ドプテレット®錠 20mg

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1　緒言 4
2.6.1.1　名称 4
2.6.1.2　構造 4
2.6.1.3　アバトロンボパグの薬理作用 5
2.6.1.4　予定する効能又は効果 5
2.6.1.5　予定する用法及び用量 5

図目次

図 2.6.1-1　アバトロンボパグマレイン酸塩の化学構造式 4

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英）	略していない表現（日）
c-Mpl	MPL, thrombopoietin receptor	トロンボポエチン受容体
TPO	thrombopoietin	トロンボポエチン

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

2.6.1.1　名称

国際一般名（INN）：Avatrombopag

医薬品一般的名称（JAN）：　日本語名　アバトロンボパグマレイン酸塩
英語名　Avatrombopag Maleate

化学名

- IUPAC
  1-(3-Chloro-5-{[4-(4-chlorothiophen-2-yl)-5-(4-cyclohexylpiperazin-1-yl)-1,3-thiazol-2-yl]carbamoyl}pyridin-2-yl)piperidine-4-carboxylic acid maleate
- JAN
  日本語：1-(3-クロロ-5-{[4-(4-クロロチオフェン-2-イル)-5-(4-シクロヘキシルピペラジン-1-イル)-1,3-チアゾール-2-イル]カルバモイル}ピリジン-2-イル)ピペリジン-4-カルボン酸　一マレイン酸塩
  英語：1-(3-Chloro-5-{[4-(4-chlorothiophen-2-yl)-5-(4-cyclohexylpiperazin-1-yl)-1,3-thiazol-2-yl]carbamoyl}pyridin-2-yl)piperidine-4-carboxylic acid monomaleate

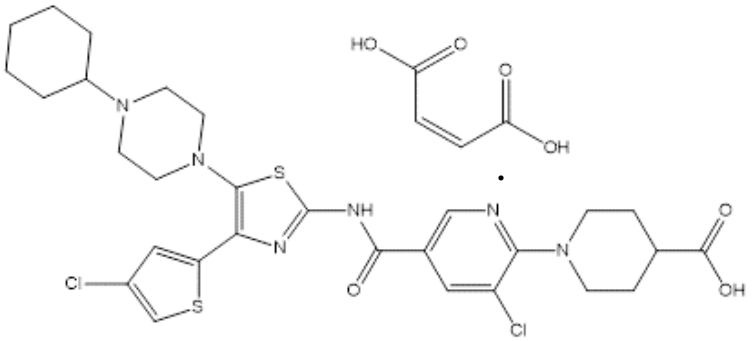
CAS 登録番号：[*677007-74-8*]

社内コード：E5501、AKR-501、YM477 及び YM-301477

2.6.1.2　構造

アバトロンボパグマレイン酸塩は光学活性物質ではない。本品の化学構造式を図 2.6.1-1 に示す。

図 2.6.1-1　アバトロンボパグマレイン酸塩の化学構造式



分子式：$C_{33}H_{38}Cl_2N_6O_7S_2$ ($C_{29}H_{34}Cl_2N_6O_3S_2$・$C_4H_4O_4$)

分子量：　765.73（アバトロンボパグマレイン酸塩）
649.65（アバトロンボパグ）

2.6.1.3 アバトロンボパグの薬理作用

アバトロンボパグマレイン酸塩は、経口投与可能な低分子（非ペプチド）化合物のトロンボポエチン（TPO）受容体（c-Mpl）作動薬である。In vitro 及び in vivo で TPO と同様の生物学的効果を発揮することで、血小板数の増加をもたらす。TPO は造血幹細胞、巨核球系細胞、及び血小板の表面に発現する c-Mpl に結合し、巨核球生成及び血小板産生に作用する。アバトロンボパグのヒト c-Mpl 上の結合部位は TPO と異なり、STAT3、STAT5 及び ERK を介して下流シグナル伝達を誘導することにより、ヒト巨核球の増殖及び分化を促進し、血小板数を増加させる。アバトロンボパグは TPO と競合することなく c-Mpl と結合することによりシグナル伝達を刺激し、血小板産生を促進する。

2.6.1.4 予定する効能又は効果

待機的な観血的手技を予定している慢性肝疾患患者における血小板減少症の改善

2.6.1.5 予定する用法及び用量

通常、成人には、アバトロンボパグとして以下の用量を 1 日 1 回、5 日間食後に経口投与する。

投与開始前の血小板数が 40,000/μL 以上 50,000/μL 未満：40 mg

投与開始前の血小板数が 40,000/μL 未満：60 mg

ドプテレット®錠 20mg

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

目次

略語・略号一覧 5
2.6.2　薬理試験の概要文 6
2.6.2.1　まとめ 6
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 9
2.6.2.2.1　In vitro 薬理試験 9
2.6.2.2.1.1　ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞の増殖促進作用 9
2.6.2.2.1.2　前駆細胞の分化 10
2.6.2.2.1.3　c-Mpl の活性化を介したシグナル伝達 15
2.6.2.2.1.4　種特異性 17
2.6.2.2.1.5　結合部位 22
2.6.2.2.2　In vivo 薬理試験 28
2.6.2.2.2.1　血小板産生 28
2.6.2.3　副次的薬理試験 30
2.6.2.3.1　アバトロンボパグの結合パネルアッセイ 30
2.6.2.3.2　血小板凝集及び血小板活性化 32
2.6.2.3.2.1　血小板凝集 32
2.6.2.3.2.2　血小板活性化 33
2.6.2.4　安全性薬理試験 36
2.6.2.4.1　In vitro 安全性薬理試験 37
2.6.2.4.1.1　hERG カリウム電流に対する作用 37
2.6.2.4.1.2　単離モルモット乳頭筋を用いた活動電位アッセイ 37
2.6.2.4.2　In vivo 安全性薬理試験 37
2.6.2.4.2.1　イヌを用いた心血管系及び呼吸機能に関する安全性薬理試験 37
2.6.2.4.2.2　ラットを用いた中枢神経系機能に関する安全性薬理試験 38
2.6.2.4.2.3　イヌを用いた腎機能に関する安全性薬理試験 38
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 39
2.6.2.6　考察及び結論 39
2.6.2.7　参考文献 42

表目次

表 2.6.2-1　アバトロンボパグの細胞増殖促進作用及び分化促進作用の検討で用いた細胞 8
表 2.6.2-2　アバトロンボパグのヒト臍帯血 CD34 陽性造血前駆細胞の巨核球以外の系列への分化促進作用 12
表 2.6.2-3　結合パネルアッセイ 31
表 2.6.2-4　安全性薬理試験の一覧 36
表 2.6.2-5　トキシコキネティクスの要約 38

表 2.6.2-6　トキシコキネティクスの要約 39

図目次

図 2.6.2-1　造血前駆細胞の分化 7
図 2.6.2-2　ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞及び Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグの細胞増殖作用 10
図 2.6.2-3　アバトロンボパグ及び rhTPO のヒト臍帯血 CD34 陽性細胞からの巨核球コロニー形成作用 11
図 2.6.2-4　アバトロンボパグ及び rhTPO の巨核球の増殖促進作用 13
図 2.6.2-5　アバトロンボパグ及び rhTPO の巨核球の倍数性への作用 14
図 2.6.2-6　アバトロンボパグ及び rhTPO の巨核球、造血前駆細胞及び巨核球前駆細胞の産生促進作用 15
図 2.6.2-7　ヒト血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT3 のチロシンリン酸化 16
図 2.6.2-8　ヒト血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化 16
図 2.6.2-9　ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT3、STAT5 及び ERK のチロシン又はスレオニンのリン酸化 17
図 2.6.2-10　ラット、モルモット、ウサギ及びビーグル犬の血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化 18
図 2.6.2-11　コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル及びカニクイザルの血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化 19
図 2.6.2-12　ハムスター及びブタ血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化 20
図 2.6.2-13　オリーブヒヒ血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化 21
図 2.6.2-14　チンパンジー血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化 21
図 2.6.2-15　^{125}I-rhTPO のヒト血小板への結合に対するアバトロンボパグ及び TM41 の作用 22
図 2.6.2-16　ヒト、カニクイザル及びキメラの c-Mpl ドメイン構造 23
図 2.6.2-17　ヒト及びサルの c-Mpl ドメインキメラを遺伝子導入した Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグ及び rhTPO の増殖促進作用 24
図 2.6.2-18　各動物種の c-Mpl 膜貫通ドメインのアミノ酸配列 25
図 2.6.2-19　ヒト、マウス及びキメラ c-Mpl のドメイン構造 25
図 2.6.2-20　マウス–ヒト c-Mpl ドメインキメラを遺伝子導入した Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグ及び rhTPO の増殖促進作用 27

図 2.6.2-21　ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスでのアバトロンボパグのヒト血小板産生作用 29
図 2.6.2-22　カニクイザルにアバトロンボパグを 14 日間反復経口投与したときの血小板数 30
図 2.6.2-23　In vitro でのアバトロンボパグ又は rhTPO のヒト血小板凝集作用 33
図 2.6.2-24　In vitro でのアバトロンボパグ又は rhTPO のヒト血小板活性化作用 34
図 2.6.2-25　アバトロンボパグの TRAP 誘導性血小板活性化作用 35
図 2.6.2-26　ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスにアバトロンボパグを反復経口投与したときのヒト血小板産生及び CD62P 発現作用 36

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADP	adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
APD	action potential duration	活動電位持続時間
ATPase	adenosine triphosphatase	アデノシントリホスファターゼ
BFU-E	burst-forming unit-erythroid	前期赤芽球バースト形成細胞
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CCK_2	Cholecystokinin 2	コレシストキニン 2
CD62P	P-selectin	P-セレクチン
CFU-GM	colony-forming unit-granulocyte-macrophage	顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞
CFU-Mix	colony-forming unit-mix	混合コロニー形成細胞
c-Mpl	MPL, thrombopoietin receptor	MPL、トロンボポエチン受容体
CRH	cytokine receptor homology	サイトカイン受容体相同
CRH1	membrane-distal cytokine receptor homology domain	膜遠位サイトカイン受容体相同ドメイン
CRH2	membrane-proximal cytokine receptor homology domain	膜近位サイトカイン受容体相同ドメイン
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
dV/dt_{max}	maximum upstroke velocity	最大立ち上がり速度
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor	顆粒球コロニー刺激因子
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
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICD	intracellular domain	細胞内ドメイン
IL-3	interleukin-3	インターロイキン 3
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PRP	platelet rich plasma	多血小板血漿
rhTPO	recombinant human thrombopoietin	組換え型ヒトトロンボポエチン
rmIL-3	recombinant murine interleukin-3	組換え型マウスインターロイキン-3
SEM	standard error of the mean	標準誤差
t_{max}	time at which the highest drug concentration occurs	最高濃度到達時間
TPO	thrombopoietin	トロンボポエチン
TRAP	thrombin receptor agonist peptide	トロンビン受容体アゴニストペプチド

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

アバトロンボパグマレイン酸塩（以下、アバトロンボパグ）（コード名：E5501、AKR-501、YM477 及び YM-301477）は、in vitro 及び in vivo でトロンボポエチン（TPO）と同様な生物学的効果を発揮する、経口投与が可能な低分子トロンボポエチン受容体（c-Mpl）作動薬（Fukushima-Shintani, 2009）として開発された。薬理試験では特記しない限り、アバトロンボパグマレイン酸塩を用いた。本 CTD ではアバトロンボパグの用量及び濃度を、フリー体換算量で表記した。アバトロンボパグ及び組換え型ヒトトロンボポエチン（rhTPO）は共に、ヒト c-Mpl を発現させたマウス pro-B 細胞株 Ba/F3（ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞）の増殖を促進させ、50%有効濃度（EC_{50}）はそれぞれ 3.3 nmol/L 及び 0.065 nmol/L であった。また、アバトロンボパグ及び rhTPO は、ヒト造血前駆細胞である臍帯血 CD34 陽性細胞のヒト巨核球への分化を促進し、EC_{50} はそれぞれ 25.0 nmol/L 及び 0.122 nmol/L であった。アバトロンボパグは、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞から巨核球系列への分化促進以外には、ヒト造血前駆細胞の分化を促進しなかった。ヒト造血前駆細胞である顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）動員末梢血 CD34 陽性細胞から巨核球への分化に対する作用、及び巨核球の倍数性に対する作用を検討して、巨核球の成熟に対する作用も評価した。アバトロンボパグは、ヒト G-CSF 動員末梢血 CD34 陽性細胞から、血小板産生に必要な倍数体巨核球への分化を促進する。アバトロンボパグによる刺激で産生された巨核球の倍数性は、rhTPO による刺激により産生された巨核球の倍数性と類似していた。さらに、rhTPO（3 nmol/L）とアバトロンボパグ（3 μmol/L）の併用刺激により産生された巨核球数は、rhTPO（3 nmol/L）の単独刺激により産生された巨核球数の約 2 倍（$P<0.001$）で、アバトロンボパグと rhTPO の併用による上乗せ効果が示唆された。

ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスにアバトロンボパグを反復経口投与したとき、末梢血中のヒト血小板数は用量依存的に増加した。移植マウスでの血小板産生に対する最小有効用量は 0.85 mg/kg/day であった。アバトロンボパグの投与を中止すると、移植マウスのヒト血小板数は投与前のレベルに戻った。

アバトロンボパグの薬理作用には種特異性があり、シグナル伝達はヒト及びチンパンジーで生じ、評価した他の動物種（ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル、カニクイザル、オリーブヒヒ、ブタ）では生じなかった。また、アバトロンボパグは、マウス c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進しなかったことから、マウス c-Mpl を活性化しないことが示された。

アバトロンボパグは 100 μmol/L までヒト血小板への rhTPO の結合を阻害せず、ヒト c-Mpl 上のアバトロンボパグの作用部位は rhTPO の作用部位と異なることが示唆された。アバトロンボパグはヒト c-Mpl（Met^{1}-Pro^{635}）の膜貫通ドメイン（Ile^{492}-Leu^{513}）を介して薬理作用を示すと考えられる。この作用機序は、アバトロンボパグがヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞に対して細胞増殖促進作用を示すが、キメラ c-Mpl（ヒト Met^{1}-Trp^{491}／マウス Ile^{483}-Pro^{625} 又はマウス Met^{1}-Ser^{496}／ヒト Ala^{506}-Pro^{635}）発現 Ba/F3 細胞に対しては細胞増殖促進作用を示さないことから裏

付けられる。さらに、アバトロンボパグは、キメラ c-Mpl［カニクイザル膜遠位サイトカイン受容体相同ドメイン（CRH1）／ヒト膜近位サイトカイン受容体相同ドメイン（CRH2）、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメイン（ICD）］Ba/F3 細胞の増殖を促進するが、キメラ c-Mpl（ヒト CRH1／カニクイザル CRH2、膜貫通ドメイン及び ICD）発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進しないことが示された。

アバトロンボパグは、ヒト c-Mpl に結合すると、STAT3、STAT5 及び ERK のチロシン又はスレオニンのリン酸化の誘導を介してシグナル伝達に影響を及ぼした。アバトロンボパグは、ヒト c-Mpl の結合部位に作用し、2 つの異なるシグナル伝達経路である JAK-STAT 及び SHC-Ras-Raf-ERK を活性化することが示された。

造血前駆細胞の系列発生を図 2.6.2-1 に示す。薬理試験に使用された細胞の種類及び試験の要約の項番号を表 2.6.2-1 に示す。

図 2.6.2-1　造血前駆細胞の分化

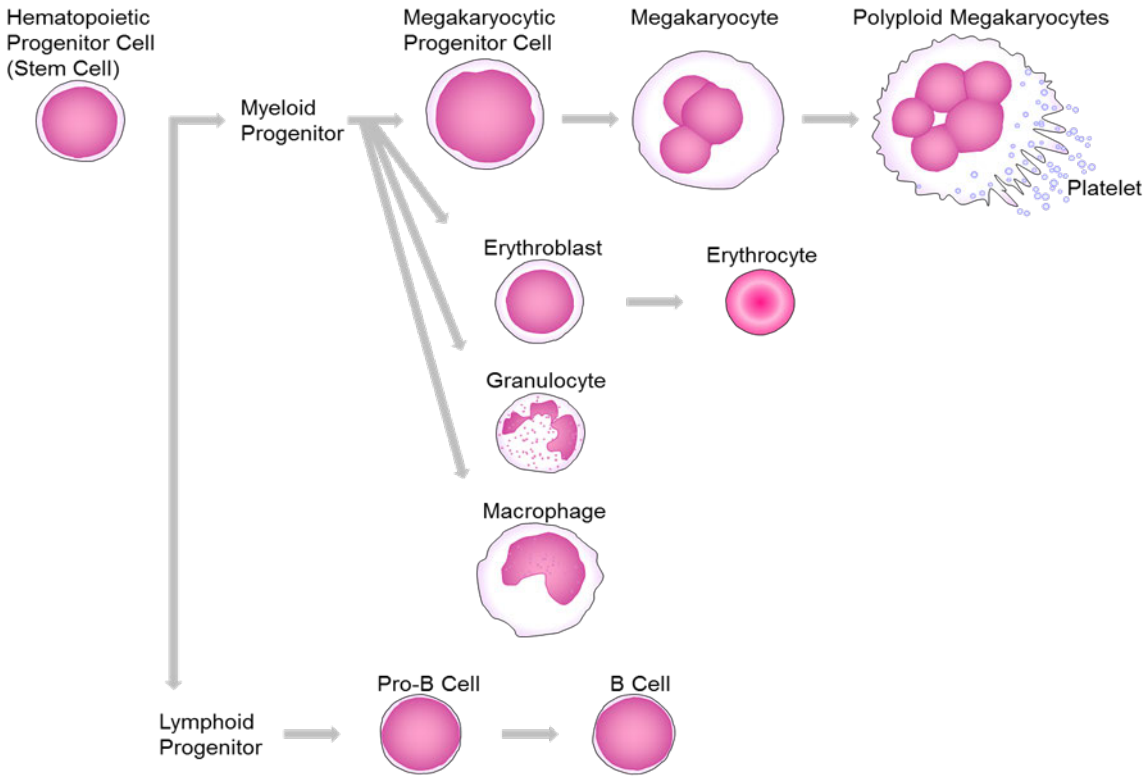


表 2.6.2-1　アバトロンボパグの細胞増殖促進作用及び分化促進作用の検討で用いた細胞

Cell Type	Study Summary Location
Recombinant Ba/F3 Murine Pro-B Cell	
Ba/F3-Human c-Mpl Cell	2.6.2.2.1.1, 2.6.2.2.1.3, 2.6.2.2.1.5
Ba/F3-Chimeric c-Mpl (Cynomolgus Monkey CRH1/Human CRH2-ICD) Cell Ba/F3-Cynomolgus Monkey c-Mpl Cell Ba/F3-Chimeric c-Mpl (Human CRH1/Cynomolgus Monkey CRH2-ICD) Cell Ba/F3-Chimeric c-Mpl (Human Met^{1}-Trp^{491}/Murine Ile^{483}-Pro^{625}) Cell Ba/F3 Chimeric c-Mpl (Murine Met^{1}-Ser^{496}/Human Ala^{506}-Pro^{635}) Cell	2.6.2.2.1.5
Hematopoietic Progenitor Cell	
Human CB $CD34^{+}$ Cell	2.6.2.2.1.2.1, 2.6.2.2.1.2.2
Human G-CSF-Mobilized PB $CD34^{+}$ Cell	2.6.2.2.1.2.3, 2.6.2.2.1.2.4
Human PB $CD34^{+}CD41^{-}$ Cell	2.6.2.2.1.2.4
Human Fetal Liver $CD34^{+}$ Cell	2.6.2.2.2.1, 2.6.2.3.2.2
Megakaryocytic Progenitor Cell	
Human PB $CD34^{+}CD41^{+}$ Cell	2.6.2.2.1.2.4
Megakaryocyte	
Human CB $CD41^{+}$ Megakaryocyte	2.6.2.2.1.2.1
Human PB $CD41^{+}CD45^{+}$ Megakaryocyte Human PB $CD41^{+}$ Megakaryocyte	2.6.2.2.1.2.3
Human PB $CD34^{-}CD41^{+}$ Megakaryocyte	2.6.2.2.1.2.4
Polyploid Megakaryocyte	
Human PB Polyploid Megakaryocyte	2.6.2.2.1.2.3
Other Than Megakaryocytic Lineage	
Human CB Erythroblast Human CB Granulocyte Human CB Macrophage	2.6.2.2.1.2.2

Ba/F3 = murine interleukin-3 dependent pro-B cell line, CB = cord blood, c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, CRH = cytokine receptor homology, CRH1 = membrane-distal CRH domain, CRH2 = membrane-proximal CRH domain, G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor, ICD = intracellular domain, PB = peripheral blood.

