示している [16]。

以上の結果より、R788 による血圧上昇は血管抵抗の増加によるものであり、血管内皮における VEGF 介在性の NO 放出抑制を一因とした血管弛緩作用の低下に起因すると推察された。このことは、R406 と同じく薬理学的に VEGF 受容体 2 阻害作用を有するキナーゼ阻害剤で報告される高血圧の誘発機序とも一致する [21]。

R788 誘発性の血圧上昇について、上述以外の機序に起因する可能性についても検討した。ラット心血管系試験（2.6.2.4.4.3）及び摘出ラット心臓を用いた試験（2.6.2.4.4.6）の結果から、心拍出量の増加とは関連がないことが示された。また、その他の血圧上昇機序としてレニンアンジオテンシン系や腎臓の器質的変化が考えられるが、いずれもこれまでの探索的試験あるいは毒性試験の病理組織検査等の結果から否定される。さらに、麻酔下ラットを用いて実施した血管内皮機能検査において、R406 は血管内皮機能に直接的な抑制を示さなかった（2.6.2.4.4.7）ことから、R788 による血圧への作用は血管弛緩経路の阻害による可能性が示唆された。

R788 のラットへの血圧上昇作用は、28 日間の投与期間を通じて認められたものの、休薬により回復することが確認された（2.6.2.4.4.2）。また、覚醒下ラットを用いたテレメトリー試験では、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）などの標準的な降圧剤により、速やかに血圧上昇から回復した（2.6.2.4.4.9 及び 2.6.2.4.4.10）。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1) Newland A, Lee EJ, McDonald V, et al. Fostamatinib for persistent/chronic adult immune thrombocytopenia. Immunotherapy. 2018;10(1):9-25.

2) Nagelkerke SQ, Dekkers G, Kustiawan I, et al. Inhibition of FcγR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcγRIIb in human macrophages. Blood. 2014;124(25):3709-18.

3) Connell NT, Berliner N. Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. Blood. 2019;133(19):2027-30.

4) Newland A, McDonald V. Fostamatinib: a review of its clinical efficacy and safety in the management of chronic adult immune thrombocytopenia. Immunotherapy. 2020;12(18):1325-40.

5) Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ,et al. A Critical Role for Syk in Signal Transduction and Phagocytosis Mediated by Fcγ Receptors on Macrophages. J Exp Med. 1997;186(7):1027-39.

6) Kiefer F, Brumall J, Al-Alawi N, et al. The Syk Protein Tyrosine Kinase Is Essential for Fcγ Receptor Signaling in Macrophages and Neutrophils. Mol Cell Biol. 1998;18(7):4209-20.

7) Braselmann S, Taylor V, Zhao H, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. J Phamacol Exp Ther. 2006;319(3):998-1008.

8) Ozaki N, Suzuki S, Ishida M, et al. Syk-dependent signaling pathways in neutrophils and macrophages are indispensable in the pathogenesis of anti-collagen antibody-induced arthritis. Int Immunol. 2012;24(9):539-50.

9) Geahlen RL. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. Trends Pharmacol Sci. 2014;35(8):414-22.

10) 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.

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

12) 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.

13) 難病情報センター. 特発性血小板減少性紫斑病 認定基準 概要・診断基準等 [homepage on the Internet]. 東京：公益財団法人 難病医学研究財団／難病情報センター [cited 2018 年 4 月 19 日]. Available from http://www.nanbyou.or.jp/upload_files/File/063-201704-kijyun.pdf

14) 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.

15) 冨山佳昭. 新規薬剤による免疫性血小板減少症の治療. 日本内科学会雑誌. 2012;101(9):2725-32.

16) Skinner M, Philp K, Lengel D, et al., The contribution of VEGF signalling to fostamatinib-induced blood pressure elevation. Br J Pharmacol. 2014;171(9):2308-20.

17) 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.

18) Shih A, Nazi I, Kelton JG, et al. Novel treatments for immune thrombocytopenia. Presse Med. 2014;43(4Pt2):e87-95.

