TABLE OF CONTENTS

1. 緒言 2

1. 緒言

リトレシチニブ（開発番号：PF-06651600，化学名：1-((2*S*,5*R*)-5-(7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-one，分子量：285.34）は ATP との結合を遮断することにより JAK3 および 5 種類の TEC ファミリーのキナーゼ（BMX，BTK，ITK，TEC および TXK）を不可逆的に阻害する共有結合形成型の経口阻害薬である。他の 3 種類の JAK アイソフォーム（JAK1，JAK2 および TYK2）よりも JAK3 に対する選択性が高く（それぞれ 293 倍超，302 倍超，302 倍超），また，広範なキナーゼ群と比較しても選択性が高い。複数分子の JAK アイソフォームが介在してシグナル伝達が行われる細胞内では，JAK3 を介する IL-2，IL-4，IL-7，IL-9，IL-15 および IL-21 の共通γ鎖受容体のシグナル伝達のみを阻害する。

リトレシチニブは，円形脱毛症，関節リウマチ，潰瘍性大腸炎，クローン病などの炎症性疾患の病態生理に関与する IL-7，IL-15，IL-21 などの JAK3 を介する共通γ鎖受容体のシグナル伝達を阻害した。また，TEC ファミリーキナーゼに依存し円形脱毛症の病態生理に関与する CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞の細胞溶解能に対しても阻害活性を示した。

ガイダンス（ICH M3[R2], 2009; EMEA/CHMP/SWP/28367/07 Rev 1, 2017）に従い，リトレシチニブの強制経口投与による薬理作用および全身曝露が認められたラットおよびイヌを安全性薬理試験および一般毒性試験に用いる動物種として選択した。

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

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

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 2
本項で使用する用語・略語 3
1. まとめ 5
2. 効力を裏付ける試験 6
2.1. 効力を裏付ける試験（In vitro） 8
2.1.1. 各種キナーゼに対する活性および選択性 8
2.1.2. 各種キナーゼに対する共有結合による不活性化の反応速度 8
2.1.3. ヒト血清アルブミンとの反応性 10
2.1.4. ヒト末梢血単核球および CD34 陽性前駆細胞に対する活性 10
2.1.5. ヒトならびにラットおよびイヌ全血細胞に対する活性 10
2.1.6. ヒト単球由来マクロファージにおける LPS 誘発サイトカイン産生に及ぼす作用 11
2.1.7. IL-27 処理ヒトマクロファージにおける TNFαおよび IL-1βシグナル伝達に及ぼす作用 12
2.1.8. ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用 12
2.1.9. B 細胞受容体および T 細胞受容体が関与する CD69 発現上昇に及ぼす作用 12
2.1.10. ヒト NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞の機能に及ぼす作用 12
2.1.11. IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する作用 13
2.1.12. 溶解したヒト PBMC における JAK3 および TEC ファミリーに対する占有率 13
2.1.13. JAK3 および TEC ファミリーキナーゼの触媒ドメインの配列相同性 14
2.1.14. ヒト巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 誘発性 STAT リン酸化に対する作用 14
2.1.15. ヒト血小板による TPO の消失に対する作用 14
2.2. 効力を裏付ける試験（In vivo） 14
2.2.1. ラットアジュバント誘発関節炎（AIA）モデルにおける有効性 14
2.2.2. 炎症性腸疾患（IBD）マウスモデルにおける有効性 15
2.2.3. 多発性硬化症の EAE マウスモデルにおける有効性 15
2.2.4. AA マウスモデルにおける有効性 16
3. 副次的薬理試験 16
3.1. リガンド結合スクリーニング試験 16

3.2. VEGFR2 リン酸化の機能的アッセイ 16
3.3. Abl キナーゼに対する阻害活性 16
3.4. キナーゼパネルを用いた選択性の検討 17
4. 安全性薬理試験 17
4.1. CHO 細胞を用いた hERG カリウム電流に対する影響（GLP 非適用） 18
4.2. HEK293 細胞を用いた hERG カリウム電流に対する影響（GLP 適用） 18
4.3. ラットを用いた神経機能および肺機能の評価（GLP 適用） 18
4.4. テレメトリーを用いた雄ラットにおける心血管系評価（GLP 非適用） 19
4.5. テレメトリーを用いたイヌにおける心血管系評価（GLP 非適用） 19
4.6. テレメトリーを用いたイヌにおける心血管系評価（GLP 適用） 20
5. 薬力学的薬物相互作用試験 20
6. 考察及び結論 20
7. 図表 21

LIST OF TABLES

Table 1. 効力を裏付ける非臨床薬理試験の要約 7
Table 2. リトレシチニブおよびヒト代謝物 M2 の in vitro 酵素阻害活性の比較 8
Table 3. リトレシチニブの各種キナーゼに対する共有結合による不活性化 9
Table 4. 細胞レベルでの阻害活性 11
Table 5. ラット，イヌおよびヒト全血での阻害活性 11
Table 6. IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する阻害活性 13
Table 7. リトレシチニブの安全性薬理試験の概要 17

LIST OF FIGURES

Figure 1. リトレシチニブを 50 mg で円形脱毛症患者に投与したときに予想される JAK3，BTK および ITK の遊離受容体（%）の経時変化 9

本項で使用する用語・略語

略号および用語の定義一覧	
略号，用語	**省略していない表現または定義**
AA	alopecia areata：円形脱毛症
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AIA	adjuvant-induced arthritis：アジュバント誘発関節炎
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
BCR	B cell receptor：B 細胞受容体
BID	dosed twice daily：1 日 2 回
BMX	bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X
BP	blood pressure：血圧
BT	body temperature：体温
BTK	Bruton tyrosine kinase
C_{av}	average plasma concentration：平均血漿中濃度
CD	cluster of differentiation：表面抗原
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis：実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC_{av50}	50% effective average concentration：50%有効平均濃度
ECG	electrocardiogram：心電図
EPO	erythropoietin：エリスロポエチン
FOB	functional observational battery：機能観察総合評価法
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児由来腎臓
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HR	heart rate：心拍数
IBD	inflammatory bowel disease：炎症性腸疾患
IC_{50}	50% inhibitory concentration：50%阻害濃度
IFN	interferon：インターフェロン
IHC	immunohistochemistry：免疫組織化学
IL	interleukin：インターロイキン
ITK	interleukin-2-inducible T-cell kinase
JAK	Janus kinase：ヤヌスキナーゼ
KDR	kinase insert domain receptor
K_i	inhibition constant：見かけの阻害定数
k_{inact}	inactivation rate constant：不活性化速度定数
K_m	Michaelis Menton constant：ミカエリス・メンテン定数
LA	locomotor activity：自発運動量
LPS	lipopolysaccharide：リポ多糖
LVP	left ventricular pressure：左室圧
M#	metabolite identification：代謝物番号
MPL	thrombopoietin receptor：トロンボポエチン受容体
MV	minute volume：分時換気量
NA	not applicable：該当なし
NK	natural killer：ナチュラルキラー
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development：経済協力開発機構

略号および用語の定義一覧	
PBMC	peripheral blood mononuclear cell：末梢血単核球
PK/PD	pharmacokinetic/pharmacodynamic：薬物動態/薬力学
pSTAT	phosphorylated signal transducer and activator of transcription：リン酸化シグナル伝達兼転写活性化因子
QD	once daily：1 日 1 回
QTc	corrected QT interval：補正 QT 間隔
SDLN	skin draining lymph node：皮膚所属リンパ節
STAT	signal transducer and activator of transcription：シグナル伝達兼転写活性化因子
TEC	tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma
THP-1	human leukemia monocytic cell line：ヒト単球性白血病細胞株
TPO	thrombopoietin：トロンボポエチン
TV	tidal volume：1 回換気量
TXK	tyrosine protein kinase encoded by the TXK gene
TYK2	tyrosine-kinase 2：チロシンキナーゼ 2
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor：血管内皮増殖因子受容体

1. まとめ

リトレシチニブは経口投与可能な，共有結合形成型の不可逆的な JAK3 阻害薬であり，他の 3 種の JAK アイソフォーム（JAK1，JAK2 およびチロシンキナーゼ TYK2）に比べて JAK3 に対する高い選択性を示した。また，キナーゼに対する選択性を広範に検討したところ，リトレシチニブは TEC ファミリーキナーゼ（BTK，BMX，ITK，TEC および TXK）に対して選択性を示し，これらを不可逆的に阻害した。リトレシチニブは JAK3 に依存する IL-2，IL-4，IL-7，IL-9，IL-15 および IL-21 の共通γ鎖受容体のシグナル伝達を阻害する。リトレシチニブは，ヒト全血中で IL-15 および IL-21 の共通γ鎖受容体のシグナル伝達を阻害したが，IL-10，IFNα，INFγ，IL-6，IL-27，IL-12，IL-23 などの JAK3 に依存しないサイトカインのシグナル伝達は阻害せず，CD34 陽性前駆細胞でのエリスロポエチン（EPO）のシグナル伝達も，巨核球および血小板におけるトロンボポエチン（TPO）のシグナル伝達および消失も阻害しなかった。また，リトレシチニブは TEC ファミリーキナーゼに依存する CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞の細胞溶解能も阻害した。IL-7，IL-15 などの共通γ鎖サイトカインや CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞の細胞溶解は円形脱毛症（AA）の病態に関与すると考えられている。リトレシチニブのヒト循環血中の主代謝物である PF-07034562（M2）は，JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 および TEC ファミリーキナーゼに対する阻害能を示さなかった。

リトレシチニブは，ラットのアジュバント誘発関節炎（AIA）モデルにおいて炎症の指標となる肢の容積を減少させ，サイトカイン依存性の STAT リン酸化に対しても顕著な阻害作用を示した。また，マウスの化学物質誘発性炎症性腸疾患（IBD）モデルでは，リトレシチニブによる疾患マーカーの改善，大腸での STAT3 および STAT5 リン酸化の阻害，ex vivo 刺激後の全血中で共通γ鎖サイトカインに関連するサイトカイン依存性の STAT リン酸化の顕著な阻害がみられ，マウスの大腸炎移植モデルでは，体重，結腸の重量・長さまたは結腸の病理組織学的所見に変化は認められず，疾患スコアが改善した。さらに，多発性硬化症のモデルとして汎用される実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスでは，リトレシチニブの予防的投与による EAE 発症の遅延，用量依存的な疾患程度の低減と，治療的投与による疾患程度の顕著な低減，神経炎症，神経変性および脱髄の改善，脊髄における STAT1，STAT3 および STAT5 リン酸化の抑制がみられた。マウスの AA モデルでは，リトレシチニブは全身投与により皮膚の炎症を改善し，T 細胞の増殖と機能を抑制して，発毛を回復させることが報告されている[1]。

副次的薬理試験では，in vitro で広範な受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素に対するリトレシチニブの作用を 10 µmol/L で評価したが，Abl，EGFR および VEGFR2 キナーゼを除き，検討した標的の 50%を超える顕著な阻害は認められなかった。フォローアップとして実施した細胞を用いた機能的アッセイではリトレシチニブによる VEGFR2 の顕著な阻害は認められず，生化学的アッセイでも生理的濃度である 1 mmol/L の ATP 存在下で Abl および EGFR の阻害（50 µmol/L 超）は認められなかった。

In vitro の安全性薬理試験として，hERG イオンチャネルに対するリトレシチニブの影響を評価した。In vivo の安全性薬理試験としては，ラットを用いた呼吸系および中枢神経系に対する影響の評価と，ラットおよびイヌを用いた心血管系に対する安全性の評価を実施した。これらの安全性薬理みられた所見は，比較的軽微で一貫性のない HR と BP の変化と，QTc に対する影響を伴わず，心拍数への影響の二次的変化と考えられる ECG パラメータの変化のみであった。