副次的薬理試験

86 の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルからなるパネルを用いて、アバトロンボパグの結合を検討した。セクレチン作動性作用及びコレシストキニン 2（CCK_2）作動性／拮抗性作用の機能アッセイ、Na^{+}/K^{+}-アデノシントリホスファターゼ（ATPase）及び H^{+}/K^{+}-ATPase の酵素アッセイも実施した。1 µmol/L で顕著な作用（50%超の阻害又は活性化）は認められなかった。

In vitro でアバトロンボパグの血小板凝集作用を評価した。アバトロンボパグは、既知の血小板凝集誘導物質であるアデノシン二リン酸（ADP）の非存在下及び存在下のいずれにおいても、血小板凝集を誘導及び亢進しないことが示された。

In vitro 及び in vivo で、血小板活性化マーカーである P-セレクチン（CD62P）の発現に対するアバトロンボパグの作用を評価することで、アバトロンボパグのヒト血小板活性化作用も検討した。これらの試験から、アバトロンボパグは CD62P の発現を顕著に増加させず、血小板を活性化させないことが裏付けられた。

安全性薬理試験

In vitro 及び in vivo で心血管系、呼吸系、中枢神経系及び腎機能に対するアバトロンボパグの作用について検討した。全ての重要な安全性薬理試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。アバトロンボパグは、ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）電流を抑制し、50%阻害濃度（IC_{50}）は 1.4 µmol/L であったが、in vitro で単離モルモット乳頭筋を用いた活動電位測定試験及び in vivo でイヌを用いた心血管系機能に関する安全性薬理試験では心血管系機能に対して明らかな作用は示さなかった。In vivo でアバトロンボパグは呼吸系及び中枢神経系に対して明らかな作用を示さなかった。アバトロンボパグ投与によってイヌの腎機能に対する可逆的な作用が認められた。

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 c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞の増殖促進作用

添付資料番号：4.2.1.1-1（SK-971417）

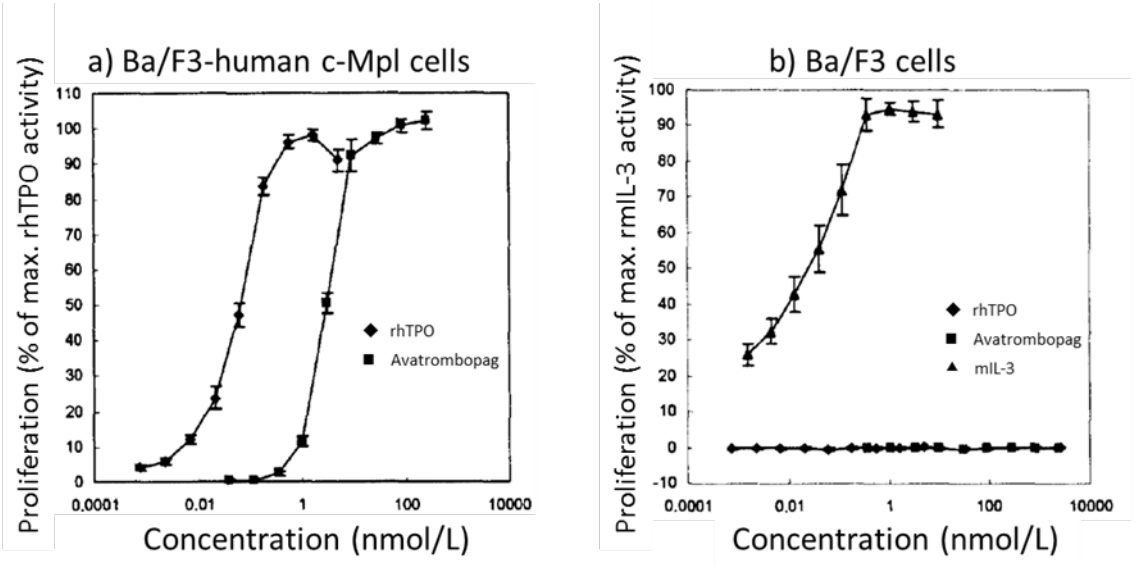
ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグ及び rhTPO の細胞増殖促進作用について、これらの薬物をヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞及び親株 Ba/F3 細胞と共にインキュベートして評価した。

ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞及び親株 Ba/F3 細胞を、10%ウシ胎児血清（FBS）添加 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地及び WEHI 条件培地内で維持した。アバトロンボパグ（0.038～250 nmol/L）又は rhTPO（0.76～5000 pmol/L）をヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞と共に 22～25 時間インキュベートした。アバトロンボパグ（0.38～2500 nmol/L）、rhTPO（0.76～5000 pmol/L）又は組換え型マウスインターロイキン-3（rmIL-3）（1.5～10000 pmol/L）を Ba/F3 細胞と共に 37～41 時間インキュベートした。細胞生存・増殖試薬である WST-1／1-メトキシ PMS を各ウェルに添加し、2 時間インキュベートした。試薬の添加直後及び添加 2 時間後に、溶液の吸光度を測定した。ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞及び Ba/F3 細胞に対する被験物質の増殖活性は、それぞれ rhTPO 及び rmIL-3 の最大増殖活性に対する割合として示した。

アバトロンボパグ及び rhTPO は、いずれもヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞の増殖を濃度依存的に促進した（図 2.6.2-2）。EC_{50}［平均値 ± 標準誤差（SEM）、n=5］はアバトロンボパグで 3.3 ± 0.2 nmol/L、rhTPO で 0.065 ± 0.005 nmol/L で、50 倍の違いがあった。アバトロンボパグの最大増殖活性は、rhTPO の最大増殖活性と同程度であった。アバトロンボパグ及び rhTPO は c-Mpl 欠損親株 Ba/F3 細胞の増殖を促進しなかった。一方、rmIL-3 は c-Mpl 欠損親株 Ba/F3 細胞

の増殖を促進した（図 2.6.2-2）。この結果から、アバトロンボパグはヒト c-Mpl に作用し、細胞増殖を促進することが示された。

図 2.6.2-2　ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞及び Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグの細胞増殖作用



Ba/F3-human c-Mpl cells (a) and Ba/F3 cells (b) were incubated with the indicated concentration of either avatrombopag (■), rhTPO (◆), or rmIL-3 (▲) for 22 to 25 or 37 to 41 hours, respectively.　Data are presented as mean ±SEM (n=5).　c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, rhTPO = recombinant human thrombopoietin, rmIL-3 = recombinant murine interleukin-3.
Source: SK-971417

2.6.2.2.1.2　前駆細胞の分化

2.6.2.2.1.2.1　ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞から巨核球への分化

添付資料番号：4.2.1.1-3（SK-971454）

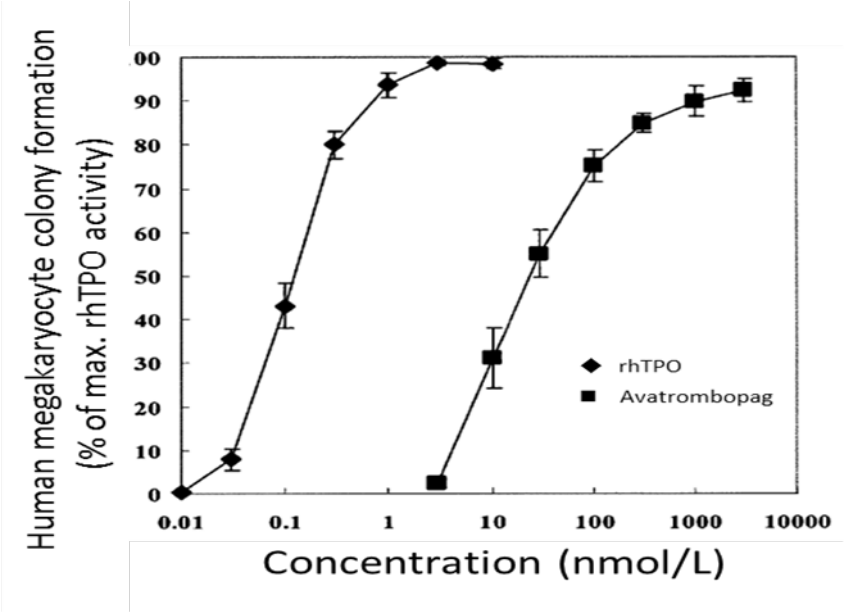
ヒト造血前駆細胞から巨核球への分化に対するアバトロンボパグ及び rhTPO の作用を検討した。

アバトロンボパグ（3～3000 nmol/L）又は rhTPO（0.01～10 nmol/L）を含む無血清コラーゲンベース培地に、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を 2500 cells/0.75 mL の密度で懸濁し、この懸濁液を 2 ウェルチャンバースライドに添加した。CD34 は細胞表面糖タンパクで、造血前駆細胞のマーカーとして使用した。10～12 日間インキュベート後に、CD41 陽性巨核球を同定した。CD41 は血小板糖タンパク IIb であり、血小板又は巨核球のマーカーとして使用した。CD41 陽性細胞を 3 個以上含むコロニーを巨核球コロニーとして計数し、rhTPO の最大分化活性に対する割合として示した。

アバトロンボパグ及び rhTPO のヒト臍帯血 CD34 陽性細胞からの巨核球コロニー形成作用を図 2.6.2-3 に示す。アバトロンボパグはヒト臍帯血 CD34 陽性細胞のヒト巨核球への分化を濃度依存的に促進した。分化促進作用の EC_{50}（平均値 ± SEM、n=5）はアバトロンボパグで 25.0 ± 7.8 nmol/L、rhTPO で 0.122 ± 0.014 nmol/L で、200 倍の違いがあった。アバトロンボパグの最大活性は、rhTPO の最大活性と同程度であった。アバトロンボパグ及び rhTPO の存在下で形成されたヒト巨核球コロニーの形態学的特性は同様であった。

これらの結果から、アバトロンボパグはヒト造血前駆細胞の巨核球への分化を、rhTPO の活性と同程度のレベルまで促進することが示された。

図 2.6.2-3　アバトロンボパグ及び rhTPO のヒト臍帯血 CD34 陽性細胞からの巨核球コロニー形成作用



Megakaryocyte colony formation was examined in the presence of avatrombopag (■) or rhTPO (◆). After 10 to 12 days of incubation, colonies that contained 3 or more $CD41^+$ cells were scored as human megakaryocyte colonies. Data are presented as mean ± SEM (n=5).
rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971454

2.6.2.2.1.2.2　ヒト造血前駆細胞の巨核球以外の系列への分化

添付資料番号：4.2.1.1-4（SK-971453）

アバトロンボパグのヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の巨核球以外の血球系列への分化促進作用を検討した。

本アッセイは、30% FBS 含有メチルセルロース培地で実施した。巨核球系列の細胞は FBS に通常含まれるトランスフォーミング増殖因子-β 等の阻害物質に対して感受性が強いため、本アッセイでは巨核球コロニーは観察されない。アバトロンボパグ（0、0.1、0.3、1、3 µmol/L）

又はサイトカイン混合物［幹細胞因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン 3（IL-3）、エリスロポエチン］を含むメチルセルロース培地にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を懸濁し、この懸濁液を 35 mm のシャーレに添加した。10～12 日間インキュベート後に、倒立顕微鏡で観察された典型的な形態学的外観に基づきコロニーを計数した。In situ で同定したコロニーの種類は、顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）、前期赤芽球バースト形成細胞（BFU-E）及び混合コロニー形成細胞（CFU-Mix、顆粒球／マクロファージ／巨核球を含む赤血球細胞コロニー）であった。サイトカイン混合物は、ヒト造血コロニーの形成を促進し、CFU-GM、BFU-E 及び CFU-Mix の数を増加させた（表 2.6.2-2）。

これらの試験条件下で、アバトロンボパグは 3 µmol/L でもヒト造血前駆細胞の分化促進作用を示さず（表 2.6.2-2）、この濃度はヒト巨核球コロニー形成に対するアバトロンボパグの EC_{50}（2.6.2.2.1.2.1 項）の約 100 倍であった。これらの結果から、アバトロンボパグはヒト造血前駆細胞のうち巨核球への分化を特異的に促進することが示唆された。

表 2.6.2-2　アバトロンボパグのヒト臍帯血 CD34 陽性造血前駆細胞の巨核球以外の系列への分化促進作用

Treatment	Concentration (µmol/L)	Number of Hematopoietic Colonies		
		CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix
Cytokine mixture	—	31.8±1.4	26.3±2.1	5.2±0.4
0.1% DMSO	—	1.7±0.4	0	0
Avatrombopag	0.1	2.0±0.4	0	0
Avatrombopag	0.3	1.8±0.5	0	0
Avatrombopag	1.0	2.1±0.3	0	0
Avatrombopag	3.0	2.3±0.3	0	0

Hematopoietic colony formation was measured in human CB $CD34^+$ hematopoietic progenitor cells cultured in methylcellulose-based medium containing 30% fetal bovine serum to suppress differentiation into megakaryocytes. Data are presented as mean ± SEM (n=5).
BFU-E = burst-forming unit-erythroid, CB = cord blood, CFU-GM = colony-forming unit-granulocyte-macrophage, CFU-Mix = colony-forming unit-mix, cytokine mixture = stem cell factor/GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)/IL-3/erythropoietin, DMSO = dimethyl sulfoxide.
Source: SK-971453

2.6.2.2.1.2.3　巨核球の成熟

添付資料番号：4.2.1.1-5（SK-971628）

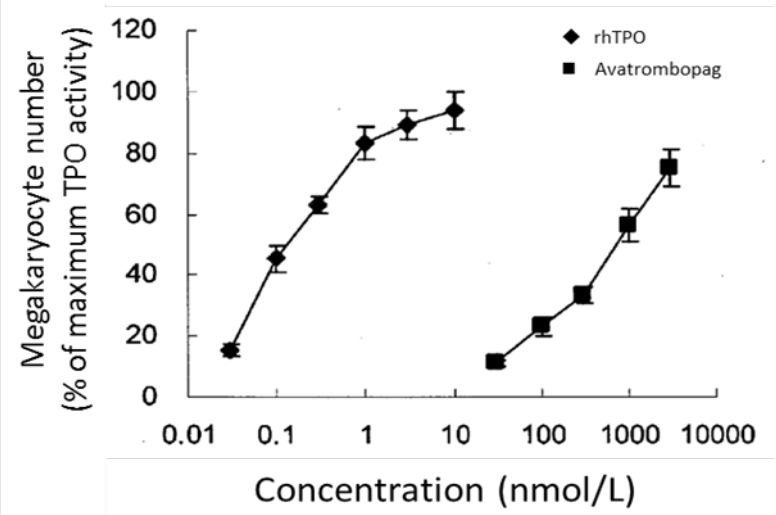
アバトロンボパグの巨核球の増殖及び倍数性への作用を検討し、巨核球の成熟への作用を評価した。通常、成熟巨核球は増殖せず、後期段階の有糸分裂を行うことなく細胞内のデオキシリボ核酸（DNA）量を増加させる。巨核球の倍数性の増加に伴い、巨核球の体積は増加する。これは血小板産生に必要な過程であり、巨核球はその大きさと豊富な細胞質により、1 細胞当たり数千の血小板を産生する（Gewirtz, 1995）。

G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34 陽性細胞に、アバトロンボパグ（30～3000 nmol/L）又は rhTPO（0.03～10 nmol/L）を添加し、無血清培地で培養した。12 日間インキュベート後に、巨核球数

及び倍数性をフローサイトメトリー法で測定した。巨核球は、CD41 及び CD45 の両方を発現する細胞と定義した。CD45 は赤血球／血小板以外の造血細胞のマーカーとして通常使用される。アバトロンボパグ及び rhTPO は、いずれもヒト末梢血 CD34 陽性細胞の CD41 陽性 CD45 陽性細胞への分化を濃度依存的に促進した（図 2.6.2-4）。アバトロンボパグ 3 μmol/L 及び rhTPO 3 nmol/L で倍数性の分布を分析した。赤血球及び血小板は DNA を有しないことから、倍数性の分析では CD41 を発現しヨウ化プロピジウム染色で陽性を示した細胞を巨核球とみなした。表面マーカーの染色後に、ヨウ化プロピジウム染色を行い、DNA 解析を実施した。アバトロンボパグ又は rhTPO と共にインキュベートしたヒト末梢血 CD34 陽性細胞の倍数性に、顕著な差は認められなかった（図 2.6.2-5）。

アバトロンボパグはヒト造血前駆細胞の倍数体巨核球への分化を促進し、濃度依存的に巨核球数を増加させた。巨核球の倍数性にアバトロンボパグと rhTPO に差はみられなかった。

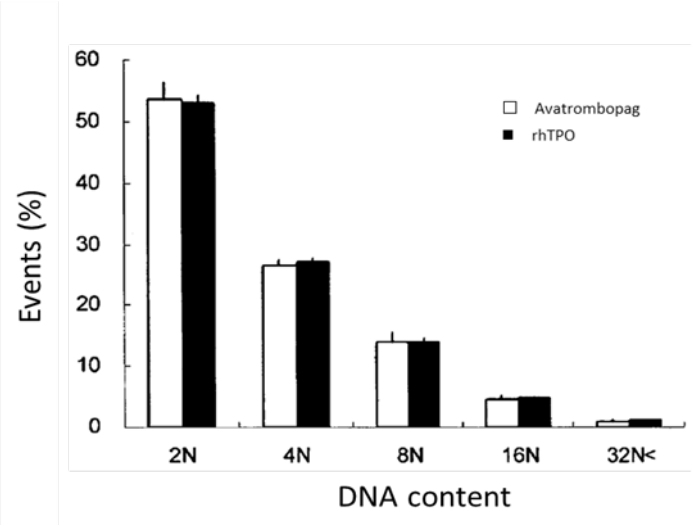
図 2.6.2-4　アバトロンボパグ及び rhTPO の巨核球の増殖促進作用



G-CSF-mobilized human PB $CD34^+$ cells were cultured for 12 days in serum-free medium in the presence of avatrombopag (■) or rhTPO (◆). The number of megakaryocytes ($CD41^+CD45^+$ cells) was counted using flow cytometry. The data represent the mean ± SEM of 5 independent experiments. G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor, PB = peripheral blood, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

Source: SK-971628

図 2.6.2-5　アバトロンボパグ及び rhTPO の巨核球の倍数性への作用



$$\text{Events (\%) at nN} = \frac{\text{number of cells with nN chromosomes}}{\text{total number of cells}} \times 100$$

G-CSF-mobilized human PB $CD34^+$ cells were cultured for 12 days in serum-free medium in the presence of 3 µmol/L avatrombopag (open columns) or 3 nmol/L rhTPO (filled columns). The data represent the mean ±SEM of 5 independent experiments. G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor, nN = number of chromosomes, where 2N is the normal diploid chromosome content, PB = peripheral blood, rhTPO = recombinant human thrombopoietin. Statistical analysis was performed in each DNA content group using *t* test. There was no significant difference between avatrombopag and rhTPO in each group.