19) 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.

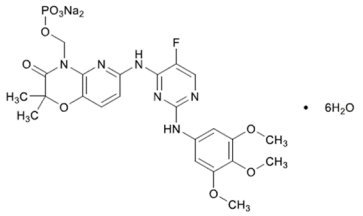
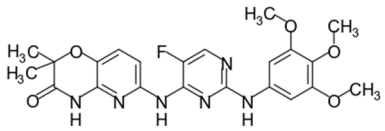
20) Langeberg WJ, Schoonen WM. Eisen M, et al. Thromboembolism in patients with immune thrombocytopenia(ITP): a meta-analysis of observational studies. Int J Hematol. 2016;103(6):655-64.

21) Bhargava P. VEGF kinase inhibitors: how do they cause hypertension? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009;297(1):R1-5.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 15
2.6.3.6 参考文献 16

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

略号一覧

略号	略していない表現	内容
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）
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
bid	bis in die	1 日 2 回投与
BP	Blood pressure	血圧
Btk	Bruton's tyrosine kinase	ブルトン型チロシンキナーゼ
CD	Cluster of differentiation	分化抗原群
CD62P	Cluster of differentiation 62 platelet	血小板に発現する CD62
C_{max}	Maximum plasma drug concentration	最大血漿中濃度
DMA	Dimethylacetamide	ジメチルアセトアミド
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
Erk1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2	細胞外シグナル調節キナーゼ 1 及び 2
FcγR	Fc gamma receptor	Fc 受容体 γ 鎖
FcγRI	High affinity IgG receptor	高親和性免疫グロブリン G 受容体
Flt1	Fms-like tyrosine kinase 1	可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 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
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子
HPβCD	2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin	2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
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
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	Intravenously	静脈内投与
Ki	Inhibition constant	阻害定数
Lyn	Lck/Yes-related tyrosine kinase	Lyn キナーゼ
NOEL	No observed effect level	無影響量

略号	略していない表現	内容
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
PR interval	PR interval	P 波の始まりから QRS 波の始まりまでの時間
PRP	Platelet-rich plasma	多血小板血漿
QA interval	QA interval	心筋収縮性の間接的な指標
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
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TPGS	d-alpha-tocopheryl-polyethylene-glycol-1000-succinate	トコフェニルポリエチレングリコールスクシナート
TT	medullary thyroid cancer cells	甲状腺髄様癌
UDP	Uridine diphosphate	ウリジン二リン酸
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2	血管内皮増殖因子受容体 2

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

				Test Articles : R788 / R406	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location Vol.**
Primary Pharmacodynamics					
Inhibition of SYK	Biochemical assay	*In vitro* R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0008	4.2.1.1.1
Inhibition of SYK	Human SYK enzyme	*In vitro* R406	[redacted], UK	[redacted]14378-71	4.2.1.1.2
Inhibition of SYK	Mouse SYK enzyme	*In vitro* R406	[redacted], UK	[redacted]14378-72	4.2.1.1.3
Inhibition of SYK	Rat SYK enzyme	*In vitro* R406	[redacted], UK	[redacted]14378-73	4.2.1.1.4
Inhibition of SYK-dependent FcγR signaling and BCR signaling	Macrophages, and B cells	*In vitro* R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0009	4.2.1.1.5
Inhibition of BCR signaling in B-cells	Human blood	*In vitro* R406	[redacted], UK	[redacted]14200-53	4.2.1.1.6
Inhibition of BCR signaling in B-cells	Human blood	*In vitro* R406	[redacted], UK	[redacted]14200-52	4.2.1.1.7
Effect of R788 on anti-CD41 antibody-induced murine ITP models	CD-1 mouse	Oral (gavage) R788	Kissei Pharmaceutical Co., Ltd. Nagano, Japan	R788-11002	4.2.1.1.8
Effect of R788 on anti-CD42 antibody-induced murine ITP models	CD-1 mouse	Oral (gavage) R788	Kissei Pharmaceutical Co., Ltd. Nagano, Japan	R788-11001	4.2.1.1.9
Secondary Pharmacodynamics					
Inhibition of platelet activation and effect on hemostasis	Human blood, ICR mouse	*In vitro* R406 Oral (gavage) R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0011	4.2.1.2.1
Effects on macrophage and neutrophil function	Human	*In vitro* R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0010	4.2.1.2.2
Selectivity: biochemical assays screen (radioligand binding assays); follow-up concentration response 3 targets in screen	Human, guinea pig, and rabbit	*In vitro* R406	[redacted] Taiwan [redacted] Taiwan	[redacted]0006	4.2.1.2.3