2. 効力を裏付ける試験

リトレシチニブの臨床開発に先立ち，非臨床薬理試験を実施してリトレシチニブの有効性について検討した。実施した試験の一覧と概略を概要表 2.6.3.1 および Table 1 に，各試験結果の要約を概要表 2.6.3.2 に示す。

Table 1.　効力を裏付ける非臨床薬理試験の要約

試験	用量および投与頻度	試験番号
In vitro 試験		
活性測定	NA	PF-06651600_[redacted]_184021
キナーゼ選択性	NA	PF-06651600_[redacted]_151236
PF-07034562（代謝物 M2）の活性測定	NA	PF-06651600_[redacted]_123643
JAK3 および各種キナーゼに対する共有結合による不活性化の反応速度	NA	PF-06651600_[redacted]_184157
ヒト血清アルブミンとの反応性	NA	PF-06651600_[redacted]_101033
ヒト PBMC におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06651600_[redacted]_184605
ヒト全血におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06651600_[redacted]_184417
ラットおよびイヌ全血におけるサイトカインによる STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06651600_[redacted]_102317
ヒト単球由来マクロファージにおける LPS 誘発サイトカイン産生に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_185220
IL-27 処理ヒトマクロファージにおける TNFαおよび IL-1β シグナル伝達に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_185307
ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_044630
B 細胞受容体および T 細胞受容体が関与する CD69 発現上昇に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_023747
ヒト PBMC 溶解物における JAK3 および TEC ファミリーの占有率	NA	PF-06651600_[redacted]_023828
ヒト NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞の機能的活性に及ぼす作用	NA	PF-06651600_[redacted]_011358
血小板による TPO の消失に及ぼす影響	NA	CP-690550_[redacted]_033455
巨核球前駆細胞における TPO および IL-6 シグナル伝達ならびに細胞増殖に対する影響	NA	CP-690550_[redacted]_094745
細胞アッセイにおける IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化の阻害	NA	PF-06700841_[redacted]_090414
In vivo 試験		
AIA ラットモデルにおける有効性	0.1～80 mg/kg QD	PF-06651600_[redacted]_090652
化学物質誘発性 IBD マウスモデルにおける有効性，バイオマーカーおよび標的調節	3～100 mg/kg BID	PF-06651600_[redacted]_181316
T 細胞移入 IBD マウスモデルにおける有効性	20，60 mg/kg BID	PF-06651600_[redacted]_100542
多発性硬化症の EAE マウスモデルにおける有効性	20，60 mg/kg BID（予防） 30，100 mg/kg BID（治療）	PF-06651600_[redacted]_085612

2.1. 効力を裏付ける試験（In vitro）

2.1.1. 各種キナーゼに対する活性および選択性

（PF-06651600_[redacted]_184021，PF-06651600_[redacted]_151236，PF-06651600_[redacted]_123643，概要表 2.6.3.2）

各種キナーゼを用いて選択性を評価した試験（PF-06651600_[redacted]_184021）では，4 種類の JAK アイソフォームに対するリトレシチニブの阻害活性を測定した。1 mmol/L の ATP 存在下でのリトレシチニブの JAK1，JAK2，JAK3 および TYK2 に対する IC_{50} はそれぞれ 9710 nmol/L 超，10,000 nmol/L 超，33.1 nmol/L および 10,000 nmol/L 超であったことから，リトレシチニブは JAK3 の強力な阻害薬であり，JAK3 に対して JAK1，JAK2 および TYK2 の 293 倍以上の選択性を有することが示された（Table 2）。また，K_m 値付近の ATP 濃度でも評価したところ，JAK1，JAK2，JAK3 および TYK2 に対する IC_{50} はそれぞれ 1640，1510，0.346 および 3780 nmol/L であった。さらに，[redacted] 社のキナーゼパネルを用いて，K_m 値付近の ATP 濃度下で 304 種類のキナーゼに対するリトレシチニブの選択性も検討したところ，リトレシチニブ（1 µmol/L）は JAK3 および TEC ファミリーキナーゼを高い選択性で阻害することが示された（PF-06651600_[redacted]_151236）。

リトレシチニブのヒト循環血中の主代謝物である PF-07034562（M2）の JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 および TEC ファミリーキナーゼに対する阻害能を 1 mmol/L の ATP 存在下で評価した（PF-06651600_[redacted]_123643）。M2 の IC_{50} は 9890 nmol/L 超（JAK1）または 10,000 nmol/L 超（JAK2，JAK3，TYK2，BMX，BTK，ITK，TEC および TXK）といずれのキナーゼに対しても阻害活性を示さないことが示された（Table 2）。

Table 2. リトレシチニブおよびヒト代謝物 M2 の in vitro 酵素阻害活性の比較

	IC_{50} (nmol/L)[a]	
キナーゼ	リトレシチニブ	M2
JAK1	>9710	>9,890
JAK2	>10,000	>10,000
JAK3	33.1	>10,000
TYK2	>10,000	>10,000
BMX	606	>10,000
BTK	608	>10,000
ITK	8510	>10,000
TEC	592	>10,000
TXK	194	>10,000

a. 1 mmol/L ATP 存在下で測定した IC_{50}

2.1.2. 各種キナーゼに対する共有結合による不活性化の反応速度

（PF-06651600_[redacted]_184157，概要表 2.6.3.2）

リトレシチニブによる JAK3 および他のキナーゼ（BTK，BLK，BMX，ITK，TEC，TXK，SLK，FGR および FLT3）に対する共有結合形成による不活性化の反応速度について検討した。評価したキナーゼのうち，ATP 結合ポケットの H10 の位置にシステインを有するもの，すなわち JAK3（Cys909），TEC ファミリーキナーゼの BTK，BMX，ITK，TEC および TXK ならびに BLK がリトレシチニブとの共有結合による不活性化を受け，ATP 結合ポケット内の別の位置に

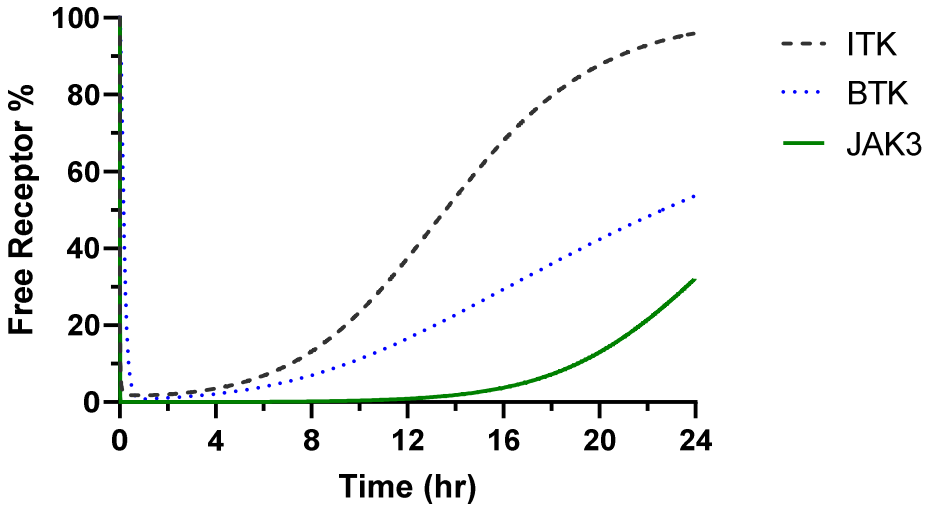
システインを有するキナーゼ（SLK，FGR および FLT3）に対する阻害は弱く，共有結合は認められなかった。BMX，ITK および TXK に対するリトレシチニブの効力は k_{inact}/K_i 値により表されたことから，JAK3 に対するリトレシチニブの選択性は不活性化反応の至適化によって得られることが反応速度的に示唆された。すなわち，JAK3 に対する K_i 値は 6.31 µmol/L と比較的弱いにもかかわらず，JAK3 の Cys909 のチオール基とリトレシチニブのアクリルアミド基の良好な配置を反映した相対的に速い不活性化により大きな k_{inact} を示したと考えられる（Table 3）。

Table 3.　リトレシチニブの各種キナーゼに対する共有結合による不活性化

酵素	k_{inact} (s^{-1})	K_i (µmol/L)	k_{inact}/K_i ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
JAK3	2.32	6.31	3.68E + 05
BMX	0.00564	0.545	1.03E + 04
ITK	0.000144	0.0269	5.35E + 03
TXK	0.000487	0.131	3.79E + 03
TEC	0.00156	0.679	2.30E + 03
BTK	0.124	62.3	1.99E + 03
BLK	0.0278	32.4	8.58E + 02

得られた不活性化パラメータ（K_i および k_{inact}），リトレシチニブを円形脱毛症（AA）に 50 mg で投与時のポピュレーション PK（PMAR-1157）および酵素のターンオーバー（JAK3：3.5 時間[2]，BTK：12 時間[3]，ITK：1.8 時間[4]）に基づき，各キナーゼに対する阻害プロファイルを予測した。典型的な JAK の可逆的阻害剤でみられる阻害[5]とは異なり，リトレシチニブによる JAK3，BTK および ITK に対する阻害のプロファイルは，経時的に変化し，投与後 24 時間にわたり阻害が継続することが示された（Figure 1）。

Figure 1.　リトレシチニブを 50 mg で円形脱毛症患者に投与したときに予想される JAK3，BTK および ITK の遊離受容体（%）の経時変化



2.1.3. ヒト血清アルブミンとの反応性

（PF-06651600_[redacted]_101033，概要表 2.6.3.2）

リトレシチニブのヒト血清アルブミンとのリン酸緩衝生理食塩水中での反応性について検討した。リトレシチニブ（1，8 または 320 µmol/L）を精製遺伝子組み換えヒト血清アルブミン（1 µmol/L または 300 µmol/L）と 37°C で 3 時間または 22 時間インキュベートし，LC/MS を用いて付加体の生成を測定した。リトレシチニブのヒト血清アルブミンとの反応性は低く，300 µmol/L のヒト血清アルブミンと 320 µmol/L のリトレシチニブを 37°C で 3 時間インキュベートしたときに，付加体は検出されなかった。同じ条件下で 22 時間インキュベートしたときには，ごくわずかな付加体が検出された。

2.1.4. ヒト末梢血単核球および CD34 陽性前駆細胞に対する活性

（PF-06651600_[redacted]_184605，概要表 2.6.3.2）

ヒト PBMC および CD34 陽性前駆細胞中のリンパ球を用いて種々のサイトカインによる刺激後の STAT リン酸化の阻害を測定した。結果の要約を Table 4 に示す。リトレシチニブはヒト PBMC のフローサイトメトリーでゲートされたリンパ球では IL-15 による JAK1/JAK3 依存性の STAT5 リン酸化を阻害し，IC_{50} は 51.7 nmol/L であった。一方，IFNαおよび IL-10 による JAK1/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化の阻害については，IC_{50} がそれぞれ 12,100 nmol/L および 60,000 nmol/L 超であり，IL-27 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化の阻害については IC_{50} が 17,800 nmol/L であった。CD34 陽性前駆細胞でリトレシチニブを 20,000 nmol/L まで評価したところ，エリスロポエチン（EPO）による JAK2/JAK2 依存性の STAT5 リン酸化の阻害は認められなかった。