Source: SK-971628

2.6.2.2.1.2.4　アバトロンボパグと TPO を併用したときの巨核球産生促進作用

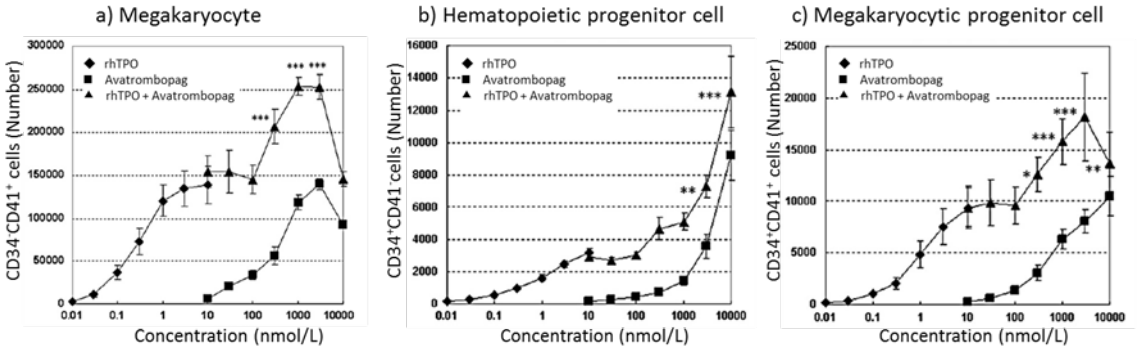
添付資料番号：4.2.1.1-17（Fukushima-Shintani, 2008）

アバトロンボパグ及び rhTPO を併用したきの巨核球形成に対する作用を検討した。

アバトロンボパグ単独（フリー体、10～10000 nmol/L）、rhTPO 単独（0.01～10 nmol/L）又はアバトロンボパグ（フリー体、10～10000 nmol/L）及び rhTPO（3 nmol/L）を併用して、G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34 陽性細胞を無血清培地で培養した。インキュベート 14 日後に、CD34 陽性 CD41 陰性細胞（造血前駆細胞）、CD34 陽性 CD41 陽性細胞（巨核球前駆細胞）及び CD34 陰性 CD41 陽性細胞（巨核球）の数をフローサイトメトリー法で測定した。

アバトロンボパグ又は rhTPO 単独では巨核球数（図 2.6.2-6a）を濃度依存的に増加させ、アバトロンボパグの最大活性は rhTPO の最大活性と同程度であった。アバトロンボパグ 3 µmol/L 及び rhTPO 3 nmol/L の併用により、巨核球数は rhTPO 3 nmol/L の単独と比較して約 2 倍に増加し（P<0.001）、造血前駆細胞（図 2.6.2-6b）及び巨核球前駆細胞（図 2.6.2-6c）の数も、アバトロンボパグ又は rhTPO 単独と比較して増加した。これらの結果から、アバトロンボパグは rhTPO との併用により巨核球だけでなく造血前駆細胞及び巨核球前駆細胞も増加させ、アバトロンボパグは rhTPO の作用とは独立して作用することが示された。

図 2.6.2-6　アバトロンボパグ及び rhTPO の巨核球、造血前駆細胞及び巨核球前駆細胞の産生促進作用



G-CSF-mobilized human PB $CD34^+$ cells were cultured for 14 days in serum-free medium in the presence of avatrombopag (■), rhTPO (◆), or 3 nmol/L rhTPO and avatrombopag (▲). The data represent the mean ±SEM of 5 independent experiments. G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor, PB = peripheral blood, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (versus 3 nmol/L TPO-treated group by the Dunnett's test).

Source: Fukushima-Shintani, 2008

2.6.2.2.1.3　c-Mpl の活性化を介したシグナル伝達

添付資料番号：4.2.1.1-6（SK-971447）、4.2.1.1-7（SK-971493）

アバトロンボパグのヒト c-Mpl を介したシグナル伝達刺激作用を検討した。

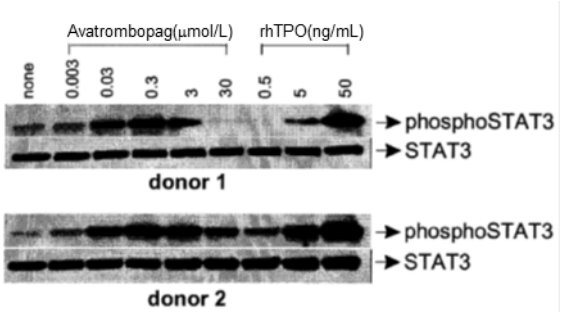
アバトロンボパグによるヒト血小板での STAT3 及び STAT5 のチロシンリン酸化の誘導作用を検討した（SK-971447）。アバトロンボパグ（0.003、0.03、0.3、3、30 μmol/L）又は rhTPO（0.5、5、50 ng/mL［0.009、0.09、0.9 nmol/L］）をヒト血小板と共に 37°C で 15 分間インキュベートした。細胞可溶化物を用いてウエスタンブロッティングを実施した。プローブとして抗リン酸化 STAT3（Tyr^{705}）抗体及び抗リン酸化 STAT5（Tyr^{694}）抗体を用いた。ゲルの各レーンに同量ずつローディングされていることを確認するため、膜をストリッピングし、抗 STAT3 抗体及び抗 STAT5 抗体を用いて増強化学発光法でリプローブした。アバトロンボパグ（0.03、0.3 及び 3 μmol/L）は、rhTPO（5 及び 50 ng/mL）と同様に、ヒト血小板で STAT3 及び STAT5 のチロシンリン酸化を強力に誘導することが示された（図 2.6.2-7、図 2.6.2-8）。

アバトロンボパグによるヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞での STAT3、STAT5 及び ERK のチロシン又はスレオニンのリン酸化の誘導作用を検討した（SK-971493）。アバトロンボパグ（0.003、0.03、0.3、3 μmol/L）又は rhTPO（0.5、5、50 ng/mL）をヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞と共に 37°C で 15 分間インキュベートした。細胞可溶化物を用いてウエスタンブロッティングを実施した。プローブとして抗リン酸化 STAT3（Tyr^{705}）抗体、抗リン酸化 STAT5（Tyr^{694}）抗体及び抗リン酸化 ERK（Thr^{202}, Thr^{204}）抗体を用いた。ゲルの各レーンに同量ずつローディングされていることを確認するため、膜をストリッピングし、抗 STAT3 抗体、抗 STAT5 抗体及び抗 ERK 抗体を用いて増強化学発光法でリプローブした。アバトロンボパグは rhTPO と同様に、ヒト c-

Mpl 発現 Ba/F3 細胞での STAT3、STAT5 及び ERK のチロシン又はスレオニンのリン酸化を誘導することが示された（図 2.6.2-9）。

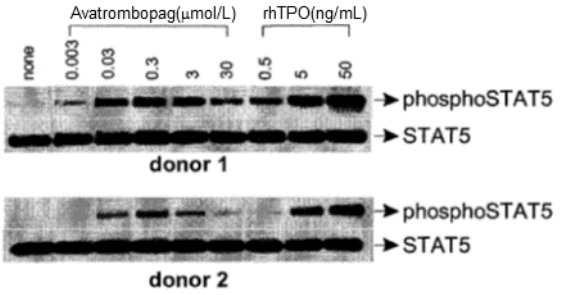
アバトロンボパグは rhTPO と同様に、ヒト血小板及びヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞で STAT3、STAT5 又は ERK タンパクのリン酸化を誘導した。このことから、アバトロンボパグがヒト c-Mpl を介した JAK-STAT 及び SHC-Ras-Raf-ERK のシグナル伝達経路の両方を活性化することが示された。

図 2.6.2-7　ヒト血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT3 のチロシンリン酸化



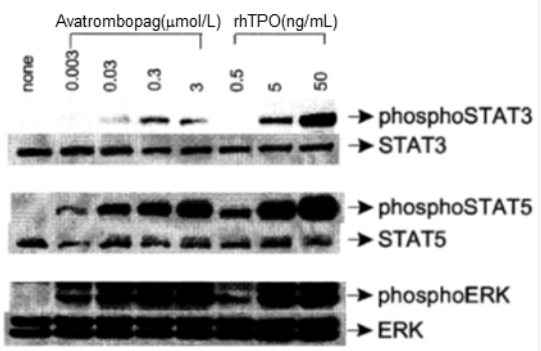
Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT3 antibody and then reprobed with anti-STAT3 antibody.　Two donors were used.　rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971447

図 2.6.2-8　ヒト血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT5 antibody and then reprobed with anti-STAT5 antibody.　Two donors were used.　rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971447

図 2.6.2-9　ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT3、STAT5 及び ERK のチロシン又はスレオニンのリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT3, anti-phospho-STAT5, and anti-phospho-ERK antibodies and then reprobed with anti-STAT3, anti-STAT5, and anti-ERK antibodies.　c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971493

2.6.2.2.1.4　種特異性

添付資料番号：4.2.1.1-6（SK-971447）、4.2.1.1-8（SK-010015）、4.2.1.1-9（SK-010014）、4.2.1.1-10（SK-971484）、4.2.1.1-11（SK-971444）、4.2.1.1-12（SK-971462）、

ヒト（2.6.2.2.1.3 項、SK-971447）、ラット、モルモット、ウサギ及びビーグル犬（SK-010015）、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル及びカニクイザル（SK-010014）、ハムスター及びブタ（SK-971484）、オリーブヒヒ（SK-971444）、並びにチンパンジー（SK-971462）から調製した血小板を用いて、アバトロンボパグによる血小板での STAT5 のチロシンリン酸化作用により種特異性を評価した。

各動物種の全血を遠心分離して多血小板血漿（PRP）を調製し、アバトロンボパグ（SK-010015 及び SK-010014 では、アバトロンボパグ塩酸塩）又は rhTPO を添加し 37°C で 15 分間（ハムスター以外の動物種）又は 3 時間（ハムスター）インキュベートした。細胞可溶化物を用いてウエスタンブロッティングを実施した。プローブとして抗リン酸化 STAT5（Tyr^{694}）抗体を用いた。ゲルの各レーンに同量ずつローディングされていることを確認するため、膜をストリッピングし、抗 STAT5 抗体を用いて増強化学発光法でリプローブした。

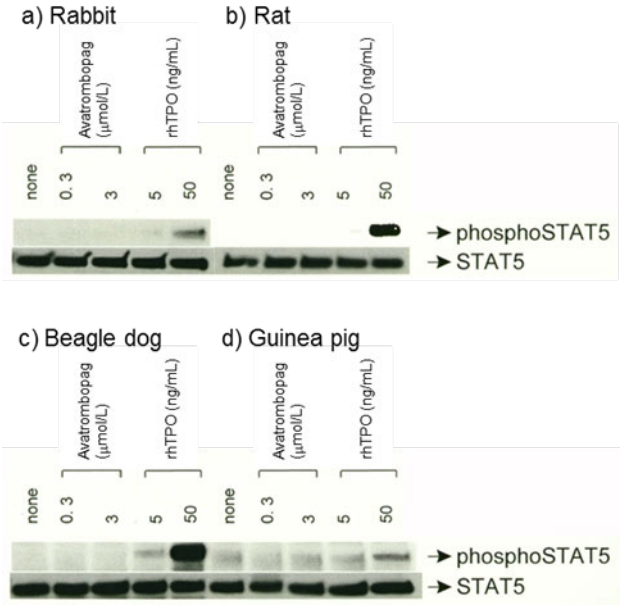
2.6.2.2.1.4.1　ラット、モルモット、ウサギ、ビーグル犬、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル及びカニクイザル

添付資料番号： 4.2.1.1-8（SK-010015）、4.2.1.1-9（SK-010014）

ラット（n=1）、モルモット（n=1）、ウサギ（n=1）、ビーグル犬（n=1）、コモンマーモセット（n=3 プール）、リスザル（n=3 プール）、アカゲザル（n=3）及びカニクイザル（n=3）の血小板で、rhTPO は STAT5 のチロシンリン酸化を誘導した。一方、アバトロンボパグはいずれの動物種の血小板でも STAT5 のチロシンリン酸化を誘導しなかった（図 2.6.2-10、図 2.6.2-11）。

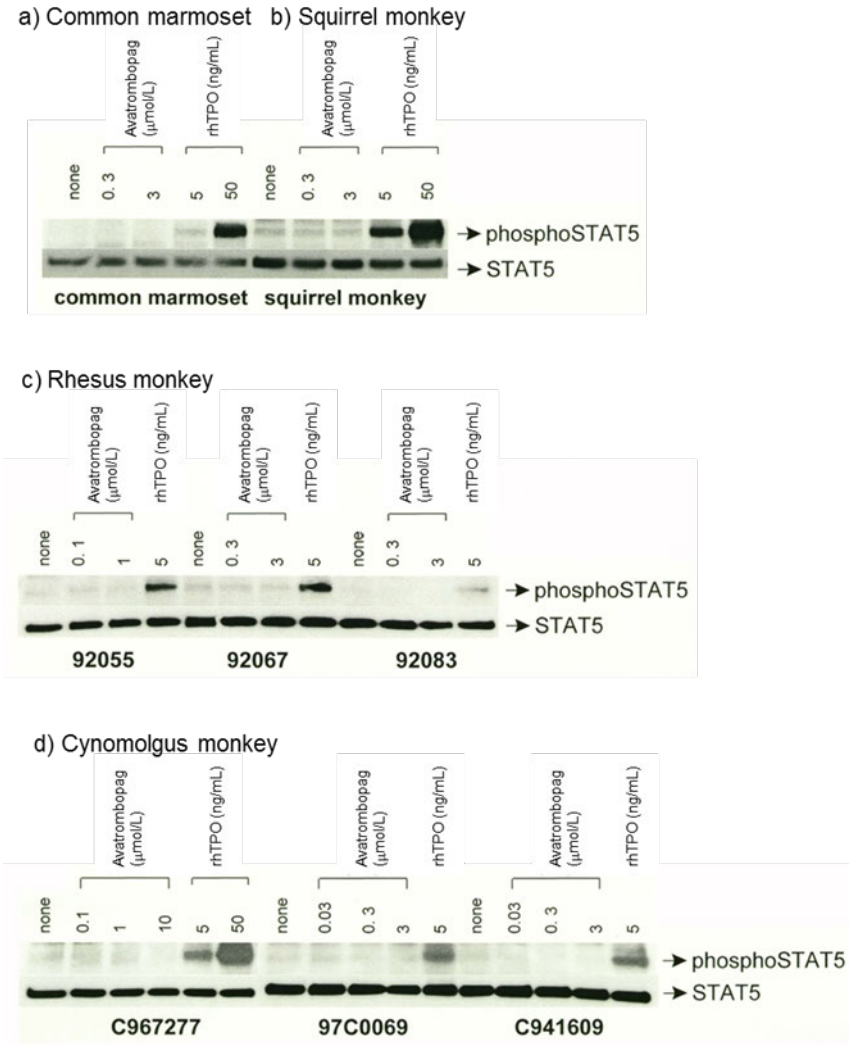
アバトロンボパグは、ラット、モルモット、ウサギ、ビーグル犬、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル及びカニクイザルの c-Mpl を活性化しなかった。

図 2.6.2-10　ラット、モルモット、ウサギ及びビーグル犬の血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT5 antibody and then reprobed with anti-STAT5 antibody (n=1).
rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-010015

図 2.6.2-11　コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル及びカニクイザルの血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT5 antibody and then reprobed with anti-STAT5 antibody (a, b: pooled lysates of 3 animals; c, d: lysates from 3 individual animals). rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

Source: SK-010014

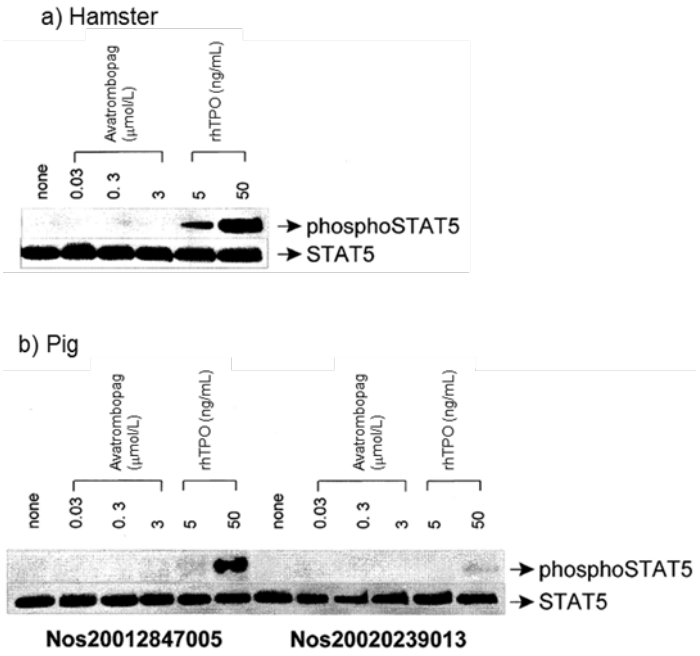
2.6.2.2.1.4.2　ハムスター及びブタ

添付資料番号： 4.2.1.1-10（SK-971484）

ハムスター（n=2 プール）及びブタ（n=2）の血小板で、rhTPO は STAT5 のチロシンリン酸化を誘導したが、アバトロンボパグ（0.03、0.3、3 µmol/L）はいずれの種の血小板でもチロシンリン酸化を誘導しなかった（図 2.6.2-12）。

アバトロンボパグは、ハムスター及びブタの c-Mpl を活性化しなかった。

図 2.6.2-12　ハムスター及びブタ血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT5 antibody and then reprobed with anti-STAT5 antibody.　Two animals were used for pig, and platelets from 2 animals were pooled and used for hamster.　rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

Source: SK-971484

2.6.2.2.1.4.3　オリーブヒヒ及びチンパンジー

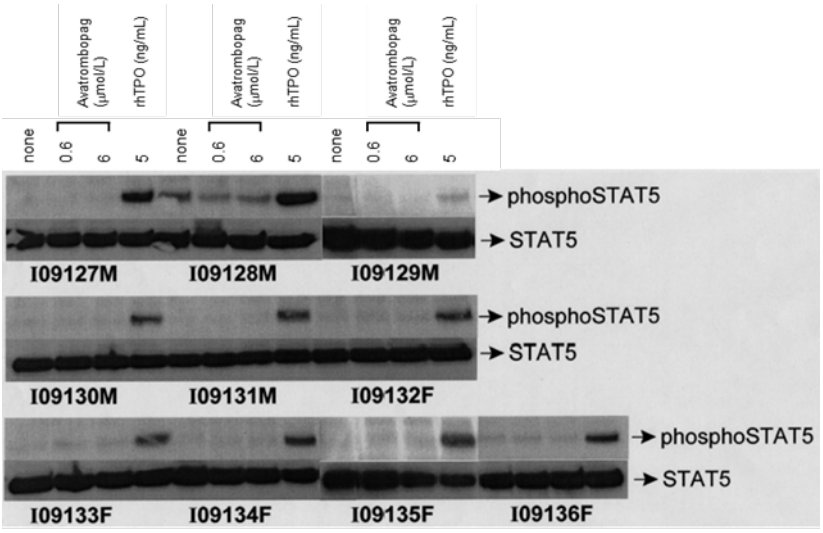
添付資料番号： 4.2.1.1-11（SK-971444）、4.2.1.1-12（SK-971462）