				Test Articles : R788 / R406	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location Vol.**
Selectivity: screening in radioligand binding, enzyme and cellular functional assays	Various species	*In vitro* R406	[redacted] Taiwan, Republic of China [redacted] UK [redacted] UK	1015[redacted]	4.2.1.2.4
Selectivity: screening in kinase binding assays	Various species	*In vitro* R406	[redacted], US	1062[redacted]	4.2.1.2.5
Selectivity: screening in kinase activity assays	Various species	*In vitro* R406	[redacted], UK	2983[redacted]	4.2.1.2.6
Selectivity: panel of 95 protein kinases; Cellular follow- up assays for 3 kinase hits	Various species	*In vitro* R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0013	4.2.1.2.7
Inhibition of VEGFR2 receptor tyrosine kinase in a biochemical assay and in HUVEC cells	Human	*In vitro* R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0092	4.2.1.2.8
Inhibition of Ret receptor tyrosine kinase in a biochemical assay and in two cell lines	SK-N-SH cells, TT cells expressing constitutively active Ret	*In vitro* R406	Rigel Pharmaceuticals, Inc. South San Francisco, CA, US	[redacted]0054	4.2.1.2.9
Thrombus formation and bleeding time in model of arterial thrombosis	Sprague Dawley rat	Oral (gavage) R788 & R406	[redacted], Sweden	[redacted]10251	4.2.1.2.10
Safety Pharmacology					
Central nervous system (Irwin Test)	Sprague Dawley rat	Oral (gavage)/ R406 besylate	[redacted], US	G-940406-0002	4.2.1.3.1
Respiratory system	Sprague Dawley rat	Oral (gavage)/ R406 besylate	[redacted], US	G-940406-0003	4.2.1.3.2
Effect on the hERG-encoded potassium channel	hERG transfected HEK293 cells	*In vitro*/ R406	[redacted], US	N-940406-0003	4.2.1.3.3
Cardiovascular system	Cynomolgus monkey (conscious telemetered)	Oral (gavage)/ R406 besylate	[redacted], UK	G-940406-0001	4.2.1.3.4
Cardiovascular – Single dose R406 plasma concentration vs effects on BP, heart rate and ECG parameters	Sprague Dawley rat (conscious telemetered)	Oral (gavage)/ R788	[redacted], US	3164[redacted]	4.2.1.3.5