2.1.5. ヒトならびにラットおよびイヌ全血細胞に対する活性

（PF-06651600_[redacted]_184417，PF-06651600_[redacted]_102317，概要表 2.6.3.2）

ヒト全血中のリンパ球を用いて種々のサイトカインによる刺激後の STAT リン酸化の阻害を測定した（PF-06651600_[redacted]_184417）。結果の要約を Table 4 に示す。リトレシチニブはヒト全血のフローサイトメトリーでゲートされたリンパ球では IL-15 および IL-21 による JAK1/JAK3 依存性の STAT5 リン酸化および STAT3 リン酸化を阻害し，IC_{50} はそれぞれ 198 nmol/L および 362 nmol/L であった。一方，リトレシチニブは IFNαおよび IL-10 による JAK1/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化，IL-27 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性の STAT3 リン酸化を阻害せず（IC_{50}：60,000 nmol/L 超），リンパ球，単球または CD34 陽性前駆細胞では，JAK2/TYK2 依存性の IL-23 による STAT3 リン酸化および IL-12 による STAT4 リン酸化，IFNγ による JAK1/JAK2 依存性の STAT1 リン酸化，IL-6 による JAK1/JAK2/TYK2 依存性の STAT1 リン酸化および STAT3 リン酸化ならびに EPO による JAK2/JAK2 依存性の STAT5 リン酸化を阻害しなかった（IC_{50}：20,000 nmol/L 超）。

また，薬理試験と毒性試験で用いた動物種であるラットとイヌの全血を用いて IL-15 および IL-21 による JAK1/JAK3 依存性の STAT5 および STAT3 のリン酸化阻害について同様に検討した（PF-06651600_[redacted]_102317）。リトレシチニブはラットおよびイヌ全血のいずれにおいても，IL-15 および IL-21 による JAK1/JAK3 依存性の STAT5 および STAT3 のリン酸化をヒト全血とほぼ同程度に阻害した（Table 5）。

Table 4.　細胞レベルでの阻害活性

シグナル伝達ペア	サイトカイン	STATリン酸化	リンパ球	IC_{50}[a] (nmol/L)	IC_{50} (ng/mL)
JAK1/TYK2	IFNα	STAT3	ヒトPBMC	12,100	3,450
			ヒト全血	>60,000	>17,100
	IL-10	STAT3	ヒトPBMC	>60,000	>17,100
			ヒト全血	>60,000	>17,100
JAK1/JAK2/TYK2	IL-27	STAT3	ヒトPBMC	17,800	5,080
			ヒト全血	>60,000	>17,100
	IL-6	STAT1/3	ヒト全血	>20,000	>5,710
JAK1/JAK2	IFNγ	STAT1	ヒト全血	>20,000	>5,710
JAK1/JAK3	IL-15	STAT5	ヒトPBMC	51.7	14.8
			ヒト全血	198	56.5
	IL-21	STAT3	ヒト全血	362	103
JAK2/TYK2	IL-23	STAT3	ヒト全血	>20,000	>5,710
	IL-12	STAT4	ヒト全血	>20,000	>5,710
JAK2/JAK2	EPO	STAT5	ヒトPBMC	>20,000	>5,710
			ヒト全血	>20,000	>5,710

a. IC_{50} が 10,000 nmol/L超の阻害は生理学的に意味がないと考えられる

Table 5.　ラット，イヌおよびヒト全血での阻害活性

シグナル伝達ペア	サイトカイン	STATリン酸化	IC_{50} (nmol/L，括弧内はng/mL)		
			ラット	イヌ	ヒト[a]
JAK1/JAK3	IL-15	STAT5	137 (39.1)	170 (48.5)	198 (56.5)
	IL-21	STAT3	302 (86.2)	212 (60.5)	362 (103)

a. 試験報告書PF-06651600_[redacted]_184417 より

2.1.6. ヒト単球由来マクロファージにおける LPS 誘発サイトカイン産生に及ぼす作用

（PF-06651600_[redacted]_185220，概要表 2.6.3.2）

マクロファージの LPS 刺激により産生されるサイトカインである IL-1β，IL-6 および TNFαを測定することにより，これらの産生を抑制的に制御する IL-10（JAK1/TYK2 依存性）に対するリトレシチニブ，PF-02384554（JAK1 を選択的に阻害）およびトファシチニブ（JAK1，JAK2 および JAK3 を阻害）の影響を比較した。PF-02384554 およびトファシチニブでは，LPS で刺激したヒト単球由来マクロファージの in vitro モデルにおいて濃度依存的な IL-1β，IL-6 および TNFα産生の増加がみられ，IL-10 の機能を阻害することが示された。これに対して，リトレシチニブは同じ条件下でこれらの炎症促進性サイトカイン濃度を変化させず，JAK3 の選択的阻害は IL-10 の機能を阻害しなかった。また，リトレシチニブ，PF-02384554 またはトファシチニブとのインキュベーションに抗 IL-10 中和抗体を加えたところ，いずれにおいても IL-1β，IL-6 および TNFαの産生が顕著に上昇したことから，LPS に刺激されて生じるこれらのサイトカイン産生の阻害は IL-10 に依存することが示された。

2.1.7. IL-27 処理ヒトマクロファージにおける TNFαおよび IL-1βシグナル伝達に及ぼす作用

（PF-06651600_[redacted]_185307，概要表 2.6.3.2）

IL-27 処理ヒトマクロファージモデルにおいて，IL-8，SOCS1 および PD-L1 の mRNA レベルを測定することにより，リトレシチニブおよび PF-02384554（JAK1 を選択的に阻害）の IL-27 の機能への影響を比較した。IL-27 は SOCS1 の mRNA 濃度を上昇させ，TNFαおよび IL-1βによる IL-8 転写を減衰させる。また，ヒトマクロファージを IL-27 で前処理すると，TNFα刺激後の PD-L1 の mRNA および表面発現が誘導される。リトレシチニブは TNFαおよび IL-1β刺激ヒトマクロファージにおいて 20 µmol/L までの濃度では IL-27 の機能を阻害しなかったが，PF-02384554 は TNFαおよび IL-1β刺激ヒトマクロファージにおいて 10 µmol/L および 20 µmol/L の濃度で IL-27 の機能を阻害した。これらの結果から，リトレシチニブによる JAK3 の選択的阻害は IL-27 の機能に影響しなかったが，JAK1 の選択的阻害では IL-27 の機能は抑制されることが示された。このことは，IL-27 のシグナル伝達が JAK1/JAK2/TYK2 依存性であり，JAK3 に依存しないことと符合する。

2.1.8. ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用

（PF-06651600_[redacted]_044630，概要表 2.6.3.2）

ヒト Th1，Th17 および B 細胞の分化に及ぼす作用について，それぞれ IFNγ，IL-17A および IgG の産生を指標として検討した。リトレシチニブは Th1 細胞での IFNγおよび Th17 細胞での IL-17A の産生を強力に阻害し，IL-21 および CD40 リガンドで刺激した CD19 陽性 B 細胞での IgG の産生も阻害した。

2.1.9. B 細胞受容体および T 細胞受容体が関与する CD69 発現上昇に及ぼす作用

（PF-06651600_[redacted]_023747，概要表 2.6.3.2）

B 細胞では B 細胞受容体（BCR）の架橋結合が，リトレシチニブにより阻害される TEC ファミリーキナーゼである BTK 依存的な CD69 の発現を上昇させる細胞内シグナル伝達カスケードを開始させることが示されている[6]。同様に T 細胞では T 細胞受容体（TCR）活性化が CD69 の発現を上昇させる[7]。そこで，単離ヒト白血球を用いて BCR および TCR の架橋結合による CD69 発現上昇を測定することにより，BCR および TCR シグナル伝達経路の重要なキナーゼである BTK および ITK（いずれも TEC ファミリーキナーゼ）に対する作用を細胞レベルで検討した。リトレシチニブによって BCR および TCR による CD69 の発現上昇が抑制されたことから（IC_{50} はそれぞれ 344 nmol/L および 380 nmol/L），リトレシチニブは細胞レベルで BTK および ITK を阻害することが示された。

2.1.10. ヒト NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞の機能に及ぼす作用

（PF-06651600_[redacted]_011358，概要表 2.6.3.2）

ヒト PBMC による NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞サブセットの細胞溶解活性に対する作用を，細胞傷害性顆粒タンパク質である CD107a の活性化依存的な細胞膜表出およびこれらの細胞における IFNγの細胞内蓄積を測定することにより評価した。刺激前に種々の濃度のリトレシチニブで PBMC を処理することにより，NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞表面への CD107a の表出が阻害され，IC_{50} はそれぞれ 509 nmol/L および 210 nmol/L であった。また，細胞内の IFNγ産生も阻

害し，IC_{50} はいずれの細胞でも 188 nmol/L であった。これらの NK 細胞および CD8 陽性 T 細胞に対する作用は ITK 依存性と考えられる。

2.1.11. IL-4，IL-13，IL-22 および IL-31 誘発性 STAT リン酸化に対する作用

（PF-06700841_[redacted]_090414，概要表 2.6.3.2）

JAK ファミリー依存性サイトカインで刺激した種々の細胞を用いてリトレシチニブの阻害作用を評価した。IL-4 は主に造血細胞に発現する JAK1/JAK3 依存性 I 型受容体または主に非造血細胞に発現する JAK1 依存性（JAK3 非依存性）II 型受容体のいずれかの受容体複合体を介してシグナル伝達を開始する[8]。I 型受容体または II 型受容体のいずれかの活性化により STAT6 がリン酸化される。リトレシチニブはヒト全血中の T 細胞および B 細胞において IL-4 による STAT6 リン酸化を阻害し，IC_{50} はそれぞれ 226 nmol/L および 1000 nmol/L であった。IFNγで前処理した THP-1 細胞（ヒト単球細胞株）では IL-31 による STAT3 リン酸化を阻害し，IC_{50} は 4410 nmol/L であった。評価した他の細胞である HT-29 細胞，初代培養ヒトケラチノサイトおよび初代培養ヒト腸管上皮細胞では，リトレシチニブは IL-4 および IL-13 による STAT6 リン酸化ならびに IL-22 による STAT3 リン酸化を阻害しなかった（IC_{50}：20,000 nmol/L 超）。

Table 6.　IL-4，IL-13，IL-22 およびIL-31 誘発性STATリン酸化に対する阻害活性

シグナル伝達ペア	サイトカイン	STATリン酸化	細胞種	IC_{50} (nmol/L)	IC_{50} (ng/mL)
JAK1/JAK3	IL-4	STAT6	B細胞	1,000	285
			T細胞	226	64.5
			単球	>20,000	>5,710
			HT-29 細胞	>20,000	>5,710
JAK1/JAK2/TYK2	IL-13		B細胞	>20,000	>5,710
			単球	>20,000	>5,710
			HT-29 細胞	>20,000	>5,710
JAK1/TYK2	IL-22	STAT3	ケラチノサイト	>20,000	>5,710
			腸管上皮細胞	>20,000	>5,710
JAK1/JAK2/TYK2	IL-31		THP-1 細胞	4400	1260

2.1.12. 溶解したヒト PBMC における JAK3 および TEC ファミリーに対する占有率

（PF-06651600_[redacted]_023828，概要表 2.6.3.2）

ヒト PBMC を用いてリトレシチニブによる JAK3 ならびに TEC ファミリーキナーゼである BTK，BMX，ITK，RLK（TXR）および TEC に対する占有率を評価した。リトレシチニブは JAK3 に対しては 73 nmol/L，TEC ファミリーキナーゼに対しては 58～176 nmol/L の濃度で 50%の占有を示したことから，これらのキナーゼに対してほぼ同程度の共有結合活性を示すことが示唆された。

2.1.13. JAK3 および TEC ファミリーキナーゼの触媒ドメインの配列相同性

ヒトの JAK3 および TEC ファミリーのタンパク質配列（TXK，ITK，BMX および BTK を含む）を，これらに対応するイヌおよびラットの相同タンパク質と比較した[9]。JAK3 キナーゼドメインの一致率は，ヒトとイヌで 94%であり，ヒトとラットで 87%であった。BTK および BMX キナーゼドメインの一致率は，それぞれヒトとイヌで 99%および 95%であり，ヒトとラットで 98%および 94%であった。ITK および TEC キナーゼドメインの一致率はいずれも，ヒトとイヌで 96%であり，ヒトとラットで 97%であった。TXK キナーゼドメインの一致率は，ヒトとイヌで 89%であり，ヒトとラットで 87%であった。