オリーブヒヒ（n=10、雄 5 例、雌 5 例）の全ての血小板検体で、rhTPO は 5 ng/mL の濃度で STAT5 のチロシンリン酸化を誘導したが、アバトロンボパグは 0.6 及び 6 μmol/L の濃度で STAT5 のチロシンリン酸化を誘導しなかった（図 2.6.2-13）（SK-971444）。

一方、チンパンジー（n=4、雄 3 例、雌 1 例）では、全ての血小板検体で、rhTPO の 5 ng/mL と同様に、アバトロンボパグも 0.03 μmol/L 以上の濃度で STAT5 のチロシンリン酸化を誘導した（図 2.6.2-14）（SK-971462）。さらに、アバトロンボパグの 0.3 μmol/L でのリン酸化の誘導は 0.03 μmol/L でのリン酸化の誘導より強力であった。

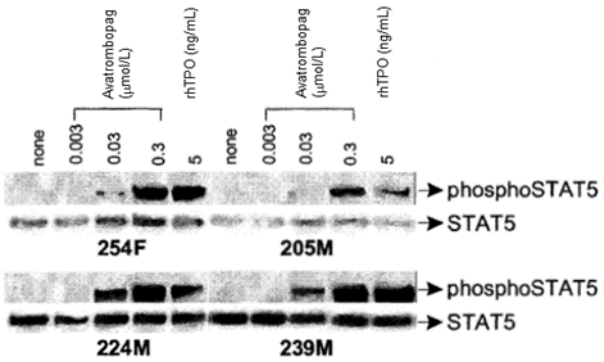
アバトロンボパグはチンパンジーの c-Mpl を活性化したが、オリーブヒヒの c-Mpl は活性化しなかった。

図 2.6.2-13　オリーブヒヒ血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT5 antibody and then reprobed with anti-STAT5 antibody (n=10; 5 males, 5 females).　F = female, M = male, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971444

図 2.6.2-14　チンパンジー血小板でのアバトロンボパグ又は rhTPO による STAT5 のチロシンリン酸化



Immunoblots were probed with anti-phospho-STAT5 antibody and then reprobed with anti-STAT5 antibody (n=4; 3 males, 1 female).　F = female, M = male, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971462

rhTPO は評価した全ての動物種の血小板で、STAT5 のチロシンリン酸化を誘導した。一方、アバトロンボパグは、ヒト及びチンパンジーの血小板では、rhTPO と同様に STAT5 のチロシンリン酸化を誘導したが、評価したそれ以外の動物種（ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ビーグル犬、コモンマーモセット、リスザル、アカゲザル、カニクイザル、オリーブヒヒ及びブタ）の血小板では、STAT5 のチロシンリン酸化を誘導しなかった。これらの結果から、

アバトロンボパグの活性には種特異性があり、チンパンジー及びヒト c-Mpl を活性化することが示唆された。

2.6.2.2.1.5　結合部位

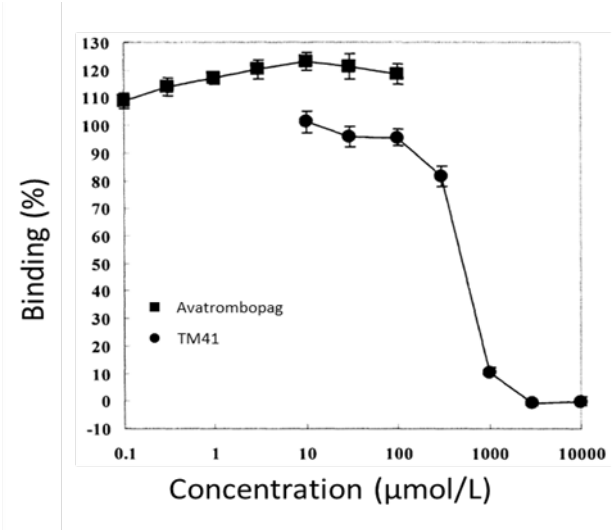
添付資料番号： 4.2.1.1-1（SK-971417）、4.2.1.1-2（CRE140019）、4.2.1.1-13（SK-971455）、4.2.1.1-14（SK-971718）

c-Mpl 上のアバトロンボパグの結合部位について検討した。

rhTPO のヒト血小板上の c-Mpl への結合に対するアバトロンボパグの作用を検討した（SK-971455）。^{125}I-rhTPO（0.5 nmol/L）とアバトロンボパグ（0.1～100 µmol/L）又は TM41（ヒト c-Mpl 阻害薬、10～10000 µmol/L）を PRP に添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。過量の rhTPO を添加して非特異的結合を測定した。インキュベート後に、ショ糖密度勾配遠心分離法を用いて非結合の放射能画分から血小板を分離し、置換された ^{125}I-rhTPO を測定した。測定結果を、被験物質非存在下の ^{125}I-rhTPO 結合に対する被験物質存在下の ^{125}I-rhTPO 結合の割合として示した。

TM41 は ^{125}I-rhTPO のヒト血小板への結合を濃度依存的に阻害し、IC_{50} は 515 ± 32 µmol/L であった。一方、アバトロンボパグは 100 µmol/L まで ^{125}I-rhTPO の結合を阻害しなかった（図 2.6.2-15）。したがって、アバトロンボパグは、ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞に対する増殖作用の EC_{50}（2.6.2.2.1.1 項）の 30000 倍の濃度まで、^{125}I-rhTPO の結合に対して作用を示さなかった。これらの結果から、ヒト c-Mpl 上のアバトロンボパグの結合部位は rhTPO の結合部位と異なることが示された。

図 2.6.2-15　^{125}I-rhTPO のヒト血小板への結合に対するアバトロンボパグ及び TM41 の作用

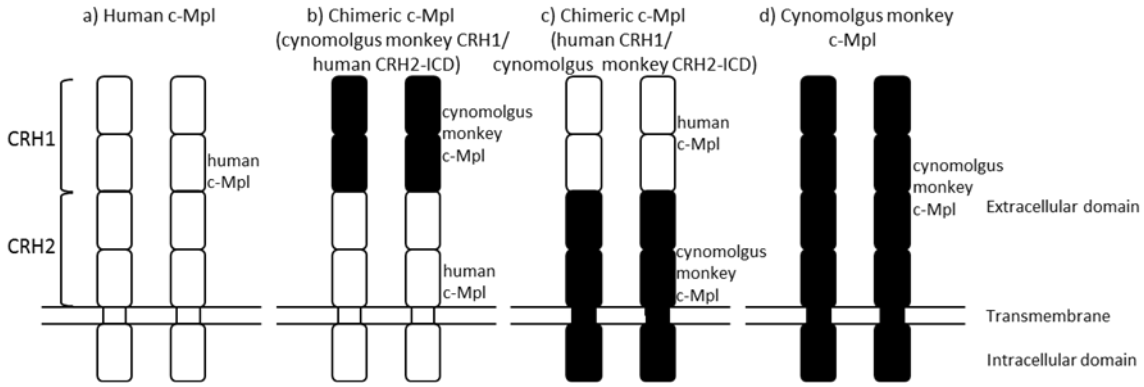


Binding of ^{125}I-rhTPO was measured using human platelet-rich plasma in the presence of increasing concentrations of avatrombopag (■) or TM41 (●). Data are presented as mean ±SEM (n=5). rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971455

アバトロンボパグのヒト c-Mpl への結合特性及び結合部位をさらに解明するために、3 つの試験を実施した（SK-971417、CRE140019、SK-971718）。

ヒト c-Mpl の細胞外ドメイン（ECD）は、CRH1 及び CRH2 と呼ばれる 2 つの重複 CRH ドメインからなる。TPO は c-Mpl の CRH1 に結合する（Sabath, 1999）。アバトロンボパグはカニクイザルに対して作用を示さなかった（SK-010014、SK-971433）。そこで、アバトロンボパグの活性の種特異性がヒト c-Mpl の CRH1 に依存するか否かを検討した（SK-971718）。カニクイザル CRH1／ヒト CRH2-ICD キメラ c-Mpl コンストラクト及びヒト CRH1／カニクイザル CRH2-ICD キメラ c-Mpl コンストラクトを作製し、Ba/F3 細胞内に遺伝子導入した（図 2.6.2-16）。アバトロンボパグ又は rhTPO をこれらの遺伝子導入細胞とインキュベートし、増殖活性を測定した。アバトロンボパグの増殖促進作用は、rhTPO の最大増殖活性に対する割合として示した。

図 2.6.2-16　ヒト、カニクイザル及びキメラの c-Mpl ドメイン構造

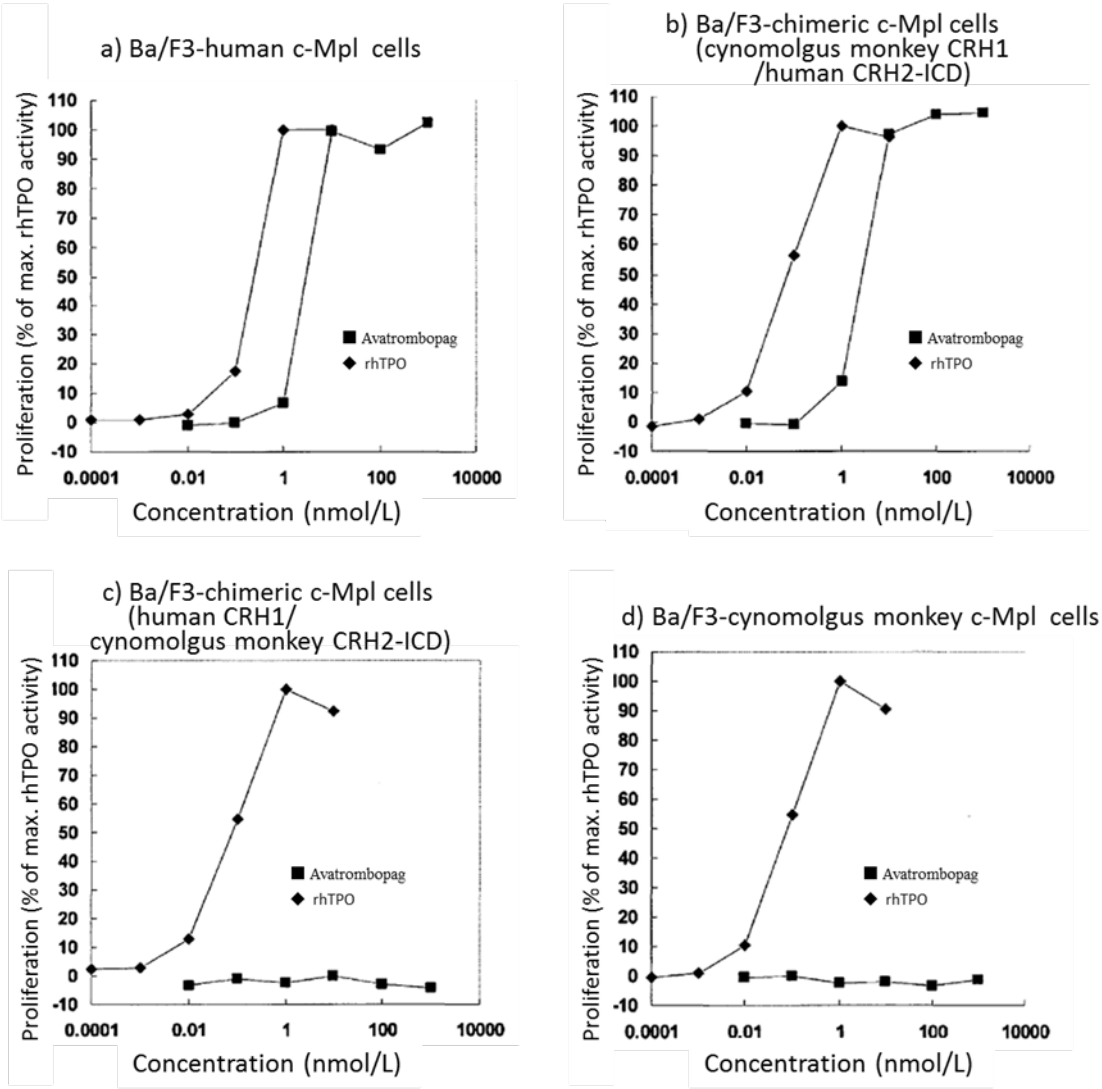


The location of the ECD, ICD, and transmembrane domains are indicated.　Cynomolgus monkey sequences are shown in black, and human sequences are in white. c-Mpl = thrombopoietin receptor, CRH = cytokine receptor homology, CRH1 = membrane-distal CRH domain, CRH2 = membrane-proximal CRH domain, ECD = extracellular domain, ICD = intracellular domain.

Source: Based on SK-971718

rhTPO は評価した全ての細胞に対して濃度依存的に増殖を促進した（図 2.6.2-17）。一方、アバトロンボパグは Ba/F3-ヒト c-Mpl 細胞（図 2.6.2-17a）及び Ba/F3-キメラ c-Mpl（カニクイザル CRH1/ヒト CRH2-ICD）細胞（図 2.6.2-17b）の増殖を促進したが、カニクイザル c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞（図 2.6.2-17d）及びキメラ c-Mpl（ヒト CRH1/カニクイザル CRH2-ICD）発現 Ba/F3 細胞（図 2.6.2-17c）の増殖を促進しなかった。これらの結果から、アバトロンボパグの活性に、CRH2、膜貫通ドメイン及び ICD を含むヒト c-Mpl 領域が重要な役割を果たしており、ヒト c-Mpl 上のアバトロンボパグの活性部位は rhTPO の活性部位と異なることが示された。

図 2.6.2-17　ヒト及びサルの c-Mpl ドメインキメラを遺伝子導入した Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグ及び rhTPO の増殖促進作用



Ba/F3-human c-Mpl (a), Ba/F3-chimeric c-Mpl (cynomolgus monkey CRH1/human CRH2-ICD) (b), Ba/F3-chimeric c-Mpl (human CRH1/cynomolgus monkey CRH2-ICD) (c), Ba/F3-cynomolgus monkey c-Mpl (d) cells were grown in the presence of increasing concentrations of avatrombopag (■) or rhTPO (◆). Data are presented as means of triplicate incubations. c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, CRH = cytokine receptor homology, CRH1 = membrane-distal CRH domain, CRH2 = membrane-proximal CRH domain, ICD = intracellular domain, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

Source: SK-971718

アバトロンボパグが血小板増殖を誘導する際に、ヒト c-Mpl 上の結合部位での ECD、ICD 又は膜貫通ドメインの必要性を検討した（図 2.6.2-18、SK-971417、CRE140019）。アバトロンボパグはヒト c-Mpl に対して特異性を示し、マウス c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞に対して作用を示さなかった（図 2.6.2-20、SK-971417）。ヒト又はマウスのいずれかに由来する ECD、ICD 及び膜貫通ドメインを様々な組み合わせで有する c-Mpl を作製し、この種特異性を検討した。具体的には、ヒト Met^{1}-Trp^{491}／マウス Ile^{483}-Pro^{625} キメラ c-Mpl コンストラクト（図 2.6.2-19b）及びマ

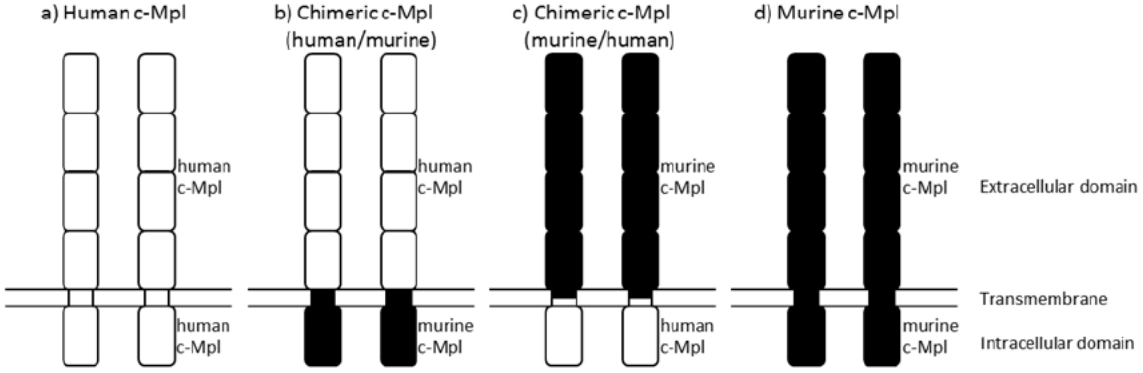
ウス Met[1]-Ser[496]／ヒト Ala[506]-Pro[635] キメラ c-Mpl コンストラクト（図 2.6.2-19c）を作製し、このコンストラクトを Ba/F3 細胞内に遺伝子導入した。この異なるコンストラクトを遺伝子導入された Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグの増殖促進作用を検討した。

図 2.6.2-18　各動物種の c-Mpl 膜貫通ドメインのアミノ酸配列

	←Extracellular domain																Intracellular domain→					
	483							490														504
Mouse	I	T	L	V	T	A	L	L	L	V	L	S	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Rat	I	T	L	V	T	A	L	L	L	V	L	S	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Syrian Hamster	I	S	L	V	T	A	L	F	L	V	L	C	L	S	V	L	L	G	L	L	L	L
Hartley Guinea Pig	I	S	L	V	T	A	L	F	L	V	L	G	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Japanese White Rabbit	I	T	L	V	T	A	L	L	L	V	L	S	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Common Marmoset	I	S	L	V	T	A	L	F	L	V	L	G	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Squirrel Monkey	I	S	L	V	T	A	L	F	L	V	L	G	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Rhesus Macaque	I	S	L	V	T	A	L	F	L	V	L	G	L	S	A	L	L	G	L	L	L	L
Cynomolgus Monkey	I	S	L	V	T	A	L	L	L	V	L	G	L	S	A	V	L	G	L	L	L	L
Olive Baboon	I	S	L	V	T	A	L	L	L	V	L	G	L	S	A	V	L	G	L	L	L	L
Chimpanzee	I	S	L	V	T	A	L	H	L	V	L	G	L	S	A	V	L	G	L	L	L	L
Human	I	S	L	V	T	A	L	H	L	V	L	G	L	S	A	V	L	G	L	L	L	L
	492							499														513

His[499] only exists in humans and chimpanzees but not in other species.　c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor,
Source: Abe, 2011; Nakamura, 2006; National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence: XP_003812896.1.