				Test Articles : R788 / R406	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Report Number**	**Location Vol.**
Cardiovascular – 28 days dosing R406 plasma concentration vs effects on BP, heart rate, QA interval and core body temperature	Sprague Dawley rat (conscious telemetered)	Oral (gavage)/ R788	[redacted] US	3391[redacted]	4.2.1.3.6
Cardiovascular – single infusion effects on arterial BP, heart rate, left ventricular pressure, ECG and blood flow	Sprague Dawley rat (anesthetized)	IV/ R406	[redacted], UK	3150[redacted]	4.2.1.3.7
Cardiovascular – single infusion (different infusion protocol to minimize vehicle effect) effects on arterial BP, heart rate, left ventricular pressure, ECG and blood flow	Sprague Dawley rat (anesthetized)	IV/ R406	[redacted], UK	3232[redacted]	4.2.1.3.8
Cardiovascular (isolated aorta)	Rat aorta	*In vitro*/ R406	N/A	Skinner et al. 2014	—
Cardiovascular(isolated subcutaneous arteries)	Human subcutaneous artery	*In vitro*/ R406	[redacted], UK	[redacted]005	4.2.1.3.9
Cardiovascular isolated Langendorff perfused heart	Rat heart	*In vitro*/ R406	[redacted], France	3228[redacted]	4.2.1.3.10
Cardiovascular (endothelial function)	Sprague Dawley rat (anesthetized)	IV/ R406	[redacted], UK	3488[redacted]	4.2.1.3.11
Cardiovascular (endothelial NO release)	Human endothelial cells	*In vitro*/ R406	[redacted], UK	1083[redacted]	4.2.1.3.12
Cardiovascular telemetry (conscious)	Wistar rat	Oral (gavage)/ R788	N/A	Lengel et al. 2015	—
Cardiovascular – co-administration with calcium channel blocker effects on BP, heart rate, and ECG	Sprague Dawley rat (conscious telemetered)	Oral (gavage)/ R788 + nifedipine	[redacted], US	3249[redacted]	4.2.1.3.13

hERG: Human ether-à-go-go related gene, IV: intravenously, N/A: not applicable

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

			Test Article : R406	
Study Type	**Species**	**EC_{50}, IC_{50} or Ki**	**Findings**	**Report Number**
***In vitro* studies**				
Mechanism of action of R406: inhibition of SYK	N/A[a)]	SYK, Ki = 30 nmol/L	In a fluorescence polarization assay R406 potently inhibited *in vitro* biochemical SYK activity in an ATP-competitive manner.	[redacted]0008
Inhibition of SYK kinase	Human	SYK, IC_{50} = 25 nmol/L	In a Caliper capillary electrophoresis assay measuring inhibition of peptide phosphorylation, R406 potently inhibited *in vitro* biochemical SYK activity with a mean pIC_{50} value of 7.60 ± 0.09 SEM (n=6). This is equivalent to a mean IC_{50} value of 25 nmol/L	[redacted]14378-71
Inhibition of SYK kinase	Mouse	SYK, IC_{50} = 20 nmol/L	In a Caliper capillary electrophoresis assay measuring inhibition of peptide phosphorylation, R406 potently inhibited *in vitro* biochemical SYK activity with a mean pIC_{50} value of 7.69 ± 0.07 SEM (n=6). This is equivalent to a mean IC_{50} value of 20 nmol/L	[redacted]14378-72
Inhibition of SYK kinase	Rat	SYK, IC_{50} = 30 nmol/L	In a Caliper capillary electrophoresis assay measuring inhibition of peptide phosphorylation, R406 potently inhibited *in vitro* biochemical SYK activity with a mean pIC_{50} value obtained of 7.53 ± 0.08 SEM (n=6). This is equivalent to a mean IC_{50} value of 30 nmol/L	[redacted]14378-73
Inhibition of SYK-dependent FcγR signaling and BCR signaling in macrophages, and B-cells	Human	FcγRI-dependent TNF-α release from macrophage cells, EC_{50} = 111 nmol/L BCR-dependent CD69 upregulation in B-cells, EC_{50} = 216 nmol/L	R406 inhibited a number of SYK-dependent cell based assays suggesting that the primary target of R406 is SYK. R406 specifically inhibited signaling from the activating class of FcγRI receptor by anti-IgG crosslinking in macrophages. R406 also inhibited the SYK-dependent BCR signaling pathway in primary human B-cells as demonstrated by inhibition of cell surface CD69 upregulation induced by BCR crosslinking with anti-IgM. This is consistent with R406 being a SYK inhibitor.	[redacted]0009
Inhibition of BCR signaling in B-cells in human blood	Human	BCR-dependent CD69 upregulation in B-cells in human blood, IC_{50} = 5.0 µmol/L	R406 inhibited the SYK-dependent BCR signaling pathway in primary human B-cells in blood as demonstrated by inhibition of cell surface CD69 upregulation induced by BCR crosslinking with anti-human IgM/IgG.	[redacted]14200-53