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

（CP-690550_[redacted]_094745，概要表 2.6.3.2）

トロンボポエチン（TPO）および IL-6（いずれも JAK-STAT 経路活性化を誘発可能なサイトカインであるが，TPO は JAK2 に依存している）誘発性 STAT リン酸化を介して巨核球前駆細胞に分化誘導したヒト骨髄 CD34 陽性前駆細胞を用いて，リトレシチニブの活性を検討した。ヒト巨核球前駆細胞において，TPO 誘発性 STAT5 リン酸化および IL-6 誘発性 STAT3 リン酸化（直接的または間接的に血小板産生に重要[10]）に対するリトレシチニブの阻害作用は弱く，IC_{50} は 20,000 nmol/L 超であった。また，CD34 陽性前駆細胞から巨核球前駆 CD41a（血小板および巨核球ならびにそれらの前駆細胞のマーカー）陽性細胞への分化増殖に対する影響を検討したところ，IL-6 を介した CD34 陽性前駆細胞からの巨核球前駆細胞への分化増殖をリトレシチニブは抑制しなかった（IC_{50}：20,000 nmol/L 超）。

2.1.15. ヒト血小板による TPO の消失に対する作用

（CP-690550_[redacted]_033455，概要表 2.6.3.2）

健常人から単離した多血小板血漿に曝露後の残存 TPO を測定することにより，TPO の内在化を介したヒト血小板による TPO 消失に対する作用を評価した。TPO の内在化はトロンボポエチン受容体（MPL）を介して行われ，この TPO の内在化には JAK2 への結合が関与していることが知られている[11]。ヒト血小板による TPO の消失に対して，リトレシチニブは阻害作用を示さなかった（IC_{50}：20,000 nmol/L 超）。血小板を介した TPO の消失が阻害されなかったことは，JAK2 キナーゼ活性の阻害に対するリトレシチニブの IC_{50} が 10,000 nmol/L 超であったこと（PF-06651600_[redacted]_184021 試験）と相関した。なお，この実験で評価したより強力な JAK2 阻害作用を示す薬物（バリシチニブおよびトファシチニブ）でも，消失に対する影響は最大で 10%であったことから，血小板の内在化による TPO 消失の 90%は JAK2 阻害に影響されないことが示唆された。

2.2. 効力を裏付ける試験（In vivo）

2.2.1. ラットアジュバント誘発関節炎（AIA）モデルにおける有効性

（PF-06651600_[redacted]_090652，概要表 2.6.3.2）

ラット AIA モデルを用いて，リトレシチニブの JAK3/TEC ファミリーキナーゼ阻害による抗炎症作用を in vivo で評価した。ラット AIA モデルは，JAK ファミリーキナーゼの阻害が疾患進行および病理学的変化を抑制することが示されており，抗炎症作用を評価する信頼性の高いモデルと考えられている[12]。

ラット AIA モデルでの評価に先立ち，無処置ラットにリトレシチニブを 6，15 および 80 mg/kg で投与後の全血を用いて用量を検討したところ，リトレシチニブはいずれの用量でも C_{max} において IL-21 の刺激による STAT3 リン酸化を 80%超～100%阻害した。

完全フロイントアジュバントで免疫した雌 Lewis ラットにおいて，プレチスモグラフィーを用いた後肢容積により関節炎の発症を確認後，0.1～80 mg/kg/日のリトレシチニブまたは溶媒を 7 日間連日 QD または BID 経口投与した。リトレシチニブの QD 経口投与により，3 mg/kg 群および 10 mg/kg 群の肢容積が有意に減少した。また，QD 投与時と BID 投与時の有効性と比較したところ，いずれにおいても EC_{av50} は同程度であり，C_{av} が抗炎症反応を予測する PK パラメータとして適切であることが示された。

2.2.2. 炎症性腸疾患（IBD）マウスモデルにおける有効性

（PF-06651600_[redacted]_181316，PF-06651600_[redacted]_100542，概要表 2.6.3.2）

一般的な DSS および TNBS によるマウスの 2 種の化学物質誘発性 IBD モデルを用いて，リトレシチニブ 3，10，30 または 100 mg/kg を予防的に BID 経口投与して大腸炎の程度の軽減を評価した（PF-06651600_[redacted]_181316）。リトレシチニブを 10 mg/kg で BID 投与したところ，体重減少，疾患活動性，大腸の病理組織学的評価に基づく炎症程度およびバイオマーカーの大腸遺伝子発現の抑制がみられた。IHC 染色分析から，10 mg/kg または 30 mg/kg を投与したマウスの大腸で STAT3 および STAT5 リン酸化が減少したことが示された。これらの試験で採取した全血を用いたアッセイを実施したところ，リトレシチニブはすべての用量で共通γ鎖のサイトカイン IL-15 および IL-21 によって刺激された STAT リン酸化を抑制した一方，IBD において防御的な効果を有する IL-10 または IL-27 によって刺激される STAT のリン酸化には作用せず，リトレシチニブが JAK3 の選択的阻害によって有効性を示す作用機序が改めて裏付けられた。

CD4+CD45RBhighCD25-細胞を C.B-17/prkdc scid/scid マウスに移植した大腸炎モデルマウスにリトレシチニブ 20 mg/kg および 60 mg/kg を BID 経口投与したところ，試験 27～31 日にマウスの疾患スコアが改善し，体重，結腸の重量・長さまたは結腸の病理組織学的所見に変化は認められなかった（PF-06651600_[redacted]_100542）。リトレシチニブ 60 mg/kg を投与した動物の結腸組織サンプルにおける遺伝子発現は，cd127，cldn10，prf1，il2 および klrk1 の発現上昇ならびに foxp3 の発現低下を示したが，20 mg/kg 群では ltf，fizz1，il1b および foxp3 の発現低下が示された。腸間膜リンパ節の細胞数に差はみられなかったが，CD4 陽性および Foxp3 陽性制御性 T 細胞数はいずれの用量群でも減少した。

2.2.3. 多発性硬化症の EAE マウスモデルにおける有効性

（PF-06651600_[redacted]_085612，概要表 2.6.3.2）

マウスの多発性硬化症モデルである EAE は，ヒトの疾患との多くの類似性により，開発中の治療薬の評価に広く利用されている。臨床症状の 1 つである麻痺は中枢神経系の炎症および脱髄の病理組織学的病変と関連があり，ミエリン特異的 CD4 陽性 T 細胞によって誘発される。28 日間までの 20 mg/kg および 60 mg/kg の予防的連日投与は EAE の発症を遅らせ，平均最高スコア，終了時の平均臨床スコア，EAE 発症率，発症日の中央値，終了時の体重変化量ならびに脊髄の病理組織学的検査による神経炎症，神経変性および脱髄に基づく疾患の程度を用量依存的に低減した。EAE の発症日から 14 日間，リトレシチニブを 30 mg/kg および 100 mg/kg の用量で

治療的に投与したところ，疾患の程度の軽減に明確な効果が認められた。IHC 染色分析により，リトレシチニブを投与したマウスの脊髄で STAT1，STAT3 および STAT5 リン酸化の減少が認められ，リトレシチニブの作用機序が確認された。

2.2.4. AA マウスモデルにおける有効性

AA モデルマウス（皮膚移植 C3H/HeJ マウス）に ALZET 浸透圧ポンプによりリトレシチニブを 30mg/kg で 4 週間全身投与したところ，AA 発症の予防効果が認められ，12 週間の投与により発症した AA に対する治療効果が認められた [1]。投与後 4 週間では，AA に関連した皮膚の炎症の改善と CD8 陽性エフェクターメモリーT 細胞の減少，SDLN（T 細胞の発生の主要部位）における NKG2D 陽性 CD8 陽性 T 細胞の減少がみられた。投与後 12 週間では，対照と比較して SDLN 内の CD8 陽性エフェクターメモリーT 細胞，NKG2D 陽性 CD8 陽性 T 細胞，IFNγを産生する CD8 陽性 T 細胞の顕著な減少と発毛がみられた。12 週間の局所塗布後では，リトレシチニブは毛の再生を明確に回復させ，AA に関連した皮膚における CD8 陽性および CD45 陽性の浸潤ならびに CD8 陽性エフェクターT 細胞を顕著に減少させた。これらの結果から，リトレシチニブによる共通γ鎖のサイトカインまたは TEC キナーゼのシグナル伝達遮断が，T 細胞の増殖と機能を抑制することにより皮膚への浸潤を減少させ，AA を改善させることが示された。

3. 副次的薬理試験

概要表 2.6.3.1 および 2.6.3.3 に要約した一連の副次的薬理試験において，リトレシチニブを評価した。

3.1. リガンド結合スクリーニング試験

（100009194，概要表 2.6.3.3）

リトレシチニブのオフターゲット薬理活性について，受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素の広範なパネル（[redacted] 社の [redacted]）を用いたリガンド結合スクリーニング試験において初期濃度 10 µmol/L で評価した。この濃度において，Abl キナーゼ，EGFR キナーゼおよび VEGFR2 キナーゼを除き，リトレシチニブの結合阻害または酵素活性阻害は 50%未満であり活性を示さなかった。50%以上の阻害がみられたこれらのキナーゼに対する阻害活性についてさらに検討したところ，IC_{50} はそれぞれ 2800 nmol/L，2200 nmol/L および 1300 nmol/L であった。

3.2. VEGFR2 リン酸化の機能的アッセイ

（PF-06651600-00-0010 pVEGFR_[redacted]-20[redacted]，概要表 2.6.3.3）

KDR キナーゼに対する影響の追加試験として，細胞レベルでの機能試験を実施した。リトレシチニブは KDR 遺伝子を発現させたブタ大動脈内皮細胞において，30 µmol/L までの濃度では KDR キナーゼ活性に影響を及ぼさないことが示された。

3.3. Abl キナーゼに対する阻害活性

（4647_31278，概要表 2.6.3.3）

Abl キナーゼに対する影響の追加試験として，Z'-LYTE スクリーニングアッセイをより広範な濃度のリトレシチニブを用いて 1 mmol/L の ATP 濃度下で実施した。Abl キナーゼに対する IC_{50} は 30 µmol/L 超であった。

3.4. キナーゼパネルを用いた選択性の検討

（PF-06651600_[redacted]_151236，概要表 2.6.3.3）

リトレシチニブの各種キナーゼに対する選択性について，多様なプロテインキナーゼのパネルを用いてスクリーニングした。[redacted] 社の SelectScreen キナーゼプロファイリングサービスの Z'-LYTE テクノロジーおよび LanthaScreen テクノロジーにより，種々のキノーム系統樹のキナーゼファミリーの代表となるように選択した 304 種のキナーゼ（それぞれ 262 種および 52 種，10 種は両方で実施）に対するリトレシチニブの活性を K_m 値付近の ATP 濃度下で評価した。

1 µmol/L のリトレシチニブ濃度で 50%以上の阻害を示したキナーゼは 12 種あった。これらを含む 21 種について K_m 値付近の ATP 濃度下で IC_{50} を求めたところ，最も低値を示したキナーゼは BMX であり，IC_{50} は 29 nmol/L と同じ条件での JAK3 に対する IC_{50}（0.346 nmol/L）の 83.8 倍であった。また，1 mmol/L の ATP 濃度下でシステインを有する 10 種のキナーゼに対する IC_{50} を求めたところ，リトレシチニブは JAK3 の触媒ドメインの Cys909 と同じ位置にシステインを有するキナーゼを阻害する傾向が示された。これらは TEC ファミリーに属する TXK，TEC，BMX，BTK および ITK の 5 種であり，IC_{50} はそれぞれ 194，592，606，608 および 8510 nmol/L と同じ条件での JAK3 に対する IC_{50}（33.1 nmol/L）のそれぞれ 5.9，17.9，18.3，18.4 および 257 倍であった。他の 5 種のキナーゼ（BLK，EGFR，HER2，HER4 および MAP2K7）に対する選択性は，BLK で 601 倍，HER4 で 761 倍，EGFR，HER2 および MAP2K7 では 1511 倍超（IC_{50} はそれぞれ 19900 nmol/L，25200 nmol/L および 50000 nmol/L 超）であった。

