2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語（略称）	内　容
ACD	慢性疾患に伴う貧血
ACVR1	アクチビン A 受容体 1 型
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson
BMP	骨形成タンパク質
Caco-2	ヒト結腸癌由来細胞株
Cmax	最高血漿中濃度
EC50	50%有効濃度
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
HR	心拍数
IC50	50%阻害濃度
IL	インターロイキン
IRAK1	インターロイキン-1 受容体関連キナーゼ 1
JAK	Janus キナーゼ
Kd	解離定数
MF	骨髄線維症
MMB	モメロチニブ
MPN	骨髄増殖性腫瘍
PAI	薬理活性比
PBMC	末梢血単核細胞
PG-APS	Peptidoglycan And Group A-specific Polysaccharide
QTc	補正 QT
STAT	シグナル伝達兼転写活性化因子
THTR	チアミントランスポーター
TPO	トロンボポエチン
TR-FRET	時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法
TYK	チロシンキナーゼ

2.6.1. 緒言

モメロチニブ（以下、MMB）は、経口投与可能な、Janus キナーゼ（JAK）の JAK1 及び JAK2 並びにアクチビン A 受容体 1 型（ACVR1）／アクチビン受容体様キナーゼ 2（ALK2）の強力な低分子阻害剤であり、骨髄線維症（MF）の治療に用いられる。表 2.6.1-1 に、薬理及び毒性試験で用いた MMB とその主要代謝物を参照するためのコード及び定義を示した。

表 2.6.1-1 MMB 及びその代謝物を参照するために用いられる ID コード

ID Code	MMB or Metabolite
GSK3070785	MMB
CYT112	MMB
CYC-11387	MMB
CYC11387	MMB
CYT-387	MMB
CYT387	MMB
GS-0387	MMB
GS-0387-01	MMB
GS0387	MMB
GS-606178	MMB
SRA0387	MMB
SRA038701	MMB
GS-698033	Metabolite M8
GS-644066	Metabolite M14
GS-701820	Metabolite M15
GS-649413	Metabolite M16
ID コードなし	Metabolite M17
GS-642112	Metabolite M19
GS-645348	Metabolite M20
GS-644603	Metabolite M21

MMB は、他の JAK 阻害薬（例、ルキソリチニブ、フェドラチニブ、パクリチニブ）と同様、MF の病因で臨床症状の発現に深く関与する JAK-STAT シグナル伝達経路の恒常的な活性化を阻害する。上記の JAK 阻害薬とは異なり、MMB は ACVR1-SMAD シグナル経路を阻害し、ACVR1 を介したヘプシジンの肝発現を抑制する。その結果、血中ヘプシジンが減少し、赤血球造血に必要な鉄利用能が増加する。この特性により、MMB は MF の重要な予後不良因子で quality of life と逆相関する貧血及び赤血球輸血依存に対して有効性を示す。更に、輸血に依存しない状態の維持又は輸血に依存しない状態への回復は、MMB を投与された MF 患者の全生存期間の改善と関連している。

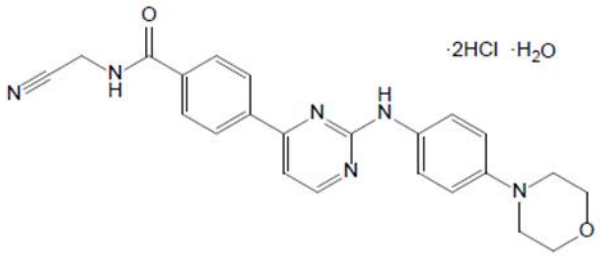


図 2.6.1-1　　MMB（二塩酸塩一水和物）の構造式

MMB（二塩酸塩一水和物）の臨床用量は、最大 200 mg を 1 日 1 回経口投与であり、忍容性に基づき投与の中止又は減量を行う。MF 患者は主に高齢者であり、診断時年齢の中央値は 66 歳である[Tefferi, 2012]。

2.6.1.1.　　非臨床試験開発計画

非臨床試験は、「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン（ICH S9）」、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス［ICH M3（R2）］」、及び低分子化合物の開発に関連するその他の ICH ガイダンスに従って実施した。

MMB の薬理作用は、JAK1、JAK2 及び ACVR1/ALK2 に対する阻害作用及び選択性を in vitro 酵素阻害試験により検討した。骨髄増殖性疾患を有するマウス及び貧血を有するラットモデルを用いて薬理作用を評価した。また、MMB の安全性薬理試験として、中枢神経系、呼吸系及び心血管系への影響を評価するための試験を実施した。

MMB の薬物動態は、吸収、分布、代謝及び排泄に関する in vitro 試験並びにマウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた in vivo 試験（一部毒性試験を含む）により検討した。