図 2.6.2-19　ヒト、マウス及びキメラ c-Mpl のドメイン構造



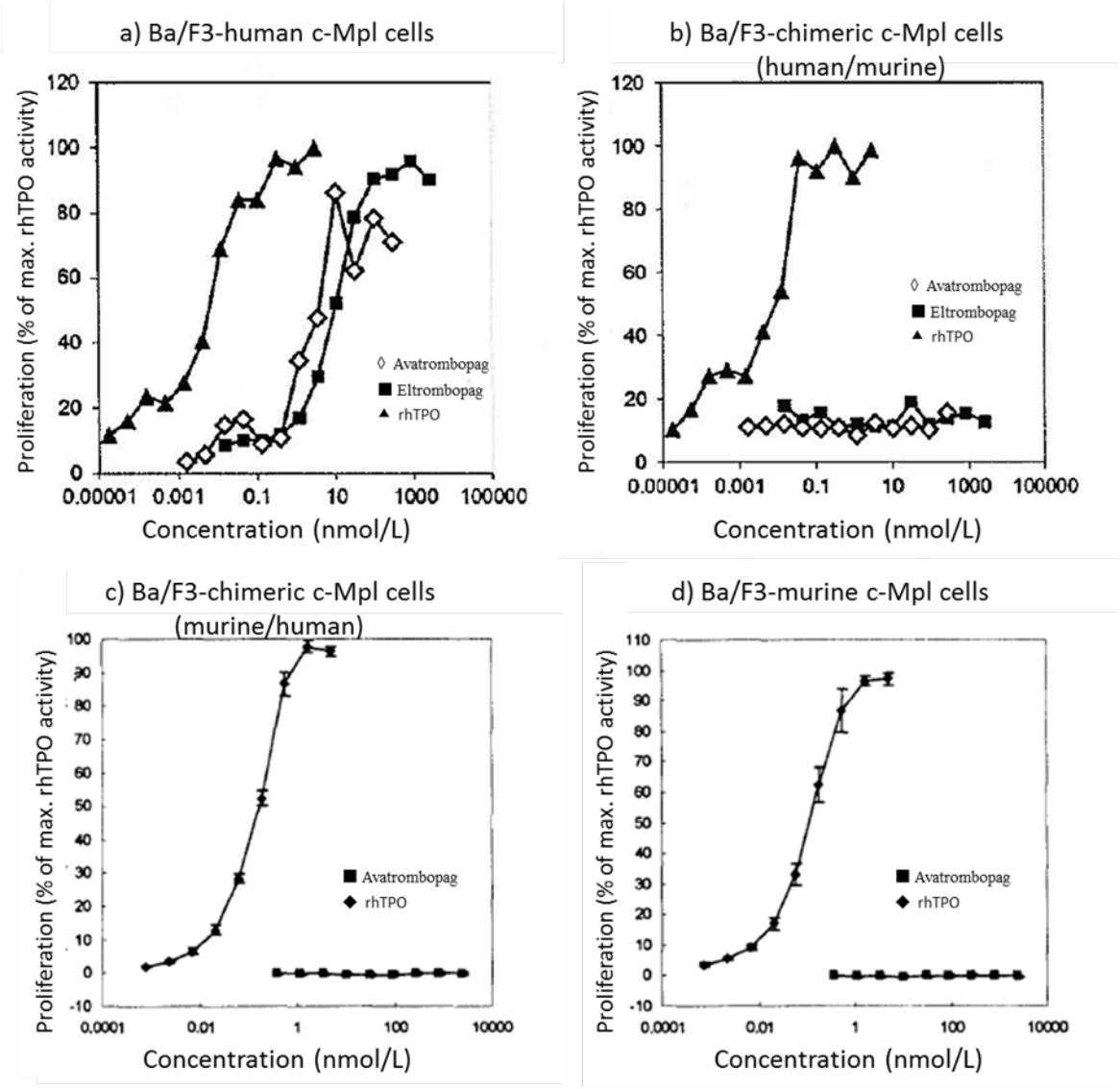
The location of the extracellular domain, intracellular domain, and transmembrane domains are indicated.　Murine sequences are shown in black, and human sequences are in white.　a) human c-Mpl, b) human Met[1]-Trp[491]/murine Ile[483]-Pro[625] chimeric c-Mpl, c) murine Met[1]-Ser[496]/human Ala[506]-Pro[635] chimeric c-Mpl, d) murine c-Mpl.
c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor.
Source: SK-971417

本試験で使用された全ての細胞は、10% FBS、0.5%ペニシリン／ストレプトマイシン添加 RPMI 1640 培地及び WEHI 条件培地で維持した。アバトロンボパグ（フリー体）又は rhTPO をヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞と共に 16 時間超、キメラ c-Mpl（ヒト Met[1]-Trp[491]／マウス Ile[483]-Pro[625]）発現 Ba/F3 細胞と共に 16 時間超（CRE140019）、アバトロンボパグ又は rhTPO をマウ

ス c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞と共に 37～45 時間、キメラ c-Mpl（マウス Met^{1}-Ser^{496}／ヒト Ala^{506}-Pro^{635}）発現 Ba/F3 細胞と共に 42～47 時間（SK-971417）インキュベートした。細胞生存・増殖試薬である WST-1／1-メトキシ PMS を各ウェルに添加し、2 時間インキュベートした。試薬の添加直後及び添加後 2 時間に、溶液の吸光度を測定した。c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞に対する被験物質による増殖活性は、それぞれ rhTPO の最大増殖活性に対する割合として示した。

rhTPO は評価した全ての細胞に対して濃度依存的に増殖を促進した（図 2.6.2-20）。一方、アバトロンボパグ及び対照薬エルトロンボパグはヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞（図 2.6.2-20a）のみで増殖促進作用を示し、マウス c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞（図 2.6.2-20d）及びキメラ c-Mpl（マウス Met^{1}-Ser^{496}／ヒト Ala^{506}-Pro^{635}）発現 Ba/F3 細胞（図 2.6.2-20c）では増殖促進作用を示さなかった。キメラ c-Mpl（ヒト Met^{1}-Trp^{491}／マウス Ile^{483}-Pro^{625}）発現 Ba/F3 細胞でも増殖促進作用を示さなかったことから（図 2.6.2-20b）、アバトロンボパグはヒト c-Mpl の ECD 及び ICD には作用しないことが示唆された。これらの結果から、アバトロンボパグの細胞増殖促進作用にはヒト c-Mpl の膜貫通ドメインが必要であることが示唆された。

図 2.6.2-20　マウス-ヒト c-Mpl ドメインキメラを遺伝子導入した Ba/F3 細胞に対するアバトロンボパグ及び rhTPO の増殖促進作用



a) Ba/F3-human c-Mpl cells.　Avatrombopag (◊), Eltrombopag (■), rhTPO (▲).　Data are presented as means of duplicate.　Source: CRE140019

b) Ba/F3-chimeric c-Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells.　Avatrombopag (◊), Eltrombopag (■), rhTPO (▲).　Data are presented as means of duplicate.　Source: CRE140019

c) Ba/F3-chimeric c-Mpl (murine Met^{1}-Ser^{496}/human Ala^{506}-Pro^{635}) cells.　Avatrombopag (■), rhTPO (◆).　Data are presented as mean ±SEM (n=5).　Source: SK-971417

Ba/F3-murine c-Mpl cells.　Avatrombopag (■), rhTPO (◆).　Data are presented as mean ±SEM (n=5).

c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

Source: SK-971417

2.6.2.2.2　In vivo 薬理試験

2.6.2.2.2.1　血小板産生

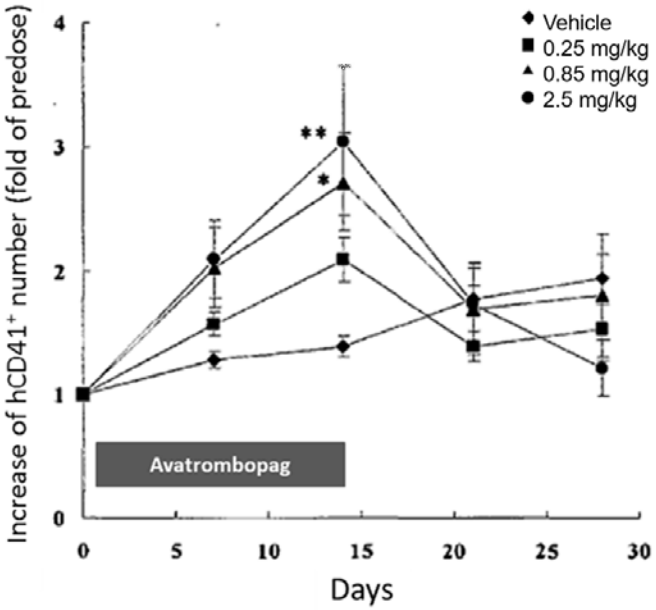
添付資料番号：4.2.1.1-6（SK-971447）、4.2.1.1-9（SK-010014）
4.2.1.1-12（SK-971462）、4.2.1.1-15（SK-971435）
4.2.1.1-16（SK-971433）、4.2.2.2-1（D20[redacted]01145-01）

In vitro で認められた血小板産生に対するアバトロンボパグの薬理作用が、in vivo でも確認されるか否かについて、ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスを用いて検討した（SK-971435）。Perez らは in vivo でヒト巨核球形成及び血小板産生を評価する方法として、NOD/SCID マウスにヒト CD34 陽性 末梢血幹細胞を異種移植したモデルマウスを報告している（Perez, 2001）。これまでの試験で、アバトロンボパグはヒト及びチンパンジー（SK-971447、SK-971462）でのみ STAT5 のリン酸化作用を示し、カニクイザル（SK-010014）では STAT5 のリン酸化作用を示さないことが明らかにされている。そこで、in vitro でみられなかったカニクイザルでのアバトロンボパグの血小板産生作用が in vivo でもみられないか否かも検討した（SK-971433）。

これまでに移植後 17～18 週から 0.09%超の hCD41 陽性血小板を産生することが示されているヒト胎児肝臓 CD34 陽性細胞移植 NOD/SCID マウスに対して、アバトロンボパグ 0、0.25、0.85 及び 2.5 mg/kg/day を 14 日間反復経口投与した（SK-971435）。アバトロンボパグの投与前及び Day 7、Day 14、Day 21 及び Day 28 に末梢血を採取し、血球数及び hCD41 陽性血小板を測定した。

アバトロンボパグはヒト血小板数を用量依存的に増加させ、Day 14 の 0.85 mg/kg/day で約 2.7 倍、2.5 mg/kg/day で約 3.0 倍に増加させた（図 2.6.2-21）。最小有効用量は 0.85 mg/kg/day であった。マウスにアバトロンボパグ 0.85 mg/kg/day を 14 日間反復経口投与後の血漿中非結合型アバトロンボパグ濃度は約 5 nmol/L と推定された（血漿中結合型 C_{max}：29.5 ng/mL、血漿蛋白結合率：89.0%～89.7%、D20[redacted]01145-01）。アバトロンボパグの投与を中止すると、ヒト血小板数はほぼ投与前のレベルに戻った。一方、アバトロンボパグはいずれの用量でもマウス血小板数を変化させなかった。

図 2.6.2-21　ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスでのアバトロンボパグのヒト血小板産生作用

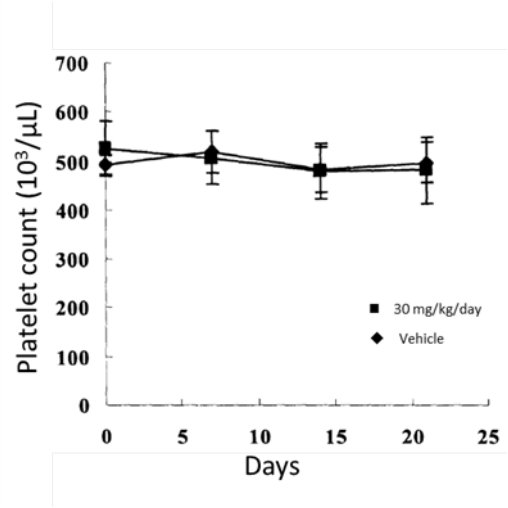


Avatrombopag (vehicle [◆], 0.25 [■], 0.85 [▲], and 2.5 [●] mg/kg/day) was administered orally for 14 days to human platelet-producing NOD/SCID mice.　The change in platelet number is expressed in terms of fold increase over pre-dosing levels.　Data are presented as mean ±SEM (n=10, n=9 for vehicle, 0.25, 2.5 mg/kg/day groups on Day 28).　*P<0.05, **P<0.01 versus vehicle group by Dunnett's test.
Source: SK-971435

カニクイザルにアバトロンボパグを経口投与したときの血小板産生作用を評価し、in vivo でもカニクイザルには作用しないか否かを検討した（SK-971433）。雄カニクイザル 6 例をランダムに割付けし、アバトロンボパグ 30 mg/kg/day 又は溶媒を 14 日間反復経口投与した。投与前及び Day 7、Day 14 及び Day 21 に採血し、自動血球計数装置を用いて血液学的パラメータを測定した。

カニクイザルにアバトロンボパグ 30 mg/kg/day を 14 日間反復経口投与したとき、末梢血中の血小板数は溶媒群と比較して増加しなかった（図 2.6.2-22）。Day 14 のカニクイザル血漿中アバトロンボパグ濃度は、13.8 µg/mL（21.2 µmol/L）であった。一方、アバトロンボパグのヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞に対する増殖促進作用及びヒト造血前駆細胞の巨核球への分化促進作用の EC_{50} は、それぞれ 3.3 nmol/L（2.6.2.2.1.1 項）及び 25.0 nmol/L（2.6.2.2.1.2.1 項）で、Day 14 のカニクイザル血漿中非結合型アバトロンボパグ濃度［636 nmol/L、サル血漿蛋白結合率：約 97%（ME03171）］は、ヒト EC_{50} を大幅に上回った。アバトロンボパグは in vivo でもカニクイザルに作用を示さず、カニクイザル血小板でアバトロンボパグが STAT5 のチロシンリン酸化を誘導しなかった in vitro での所見と一致した。

図 2.6.2-22　カニクイザルにアバトロンボパグを 14 日間反復経口投与したときの血小板数



Avatrombopag (30 mg/kg/day [■] or vehicle [◆]) was administered orally to cynomolgus monkeys for 14 days. Blood samples were withdrawn before and on Days 7, 14, and 21 after the start of dosing, and blood cell counts were measured.　Data are presented as mean ± SEM (n=3).
Source: SK-971433

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　アバトロンボパグの結合パネルアッセイ

添付資料番号：4.2.1.2-1（929084）

86 の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルからなるパネルを用いて、アバトロンボパグの結合活性を 1 及び 10 μmol/L で各 2 回測定した（表 2.6.2-3）。セクレチン作動性作用の機能アッセイを 1 及び 10 μmol/L で実施し、CCK_2 作動性／拮抗性作用の機能アッセイを 10 μmol/L までの 5 濃度で実施した。Na^+/K^+-ATPase の酵素アッセイを 1 及び 10 μmol/L で実施し、H^+/K^+-ATPase の酵素アッセイを 100 μmol/L までの 8 濃度で実施した。結合率は、各標的に特異的な放射標識リガンドの結合阻害率（%）として算出した。機能アッセイ及び酵素アッセイでは、アバトロンボパグの活性は、対照値に対する阻害率（%）として算出した。

アバトロンボパグ 1 μmol/L では顕著な作用（50%超の阻害又は活性化）は認められなかった。アバトロンボパグ 10 μmol/L では、アデノシン A3（A_3）受容体、1 型アンギオテンシン II（AT_1）受容体、CCK_2 受容体、ムスカリン 4（M_4）受容体、ニューロキニン 2（NK_2）受容体、ニューロキニン 3（NK_3）受容体、5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）5A（5-HT_{5a}）受容体及び N 型 Ca^{2+}チャネルに顕著な作用（50%以上の阻害）が認められた。アバトロンボパグは CCK_2 受容体拮抗作用を有し、IC_{50} は 7.0 μmol/L であった。アバトロンボパグは、10 μmol/L まで Na^+/K^+-ATPase への影響及びセクレチン作動性作用を示さず、100 μmol/L まで H^+/K^+-ATPase に影響を及ぼさなかった。

表 2.6.2-3　結合パネルアッセイ

Target	Origin	Target	Origin	Target	Origin
Adenosine, A_1	human recombinant	NMDA	rat cerebral cortex	Prostaglandin E2, EP_4	human recombinant
Adenosine, A_{2A}	human recombinant	PDGF	BALB/c 3T3 cells (mouse)		
Adenosine, A_3	human recombinant			Prostacyclin, IP (PGI_2)	human recombinant
α_1 Adrenergic (non-selective)	rat cerebral cortex	CXCR2 (IL-8B)	human recombinant		
		CCR1	human recombinant	Purinergic, P2X	rat urinary bladder
α_2 Adrenergic (non-selective)	rat cerebral cortex	TNF-α	U-937 cells (human)	Purinergic, P2Y	rat cerebral cortex
		Histamine, H_1	human recombinant	Serotonin, 5-HT_{1A}	human recombinant
β_1 Adrenergic	human recombinant	Histamine, H_2	human recombinant	Serotonin, 5-HT_{1B}	rat cerebral cortex
β_2 Adrenergic	human recombinant	Melanocortin, MC_4	human recombinant	Serotonin, 5-HT_{2A}	human recombinant
Angiotensin, AT_1	human recombinant	Melatonin, MT_1 (ML_{1A})	human recombinant	Serotonin, 5-HT_{2B}	human recombinant
Angiotensin, AT_2	human recombinant			Serotonin, 5-HT_{2C}	human recombinant
Benzodiazepine (central)	rat cerebral cortex	Muscarinic, M_1	human recombinant	Serotonin, 5-HT_3	human recombinant
		Muscarinic, M_2	human recombinant	**Serotonin, 5-HT_{5a}**	human recombinant
Benzodiazepine (peripheral)	rat heart	Muscarinic, M_3	human recombinant	Serotonin, 5-HT_6	human recombinant
		Muscarinic, M_4	human recombinant	Serotonin, 5-HT_7	human recombinant
Bombesin, BB (non-selective)	rat cerebral cortex	Muscarinic, M_5	human recombinant	Sigma (non-selective)	rat cerebral cortex
		Neurokinin, NK_1	U-373MG cells (human)		
Bradykinin, B_2	human recombinant			Somatostatin (sst) (non-selective)	AtT-20 cells (mouse)
Calcitonin gene related peptide, CGRP	human recombinant	**Neurokinin, NK_2**	human recombinant		
		Neurokinin, NK_3	human recombinant	Glucocorticoid, GR	IM-9 cells (human)
		Neuropeptide, Y_1	SK-N-MC cells (human)	Vasoactive intestinal peptide, VIP_1($VPAC_1$)	human recombinant
Cannabinoid, CB_1	human recombinant				
Cholecystokinin CCK_A (CCK_1)	human recombinant	Neuropeptide, Y_2	KAN-TS cells (human)	Vasopressin, V_{1a}	human recombinant
Cholecystokinin CCK_B (CCK_2)	human recombinant	Neurotensin, NT_1 (NTS_1)	human recombinant	L-Type Ca^{2+} channel (dihydropyridine)	rat cerebral cortex
Dopamine, D_1	human recombinant	N neuronal α4β2	SH-SY5Y cells (human)	L-Type Ca^{2+} channel (verapamil)	rat cerebral cortex
Dopamine, D_{2S}	human recombinant				

Target	Origin	Target	Origin	Target	Origin
Dopamine, D_3	human recombinant	N neuronal α7	SH-SY5Y cells (human)	**N-Type Ca^{2+} channel**	rat cerebral cortex
Dopamine, $D_{4.4}$	human recombinant				
Dopamine, D_5	human recombinant	δ_2 Opioid	human recombinant	K^+_V channel	rat cerebral cortex
Endothelin, ET_A	human recombinant	κ Opioid	rat recombinant	SK^+_{Ca} channel	rat cerebral cortex
Endothelin, ET_B	human recombinant	μ Opioid	human recombinant	Cl^- channel (GABA-gated)	rat cerebral cortex
GABA (non-selective)	rat cerebral cortex	Nociceptin, NOP (ORL1)	human recombinant	Norepinephrine Transporter	human recombinant
Galanin, GAL_1	human recombinant	PAC_1 (PACAP)	human recombinant		
Galanin, GAL_2	human recombinant	PPARγ	human recombinant	Dopamine Transporter	human recombinant
AMPA	rat cerebral cortex	Phencyclidine, PCP	rat cerebral cortex		
Kainate	rat cerebral cortex	Prostaglandin E2,EP_2	human recombinant	5-HT Transporter	human recombinant