4. 安全性薬理試験

一連の安全性薬理試験において，リトレシチニブを評価した。In vivo 試験では，臨床投与経路である経口投与を選択し（Table 7），リトレシチニブのマロン酸塩を使用した [redacted]GR139 試験および [redacted]GR140 試験ならびにトシル酸塩を使用した 180319.QHJ 試験以外の安全性薬理試験では遊離塩基を使用し，用量はいずれも遊離塩基換算値で表記した。

Table 7.　リトレシチニブの安全性薬理試験の概要

試験	試験番号	濃度または用量	GLP 適用	概要表
In vitro 試験				
hERG パッチクランプ試験	[redacted]GR206	1, 3, 10, 30 µmol/L	非適用	2.6.3.4
hERG パッチクランプ試験	180319.QHJ	0, 30, 100, 300 µmol/L	適用	2.6.3.4
In vivo 試験				
肺機能 – ラット				
RR，TV，MV	[redacted]GR139	0, 75, 175, 400 mg/kg[a]	適用	2.6.3.4
神経機能 – ラット				
FOB，BT，LA	[redacted]GR139	0, 75, 175, 400 mg/kg[a]	適用	2.6.3.4
心血管系 – ラット				
HR，BT，BP，身体活動	[redacted]LJ074	0, 125 mg/kg[c]	非適用	2.6.3.4
心血管系 – 覚醒イヌ				
ECG，HR，BP，LVP，身体活動	[redacted]GR078	0, 6, 20 mg/kg[b]	非適用	2.6.3.4
ECG，HR，BP，LVP，身体活動	[redacted]GR140	0, 3, 15, 45 mg/kg[a]	適用	2.6.3.4

a. 単回投与
b. 2 回投与
c. 3 回投与

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

4.1. CHO 細胞を用いた hERG カリウム電流に対する影響（GLP 非適用）

（[redacted]GR206，概要表 2.6.3.4）

CHO 細胞に安定的に発現させた hERG カリウムイオンチャネルに及ぼすリトレシチニブの影響を 1，3，10 および 30 µmol/L の濃度でプレーナーパッチクランプ法を用いて評価した。陽性対照にシサプリドを用いた。

リトレシチニブは 1，3，10 および 30 µmol/L の濃度で，hERG 電流の振幅をそれぞれ-0.2%，2.2%，5.0%および 12.9%阻害し，hERG 電流に対する IC_{50} は 30 µmol/L（8560 ng/mL）超であった。陽性対照であるシサプリドの IC_{50} は 58.0 nmol/L であった。

4.2. HEK293 細胞を用いた hERG カリウム電流に対する影響（GLP 適用）

（180319.QHJ，概要表 2.6.3.4）

HEK293 細胞に安定的に発現させた hERG カリウムイオンチャネルに及ぼすリトレシチニブの影響を 30，100 および 300 µmol/L の濃度でパッチクランプ法を用い，生理的温度付近（33°C～35°C）で評価した。陽性対照にテルフェナジン（60 nmol/L）を用いた。

リトレシチニブは 30，100 および 300 µmol/L の濃度で，hERG 電流の振幅をそれぞれ 2.7%，16.5%および 31.0%阻害し，100 µmol/L および 300 µmol/L では有意であった。リトレシチニブの hERG カリウム電流に対する IC_{50} は 300 µmol/L（85600 ng/mL）超であった。陽性対照であるテルフェナジンでは 78.8%の阻害がみられた。

4.3. ラットを用いた神経機能および肺機能の評価（GLP 適用）

（[redacted]GR139），概要表 2.6.3.4）

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

リトレシチニブを 0（0.5%メチルセルロース），75，175 または 400 mg/kg の用量で，雄の Wistar Han ラット（6 匹/群）に単回強制経口投与した。雄ラットの T_{max} 付近である投与約 1 時間後に FOB および体温測定を実施し，その直後にラットを活動モニタリングケージに入れ，自発運動量（水平および垂直行動）を 30 分間記録した。加えて，雄 Wistar Han ラット（6 匹/群）に，0，75，175 または 400 mg/kg を同様に投与し，全身プレチスモグラフィーを用いて投与後 240 分間の呼吸数，1 回換気量および分時換気量を評価した。

400 mg/kg まで，1 回換気量および分時換気量の変化，体温および自発運動の変化ならびに FOB に変化は認められなかった。

呼吸数の統計的に有意な増加（対照群との比較）が 400 mg/kg の投与後 240 分にのみ認められた。単一の時点でみられたこの平均値の高値は，同群の他の動物（86.7～146.7 呼吸/分）との比較から異常値の可能性が考えられる一例の結果（206.3 呼吸/分）によるものであった。また，試験期間を通じて記録した呼吸数にその他の影響はみられず，全般的な呼吸機能の指標となる分

時換気量にも変化は認められなかった。これらのことから，上述した呼吸数の増加はリトレシチニブに関連するものではないと判断した。

4.4. テレメトリーを用いた雄ラットにおける心血管系評価（GLP 非適用）

（[redacted]LJ074，概要表 2.6.3.4）

リトレシチニブを 0（1 N 塩酸で pH3 に調製した 0.5%メチルセルロース）または 125 mg/kg の用量で，雄 Wistar Han ラット（8 匹/群）に 3 日間 QD 強制経口投与し，心拍数，平均血圧，収縮期血圧，拡張期血圧，体温および自発運動量を投与前から投与後 24 時間まで記録した。試験 1 日および 3 日の投与後 1，3，7 および 24 時間にサテライト群の雄 3 匹（125 mg/kg）から採血し，血漿中リトレシチニブ濃度を測定した。

試験 1 日の投与後 2～4 時間に収縮期，拡張期および平均血圧のわずかな上昇（それぞれ+5.0, +4.4 および+4.7 mmHg）が認められ，投与後 4～20 時間もこれより程度は低いが高値（+2 mmHg 程度）が持続した。試験 1 日のリトレシチニブの C_{max} 値は 13,000 ng/mL，T_{max} は 1 時間であった。試験 3 日の投与後 4～20 時間に収縮期血圧のわずかな低下（-3.1～-4.2 mmHg）と，投与後 0～16 時間に平均血圧のわずかな低下（-1.6～-3.6 mmHg），投与後 0～2 時間に体温の低下（-0.5°C）が認められた。試験 3 日のリトレシチニブの C_{max} 値は 13,600 ng/mL，T_{max} は 1.7 時間であった。

4.5. テレメトリーを用いたイヌにおける心血管系評価（GLP 非適用）

（[redacted]GR078，概要表 2.6.3.4）

リトレシチニブをテレメトリーを埋め込んだ雄ビーグル犬（4 匹）に 0（1 N 塩酸で pH3 に調製した 0.5%メチルセルロース），6 および 20 mg/kg の用量で増量デザインを用いて 1 用量あたり 2 日間 QD 強制経口投与した（各用量の投与 1 日はそれぞれ試験 1 日，8 日および 15 日）。投与前約 1 時間から投与後約 22 時間まで記録を行った。投与前および投与後 4 時間に採血し，血漿中リトレシチニブ濃度を測定した。心血管系評価の後（試験 22 日），すべての動物に 20 mg/kg の用量で単回投与し，投与前ならびに投与後 1，2，4，7 および 24 時間に採血して血漿中リトレシチニブ濃度を測定した。

6 mg/kg および 20 mg/kg で投与 1 日および 2 日に心拍数の減少（-4～-7 bpm）が認められ，投与 3 日にも一過性の減少（-11～-12 bpm）がみられ，これに対応して RR 間隔が延長（+37～+144 msec）した。20 mg/kg では，投与 2 日および 3 日に収縮期血圧および平均血圧のわずかな低下（それぞれ-4～-7 mmHg および-3～-5 mmHg），投与 1，2 および 3 日に拡張期血圧のわずかな低下（-3～-4 mmHg）が認められた。これらの変化の程度は小さかったがリトレシチニブによるものと考えられた。また，投与 2 日には左室拡張終末期圧のわずかな低下（-3～-4 mmHg）が認められ，投与 1，2 および 3 日に QT 間隔の延長が認められたが，QTc の変化はなかったことから，この変化は心拍数の減少に伴う二次的変化と考えられた。すべての測定値は投与 5 日には対照群と同程度の値まで回復した。

20 mg/kg でのリトレシチニブの C_{max} 値および AUC_{24} 値はそれぞれ 8650 ng/mL および 24,700 ng•h/mL であり，T_{max} は 1.5 時間であった。心血管系評価中の投与後 4 時間におけるリトレシチニブの血漿中濃度は用量の増加に伴い増加し，20 mg/kg の値（1420 ng/mL）は PK 評価における同時点の値（1590 ng/mL）と同程度であった。

4.6. テレメトリーを用いたイヌにおける心血管系評価（GLP 適用）

（[redacted]GR140，概要表 2.6.3.4）

リトレシチニブをテレメトリーを埋め込んだ雄ビーグル犬（3 匹）に 0（0.5%メチルセルロース），3，15 および 45 mg/kg の用量でクロスオーバーデザインを用いて単回強制経口投与した。投与前約 1 時間から投与後約 24 時間まで記録を行った。投与前および投与後 4 時間に採血し，血漿中リトレシチニブ濃度を測定した。心血管系評価の後，すべての動物に 45 mg/kg の用量で単回投与し，投与前ならびに投与後 1，2，4，7 および 24 時間後に採血して血漿中リトレシチニブ濃度を測定した。

いずれの期間中も一般状態の変化は認められず，3 mg/kg または 15 mg/kg の投与後ではいずれのパラメータにも変化は認められなかった。45 mg/kg の投与後 0.5～3.5 時間にわずかな心拍数の増加（+15 bpm）が認められた。同じ時間帯に QT 間隔の短縮（-11 msec）も認められ，心拍数増加に伴う二次的変化と考えられた。心拍数で補正した QTc には明確な変化はみられなかった。

45 mg/kg でのリトレシチニブの C_{max} 値および AUC_{24} 値はそれぞれ 12,800 ng/mL および 64,200 ng•h/mL であり，T_{max} は 1.7 時間であった。心血管系評価中の投与後 4 時間におけるリトレシチニブの血漿中濃度は用量の増加に伴い増加し，45 mg/kg の値（5830 ng/mL）は PK 評価における同時点の値（7710 ng/mL）とほぼ同程度であった。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

リトレシチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察及び結論

実施した各種の薬効薬理試験および副次的薬理試験の成績から，リトレシチニブは JAK3 および TEC ファミリーキナーゼに対して高い選択性を有することが示され，細胞を用いた検討においてこれらのキナーゼに依存するシグナル伝達や機能を阻害した。リトレシチニブは，ATP 結合ポケットの H10 の位置にシステインを有するキナーゼと共有結合することにより不可逆的に阻害し，JAK3 および TEC ファミリーキナーゼに対してほぼ同程度の共有結合活性を示すことが示唆された。リトレシチニブは ATP 結合ポケット内の別の位置にシステインを有するキナーゼには共有結合せず，それらに対する阻害活性も弱かった。

リトレシチニブは，ラットの AIA モデルならびにマウスの化学物質誘発性 IBD モデル，T 細胞移入大腸炎モデルおよび EAE モデルといったげっ歯類の炎症性疾患モデルにおいて，炎症の抑制や疾患マーカーの改善，サイトカイン依存性の STAT リン酸化に対する阻害など in vivo での有効性を示した。また，リトレシチニブはマウスの AA モデルにおいて，全身投与により皮膚の炎症を改善し，発毛を回復させることが報告されている [1]。