MMB の毒性は、マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いた単回投与試験、並びにマウス（最長 8 週間）、ラット（最長 26 週間投与、休薬 10 週間）及びイヌ（最長 39 週間投与、休薬 6 週間）を用いた反復経口投与試験により評価した。また、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、in vitro 皮膚刺激性試験、ex vivo ウシ角膜毒性試験、in vitro 光毒性試験及びマウスの局所リンパ節試験を実施した。MF は主に高齢者に認められる疾患であるが、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施し、受胎能、妊娠及び小児への影響を評価した。不純物の安全性は、ラットを用いた 4 週間反復投与経口試験及び in vitro の細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）により評価した。多くの毒性試験において代謝物の測定を実施し、MMB の安全性プロファイルに及ぼす影響を評価した。

安全性薬理試験及び主要な毒性試験はいずれも経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従い、OECD 加盟国で実施した。主要な試験以外の試験は、試験実施施設の標準操作手順書に従って実施した。

これらの試験の詳細は、2.6.2 から 2.6.7 に記載した。

2.6.1.2. 参考文献

Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the Mayo Clinic experience. Mayo Clin Proc. 2012;87(1):25-33.

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.2.1. まとめ

モメロチニブ（以下、MMB）の効力、選択性及び有効性を検討するため、in vitro 及び in vivo 薬理試験を実施した。2.6.1 の表 2.6.1-1 に、MMB 及びその主要代謝物を記述するために用いたコード及び定義を示した。

2.6.2.1.1. 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1. In vitro 試験

2.6.2.1.1.1.1. 酵素アッセイ

- MMB は野生型 Janus キナーゼ（JAK）1 及び JAK2 の強力な阻害薬であり、50%阻害濃度（IC50）はそれぞれ 30 及び 3.8 nM である。MMB は骨髄増殖性腫瘍（MPN）の原因となる JAK2 V617F 変異体に対しても強い活性を有する（IC50 値：2.8 nM）。
- 残りの JAK ファミリーの IC50 値については独立した 2 試験を実施して取得している。1 つ目の試験から得られた JAK3 及びチロシンキナーゼ 2（TYK2）の IC50 値は、それぞれ 270 及び 260 nM であった。一方、もう 1 つの試験から得られた IC50 値は、それぞれ 17.1 及び 5.03 nM であった。しかしながら、後者の試験では ATP 濃度が生理学的濃度よりも低かったため、これらの IC50 値の意義は小さいと考えられた。
- 主要なヒト血中代謝物である M21 について、JAK ファミリーに対する作用を検討した結果、解離定数（Kd）は 150 nM（JAK1）、1.1 nM（JAK2）、8 nM（JAK3）及び 1.2 nM（TYK2）であった。MMB 及び M21 を直接比較すると、MMB の Kd 値は 28 nM（JAK1）及び 0.13 nM（JAK2）であり、M21 の Kd 値である 53 nM（JAK1）と 0.79 nM（JAK2）よりも低かった。
- MMB 及び M21 は JAK2 の可逆的阻害薬であり、酵素への結合時間はそれぞれ 131 及び 33 秒であった。
- MMB は、酵素アッセイにおいて、ALK2 とも呼ばれるアクチビン A 受容体 1 型（ACVR1）に強力な阻害作用を示す。MMB 及び M21 は、ATP 非依存的競合結合試験において、ACVR1 を阻害し、その Kd 値はそれぞれ 8.6 及び 38 nM であった。
- マイナーな血中ヒト代謝物である M19 は活性が弱く、その Kd 値は 10000 nM 超（JAK1）、280 nM（JAK2）、190 nM（JAK3）、1200 nM（TYK2）であった。

2.6.2.1.1.1.2. 細胞アッセイ

- MMB の JAK シグナル伝達に及ぼす影響について細胞を用いて検討した結果、MMB は STAT タンパク質の JAK 依存性リン酸化を阻害することが示された。初代ヒト末梢血単核細胞（PBMC）において、MMB は STAT3 のインターロイキン（IL）-6 刺激（JAK1/2 介在性）によるリン酸化（50%有効濃度［EC50］値：259 nM）、STAT5 のトロンボポエチン（TPO）刺激（JAK2 介在性）によるリン酸化（EC50 値：59.6 nM）、並びに

STAT6 の IL-4 刺激（JAK1/3 介在性）によるリン酸化（EC50 値：236 nM）を阻害した。また、JAK2 V617F 変異を有する HEL92.1.7 細胞において、MMB は STAT5 のサイトカイン非依存的な恒常的リン酸化を阻害した（IC50 値：約 400 nM）。