			Test Article : R406	
Study Type	**Species**	**EC_{50}, IC_{50} or Ki**	**Findings**	**Report Number**
Inhibition of BCR signaling in B-cells in human blood	Human	BCR-dependent pSYK activation in B-cells in human blood IC_{50} = 3.5 μmol/L	R406 inhibited the SYK-dependent BCR signaling pathway in primary human B-cells in blood as demonstrated by inhibition of pSYK activation induced by BCR crosslinking with anti-Human IgM/IgG.	[redacted]14200-52

a): not applicable

				Test Article : R788	
Study Type	**Species**	**Administration Route**	**Dose**	**Findings**	**Report Number**
***In vivo* studies**					
Evaluation of the efficacy of R788 in murine model of ITP	Mouse CD-1	Oral	R788 at 20 mg/kg, 40 mg/kg, and 80 mg/kg	The inhibitory effect on the reduction of platelet count were confirmed in R788 administration groups. In the 40 and 80 mg/kg administration groups, a significant inhibitory effect on the reduction of platelet count were observed compared with the Control-CD41 group	R788-11002
Evaluation of the efficacy of R788 in murine model of ITP	Mouse CD-1	Oral	R788 at 20 mg/kg, 40 mg/kg, and 80 mg/kg	The inhibitory effect on the reduction of platelet count were confirmed in R788 administration groups. In the 40 and 80 mg/kg administration groups, a significant inhibitory effect on the reduction of platelet count were observed compared with the Control-CD42 group	R788-11001

2.6.3.3 副次的薬理試験

			Test Article : R406	
Study Type	**Species**	**EC_{50}, IC_{50}, Ki or Concentration**	**Findings**	**Report Number**
***In vitro* studies**				
R406 effects on platelets	Human	R406 at 1.25 – 10 µmol/L	R406 at 5 µmol/L inhibited cell surface CD62P (P-selectin) in human PRP platelets induced by collagen but not by ADP.	[redacted]0011
Effect of R406 on macrophage and neutrophil function	Human	Neutrophil migration: R406 10 µmol/L = 0% inhibition Phagocytosis by leukocytes: R406 EC_{50} > 50 µmol/L Phagocytosis-induced oxidative burst: R406 EC_{50} > 30 µmol/L Microbicidal activity of neutrophils: R406 10 µmol/L = 0% inhibition	Collectively, these results indicate that R406 does not significantly affect microbicidal activity and thus appears not to impact negatively on this aspect of innate immune responses.	[redacted]0010
Selectivity: biochemical assays screen	Human, Guinea pig, rabbit	Human adenosine A3 receptor binding, IC_{50} = 0.0806 µmol/L Human adenosine A3 receptor antagonist activity, IC_{50} = 0.0933 µmol/L Guinea pig adenosine transporter, IC_{50} = 1.84 µmol/L Rabbit monoamine transporter, IC_{50} = 2.74 µmol/L	In a commercial counter-assay screen of 140 molecular targets at a single test concentration of 10 µmol/L, R406 significantly inhibited three biochemical assays (> 50% inhibition). In an *in vitro* functional assay measuring stimulation or inhibition of ligand-induced GTPγS binding to the adenosine A3 receptor, R406 exhibited antagonistic activity (IC_{50} ~ 0.0933 µmol/L).	[redacted]0006
Selectivity screening in radioligand binding, enzyme and cellular functional assays	Various species	Test concentration range 0.003 – 100 µmol/L Adenosine A3 receptor Ki 17 nmol/L, IC_{50} 18 nmol/L antagonist FGFR1 kinase, IC_{50} 46 nmol/L Flt1 kinase, IC_{50} 70 nmol/L Src kinase, IC_{50} 83 nmol/L UDP glucuronosyltransferase UGT1A1, IC_{50} 143 nmol/L Yes1 kinase, IC_{50} 191 nmol/L Phosphodiesterase PDE5, IC_{50} 308 nmol/L Adenosine transporter, Ki 630 nmol/L	R406 was tested at a single concentration of 10 µmol/L in 203 *in vitro* radioligand binding and enzyme assays and was active (≥ 50% inhibition) in 17 assays. Concentration-response curves were constructed for these 17 targets and for the targets identified in [redacted]0006. R406 had sub-micromolar activity (IC_{50} or Ki) at 8 targets. For receptors and transporters, *in vitro* functional assays were used to define the mode of action of R406 at 3 targets (adenosine A3 receptor, adenosine transporter, monoamine transporter).	1015[redacted]