リトレシチニブは副次的薬理試験において，Abl，EGFR および VEGFR2 を除く広範な受容体，トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素に対する作用を示さなかった。フォローアップとして実施した試験では，これらのキナーゼに対する IC_{50} は 30 µmol/L 超（ヒトに臨床用量である 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 27 倍以上に相当）であったことから，臨床で想定される濃度では阻害しないことが示された。

リトレシチニブは GLP 適用下で実施した hERG イオンチャネルに対する影響を評価した試験において，hERG 電流の振幅を 30，100 および 300 µmol/L の濃度でそれぞれ 2.7%，16.5%および 31.0%阻害しており，IC_{10} および IC_{50} はそれぞれ 30 µmol/L 超および 300 µmol/L 超であった。300 µmol/L 超はヒトに臨床用量である 50 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 273 倍以上に相当する。また，心血管系に対する影響を評価した安全性薬理試験および反復投与毒性試験のいずれにおいても，リトレシチニブによる QT の直接的な変化や QTc の延長はみられなかった。これらの in vitro および in vivo の安全性薬理試験の成績から，リトレシチニブは臨床で想定される濃度では QTc に対する影響を示さないことが示唆された。

In vivo の安全性薬理試験および反復投与毒性試験において，HR と BP に一貫性のない逆方向の変化が認められた。この原因については不明であるが，HR と BP への影響は軽微～軽度であり，いずれの毒性試験においても心臓や循環器系に病理組織学的な変化は認められなかった。

リトレシチニブのヒト循環血中の主代謝物である PF-07034562（M2）は，JAK1，JAK2，JAK3，TYK2 および TEC ファミリーキナーゼに対する阻害能を示さず，リトレシチニブの薬理活性に寄与しないことが示された。また，M2 はラットおよびイヌの血漿中にも認められたことから（2.6.4.5 項），実施した in vivo の安全性薬理試験ではこの代謝物についても評価されていると考えられる。

以上の包括的な非臨床薬理試験成績は，AA 患者へのリトレシチニブ投与の妥当性を裏付けているものと考える。

7. 図表

本文中の該当箇所に記載した。

参考文献

1 Dai Z, Chen J, Chang Y, et al. Selective inhibition of JAK3 signaling is sufficient to reverse alopecia areata. JCI Insight 2021;6(7):1-13.

2 Telliez JB, Dowty ME, Wang L, et al. Discovery of a JAK3-selective inhibitor: Functional differentiation of JAK3-selective inhibition over pan-JAK or JAK1-selective inhibition. ACS Chem Biol 2016;11(12):3442-51.

3 Saffran DC, Parolini O, Fitch-Hilgenberg ME, et al. Brief report: a point mutation in the SH2 domain of Bruton's tyrosine kinase in atypical x-linked agammaglobulinemia. NEJM 1994;330(21):1488-91.

4 Harling JD, Deakin AM, Campos S, et al. Discovery of novel irreversible inhibitors of interleukin (IL)-2-inducible tyrosine kinase (ITK) by targeting cysteine 442 in the ATP pocket. J Biol Chem 2013;288(39):28195-206.

5 Dowty ME, Jesson MI, Ghosh S, et al. Preclinical to clinical translation of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in rheumatoid arthritis. J Pharmacol Exp Ther 2014;348(1):165-73.

6 Kurosaki T. Regulation of BCR signaling. Mol Immunol 2011;48(11):1287-91.

7 Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. Stem Cells 1994;12(5):456-65.

8 Keegan AD, Johnston JA, Tortolani PJ, et al. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: Analysis of Janus kinase activation. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(17):7681-5.

9 Telliez, JB. White Paper: Analysis of Human Versus Dog and Human Versus Rat Sequence Homology of the Catalytic Domains of JAK3 and the TEC Kinase Family. Pfizer Inc., 2018.

10 Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. Blood. 2001;98(9):2720-5.

11 Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. J Biol Chem 1995;270(10):4979-82.

12 LaBranche TP, Jesson MI, Radi ZA, et al. JAK inhibition with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. Arthritis Rheum 2012;64(11):3531-42.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITION OF TERMS 2
2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW 5
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 8
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS 19
2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY 20

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITION OF TERMS

Abbreviations	Definitions
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AIA	adjuvant-induced arthritis
ATP	adenosine triphosphate
AUC_{24}	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours
BCR	B cell receptor
BID	dosed twice daily
BLK	B lymphocyte kinase
BMX	bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X protein
bpm	beats per minute
BT	body temperature
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CD	cyclin dependent
cd127	interleukin 7 gene
$CD45RB^{high}$	adoptive transfer of $CD4^{+}CD45RB^{high}CD25$ T cells from healthy to wild type mice
CHO	Chinese hamster ovary
cldn10	claudin 10 gene
C_{max}	maximum plasma concentration
DBP	diastolic blood pressure
DSS	dextran sulfate sodium
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPO	erythropoietin
ERBB4	human epidermal growth factor receptor 4
FGR	Src family of nonreceptor tyrosine kinases
fizz1	murine gene expressed in intestinal crypt epithelium and white adipose tissue
FLT	FMS-like tyrosine kinase
FOB	functional observational battery
foxp3	forkhead box P3 gene
GLP	Good Laboratory Practice
HCl	hydrochloric acid
HEK	human embryonic kidney
hERG	human ether-a-go-go gene
HT-29	human colonic epithelial cells
HPD	hours postdose
HR	heart rate
HSA	human serum albumin
IBD	inflammatory bowel disease
IC_{50}	50% inhibitory concentration
IFN	interferon
IL	interleukin

Abbreviations	Definitions
il1b	interleukin 1 beta gene
il2	interleukin 2 gene
ITK	interleukin-2-inducible T-cell kinase
JAK	Janus kinase
KDR	kinase insert domain receptor
K_i	equilibrium dissociation constant
K_{inact}	inactivation rate constant
klrk1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 gene
K_m	Michaelis constant (substrate concentration at which the reaction is half its maximum rate)
LA	locomotor activity
LPS	lipopolysaccharide
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
ltf	lactoferrin gene
LV + dP/dT max	maximum rate of rise in left ventricular pressure
LV-EDP	left ventricular end diastolic pressure
LV-SP	left ventricular systolic pressure
LYN	tyrosine protein kinase encoded by the LYN gene
M	male
M#	metabolite
MBP	mean blood pressure
MMS	mean maximum score
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	multiple sclerosis
MV	minute volume
N	number of animals/repeats
NA	not applicable
NK	natural killer
OC_{50}	50% occupancy concentration
PAE	porcine aortic endothelial
PAE-KDR	PAE cells transfected with KDR gene (also known as vegfr-2)
PBMC(s)	peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	phosphate buffered saline
PD	pharmacodynamic
PD-L1	programmed death ligand
prf1	perforin 1 gene
PR-I	PR-interval
pSTAT	phosphorylated STAT
PWRDM	Pfizer Worldwide Research, Development & Medical
QD	once per day
QRS-I	QRS-interval
QTc	corrected QT interval
QT-I	QT-interval
RLK	resting lymphocyte kinase

Abbreviations	Definitions
RR	respiratory rate
RR-I	RR-interval
SBP	systolic blood pressure
SLK	ste20-like kinase
SOCS	suppressors of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TEC	tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma
Th	t helper cell
THP-1	human leukemia monocytic cell line
T_{max}	time to reach peak (maximum) concentration following drug administration
TNBS	2, 4, 6 trinitrobenzene sulfonic acid
TNF	tumor necrosis factor
TPO	thrombopoietin
TV	tidal volume
TXK	tyrosine protein kinase encoded by the TXK gene
TYK	tyrosine kinase
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Ritlecitinib

Type of Study	Species/Strain or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics					
Biochemical potency of ritlecitinib: Inhibition of JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2 kinases	Human recombinant enzymes	In Vitro	No	PWRDM[a]	PF-06651600_[redacted]_184021
Activity of ritlecitinib in kinase selectivity panel assays	Human recombinant enzymes	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_151236
Biochemical potency of ritlecitinib metabolite; M2 (PF-07034562): inhibition of JAK and TEC family kinases	Human recombinant enzymes	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_123643
Covalent modification kinetics of ritlecitinib for JAK3 and off-target kinases	Human recombinant enzymes	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_184157
Reactivity of ritlecitinib with recombinant HSA	Human recombinant serum albumin	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_101033
Potency and selectivity of ritlecitinib: effect on cytokine-dependent STAT phosphorylation	Human PBMCs	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_184605
Effect of ritlecitinib on cytokine-dependent STAT Phosphorylation	Leukocytes in human whole blood	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_184417
Inhibition of cytokine-dependent pSTAT in rat and dog whole blood	Leukocytes in rat and dog whole blood	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_102317
Effects of ritlecitinib on LPS-Induced Cytokine Production	Human monocytes and macrophages	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_185220
Effects of ritlecitinib on TNF and IL-1b signaling	Human macrophages	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_185307
Effects of ritlecitinib on cellular differentiation	human Th1, Th17 and B cells	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_044630
Effect of ritlecitinib on B cell receptor and T cell receptor mediated CD69 upregulation	Human PBMCs and CD4+ T Cells	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_023747

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Ritlecitinib

Type of Study	Species/Strain or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Effects of ritlecitinib on human NK cell and CD8+ T cell functional activity	Human NK and CD8+ T Cells	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_011358
Effect of ritlecitinib on IL-4, IL-13, IL-22, and IL-31 induced STAT phosphorylation in cellular assays	HT-29 and THP-1 cells, human whole blood, primary keratinocytes, and primary intestinal epithelial cells	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06700841_[redacted]_090414
Measurement of JAK3 and TEC kinase family occupancy by ritlecitinib	Human PBMC lysate	In Vitro	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_023828
Effect of ritlecitinib on thrombopoietin and IL-6 signaling and cell expansion	Megakaryocyte precursor cells	In Vitro	No	PWRDM[b]	CP-690550_[redacted]_094745
Effects of ritlecitinib on thrombopoietin clearance	Human platelets	In Vitro	No	PWRDM[b]	CP-690550_[redacted]_033455
Efficacy, biomarker identification, and PD evaluation in rats	Rat AIA model	Oral Gavage	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_090652
Efficacy, biomarker identification, and target modulation in mice	DSS-and TNBS-induced Mouse IBD model	Oral Gavage	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_181316
Efficacy in a T-cell transfer mouse model	CD45RB^{high} induced Mouse IBD model	Oral Gavage	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_100542
Efficacy in the EAE Mouse	MS Mouse model	Oral Gavage	No	PWRDM[b]	PF-06651600_[redacted]_085612
Secondary Pharmacodynamics					
Ligand binding, cellular and nuclear receptor functional, enzyme, and uptake assays	Cloned cells, cell membranes	In Vitro	No	[redacted][c]	100009194
Functional cell-based assay for VEGFR2 phosphorylation	Porcine aortic endothelial cells overexpressing kinase insert domain receptor (PAE-KDR)	In Vitro	No	[redacted][d]	PF-06651600-00-0010 pVEGFR_[redacted]-20[redacted]
Z'-LYTE® kinase screening assay	Panel of various protein kinases	In Vitro	No	[redacted][c]	4647_31278
Activity of ritlecitinib in kinase selectivity panel assays	Panel of various protein kinases	In Vitro	No	[redacted][c]	PF-06651600_[redacted]_151236

2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: Ritlecitinib

Type of Study	Species/Strain or Test System	Method of Administration	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
Safety Pharmacology					
hERG Assay	CHO cells	In Vitro	No	PWRDM[a]	[redacted]GR206
hERG Assay	HEK293 cells	In Vitro	Yes	[redacted][f]	180319.QHJ
Neurofunctional and Pulmonary Function	Wistar Han rats	Oral Gavage[g]	Yes	PWRDM[a]	[redacted]GR139
Cardiovascular	Wistar Han rats	Oral Gavage[h]	No	PWRDM[i]	[redacted]LJ074
Cardiovascular	Radio-telemetry implanted Beagle dogs	Oral Gavage[j]	No	PWRDM[a]	[redacted]GR078
Cardiovascular	Radio-telemetry implanted Beagle dogs	Oral Gavage[j]	Yes	PWRDM[a]	[redacted]GR140
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Studies not conducted.					

a. Groton, CT.
b. Cambridge, MA.
c. [redacted], France.
d. [redacted], MA.
e. [redacted], NY; [redacted], MA; [redacted], France.
f. [redacted], OH.
g. Single dose.
h. 3 doses.
i. La Jolla, CA.
j. 2 doses.