The bold targets showed the effects at 10 μg/mL.
Source: 929084

2.6.2.3.2　血小板凝集及び血小板活性化

2.6.2.3.2.1　血小板凝集

添付資料番号：4.2.1.2-2（SK-971615）

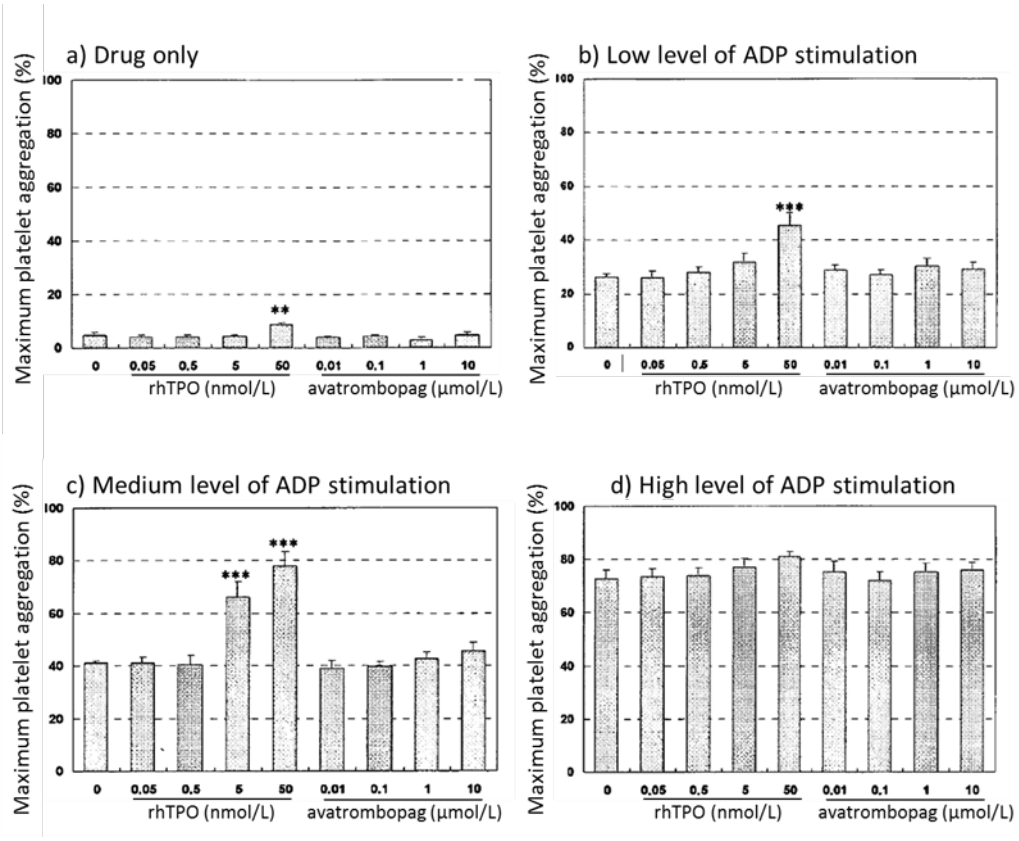
アバトロンボパグのヒト血小板凝集作用を検討した。

健康被験者からヒト PRP を調製した。アバトロンボパグ及び rhTPO の血小板凝集亢進作用を検討するために、PRP にアバトロンボパグ（0.01、0.1、1、10 μmol/L）、rhTPO（0.05、0.5、5、50 nmol/L）又は溶媒［0.35%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）］を添加し、その 5 分後に既知の血小板凝集誘導物質である ADP を添加し、室温でインキュベートした。アバトロンボパグ及び rhTPO の単独での血小板凝集誘導作用を検討するために、ADP を添加しないサンプルも調製した。血小板凝集を血小板凝集計で測定し、37°C に維持された撹拌懸濁液の光線透過率の上昇を記録した。

アバトロンボパグは、ADP の添加の有無にかかわらず、血小板凝集を誘導及び促進しなかった（図 2.6.2-23）。一方、rhTPO（50 nmol/L）は ADP の非存在下で顕著な血小板凝集を誘導し（図 2.6.2-23a）、rhTPO（5 及び 50 nmol/L）は ADP 誘導性血小板凝集を促進した（図 2.6.2-23b、図 2.6.2-23c）。

アバトロンボパグは、rhTPO の血小板凝集に対する最小有効濃度（5 nmol/L）の 2000 倍の 10 μmol/L でも血小板凝集を誘導及び促進しなかったことから、血小板凝集誘導作用及び血小板凝集促進作用を有しないことが示された。

図 2.6.2-23　In vitro でのアバトロンボパグ又は rhTPO のヒト血小板凝集作用



Platelet aggregation was induced to the following levels using ADP: (a) None: ADP (0 µmol/L), (b) Low level: ADP (1 µmol/L), (c) Medium level: ADP (2 µmol/L), (d) High level: ADP (10 µmol/L).　The data represent the mean ± SEM (n=4).　** P<0.01, *** P<0.001 (versus vehicle-treated group by the Dunnett's test).　ADP = adenosine diphosphate, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
Source: SK-971615

2.6.2.3.2.2　血小板活性化

添付資料番号：4.2.1.2-3（SK-971614）、4.2.1.2-4（SK-971507）

CD62P は、血小板が活性化すると速やかに細胞膜に移動し、血小板活性化マーカーとして使用される。In vitro（SK-971614）及び in vivo（SK-971507）で、ヒト血小板上の血小板活性化マーカーCD62P の発現に対するアバトロンボパグの作用を検討して、アバトロンボパグのヒト血小板活性化作用を評価した。

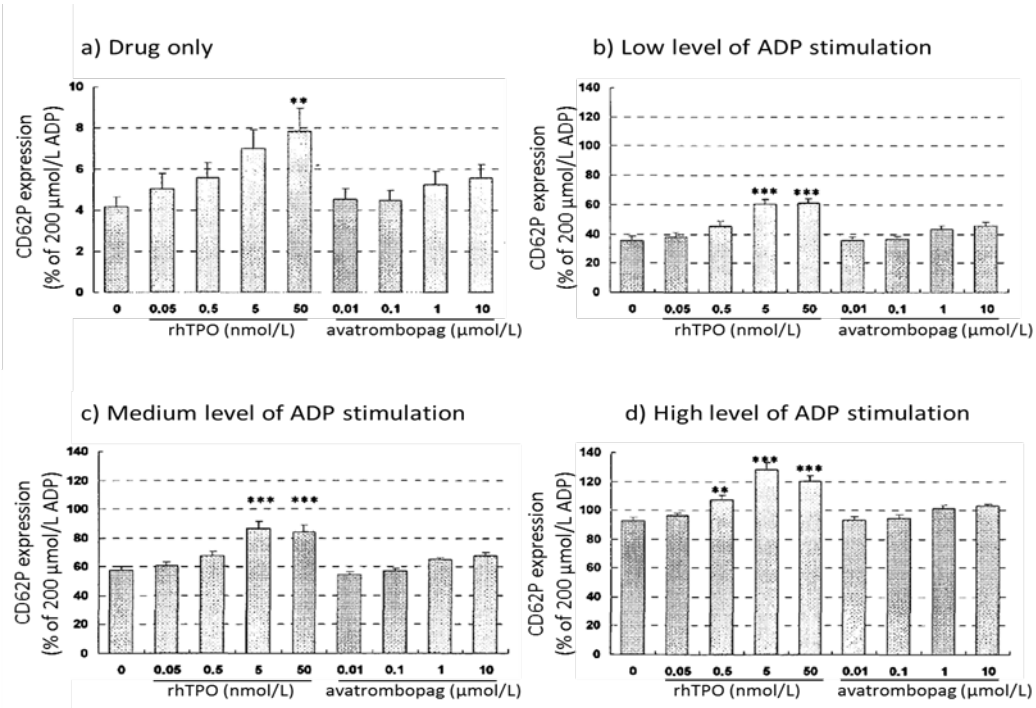
PRP とアバトロンボパグ（0.01、0.1、1、10 µmol/L）、rhTPO（0.05、0.5、5、50 nmol/L）又は溶媒（0.35%ウシ血清アルブミン含有 PBS）を混合した（SK-971614）。10 分後に ADP 又は生理食塩液を添加し、室温で 10 分間インキュベートした。血小板の活性化は、フローサイトメトリー法を用いて、ADP により刺激された血小板上の CD62P の発現として測定した。血小板はフルオレセイン結合型抗 CD42a 抗体により染色された画分として同定され、CD42a 画分の R-フィコエリトリン結合型抗ヒト CD62P 抗体の蛍光強度の中央値を求めた。各検体の

CD62P 発現を、ADP 200 µmol/L により刺激された血小板上の CD62P の蛍光強度の中央値と、アイソタイプコントロール抗体（PE 結合型マウス IgG1、κ）により染色された非刺激血小板上の CD62P の蛍光強度の中央値（この値を 100%とする）との差として算出した。

アバトロンボパグは、ADP の添加の有無にかかわらず、ヒト血小板上の CD62P の発現を顕著に促進せず、アバトロンボパグは血小板を活性化しないことが裏付けられた（図 2.6.2-24）。一方、rhTPO は、ADP の添加の有無にかかわらず、ヒト血小板上の CD62P の発現を顕著に誘導した。rhTPO は、ADP 存在下では 5 nmol/L 以上で有意（P<0.001）に、高濃度の ADP 刺激下では 0.5 nmol/L で有意（P<0.01）に、ADP 非存在下でも 50 nmol/L で有意（P<0.01）に CD62P の発現を誘導した（図 2.6.2-24）。したがって、アバトロンボパグは、rhTPO の最小有効濃度（0.5 nmol/L）の 20,000 倍の濃度である 10 µmol/L まで顕著な作用を示さなかった。

これらの結果から、アバトロンボパグは顕著な血小板活性化作用を有さないことが示された。

図 2.6.2-24　In vitro でのアバトロンボパグ又は rhTPO のヒト血小板活性化作用



Platelet aggregation was induced to the following levels using ADP.　(a) None: ADP (0 µmol/L) (b) Low level: ADP (1 – 2 µmol/L).　(c) Medium level: ADP (2 – 5 µmol/L).　(d) High level: ADP (10 – 50 µmol/L).　The data represent the mean ± SEM (n=5).　ADP = adenosine diphosphate, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.
** *P*<0.01, *** *P*<0.001 (versus vehicle-treated group by the Dunnett's test).
Source: SK-971614

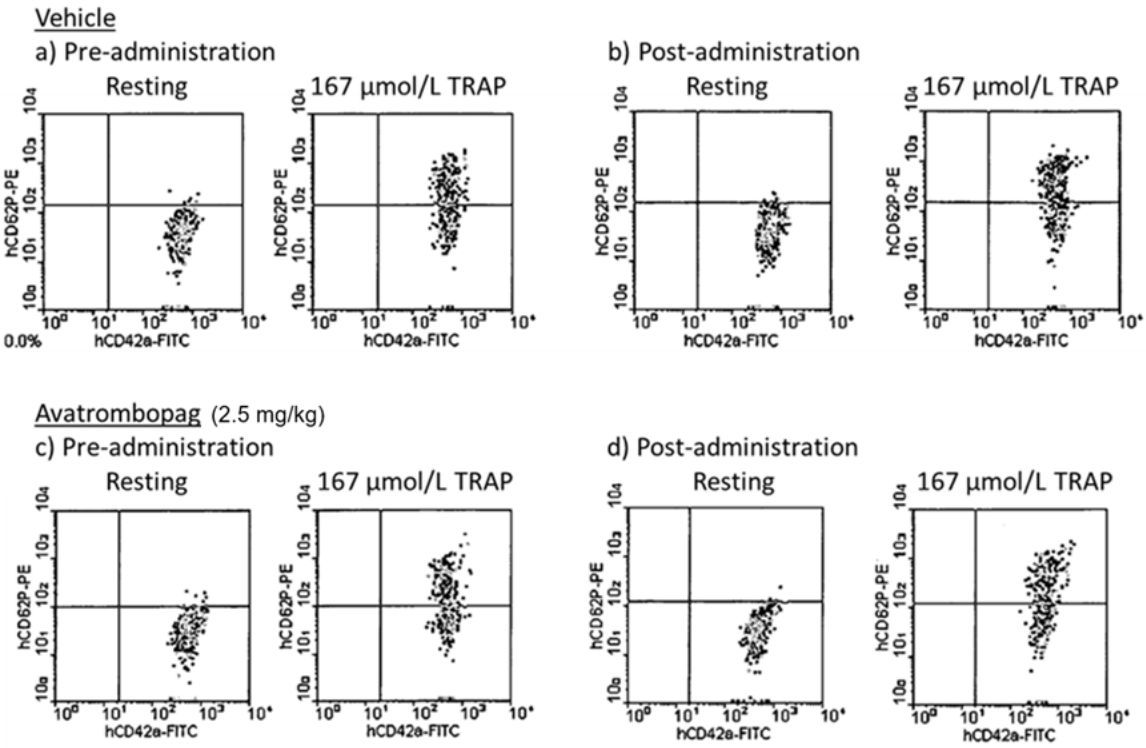
In vivo でのアバトロンボパグの血小板活性化作用について、ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスを用いて検討した（SK-971507）。移植マウスにアバトロンボパグ（0 又は 2.5 mg/kg/day）を 14 日間反復経口投与した。Day 15 に末梢血

を採取し、トロンビン受容体アゴニストペプチド（TRAP）を添加して血小板を活性化した。血小板活性化後に、血球数、ヒト血小板数及び CD62P 発現を測定した。ヒト血小板数及び CD62P 発現の経時変化を測定し、被験物質の投与前の値に対する投与後の増加の割合として示した。

移植マウスにより産生されたヒト血小板上に、TRAP 誘導性の CD62P 発現が認められた。アバトロンボパグの投与前後で、TRAP 167 µmol/L（血小板活性化の誘導に必要とされる量を上回る量）により誘導されるヒト血小板上の CD62P 発現の最大応答を評価した。静止血小板及び活性化血小板でのフローサイトメトリー法による代表的な結果を図 2.6.2-25 に示す。ヒト血小板は、抗ヒト CD42a 抗体により染色された画分として同定した。

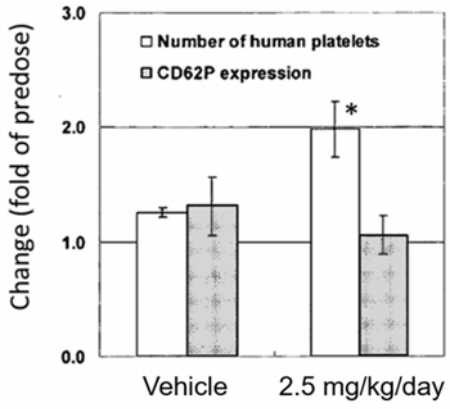
溶媒群及びアバトロンボパグ 2.5 mg/kg/day 群での投与前後で、TRAP 刺激により $CD42a^{+}$画分の CD62P の蛍光強度が増加し、その程度はいずれも同様であった。移植マウスにアバトロンボパグを反復経口投与したとき、ヒト血小板数が増加し、Day 15 の血小板数は溶媒群と比較して約 2.0 倍（$P<0.05$）であった（図 2.6.2-26）。一方、ヒト血小板での TRAP 誘導性 CD62P 発現はアバトロンボパグの投与により変化せず、溶媒群と同様であった（図 2.6.2-26）。上述の結果から、移植マウスでアバトロンボパグはヒト血小板の増殖を促進したが、14 日間アバトロンボパグを曝露してもヒト血小板の機能に影響を及ぼさなかった。

図 2.6.2-25　アバトロンボパグの TRAP 誘導性血小板活性化作用



Platelet activation was determined by CD62P expression in platelets from NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells. Human platelets were identified as the fractions stained by anti-CD42a. The median fluorescence intensity of CD62P on $CD42a^+$ fractions was analyzed by flow cytometry. Typical results of pre-administration (a) and post-administration (b) in the vehicle group, and pre-administration (c) and post-administration (d) of avatrombopag in the 2.5 mg/kg/day group are shown.
Source: SK-971507

図 2.6.2-26　ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスにアバトロンボパグを反復経口投与したときのヒト血小板産生及び CD62P 発現作用



Avatrombopag was administered orally for 14 days to human platelet-producing NOD/SCID mice. Peripheral blood was collected on Day –2 and Day 15 and the number of human platelets and levels of CD62P expression were measured. The data are presented as fold increase over pre-dosing levels (mean ±SEM [n=4]). *P<0.05 versus vehicle control group by t test.
Source: SK-971507

2.6.2.4　安全性薬理試験

In vitro 及び in vivo で心血管系、呼吸系、中枢神経系及び腎機能に対するアバトロンボパグの影響の有無を検討した。腎機能に関する安全性薬理試験を除く安全性薬理試験は GLP に従って実施した。

表 2.6.2-4　安全性薬理試験の一覧

Type of Study and Test System	Species	GLP	Location	Study Number
hERG potassium currents	in vitro	Yes	4.2.1.3-1	SP-0358
Action potentials in isolated guinea pig papillary muscles	in vitro	Yes	4.2.1.3-2	SP-0372
Cardiovascular and respiratory function	Dog	Yes	4.2.1.3-3	SP-0351
Central nervous system	Rat	Yes	4.2.1.3-4	SP-0350
Renal function	Dog	No	4.2.1.3-5	[redacted]03-4108

GLP = Good Laboratory Practice, hERG = human ether-à-go-go related gene.