			Test Article : R406	
Study Type	**Species**	**EC_{50}, IC_{50} or Concentration**	**Findings**	**Report Number**
Selectivity screening in kinase binding assays	Various species	388 kinases tested at 10 µmol/L Concentration-response curves generated for 260 kinases (0.0003 – 30 µmol/L) R406 had K_d < 1 µmol/L at 192 kinases	R406 was tested at a single concentration of 10 µmol/L in 388 *in vitro* kinase binding assays. Concentration-response curves were generated initially at a set of 260 kinases; subsequently curves were repeated at a subset of 68 kinases. R406 had K_d < 1 µmol/L at 192 of the 388 kinases.	1062[redacted]
Selectivity screening in kinase activity assays	Various species	Defined IC_{50} values were calculated for 120 of the 139 kinases, with values ranging from 3 to 3,490 nmol/L. In the remaining 19 kinase assays, R406 was either inactive or the maximum response was < 50% inhibition so it was not possible to calculate meaningful IC_{50} values.	R406 was tested in a panel of 139 *in vitro* kinase activity assays. Concentration-response curves were generated at near-K_m [ATP] and at higher, cell-relevant [ATP].	2983[redacted]
Kinase selectivity in a panel of 95 protein kinases. Cellular follow up assays for 3 kinase hits	Various species	Kinase panel tested at 0.3 µmol/L, 1 µmol/L, and 3 µmol/L Lyn Kinase no inhibition at 2 µmol/L Aurora B Kinase EC_{50} = 4.3 µmol/L Btk Kinase EC_{50} = 2.1 µmol/L	R406 indicated activity (> 50% reduction in activity) against 28, 54, and 66 kinases when tested at 0.3 µmol/L, 1 µmol/L, and 3 µmol/L, respectively. Three of the kinases were then chosen to further evaluate whether R406 was able to inhibit these kinases in a cellular context. Unlike SYK kinase, which was inhibited with similar potency in the *in vitro* biochemical and cellular assays, neither Lyn, Aurora, nor Btk, were inhibited substantially in the cellular context.	[redacted]0013
Inhibition of VEGFR2 receptor tyrosine kinase in a biochemical assay and in HUVEC cells	Human	VEGFR2 kinase, IC_{50} = 43 nmol/L Inhibition of VEGFR2 kinase in HUVEC cells, EC_{50} = 333 nmol/L	R406 potently inhibited the auto- phosphorylation of VEGFR2 kinase *in vitro* in a biochemical assay and in HUVEC cells as assessed by ELISA.	[redacted]0092
Inhibition of Ret receptor tyrosine kinase in a biochemical assay and in two cell lines	Human	Ret kinase, IC_{50} = 5 nmol/L Inhibition of Ret kinase in SK-N-SH and TT cells, EC_{50} < 100 nmol/L	R406 potently inhibited the auto- phosphorylation of Ret kinase *in vitro* in a fluorescence polarization biochemical assay and in two different cell lines as assessed by western blot.	[redacted]0054