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600_[redacted]_184021					
Biochemical potency of ritlecitinib: kinase inhibition using recombinant enzymes	Human	In Vitro	0.0001 to 10 µM	N = 7 to 16	**Ritlecitinib IC_{50} nM (ng/mL)** **JAK1**: K_m for ATP: 1640 (468); 1 mM ATP: >9710 (>2770) **JAK2**: K_m for ATP: 1510 (431); 1 mM ATP: >10000 (>2850) **JAK3**: K_m for ATP: 0.346 (0.0987); 1 mM ATP: 33.1 (9.44) **TYK2**: K_m for ATP: 3780 (1080); 1 mM ATP: >10000 (>2850)
Report Number: PF-06651600_[redacted]_151236					
Activity of ritlecitinib in kinase selectivity panel assays using recombinant enzymes	Human	In Vitro	1 µM	305 kinases	No inhibition >50% for all kinases evaluated except for those shown below (corresponding IC_{50} values included). **BMX**: Ritlecitinib % Inhibition: 97.0; IC_{50} nM (ng/mL)[a]: 29.0 (8.27) **JAK3**: 96.0; 0.346 (0.0987) **TXK**: 94.6; 34.5 (9.84) **EGFR**: 94.4; 2160 (616) **ERBB4**: 91.1; 257 (73.3) **LRRK2**: 86.9; 401 (114) **ITK**: 85.1; 8510 (2430)[b] **BLK**: 81.6; 315 (89.9) **TEC**: 76.3; 219 (62.5) **BTK**: 68.9; 38.2 (10.9) **SLK**: 60.7; 1060 (302) **LYN-B**: 55.2; 21300 (6080) **LYN-A**: 52.7; 15800 (4510) **FGR**: 52.6; 21600 (6160)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600_[redacted]_123643					
Biochemical potency of Ritlecitinib metabolite; M2 (PF-07034562): kinase inhibition using recombinant enzymes	Human	In Vitro	100 pM to 10 µM	N = 17	**M2 (PF-07034562) IC_{50} nM (ng/mL)** **JAK1**: >9890 (>4020) **JAK2**: >10000 (>4070) **JAK3**: >10000 (>4070) **TYK2**: >10000 (>4070) **BMX**: >10000 (>4070) **BTK**: >10000 (>4070) **ITK**: >10000 (>4070) **TEC**: >10000 (>4070) **TXK**: >10000 (>4070)
Report Number: PF-06651600_[redacted]_184157					
Covalent modification of JAK3 and potential off-target kinases by ritlecitinib using recombinant enzymes	Human	In Vitro	0.0185 to 1.5 µM	NA	**Ritlecitinib** **BMX**: k_{inact} 0.00564 (s^{-1}); K_i 545 (156) nM (ng/mL) **JAK3**: 2.32; 6310 (1800) **ITK**: 0.000144; 26.9 (7.68) **TXK**: 0.000487; 131 (37.4) **BLK**: 0.0278; 32400 (9250) **TEC**: 0.00156; 679 (194) **BTK**: 0.124; 62300 (17800) **SLK**: --[c]; 263 (75.0) **FGR**: --[c]; >1000 (285) **FLT3**: --[c]; >1000 (285)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600 [redacted] 101033					
Reactivity of ritlecitinib with recombinant HSA	Human	In Vitro	1 to 320 µM	NA	Ritlecitinib displayed a low propensity to react with HSA with no detectable adduct formation after 3 hours incubation at 37°C with HSA. Only minor adduct formation was detected under the same conditions but after 22 hours incubation.
Report Number: PF-06651600 [redacted] 184605					
Cellular potency and selectivity of ritlecitinib: effect on cytokine-dependent pSTAT in PBMCs and $CD34^+$ progenitor cells	Human	In Vitro	0.0001 to 60 µM	N = 1 to 13	**Ritlecitinib**

Cytokine	IC_{50} nM (ng/mL)
JAK1/TYK2 Signaling Pair	
IFNα	12100 (3450)
IL-10	>60000 (>17100)
JAK1/JAK3 Signaling Pair	
IL-15	51.7 (14.8)
JAK1/JAK2/TYK2 Signaling Pair	
IL-27	17800 (5080)
JAK2/JAK2 Signaling Pair	
EPO	>20000 (>5710)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600 [redacted] 184417					
Effect of ritlecitinib on cytokine-dependent pSTAT in whole blood	Human	In Vitro	0.001 to 60 μM	N = 1 to 11	**Ritlecitinib** **Cytokine** / **IC50 nM (ng/mL)** **JAK1/TYK2 Signaling Pair** IFNα: >60000 (>17100) IL-10: >60000 (>17100) **JAK1/JAK2/TYK2 Signaling Pair** IL-6[d]: >20000 (>5710) IL-27: >60000 (>17100) **JAK1/JAK3 Signaling Pair** IL-15: 198 (56.5) IL-21: 362 (103) **JAK1/JAK2 Signaling Pair** INFγ: >20000 (>5710) **JAK2/TYK2 Signaling Pair** IL-12: >20000 (>5710) IL-23: >20000 (>5710) **JAK2/JAK2 Signaling Pair** EPO: >20000 (>5710)
Report Number: PF-06651600 [redacted] 102317					
Effect of ritlecitinib on pSTAT induced by IL-15 and IL-21	Rat and Dog	In Vitro	0.0003 to 20 μM	N = 2 to 3	**Ritlecitinib** **Cytokine** / **IC50 nM (ng/mL)** — **Rat** / **Dog** **JAK1/JAK3 Signaling Pair** IL-15: 137 (39.1) / 170 (48.5) IL-21: 302 (86.2) / 212 (60.5)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600_[redacted]_185220					
Effect of ritlecitinib on LPS-induced proinflammatory cytokine secretion by monocyte derived macrophages	Human	In Vitro	0.0039 to 15 µM	N = 1 to 13	In primary human macrophages, IL-10 is required to suppress IL-1β, IL-6, and TNFα production in response to LPS, and JAK3 selective inhibition with ritlecitinib had no effect on IL-10 signaling.
Report Number: PF-06651600_[redacted]_185307					
Effect of ritlecitinib on TNFα and IL-1β signaling in IL-27 primed macrophages	Human	In Vitro	1 to 20 µM	N = 1 to 2	IL-27 attenuates both TNFα and IL-1β induced IL-8 transcription, promotes SOCS1 mRNA levels, and induces both PD-L1 mRNA and surface expression following TNFα stimulation. In the presence of ritlecitinib, IL-8 mRNA suppression is maintained (sparing IL-27 function in TNFα and IL-1β stimulated human macrophages) along with maintenance of SOCS1 and PD-L1 transcripts, and PD-L1 surface expression.
Report Number: PF-06651600_[redacted]_044630					
Ritlecitinib effects on differentiation of Th1, Th17, and B cells	Human	In Vitro	0.00034 to 20 µM	N = 2 to 4	**Ritlecitinib** **Cytokine** / **IC_{50} nM (ng/mL)** **Th1 Cells** IFNγ during differentiation: 34.0 (9.70) IFNγ post differentiation: 49.0 (14.0) **Th17 Cells** IL-17A during differentiation: 211 (60.2) IL-17A post differentiation: 278 (79.3) **B Cells** IgG production: 86.0 (24.5)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600 [redacted] 023747					
Effect of ritlecitinib on BCR- and TCR-induced CD69 upregulation	Human	In Vitro	0.0003 to 20 μM	N = 3 to 8	In cellular settings, ritlecitinib inhibited BCR- and TCR-mediated CD69 upregulation with IC_{50} values of 344 nM (98.2 ng/mL) and 380 nM (108 ng/mL), respectively.
Report Number: PF-06651600 [redacted] 011358					
Activity of ritlecitinib: inhibition of NK and CD8+ T cell function in PBMCs	Human	In Vitro	0.0015 to 30 μM	N = 4 to 9	Ritlecitinib inhibited degranulation as measured by surface modulation of CD107a and intracellular IFNγ production in NK cells with IC_{50} values of 509 nM (145 ng/mL) and 188 nM (53.6 ng/mL), respectively, as well as in CD8+ T cells with IC_{50} values of 210 nM (59.9 ng/mL) and 188 nM (53.6 ng/mL), respectively.
Report Number: PF-06700841 [redacted] 090414					
Effect of ritlecitinib on pSTAT in IL-4, IL-13, IL-22, and IL-31 induced whole blood, primary keratinocytes, primary intestinal epithelial, HT-29, and THP-1 cells	Human	In Vitro	0.0003 to 30 μM	N = 2 to 7	**Ritlecitinib**

Whole Blood Cell Type	IC_{50} nM (ng/mL)
B Cells[e]	
IL-4	1000 (285)
IL-13	>20000 (>5710)
T Cells[e]	
IL-4	226 (64.5)
Monocytes[e]	
IL-4	>20000 (>5710)
IL-13	>20000 (>5710)
Primary Keratinocytes[f]	
IL-22	>20000 (>5710)
Primary Intestinal Epithelium[f]	
IL-22	>20000 (>5710)
HT-29 Cells[e]	
IL-4	>20000 (>5710)
IL-13	>20000 (>5710)
THP-1 Cells[f]	
IL-31	4410 (1260)

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600 [redacted] 023828					
JAK3 and TEC kinase cellular occupancy of ritlecitinib in PBMCs	Human	In Vitro	0.003 to 10 µM	N = 4 to 5	**Ritlecitinib** Cytokine / OC50 nM (ng/mL) JAK3: 73.0 (20.8) BTK: 89.0 (25.4) BMX: 67.0 (19.1) ITK: 176 (50.2) RLK (TXK): 161 (45.9) TEC: 58.0 (16.6)
Report Number: CP-699550 [redacted] 094745					
Effect of ritlecitinib on TPO and IL-6 signaling, and CD41a^{+} cell expansion in megakaryocyte precursor cells	Human	In Vitro	0.0003 to 20 µM	N = 2	**Ritlecitinib** Precursor Cell / IC50 nM (ng/mL) TPO-induced pSTAT5: >20000 (>5710) IL-6-induced pSTAT3: >20000 (>5710) Expansion of CD41a^{+} cells: >20000 (>5710)
Report Number: CP-690550 [redacted] 033455					
Effects of ritlecitinib on clearance of TPO by platelets	Human	In Vitro	0.003 to 20 µM	N = 3 donors	Dose-dependent TPO clearance with IC_{50} value of >20000 nM (5710 ng/mL) which correlates with the inhibition of JAK2 kinase activity (IC_{50} = >10000 nM[g]).