2.6.2.4.1　In vitro 安全性薬理試験

2.6.2.4.1.1　hERG カリウム電流に対する作用

添付資料番号: 4.2.1.3-1（SP-0358）

hERG 遺伝子導入 HEK293 細胞を用いて、アバトロンボパグの hERG 電流に対する作用をホールセルパッチクランプ法で検討した（SP-0358）。hERG 遺伝子導入 HEK293 細胞（1 群当たり 5 cells）に対してアバトロンボパグを 0.1、1 及び 3 µmol/L で灌流処置し、15 分間曝露した。15 分間処置後の名目上の濃度である 1 及び 3 µmol/L の実際の濃度はそれぞれ 0.65 及び 2.54 µmol/L であり、これは、被験物質の装置への吸着によるものであった。アバトロンボパグは、hERG 電流を抑制し、IC_{50} は 1.4 µmol/L であることが示された。

2.6.2.4.1.2　単離モルモット乳頭筋を用いた活動電位アッセイ

添付資料番号: 4.2.1.3-2（SP-0372）

単離モルモット乳頭筋を用いて、アバトロンボパグの活動電位に対する作用をガラス微小電極法で検討した。単離モルモット乳頭筋（1 群当たり 6 個）に対してアバトロンボパグを 0.1、1 及び 3 µmol/L で灌流処置し、45 分間曝露した。灌流後の 1 及び 3 µmol/L 群の実際の濃度はそれぞれ 0.51 及び 1.37 µmol/L であり、これは、被験物質の装置への吸着によるものであった。静止膜電位、活動電位振幅、最大立ち上がり速度（dV/dt_{max}）及び活動電位持続時間［30%、60%及び 90%再分極での活動電位持続時間（それぞれ APD_{30}、APD_{60} 及び APD_{90}）］に対する作用の有無について検討した。アバトロンボパグは最高濃度（1.37 µmol/L）までいずれのパラメータにも影響を与えなかった。

2.6.2.4.2　In vivo 安全性薬理試験

2.6.2.4.2.1　イヌを用いた心血管系及び呼吸機能に関する安全性薬理試験

添付資料番号: 4.2.1.3-3（SP-0351）

テレメトリーシステムを装着した覚醒ビーグル犬（雄 4 例）に対して、アバトロンボパグ（0、3、30 及び 300 mg/kg）を単回強制経口投与し、心血管系及び呼吸機能に対する影響の有無について評価した。対照群に対しては同容量の溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）を投与した。心血管系パラメータ（血圧、心拍数及び心電図）及び呼吸系パラメータ（呼吸数及び血液ガス）に対する影響の有無、一般状態、体重、摂餌量、体温及びトキシコキネティクスを評価した。

イヌに対して 300 mg/kg までの用量で投与した結果、アバトロンボパグは心血管系機能及び呼吸機能に対して影響を示さなかった。30 mg/kg 以上の用量では最高濃度到達時間（t_{max}）付近の時点に嘔吐が認められた。

投与後 48 時間までのトキシコキネティクス評価では、t_{max} は 1～4 時間であった。曝露量は、3 及び 30 mg/kg の間では用量依存的に増加したが、30 及び 300 mg/kg の間では用量比を下回って増加した（表 2.6.2-5）。

表 2.6.2-5　トキシコキネティクスの要約

Dose (mg/kg)	Male	
	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0-24)}$ (ng·h/mL)
3	588 ± 180	3372 ± 1158
30	5842 ± 2583	36,633 ± 17,380
300	9227 ± 3798	103,073 ± 67,942

Data represent the mean ±SD (n=4).
$AUC_{(0-24)}$ = area under the concentration-time curve from zero time to 24 hours, C_{max} = maximum observed concentration.
Source: SP-0351

2.6.2.4.2.2　ラットを用いた中枢神経系機能に関する安全性薬理試験

添付資料番号: 4.2.1.3-4（SP-0350）

雄の F344 ラット（1 群当たり 6 例）に対して、アバトロンボパグ（0、1、10 及び 100 mg/kg）を単回強制経口投与し、中枢神経系機能に対する影響の有無について Irwin 法で評価した。対照群に対しては同容量の溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）を投与した。投与後 48 時間まで動物を観察した。アバトロンボパグは 100 mg/kg までの用量でいずれの中枢神経系パラメータに影響を示さなかった。

2.6.2.4.2.3　イヌを用いた腎機能に関する安全性薬理試験

添付資料番号: 4.2.1.3-5（[redacted]03-4108）

雄のビーグル犬（1 群当たり 4 例）に対して、アバトロンボパグ（0、3、30 及び 300 mg/kg）を単回強制経口投与し、7 日後に剖検した。対照群に対しては同容量の対照物質／溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）を投与した。一般状態、体重、摂餌量及び腎機能（糸球体濾過量、有効腎血漿流量及びクレアチニンクリアランス）の評価、血液生化学的検査、トキシコキネティクス解析、尿検査及び腎臓の病理学組織学的検査を行った。

いずれの投与群にもアバトロンボパグ投与に関連すると考えられる死亡例は認められなかった。アバトロンボパグ投与による影響は、最高用量群（300 mg/kg）にのみ認められ、糞便の色調又は量の変化、血中尿素窒素（BUN）、クレアチニンの上昇、血清中無機リン酸の低下、尿中タンパク、尿糖、尿中ケトン体及び尿潜血、尿量の増加、尿浸透圧の低下、糸球体濾過量の減少並びに有効腎血漿流量の減少が認められた。アバトロンボパグの投与の 7 日後までに、これらのパラメータは投与前値に回復した。また、病理組織学的変化として尿細管に可逆的な尿円柱及び皮質の単核細胞浸潤を伴う再生及び拡張が認められた。

30 mg/kg までの用量ではアバトロンボパグ投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

アバトロンボパグの濃度が検出限界以下となる投与 72 時間後までの全身曝露量を求めた。t_{max} は 2～3 時間であり、曝露量は 30 mg/kg と 300 mg/kg で同程度であった（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6　トキシコキネティクスの要約

Dose (mg/kg)	Male	
	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0-24)}$ (ng·h/mL)
3	1282 ± 303	8556 ± 3115
30	5445 ± 1715	43736 ± 10791
300	5622 ± 571	51137 ± 19499

Data represent the mean ±SD (n=4).
$AUC_{(0-24)}$ = area under the concentration-time curve from zero time to 24 hours, C_{max} = maximum observed concentration.
Source: [redacted] 03-4108

要約すると、イヌではアバトロンボパグは 300 mg/kg で腎機能に可逆的な影響が認められ、血清中の BUN、クレアチニンの上昇、尿の変化、糸球体濾過量及び有効腎血漿流量の減少がみられ、さらに、近位尿細管に可逆的な病理組織学的変化を伴っていた。30 mg/kg までの用量ではアバトロンボパグによる変化は認められなかった。したがって、無毒性量（NOAEL）は 30 mg/kg であった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

アバトロンボパグでは、薬理学的標的で互いに競合する薬物あるいは類似又は拮抗する薬理作用を有する薬物との併用を計画していないため、薬力学的薬物相互作用試験を実施していない。

2.6.2.6　考察及び結論

アバトロンボパグは、in vitro 及び in vivo で TPO と同様な生物学的効果を発揮する、経口投与が可能な低分子トロンボポエチン受容体作動薬（Fukushima-Shintani, 2009）として開発された。TPO は糖タンパクホルモンで、通常、巨核球の産生及び分化を促進し、血小板産生をもたらす。アバトロンボパグは、ヒト c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞の増殖（EC_{50} = 3.3 ± 0.2 nmol/L）及びヒト臍帯血 CD34 陽性細胞のヒト巨核球への分化（EC_{50} = 25.0 ± 7.8 nmol/L）を促進し、最大作用は rhTPO と同程度であった。しかし、アバトロンボパグはヒト臍帯血 CD34 陽性造血前駆細胞の巨核球以外の系列への分化を促進しなかった。

アバトロンボパグは、血小板の産生に重要なヒト造血前駆細胞（G-CSF 動員ヒト末梢血 CD34 陽性細胞）の倍数体巨核球への分化を促進した。さらに、rhTPO 単独添加時と比べてアバトロンボパグと rhTPO 共添加時に巨核球数が増加したことから、c-Mpl 上のアバトロンボパグの結合部位が rhTPO の結合部位と異なることが示唆された。

ヒトの造血幹細胞（胎児肝臓由来 CD34 陽性細胞）を移植した NOD/SCID マウスで、アバトロンボパグの in vivo 血小板産生作用を検討した。移植マウスにアバトロンボパグを反復経口投与したとき、移植マウス末梢血中のヒト血小板数が用量依存的に増加した。移植マウスでの血小板産生に対する最小有効用量は 0.85 mg/kg であった。

rhTPO は血小板の凝集及び活性化を顕著に促進したが、アバトロンボパグは血小板の凝集及び活性化により評価した血小板の機能に対して悪影響を及ぼさなかった。これらの結果から、肝疾患に伴う血小板減少症等の疾患で、アバトロンボパグは血小板の活性化及び凝集を促進することなく、血小板数を増加させることができると示唆される。

薬理試験結果から、ヒト c-Mpl 上のアバトロンボパグの結合部位が rhTPO の結合部位と異なることが示唆された。TPO は c-Mpl の CRH1 に結合し（Sabath, 1999）、rhTPO は評価された全ての動物種の血小板で STAT5 のチロシンリン酸化を誘導するため、アバトロンボパグは TPO に対する上乗せ効果を示す可能性がある。一方、アバトロンボパグは種特異性があり、評価した動物種の中ではヒト及びチンパンジーでのみ作用を示した。また、rhTPO と異なり、アバトロンボパグは Ba/F3-マウス c-Mpl 細胞の増殖を促進しなかった。アバトロンボパグの薬理作用に重要な役割を果たしているのは CRH2、膜貫通ドメイン及び ICD を含むヒト c-Mpl 領域であった。アバトロンボパグは、キメラ（マウス Met^{1}-Ser^{496}／ヒト Ala^{506}-Pro^{635} 又はヒト Met^{1}-Trp^{491}／マウス Ile^{483}-Pro^{625}）c-Mpl 発現 Ba/F3 細胞の増殖を促進しなかった。さらに詳細なヒト c-Mpl の試験から、アバトロンボパグの種特異的な薬理作用は、ヒト c-Mpl の膜貫通ドメインの 499 番目のヒスチジンアミノ酸残基（His^{499}）に依存していた（Zhang, 2008）。His^{499} はヒトとチンパンジーの間で保存されているが、他の動物種にはみられない。His^{499} はアバトロンボパグ誘導体 AS1670542 及びいくつかの低分子非ペプチジル c-Mpl 活性化剤の薬理作用に必須であることも報告されており、これらの薬物の種特異性に関与するのは c-Mpl の膜貫通領域の 499 番目のアミノ酸（ヒト及びチンパンジーでは His、それ以外の全ての動物種では Leu 又は Phe）である（Abe, 2011; Kuter, 2009; Nakamura, 2006; Nogami, 2008）。

アバトロンボパグは、ヒト c-Mpl に結合すると、STAT3、STAT5 及び ERK のチロシン又はスレオニンのリン酸化を誘導してシグナル伝達に影響を及ぼすことが示された。アバトロンボパグは、ヒト c-Mpl の作用部位で、2 つの異なるシグナル伝達経路である JAK-STAT 及び SHC-Ras-Raf-ERK を活性化した。

副次的薬理試験では、86 の選択された受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対して、アバトロンボパグは臨床的に意義のある濃度で顕著な結合を示さず、オフターゲット作用の可能性は低いと示唆された。

安全性薬理試験では、in vitro 及び in vivo で心血管系、呼吸系、中枢神経系及び腎機能に対するアバトロンボパグの作用について検討した。アバトロンボパグは、hERG 電流を抑制し、IC_{50} は 1.4 μmol/L（910 ng/mL）であったが、in vitro で単離モルモット乳頭筋を用いた活動電位測定試験では 1.37 μmol/L（890 ng/mL）までの濃度で検討され、また in vivo でイヌを用いた心血管系機能に関する安全性薬理試験では 300 mg/kg（C_{max}：9227 ng/mL、非結合型 C_{max}：203 ng/mL、

$AUC_{(0-24)}$：103073 ng·h/mL、非結合型 $AUC_{(0-24)}$：2268 ng·h/mL）の用量まで投与したが、心血管機能に対して顕著な作用を示さなかった。また、覚醒下のイヌに対して 300 mg/kg（C_{max}：9227 ng/mL、非結合型 C_{max}：203 ng/mL、$AUC_{(0-24)}$：103073 ng·h/mL、非結合型 $AUC_{(0-24)}$：2268 ng·h/mL）までの用量で呼吸機能に対する作用は認められなかった。ラットを用いた中枢神経系機能に関する試験の C_{max} 及び AUC のデータはないため、ラット 4 週間反復経口投与毒性試験（4.2.3.2-5）での Day 1 の雄ラットのデータを用いた。ラットに対して 100 mg/kg（C_{max}：9288 ng/mL、非結合型 C_{max}：1003 ng/mL、$AUC_{(0-24)}$：97806 ng· h/mL、非結合型 $AUC_{(0-24)}$：10563 ng·h/mL）までの用量で中枢神経系に対する作用は認められなかった。イヌでは 30 mg/kg（C_{max}：5445 ng/mL、非結合型 C_{max}：120 ng/mL、$AUC_{(0-24)}$：43736 ng·h/mL、非結合型 $AUC_{(0-24)}$：962 ng·h/mL）までの用量で腎機能に対する作用は認められなかった。アバトロンボパグを 300 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、イヌの腎機能低下を引き起こしたが、この作用は比較的軽度で、イヌに特異的であり、可逆的であった（2.6.6.9 項）。イヌではマレイン酸に対する感受性が高く、同様の病変（近位尿細管の壊死）を引き起こすことが知られているため（Everett, 1993; Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2007; Guha, 2017）、アバトロンボパグの塩であるマレイン酸が上記の腎臓における変化に関与した可能性が考えられる。慢性肝疾患患者を対象とした第 3 相試験である E5501-G000-310 試験及び E5501-G000-311 試験での、60 mg コホートのヒト平均 C_{max} は 352 ng/mL（非結合型：12 ng/mL）で（2.7.2.3.4.2 項）、イヌを用いた心血管系及び呼吸系を評価した試験での C_{max} の安全域は 26 倍（非結合型：16 倍）を上回った。同様に、イヌを用いた腎機能に関する安全性薬理試験での C_{max} の安全域は 16 倍（非結合型：10 倍）であった。これらの結果から、ヒトでアバトロンボパグが心血管系、呼吸系、中枢神経系又は腎臓に対して有害作用を示すリスクは低いと考えられる。

要約すると、アバトロンボパグは、TPO と同様な生物学的効果を発揮するヒト c-Mpl 作動薬である。アバトロンボパグのヒト c-Mpl 上の結合部位は TPO と異なるが、STAT3、STAT5 及び ERK を介して下流シグナル伝達を誘導することにより、ヒト巨核球の増殖及び分化を促進し、血小板数を増加させる。

2.6.2.7　参考文献

Abe M, Suzuki K, Sakata C, Sugasawa K, Hirayama F, Koga Y, et al. Pharmacological profile of AS1670542, a novel orally-active human thrombopoietin receptor agonist. Eur J Pharmacol. 2011;650(1):58–63.

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final report on the safety assessment of maleic acid. Int J Toxicol. 2007;26 (Suppl 2):125–30.

Everett RM, Descotes G, Rollin M, Greener Y, Bradford JC, Benziger DP, et al.　Nephrotoxicity of pravadoline maleate (WIN 48098-6) in dogs: evidence of maleic acid-induced acute tubular necrosis. Fundam Appl Toxicol. 1993;21(1);59–65.

Fukushima-Shintani M, Suzuki K, Iwatsuki Y, Abe M, Sugasawa K, Hirayama F, et al. AKR-501 (YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist. Eur J Haematol. 2009;82(4):247–54.

Gewirtz AM. Megakaryocytopoiesis: the state of the art. Thromb Haemost. 1995;74(1):204–9.

Guha M, Nguyen L, Poitout-Belissent F, Bedard A, Raman K. Salt Selection Matters: Differential Renal Toxicity With MDV1634.Maleate Versus MDV1634.2HCl. Int J Toxicol. 2017;36(3):207-219.

Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. Clin Lymphoma Myeloma. 2009;9 Suppl 3:S347–56.

Nakamura T, Miyakawa Y, Miyamura A, Yamane A, Suzuki H, Ito M, et al. A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Blood. 2006;107(11):4300–7.

Nogami W, Yoshida H, Koizumi K, Yamada H, Abe K, Arimura A, et al. The effect of a novel, small non-peptidyl molecule butyzamide on human thrombopoietin receptor and megakaryopoiesis. Haematologica. 2008;93(10):1495–504.

Perez LE, Rinder HM, Wang C, Tracey JB, Maun N, Krause DS. Xenotransplantation of immunodeficient mice with mobilized human blood $CD34^{+}$ cells provides an in vivo model for human megakaryocytopoiesis and platelet production. Blood. 2001;97(6):1635–43.

Sabath DF, Kaushansky K, Broudy VC. Deletion of the extracellular membrane-distal cytokine receptor homology module of Mpl results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. Blood. 1999;94(1):365–7.

Zhang J, Alt J, Yang M, Baranwal A, Luby TM. AKR-501 activates the thrombopoietin receptor through interaction with the transmembrane domain. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008;112:Abstract 5391.

ドプテレット®錠 20mg

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

目次

2.6.3　薬理試験概要表 3
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 7
2.6.3.3　副次的薬理試験 14
2.6.3.4　安全性薬理試験 17
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 18

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

Test Article: Avatrombopag maleate

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics						
In Vitro Pharmacodynamics						
Proliferative effect on Ba/F3-human or murine c-Mpl cells (1)	No	Ba/F3 cells, Ba/F3-human or murine c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (murine Met^{1}-Ser^{496}/human Ala^{506}-Pro^{635}) cells	in vitro	[redacted]	SK-971417	4.2.1.1-1
Proliferative effect on Ba/F3-human or murine c-Mpl cells (2)	No	Ba/F3-human c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells	in vitro	[redacted]	CRE140019[b]	4.2.1.1-2
Effect on megakaryocyte colony formation from human hematopoietic progenitor cells	No	Human CB $CD34^{+}$ cells	in vitro	[redacted]	SK-971454	4.2.1.1-3
Effect on human hematopoietic colony formation other than megakaryocytic lineage	No	Human CB $CD34^{+}$ cells	in vitro	[redacted]	SK-971453	4.2.1.1-4
Effect on megakaryocyte maturation and ploidy level	No	Human PB $CD34^{+}$ cells	in vitro	[redacted]	SK-971628	4.2.1.1-5
Effect on induction of tyrosine phosphorylation of STAT3 and STAT5 in human blood platelets	No	Human blood platelets	in vitro	[redacted]	SK-971447	4.2.1.1-6
Effect on induction of tyrosine or threonine phosphorylation of STAT3, STAT5, and ERK in Ba/F3-human c-Mpl cells	No	Ba/F3-human c-Mpl cells	in vitro	[redacted]	SK-971493	4.2.1.1-7

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Effect on induction of tyrosine phosphorylation of STAT5 in rat, guinea pig, rabbit, and beagle dog blood platelets	No	Rat, guinea pig, rabbit, and dog blood platelets	in vitro	[redacted]	SK-010015[c]	4.2.1.1-8
Effect on induction of tyrosine phosphorylation of STAT5 in common marmoset and squirrel, rhesus, and cynomolgus monkey blood platelets	No	Common marmoset and squirrel, rhesus, and cynomolgus monkey blood platelets	in vitro	[redacted]	SK-010014[c]	4.2.1.1-9
Effect on induction of tyrosine phosphorylation of STAT5 in hamster and porcine blood platelets	No	Hamster and porcine blood platelets	in vitro	[redacted]	SK-971484	4.2.1.1-10
Effect on induction of tyrosine phosphorylation of STAT5 in olive baboon blood platelets	No	Olive baboon blood platelets	in vitro	[redacted]	SK-971444	4.2.1.1-11
Effect on induction of tyrosine phosphorylation of STAT5 in chimpanzee blood platelets	No	Chimpanzee blood platelets	in vitro	[redacted]	SK-971462	4.2.1.1-12
Effect on rhTPO binding to human c-Mpl on human platelets	No	Human PRP	in vitro	[redacted]	SK-971455	4.2.1.1-13
Requirement of CRH2 in human c-Mpl for activity	No	Ba/F3-human c-Mpl cells, Ba/F3-cynomolgus monkey c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (cynomolgus monkey CRH1/human CRH2-ICD) cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (human CRH1/cynomolgus monkey CRH2-ICD) cells	in vitro	[redacted]	SK-971718	4.2.1.1-14
Additive effects of the combination of avatrombopag and rhTPO on megakaryocytopoiesis	No	$CD34^+CD41^-$ cells (hematopoietic progenitor cells), $CD34^+CD41^+$ cells (megakaryocytic progenitor cells), and $CD34^-CD41^+$ cells (megakaryocytes)	in vitro	Astellas Pharma Inc.	Fukushima-Shintani, 2008[b]	4.2.1.1-17

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
In Vivo Pharmacodynamics						
Effect on human platelet production after oral administration to NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	No	NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	PO	[redacted]	SK-971435	4.2.1.1-15
Effect on platelet production after repeated oral administration to cynomolgus monkeys	No	Cynomolgus monkey	PO	[redacted]	SK-971433	4.2.1.1-16
Secondary Pharmacodynamics						
Binding panel assay	No	Binding assays for 86 receptors, transporters, and ion channels. Cellular functional assays for CCK_2 (agonist and antagonist effect) and secretin (agonist effect) receptor. Enzyme assays for H^+/K^+-ATPase and Na^+/K^+-ATPase.	in vitro	[redacted]	929084	4.2.1.2-1
Effect on in vitro human platelet aggregation	No	Human PRP	in vitro	[redacted]	SK-971615	4.2.1.2-2
Effect on in vitro human platelet activation	No	Human PRP	in vitro	[redacted]	SK-971614	4.2.1.2-3
Effect on human platelet function after oral administration to NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	No	NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	PO	[redacted]	SK-971507	4.2.1.2-4
Safety Pharmacology						
Effects on hERG potassium currents	Yes	HEK293 cells transfected with hERG	in vitro	[redacted]	SP-0358	4.2.1.3-1

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Effects on action potentials in isolated guinea pig papillary muscles	Yes	Guinea pig papillary muscle	in vitro	[redacted]	SP-0372	4.2.1.3-2
Effects on cardiovascular and respiratory function	Yes	Beagle dog	PO	[redacted]	SP-0351	4.2.1.3-3
Effects on the central nervous system	Yes	F344 rat	PO	[redacted]	SP-0350	4.2.1.3-4
Effects on renal function	No	Beagle dog	PO	[redacted]	[redacted]03-4108	4.2.1.3-5
Pharmacodynamic Drug Interactions						
Pharmacodynamic drug interaction studies were not conducted.						