				Test Articles : R788 / R406	
Study Type	**Species**	**Administration Route**	**Dose or Concentration**	**Findings**	**Report Number**
***In vivo* studies**					
R406 effects on platelet function	Mouse	Oral	R406, up to 100 mg/kg	R406, dosed orally up to 100 mg/kg and resulting in systemic exposures up to around 25 µmol/L, had no effect on bleeding time, while aspirin at 100 mg/kg caused an 88% prolongation.	[redacted]0011
Effect of SYK inhibition on thrombosis and bleeding in the anaesthetized rat	Rat	Oral	R788 at 10 mg/kg, 30 mg/kg and 100 mg/kg	R788 significantly increased blood flow in the thrombotic vessel at 100 mg/kg. R788 at 30 mg/kg and 10 mg/kg showed no statistically significant effects on blood flow. R788 had no statistically significant effect on thrombus weight when dosed alone or in combination with acetyl salicylic acid (ASA) dosed at 20 mg/kg. No increase in bleeding time was detected in this model.	[redacted]10251

2.6.3.4 安全性薬理試験

					Test Articles: R788 / R406 besylate		
Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses Test Article**	**No. & Gender/ Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Report Number**
Central nervous system (Irwin test)	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage in 40% TPGS and 60% PG	0, 5, 15, 50 mg/kg R406 besylate	6 males	Well tolerated. No biologically relevant changes after doses of 5 or 15 mg/kg. At 50 mg/kg, reduced touch response at all time points with a maximal effect at 120 minutes post-dose; decreased startle response, decreased locomotion and decreased grooming at 90 minutes post-dose, together with vocalization (in 2 – 3/6 animals at all time points). NOEL: 15 mg/kg	Yes	G-940406-0002
Respiratory	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage in 40% TPGS and 60% PG	0, 5, 15, 50 mg/kg R406 besylate	8 males	Well tolerated with no effect on respiratory function. NOEL: 50 mg/kg	Yes	G-940406-0003
Cardiovascular	hERG-expressing HEK293 Cells	*In vitro*	2 µmol/L R406	4 cells	No inhibition of hERG tail current.	No	N-940406-0003
Cardiovascular telemetry (conscious)	Cynomolgus monkey	Oral gavage in 40% TPGS and 60% PG	0, 5, 15, 50 mg/kg R406 besylate	4 males (Latin Square Design)	Well tolerated; slight reduction in heart rate at 50 mg/kg (max decrease of ~ 30 bpm at 180 minutes post-dose). A non-significant trend for increased blood pressure was also seen at 50 mg/kg. NOEL: 15 mg/kg Mean peak plasma concentration of R406 was 1910 ng/mL (4 µmol/L, average of the 4 values obtained at 50 mg/kg).	Yes	G940406-0001
Cardiovascular telemetry (conscious)	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage in 0.1% sodium carboxy-methylcellulose, 0.1% methyl paraben and 0.02% propyl paraben	10, 30, 100 mg/kg R788	5 – 6 males	R788 produced a dose-dependent elevation of systolic and diastolic blood pressure that returned to vehicle levels 10 hours post-dose. Blood pressure changes were directly related to R406 plasma concentration. The EC_{50} for the effect on mean arterial pressure was estimated to be in the range of 0.7 to 1 µmol/L based on total R406 plasma levels. QA and PR intervals were prolonged following the 100 mg/kg dose. Marginal reductions in heart rate were observed.	No	3164[redacted]