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600_[redacted]_090652					
Efficacy, biomarker identification, and PD evaluation in arthritic rats	Lewis Rat (AIA Model)	Oral Gavage	0.1, 0.3, 1, 3, 6, 10, 15, 30, or 80 mg/kg QD for 7 days[h]	Female (n = 5 to 10)	Ritlecitinib dose-dependently inhibited pSTAT3 induced by IL-21 (>80%) in T-cells and monocytes at all dose levels. The effect of pSTAT1 formation by IFNα was ≤20% in T-cells and monocytes at 6 and 15 mg/kg but increased to 60% at 80 mg/kg. IL-10 mediated pSTAT3 in monocytes was inhibited similarly to the IFNα effect. Once-daily 7-Day oral dosing with ritlecitinib resulted in a dose-dependent reduction in paw swelling as low as 3 mg/kg and was dependent on the daily C_{av} of ritlecitinib. **Ritlecitinib Plasma Concentrations and Paw Swelling Change (Mean)**

Dose (mg/kg)	C_{av} nM (ng/mL)	Paw Swelling Change (%)
0.1	39.9 (11.4)	7.35
0.3	19.1 (5.44)	47.9
1	111 (31.7)	20.7
3	194 (55.4)	66.5
6	234 (66.8)	66.6
10	638 (182)	59.3
15	827 (236)	50.4
30	2260 (645)	80.8
80	3880 (1110)	105

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600_[redacted]_181316					
Efficacy, PD, biomarker identification, and target modulation in DSS-and TNBS-induced mice	C57Bl/6 Mouse (IBD Models)	Oral Gavage	3, 10, 30, or 100 mg/kg BID for 3 to 11 days	Female (n = 10)	When dosed at 10 mg/kg BID, ritlecitinib improved IBD markers of disease with a decrease of pSTAT3 in the colon of mice treated at 10 mg/kg and both pSTAT3 and pSTAT5 in the colons of mice treated with the 30 mg/kg. Ritlecitinib also inhibited JAK3 selectively, where all doses decreased pSTATs when stimulated by IL-15 and IL-21, while having no effect on the pSTATs when stimulated with IL-10 or IL-27, which are believed to have a protective effect in IBD.

Mean Ritlecitinib Plasma Concentrations

Dose (mg/kg)	Peak nM (ng/mL)	Trough nM (ng/mL)
3	1880 (536)	3.50 (0.999)
10	2990 to 17200 (853 to 4910)	0 to 102 (0 to 29.1)
30	19300 to 29000 (5510 to 8270)	0 to 233 (0 to 66.5)
100	32800 to 50800 (9360 to 14500)	130 to 404 (37.1 to 115)
Peak = 0.25 hours post dosing. Trough = 16 hours post dosing.		

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Report Number: PF-06651600 [redacted] 100542					
Efficacy in CD45RB^{high} induced mice	BALB/cBy and C.B-17/prkdc scid/scid Mouse (IBD Model)	Oral Gavage	20 or 60 mg/kg BID for 31 days	Female (n = 10)	Treatment with ritlecitinib at 20 mg/kg and 60 mg/kg significantly improved disease scores at Days 27-31, with no effect on weight change. Colon weight and length, lymph node cell count, and inflammation severity were not significantly affected at either dose. T-regulatory cell genes, Foxp3 was decreased at both doses, while ltf, fizz1, and il1b were reduced at the 20 mg/kg dose and cd127, cldn10, prf1, il2 and klrk1 were reduced at the 60 mg/kg dose.

Mean Ritlecitinib Serum Concentrations

Dose (mg/kg)	Peak nM (ng/mL)	Trough nM (ng/mL)
20	15700 (4480)	7.18 (2.05)
60	35700 (10200)	4.52 (1.29)
After 35 days of dosing. Peak = 0.25 hours post dosing. Trough = 24 hours post dosing.		

Report Number: PF-06651600 [redacted] 085612

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

System Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration/ Doses	N/ Sex	Noteworthy Findings
Efficacy and PD in MS induced mice	C57BL/6 Mouse (EAE Model)	Oral Gavage	20 and 60 mg/kg (prophylactically) BID for 28 Days 30 and 100 mg/kg (therapeutically) BID for 14 Days	Female (n = 10 or 15)	When dosed prophylactically at 20 or 60 mg/kg, ritlecitinib was efficacious at postponing EAE onset and decreasing disease severity in a dose-dependent manner as measured by MMS, average end clinical score, percent incidence of EAE, median day of onset, average end weight change, and spinal cord histopathology readouts of neuroinflammation, neurodegeneration, and demyelination. When dosed therapeutically at 30 and 100 mg/kg/dose for 14 days from the day of EAE onset, ritlecitinib was efficacious at decreasing disease severity and improving recovery as described above. Ritlecitinib lowered pSTAT1, pSTAT3, and pSTAT5 in the spinal cords of mice. **Ritlecitinib Mean Plasma Concentrations** **Dose (mg/kg)** / **Peak nM^ (ng/mL)** / **Trough nM (ng/mL)** 30 / 40400 (11500) / 24.2 (6.91) 100 / 99500 (28400) / 156 (44.5) Peak = 0.25 hours post dosing. Trough = 10 hours post dosing. ^ Corresponding total brain concentrations were 1190 and 3780 nM, respectively.

Note: None of these studies are GLP compliant. A molecular weight of 285.34 g/mol for ritlecitinib and 406.50 g/mol for PF-07034562 (M2) were used to convert nM to ng/mL where noted.
a. IC_{50} determined at K_m for ATP.
b. IC_{50} determined at 1 mM ATP.
c. Non-covalent inhibition.
d. Value determined from phosphorylation of both STAT1 and STAT3.
e. Value determined from phosphorylation of STAT6.
f. Value determined from phosphorylation of STAT3.
g. IC_{50} value obtained from the study report PF-06651600_[redacted]_184021.
h. A single dose at 6, 15, or 80 mg/kg was administered in the target modulation studies.

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Test Article: Ritlecitinib

Type of Test	Test Cells/Tissues	Method of Administration	Concentration	Results	GLP Compliance	Report Number
Ligand binding, cellular and nuclear receptor functional, enzyme, and uptake assays	Cloned cells, cell membranes	In Vitro	10 µM	No >50% of a maximal inhibitory response except for Abl kinase (IC_{50} = 2800 nM) EGFR kinase (IC_{50} = 2200 nM) VEGFR2 kinase (IC_{50} = 1300 nM)	No	100009194
Functional VEGFR2 follow-up assay	PAE-KDR cells	In Vitro	Up to 30 µM	No inhibition	No	PF-06651600-00-0010 pVEGFR_[redacted]-20[redacted]
Kinase selectivity panel assays	Recombinant proteins	In Vitro	Up to 30 µM (1 mM ATP)	IC_{50} >30 µM for Abl kinase inhibition	No	4647_31278
Kinase selectivity panel assays	Recombinant proteins	In Vitro	Up to 50 µM (1 mM ATP)	IC_{50} >50 µM for EGFR inhibition	No	PF-06651600_[redacted]_151236

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Ritlecitinib

In Vitro

Type of Test	Test Cells/Tissues	Test Concentration (µM)	Results	GLP Compliance	Study Number
Planar patch-clamp	CHO cells stably expressing hERG	1, 3, 10, 30[a]	-0.2%, 2.2%, 5%, and 12.9% inhibition of hERG current at 1, 3, 10, and 30 µM, respectively. IC_{50} >30 µM	No	[redacted]GR206
Patch-clamp	HEK293 cells stably expressing hERG	0, 30, 100, 300[b]	2.7%, 16.5%*, and 31%* inhibition of hERG potassium current at 30, 100, and 300 µM, respectively. IC_{50} >300 µM	Yes	180319.QHJ

* p ≤0.05 significantly different from control based on appropriate trend or pairwise comparison. A full description of the statistical decision tree can be found in the final report for this study.
a. This study utilized the free base (PF-06651600-00).
b. This study utilized the tosylate salt (PF-06651600-15).

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Ritlecitinib

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Pulmonary TV, RR, MV	Rat/Wistar Han	Oral gavage, QD 10 mL/kg (0.5% [w/v] Methylcellulose) Lot [redacted][b]	0, 75, 175, 400 (single dose)	6M	None	Yes	[redacted]GR139
Neurofunctional FOB, BT, LA	Rat/Wistar Han	Oral gavage, QD 10 mL/kg (0.5% [w/v] Methylcellulose) Lot [redacted][b]	0, 75, 175, 400 (single dose)	6M	None	Yes	[redacted]GR139
Cardiovascular HR, SBP, DBP, MBP, activity, BT	Rat/Wistar Han	Oral gavage, QD 10 mL/kg (0.5% [w/v] Methylcellulose adjusted to pH 3) Lot [redacted][c]	0, 125 (3 doses)	8M	**125 mg/kg:** ↑ SBP, ↑ DBP, ↑ MBP (Day 1); ↓ BT, ↓ SBP, ↓ MBP (Day 3)	No	[redacted]LJ074

Cardiovascular Study ([redacted]LJ074) Toxicokinetic Parameters:

Dose (mg/kg/day)	0	125
Day 1		
C_{max} (ng/mL)	NA[d]	13000
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[d]	33400
T_{max} (h)	NA[d]	1.00
Day 3		
C_{max} (ng/mL)	NA[d]	13600
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[d]	39900
T_{max} (h)	NA[d]	1.67

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Ritlecitinib

In Vivo

Organ Systems Evaluated	Species/Strain /Model	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular RR-I, PR-I, QRS-I, QT-I, QTc, HR SBP, DBP, MBP LV-SP, LV-EDP, LV + dP/dT max Activity	Dog/Beagle/ Ambulatory telemetry	Oral gavage, QD 5 mL/kg, (0.5% [w/v] Methylcellulose adjusted to pH 3 with 1N HCl) Lot [redacted][c]	0, 6, 20 (2 doses)[e]	4M	**≥6 mg/kg:** ↓ HR, ↑ RR-I, ↑ QT-I **20 mg/kg:** ↓ SBP, ↓ MBP, ↓ DBP, ↓ LV-EDP	No	[redacted]GR078

Cardiovascular Study ([redacted]GR078) Toxicokinetic Parameters:

Dose (mg/kg)	0	6	20
C_{max} (ng/mL)	NA[f]	NA[f]	8650
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[f]	NA[f]	24700
T_{max} (h)	NA[f]	NA[f]	1.50
Plasma Concentration (ng/mL) (4 HPD)	NA[g]	393	1590

2.6.3.4 SAFETY PHARMACOLOGY

Test Article: Ritlecitinib

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration (Vehicle) Test Article Lot Number	Doses[a] (mg/kg)	Number/ Sex/Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular[h] RR-I, PR-I, QRS-I, QT-I, QTc, HR SBP, DBP, MBP LV-SP, LV-EDP, LV + dP/dT max Activity	Dog/Beagle/ Ambulatory telemetry	Oral gavage, QD 5 mL/kg (0.5% [w/v] Methylcellulose) Lot [redacted][b]	0, 3, 15, 45 (single dose)	3M	**45 mg/kg:** ↑ HR (15 bpm; 0.5-3.5 HPD), ↓ QT-I (-11 msec; 0.5-3.5 HPD)	Yes	[redacted]GR140

Cardiovascular Study ([redacted]GR140) Toxicokinetic Parameters:

Dose (mg/kg)	0	3	15	45	45[f]
C_{max} (ng/ml)	NA[g]	NA[g]	NA[f]	NA[f]	12800
AUC_{24} (ng•h/mL)	NA[g]	NA[g]	NA[f]	NA[f]	64200
T_{max} (h)	NA[g]	NA[g]	NA[f]	NA[f]	1.7
Plasma Concentration (ng/mL) (4 HPD)	NA[i]	187	1570	5830	7710

a. Single dose unless specified otherwise.
b. This study utilized the malonate salt (PF-06651600-25).
c. This study utilized the free base (PF-06651600-00).
d. Samples not collected.
e. Animals were dosed in an escalation study design during cardiovascular portion of the study.
f. Plasma samples obtained for toxicokinetic analyses during the toxicokinetic leg of the study.
g. Parameter not measured during the cardiovascular leg of the study.
h. Animals were dosed in a cross-over study design during cardiovascular portion of the study.
i. All samples below assay limit of quantitation (1 ng/mL).