ATPase = adenosine triphosphatase, Ba/F3-c-Mpl cell = Ba/F3 murine pro-B cell expressing c-Mpl, CB = cord blood, c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, CRH = cytokine receptor homology, CRH1 = membrane-distal CRH domain, CRH2 = membrane-proximal CRH domain, GLP = Good Laboratory Practice, hERG = human ether-à-go-go-related gene, ICD = intracellular domain, PB = peripheral blood, PRP = platelet-rich plasma, PO =oral, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

a: An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

b: Avatrombopag free base

c: Avatrombopag hydrochloride

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Proliferative effect on Ba/F3-human or murine c-Mpl cells (1)	Cell proliferation was measured by cell viability and proliferation reagent, WST-1/1-methoxy PMS.	Ba/F3-human c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells	n=5	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.038 – 250 nmol/L rhTPO: 0.76 – 5000 pmol/L	Avatrombopag induced proliferation of Ba/F3-human c-Mpl cells with an EC_{50} of 3.3 nmol/L, but not in murine c-Mpl, chimeric c-Mpl (murine Met^{1}-Ser^{496}/human Ala^{506}-Pro^{635}), or parental Ba/F3 cells. Avatrombopag also supported the proliferation of Ba/F3-chimeric c-Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells in this study. It was confirmed in the study CRE140019 that the Ba/F3-chimeric c Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells used in the study SK-971417 were demonstrated to express human c-Mpl in addition to human ECD/murine ICD chimeric c-Mpl, suggesting those cells were not appropriate for the study.	4.2.1.1-1 SK-971417
		Ba/F3-murine c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (murine Met^{1}-Ser^{496}/human Ala^{506}-Pro^{635}) cells			Avatrombopag maleate: 0.38 – 2500 nmol/L rhTPO: 0.76 – 5000 pmol/L		

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Proliferative effect on Ba/F3-human or murine c-Mpl cells (2)	Cell proliferation was measured by cell viability and proliferation reagent, WST-1/1-methoxy PMS.	Ba/F3-human c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (human Met^{1}-Trp^{491}/murine Ile^{483}-Pro^{625}) cells	duplicate	in vitro	Avatrombopag free base: 0.00157 – 278 nmol/L rhTPO: 0.0169 pmol/L – 3 nmol/L	Avatrombopag did not induce proliferation of Ba/F3-chimeric c-Mpl (human ECD/murine transmembrane and ICD) cells. This result suggests that avatrombopag did not act on the ECD of human c-Mpl.	4.2.1.1-2 CRE140019
Effect on megakaryocyte colony formation from human hematopoietic progenitor cells	Megakaryocyte ($CD41^{+}$cells) colony formation from human CB $CD34^{+}$cells in serum-free collagen-based semi-solid culture system	Human CB $CD34^{+}$ cells	n=5	in vitro	Avatrombopag maleate: 3 – 3000 nmol/L rhTPO: 0.01 – 10 nmol/L	The EC_{50} of avatrombopag was 25.0 nmol/L, while rhTPO had an EC_{50} of 0.122 nmol/L in this assay.	4.2.1.1-3 SK-971454
Effect on human hematopoietic colony formation other than megakaryocytic lineage	Hematopoietic colony formation from human CB $CD34^{+}$cells in methylcellulose-based semi-solid culture system containing 30% FBS	Human CB $CD34^{+}$ cells	n=5	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.1, 0.3, 1, 3 µmol/L	There were no colonies of any type detected when avatrombopag was tested in the system at concentration up to 3 µmol/L (100-fold higher than EC_{50} for megakaryocyte colony formation in Study No. SK-971454).	4.2.1.1-4 SK-971453

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Effect on megakaryocyte maturation and ploidy level	Differentiation of PB $CD34^+$ cells into polyploid megakaryocytes in serum-free liquid culture system. The number of megakaryocyte and polyploidy level were measured by using flow cytometry ($CD41^+CD45^+$ cells were regarded as megakaryocytes).	G-CSF-mobilized human PB $CD34^+$ cells	n=5	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.03 – 3 µmol/L rhTPO: 0.03 – 10 nmol/L	Both avatrombopag and rhTPO promoted differentiation of human PB $CD34^+$ cells into $CD41^+CD45^+$ cells in a concentration-dependent manner. The ploidy level was not different from that of rhTPO.	4.2.1.1-5 SK-971628
Phosphorylation of STAT3 and STAT5 in human blood platelets	Tyrosine phosphorylation of STAT3 and STAT5 in the lysates of platelets purified from whole blood from 2 different donors	Human blood platelets	n=2	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.003, 0.03, 0.3, 3, 30 µmol/L rhTPO: 0.5, 5, 50 ng/mL	Avatrombopag at 0.03, 0.3, and 3 µmol/L induced tyrosine phosphorylation of STAT3 and STAT5 in human platelets, as did rhTPO at 5 and 50 ng/mL.	4.2.1.1-6 SK-971447
Phosphorylation of STAT3, STAT5, and ERK in Ba/F3-human c-Mpl cells	Tyrosine or threonine phosphorylation of STAT3, STAT5, and ERK in cell lysates	Ba/F3-human c-Mpl cells	n=1	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.003, 0.03, 0.3, 3 µmol/L rhTPO: 0.5, 5, 50 ng/mL	Avatrombopag induced phosphorylation of STAT3, STAT5, and ERK in Ba/F3-human c-Mpl cells, similar to rhTPO.	4.2.1.1-7 SK-971493

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Phosphorylation of STAT5 in rat, guinea pig, rabbit, and beagle dog blood platelets	Tyrosine phosphorylation of STAT5 in cell lysates of platelets	Rat, guinea pig, rabbit, and dog blood platelet	n=1 /species	in vitro	Avatrombopag hydrochloride: 0.3, 3 µmol/L rhTPO: 5, 50 ng/mL	Avatrombopag did not induce tyrosine phosphorylation of STAT5 in rat, guinea pig, rabbit, and beagle dog platelets, but rhTPO did.	4.2.1.1-8 SK-010015
Phosphorylation of STAT5 in common marmoset, and squirrel, rhesus and cynomolgus monkey blood platelets	Tyrosine phosphorylation of STAT5 in the lysates of platelets	Rhesus and cynomolgus monkey blood platelets	n=3 /species	in vitro	Avatrombopag hydrochloride: 0.03 – 10 µmol/L rhTPO: 5, 50 ng/mL	Avatrombopag did not induce tyrosine phosphorylation of STAT5 in common marmoset, and squirrel, rhesus and cynomolgus monkey platelets, but rhTPO did.	4.2.1.1-9 SK-010014
		Common marmoset and squirrel monkey blood platelets	n=3 (pooled)/ species				
Phosphorylation of STAT5 in hamster and porcine blood platelets	Tyrosine phosphorylation of STAT5 in the lysates of platelets	Hamster blood platelets	n=2 (pooled)	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.03, 0.3, 3 µmol/L rhTPO: 5, 50 ng/mL	Avatrombopag did not induce tyrosine phosphorylation of STAT5 in hamster or porcine platelets, but rhTPO did.	4.2.1.1-10 SK-971484
		Porcine blood platelets	n=2				
Phosphorylation of STAT5 in olive baboon blood platelets	Tyrosine phosphorylation of STAT5 in the lysates of platelets	Olive baboon blood platelets	n=10	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.6, 6 µmol/L rhTPO: 5 ng/mL	Avatrombopag did not induce tyrosine phosphorylation of STAT5 in olive baboon platelets, but rhTPO did at 5 ng/mL.	4.2.1.1-11 SK-971444
Phosphorylation of STAT5 in chimpanzee blood platelets	Tyrosine phosphorylation of STAT5 in the lysates of platelets	Chimpanzee blood platelets	n=4	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.003, 0.03, 0.3 µmol/L rhTPO: 5 ng/mL	Avatrombopag at 0.3 µmol/L induced phosphorylation more strongly than at 0.03 µmol/L, as did rhTPO at 5 ng/mL.	4.2.1.1-12 SK-971462

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Effect on rhTPO binding to human c-Mpl on human platelets	^{125}I-rhTPO binding in the presence of avatrombopag to platelets isolated from healthy subjects	Human PRP	n=5	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.1 – 100 µmol/L TM41: 10 – 10,000 µmol/L	Avatrombopag did not compete for receptor binding with ^{125}I-rhTPO at any of the concentrations tested. As expected, TM41 did inhibit ^{125}I-rhTPO binding with an IC_{50} of 515 µmol/L.	4.2.1.1-13 SK-971455
Requirement of CRH2 in human c-Mpl for activity	Cell proliferation of Ba/F3-chimeric c-Mpl (human, cynomolgus monkey or human and cynomolgus monkey) cells	Ba/F3-human or cynomolgus monkey c-Mpl cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (cynomolgus monkey CRH1/human CRH2-ICD) cells, Ba/F3-chimeric c-Mpl (human CRH1/cynomolgus monkey CRH2-ICD) cells	triplicate incubations	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.01 – 1000 nmol/L rhTPO: 0.0001 – 10 nmol/L	Avatrombopag induced proliferation of Ba/F3-human c-Mpl cells or Ba/F3-chimeric c-Mpl (cynomolgus monkey CRH1/human CRH2-ICD) cells. Avatrombopag treatment did not result in proliferation of Ba/F3-cynomolgus monkey c-Mpl cells or Ba/F3-chimeric c-Mpl (human CRH1/cynomolgus monkey CRH2-ICD) cells. These results showed that a region of human c-Mpl including CRH2, transmembrane domain, and ICD was important for avatrombopag activity.	4.2.1.1-14 SK-971718

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Effect on human platelet production after oral administration to NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	The number of blood cells and human $CD41^+$ platelets in PB before dosing and on Days 7, 14, 21, and 28 after the start of avatrombopag administration	Mouse/ NOD/SCID transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	10 females (n=9 for vehicle, 0.3, and 3 mg/kg groups on Day 28)	PO/ gavage	Avatrombopag maleate: 0, 0.25, 0.85, 2.5 mg/kg (once daily for 14 days)	Oral administration of avatrombopag dose-dependently increased the number of human platelets, resulting in approximately a 2.7-fold increase at 1 mg/kg (P<0.05) and a 3.0-fold increase at 3 mg/kg (P<0.01) on Day 14 after the start of administration. The minimum effective dose was 1 mg/kg.	4.2.1.1-15 SK-971435
Effect on platelet production after repeated oral administration to cynomolgus monkeys	The change in the number of platelets in PB after the start of avatrombopag administration	Monkey/ cynomolgus	3 males /group	PO/ gavage	Avatrombopag maleate: 0, 30 mg/kg (once daily for 14 days)	Oral administration of avatrombopag at 30 mg/kg for 14 days did not increase platelet count in the PB of cynomolgus monkeys as compared to the vehicle group.	4.2.1.1-16 SK-971433
Additive effects of the combination of avatrombopag and rhTPO on megakaryocytopoiesis	The change in the number of $CD34^+CD41^-$ cells (hematopoietic progenitor cells), $CD34^+CD41^+$ cells (megakaryocytic	G-CSF-mobilized human PB $CD34^+$ cells	n=5	in vitro	Avatrombopag free base (10 - 10000 nmol/L), rhTPO (0.01 - 10 nmol/L), or a combination of avatrombopag free base (10 -10000 nmol/L) and rhTPO (3 nmol/L)	Avatrombopag, in combination with rhTPO, increased not only megakaryocytes, but also hematopoietic progenitor cells and megakaryocytic progenitor cells, and that the effects of avatrombopag were at	4.2.1.1-17 Fukushima-Shintani, 2008

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Test Article/ Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
	progenitor cells), and $CD34^{-}CD41^{+}$ cells (megakaryocytes) by using flow cytometry					least additive to that of rhTPO.	

Ba/F3-c-Mpl cell = Ba/F3 murine pro-B cell expressing c-Mpl, CB = cord blood, c-Mpl = MPL, thrombopoietin receptor, CRH = cytokine receptor homology, CRH1 = membrane-distal CRH domain, CRH2 = membrane-proximal CRH domain, EC_{50} = 50% effective concentration, ECD = extracellular domain, FBS = fetal bovine serum, G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor, IC_{50} = 50% inhibitory concentration, ICD = intracellular domain, PB = peripheral blood, PO = oral, PRP = platelet-rich plasma, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

a: Doses and concentrations of avatrombopag were expressed in terms of the free base.

2.6.3.3　副次的薬理試験

Test Article: Avatrombopag maleate

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Binding panel assay	Binding assays for 86 receptors, transporters, and ion channels. Cellular functional assays for CCK_2 (agonist and antagonist effect) and secretin (agonist effect) receptor. Enzyme assays for H^+/K^+-ATPase and Na^+/K^+-ATPase.	NA	NA	in vitro	Avatrombopag maleate: Up to 10 µmol/L or 100 µmol/L	Significant binding (≥50% inhibition) at 10 µmol/L at A_3, AT_1, CCK_2, M_4, NK_2, NK_3, 5-HT_{5a} receptors and N-type Ca^{2+} channel. No significant binding (>50% inhibition) was observed at 1 µmol/L. Antagonistic effect at the CCK_2 receptor with an IC_{50} = 7.0 µmol/L	4.2.1.2-1 929084
Effect on in vitro human platelet aggregation	Platelet aggregation stimulated with 3 concentrations of ADP that were designed to induce low, medium, and high levels of platelet aggregation, or platelet aggregation without ADP stimulation. Platelet aggregation was measured with an aggregometer.	Human PRP	n=4	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.01, 0.1, 1, 10 µmol/L rhTPO: 0.05, 0.5, 5, 50 nmol/L	Avatrombopag did not result in platelet aggregation when used alone, nor did it potentiate the effect of ADP. rhTPO resulted in platelet aggregation at the highest concentration tested (50 nmol/L) when used alone, and potentiated the aggregation caused by low and medium concentrations of ADP.	4.2.1.2-2 SK-971615

Type of Study/Description	Methods	Species/ Strain	Number/ Gender	Route	Dose or Concentration[a]	Observations	Location/ Study Number
Effect on in vitro human platelet activation	P-selectin (CD62P) expression on platelets stimulated with 3 concentrations of ADP that were designed to induce low, medium, and high levels of platelet aggregation, or P-selectin (CD62P) expression on platelets without ADP stimulation. P-selectin (CD62P) expression was monitored by using flow cytometry.	Human PRP	n=5	in vitro	Avatrombopag maleate: 0.01, 0.1, 1, 10 µmol/L rhTPO: 0.05, 0.5, 5, 50 nmol/L	Avatrombopag did not cause platelet activation when used alone and also did not appear to potentiate the activation induced by ADP. rhTPO did result in activation of platelets at the highest concentration tested (50 nmol/L) when used alone, and potentiated the activation caused by all 3 different concentrations of ADP.	4.2.1.2-3 SK-971614
Effect on human platelet function after oral administration to NOD/SCID mice transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	The number of blood cells and human $CD41^+$ platelets in PB, and thrombin receptor-activating peptide-induced P-selectin (CD62P) expression on the surface of platelets before dosing and on Day 15 after the start of avatrombopag administration	Mouse/ NOD/SCID transplanted with human fetal liver $CD34^+$ cells	5-females /group[b]	PO/ gavage	Avatrombopag maleate: 0, 2.5 mg/kg (once daily for 14 days)	Oral administration of avatrombopag increased the number of human platelets, resulting in an approximately 2.0-fold increase on Day 15 at 2.5 mg/kg ($P<0.05$). There was no apparent difference in P-selectin (CD62P) expression between the avatrombopag group and the vehicle group. The results show that human platelet function in NOD/SCID mice was not influenced by avatrombopag even after exposure for 14 days.	4.2.1.2-4 SK-971507

ADP = adenosine diphosphate, ATPase = adenosine triphosphatase, IC_{50} = 50% inhibitory concentration, NA = not applicable, PO = oral, PRP = platelet-rich plasma, rhTPO = recombinant human thrombopoietin.

a: Doses and concentrations of avatrombopag were expressed in terms of the free base.

b:　One animal in the vehicle group died on Day 6 after administration.　One animal in the avatrombopag-treated group was excluded due to anemia.

2.6.3.4　安全性薬理試験

Test Article: Avatrombopag maleate

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)	Gender and n per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number
hERG potassium currents	HEK293 cells with hERG cDNA	in vitro	0.1, 1, 3 μmol/L[b]	n=5/group	Suppression of hERG current in a concentration-dependent manner (IC_{50}: 1.4 μmol/L).	Yes	4.2.1.3-1 SP-0358
Action potentials in isolated guinea pig papillary muscles	Guinea pig /Hartley	in vitro	0.1, 1, 3 μmol/L[c]	n=6/group	No effects on the parameters tested in isolated guinea pig papillary muscles.	Yes	4.2.1.3-2 SP-0372
Cardiovascular and respiratory function	Dog/Beagle	PO (0.5 w/v% MC solution)	0, 3, 30, 300 (as free base)	4 males/dose	≤300 mg/kg:　No effects on cardiovascular or respiratory functions.	Yes	4.2.1.3-3 SP-0351
Central nervous system	Rat/F344	PO (0.5 w/v% MC solution)	0, 1, 10, 100 (as free base)	6 males/group	No effect on general condition or behavior, or CNS function (Irwin's method).	Yes	4.2.1.3-4 SP-0350
Renal function	Dog/Beagle	PO (0.5 w/v% MC solution)	0, 3, 30, 300 (as free base)	4 males/group	≤30 mg/kg: No effects. 300 mg/kg: Renal effects including decreased glomerular filtration rate and effective renal plasma flow, serum (including increased BUN and creatinine, decreased phosphorus) and urine changes, and histologic renal tubular regeneration.	No	4.2.1.3-5 [redacted]03-4108

BUN = blood urea nitrogen, CNS = central nervous system, GLP = Good Laboratory Practice, hERG = human ether-à-go-go-related gene, MC = methylcellulose, PO = oral.

a: An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

b: Actual concentration of avatrombopag at 1 and 3 μmol/L were 0.65 and 2.54 μmol/L, respectively (Study No. SP-0358 including A-0323).

c: Actual concentration of avatrombopag at 1 and 3 μmol/L were 0.51 and 1.37 μmol/L, respectively (Study No. SP-0372 including A-0338).

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

実施せず。