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses Test Article	No. & Gender/ Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Cardiovascular telemetry (conscious)	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage in 0.1% sodium carboxy-methylcellulose, 0.1% methyl paraben and 0.02% propyl paraben	0, 8.5, 30 mg/kg *bid* R788 for 28 days	6 – 8 males per group	R788 increased arterial pressure following administration of both 8.5 and 30 mg/kg doses. Heart rates following both doses were sporadically different compared to vehicle treatment throughout the study. QA interval was increased relative to vehicle treatment on Day 1 following 30 mg/kg but subsequent changes on later days of the study showed decreases in QA interval. All parameters returned to values equivalent to those observed following vehicle treatment within 4 days after cessation of dosing (Day 32). C_{max} exposures of R406 for the 8.5 and 30 mg/kg doses were 1.270 ± 0.445 µmol/L, and 5.049 ± 2.958 µmol/L, respectively.	No	3391[redacted]
Cardiovascular (anaesthetized)	Rat / Sprague Dawley	IV infusion in 40% DMA/ 40% PEG400/ 20% of 75% HPβCD in water	0, 1, 3, 10 mg/kg R406	4 – 5 males	R406 caused an increase in arterial blood pressure and femoral artery resistance. Vehicle induced increases in dP/dt_{max} (an index of cardiac contractility) are prevented by R406 administration. Peak total plasma concentrations were 1.53, 7.29, and 27.12 µmol/L following administration of 1, 3, and 10 mg/kg R406, respectively.	No	3150[redacted]
Cardiovascular (anaesthetized)	Rat / Sprague Dawley	IV infusion in 40% DMA/ 40% PEG400/ 20% of 75% HPβCD in water	0, 3, 5 mg/kg R406	8 males	R406 caused an increase in arterial blood pressure and a decrease in blood flow and dP/dt_{max} (an index of cardiac contractility). Peak total plasma concentrations were 3.90 and 6.02 µmol/L following administration of 3 and 5 mg/kg R406, respectively.	No	3232[redacted]
Cardiovascular (isolated aorta)	Rat isolated aorta	*In vitro*	Up to 1 µmol/L R406	4 – 6	R406 had no effect on rat aorta relaxation (up to 1 µmol/L) and no effect on phenylephrine-induced contraction (up to 0.3 µmol/L).	No	Skinner et al. 2014 [1)]
Cardiovascular (isolated subcutaneous arteries)	Human isolated subcutaneous arteries	*In vitro*	Up to 1 µmol/L R406	NA	R406 had no direct effects on human subcutaneous artery tone and had no effect on the vasoconstrictive response to phenylephrine. Pre-incubation with R406 caused an attenuation of the U46619 vasoconstrictive response.	No	[redacted]005
Cardiovascular (isolated heart)	Rat	*In vitro*	10 to 300 nmol/L R406	6 male hearts	No effects on coronary flow, heart rate, or cardiac contractility.	No	3228[redacted]

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses Test Article	No. & Gender/ Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Cardiovascular (anaesthetized, endothelial function)	Rat / Sprague Dawley	IV infusion in 40% DMA/ 40% PEG400/ 20% of 75% HPβCD in water	0, 4.5 mg/kg R406	R406: 6 males/ group Vehicle: 5 males/ group	R406 consistently caused increases in systolic and diastolic blood pressure in all experiments. R406 did not reduce arterial blood flow or conductance during the hyperaemic response following arterial occlusion, nor did it inhibit the vasodilatory actions of acetylcholine. R406 inhibited the vasodilatory actions of vascular endothelial growth factor.	No	3488[redacted]
Cardiovascular (endothelial NO release)	Human endothelial cells	*In vitro*	Up to 1 µmol/L R406	NA	R406 inhibited VEGF-induced synthesis of nitric oxide with an IC_{50} of 0.34 µmol/L. R406 also inhibited the VEGF-induced phosphorylation of Erk1/2, eNOS and AKT.	No	1083[redacted]
Cardiovascular telemetry (conscious)	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage in 1% polysorbate	100 mg/kg R788; 15 mg/kg atenolol; 10 mg/kg nifedipine; 30 mg/kg captopril	4 males	Co-administration with either nifedipine, captopril, or atenolol resulted in less blood pressure elevation compared to R788 treatment alone.	No	Lengel et al. 2015 [2)]
Cardiovascular telemetry (conscious)	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage in 0.1% sodium carboxy-methylcellulose, 0.1% methyl paraben and 0.02% propyl paraben	100 mg/kg R788; 10 mg/kg nifedipine	6 males	R788-induced increases in blood pressure and decreases in QA interval were prevented by co-administration of nifedipine. Nifedipine had no effect on peak average total concentrations of R406.	No	3249[redacted]

NA: not applicable

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験無し。

2.6.3.6 参考文献

1) Skinner M, Philp K, Lengel D, et al., The contribution of VEGF signalling to fostamatinib-induced blood pressure elevation. Br J Pharmacol. 2014;171(9):2308-20.

2) 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.