- MMB は JAK2 V617F 変異を有する細胞を含む恒常的活性化型 JAK2 発現細胞の増殖を、強力かつ選択的に阻害した。IC50 値は、TEL-JAK2 融合タンパク発現 Ba/F3 細胞で 798 nM、JAK2 V617F 変異 HEL92.1.7 細胞で 1805 nM であった。検討した 10 種類の多様な腫瘍細胞株において MMB の細胞増殖抑制作用は弱く、MMB による非特異的な細胞毒性は限定的であることが示された。
- MMB 及び M21 は、HepG2 肝細胞において、骨形成タンパク質（BMP）6 刺激により誘導されるヘプシジン RNA の発現量を減少させ、EC50 値はそれぞれ 652 及び 1420 nM であった。
- MMB は NF-κB レポーター活性を阻害した（IC50 値：600 nM）。これは、上流の NF-κB 調節因子 IKK-α（Kd 値：0.73 nM）、IKK-β（Kd 値：1.9 nM）及び IKK-ε（Kd 値：34 nM）、並びに IRAK1（Kd 値：7.7 nM）に対する強い結合によると考えられる。
- MMB は、メチルセルロース法によるコロニー形成試験において、赤血球系（IC50 値：0.90～1.21 μM）及び骨髄系（IC50 値：0.81～1.29 μM）前駆細胞の増殖を抑制した。

2.6.2.1.1.2. In vivo 試験

- JAK2 V617F 変異によるマウス MPN モデルにおいて、MMB は、用量及び時間依存的に、白血球数、ヘマトクリット値及び脾臓サイズを正常化し、髄外造血を減少させ、骨髄での造血を正常に戻した。また、対照動物と比較して、MMB 投与動物では炎症性サイトカイン IL-17、IL-3 及び IP-10 の濃度が低下した。
- ラットの慢性疾患に伴う貧血（ACD）モデルにおいて、MMB により JAK/STAT 及び ACVR1/SMAD 経路を阻害すると、肝臓における pSTAT3 及び pSMAD1/5/8 レベルが減少し、肝ヘプシジン遺伝子（Hamp）の転写も減少した。これは JAK1/2 阻害剤であるルキソリチニブではみられなかった。また、血清ヘプシジンの減少、血清鉄の増加及び骨髄での赤血球産生も認められた。ラット ACD モデルを用いた別の試験では、MMB は脾臓の IL-6 mRNA レベルを減少させた。このことは、炎症性サイトカインに対する抑制作用に関するこれまでの知見と一致した。

2.6.2.1.2. 副次的薬理試験

- MMB は、イオンチャネル、トランスポーター及び受容体パネルを用いた放射性リガンド結合試験において 42 標的中 31 種に有意な影響を示さなかったが、CAMK2D、CAMK4、HIPK2、PKD2、FGFR1、FGFR2、STK17A、IKK1、PHKG2、UGT1A1 及び PDE4 を有意に阻害した。JAK2、JAK1 及び ACVR1 に対する MMB の親和性は低濃度（nM）のため、上記最初の 9 分子に対する MMB の阻害活性は無視できるものと考え

られた。PDE4 及び UGT1A1 に関して補足試験を実施したところ、MMB は阻害作用を示し、その IC50 値はそれぞれ 16.4 及び 0.3 μM であった。

- MMB（10 μM）は、選択した 30 種類の受容体、並びに血管作動性受容体及びカルシウムチャネルに対して活性を示さなかった（in vitro）。
- MMB はヒト結腸癌由来細胞株（Caco-2）及びチアミントランスポーター（THTR）過剰発現細胞において、チアミン輸送を抑制しなかった。

2.6.2.1.3. 安全性薬理試験

- In vitro の hERG 試験において MMB は hERG チャネル K^+電流を阻害したが、その程度は軽度であった（IC50 値>10 μM）。
- テレメトリーシステムを装着したイヌに MMB を単回経口投与したときの心血管系に及ぼす影響を検討した。5 又は 30 mg/kg では、血行動態及び心電図への影響は認められなかった。100 mg/kg では、動脈圧の顕著な低下（最大 29%）及び心拍数（HR）の増加が認められた。この用量での推定最高血漿中濃度（Cmax；遊離薬物濃度として）は、ヒト推定曝露量の約 4 倍に相当した。
- MMB（3 μM）は in vitro で末梢神経機能に関連するイオンチャネル（hNAV1.6、hNAV1.7、hNAV1.8、hHCN2、hKv1.1 及び hKv1.2）を阻害しなかった。
- ラットに MMB を単回経口投与したときの中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した結果、250 mg/kg までの用量で悪影響は認められなかった。

2.6.2.1.4. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用については検討しなかった。

2.6.2.2. 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1. In vitro 試験

2.6.2.2.1.1. JAK ファミリー酵素に対する MMB 及び代謝物の活性と選択性

MMB は、TR-FRET 試験（PC-352-2005）において、JAK1（IC50 値：30 nM）及び JAK2（IC50 値：3.8 nM）の強力かつ可逆的な阻害薬であることが確認された。JAK3 及び TYK2 に対する MMB の選択性を AlphaScreen 及び SelectScreen™ Biochemical Kinase (SSBK) Profiling Service Z -LYTE® Screening で検討した結果、IC50 値はそれぞれ 270 及び 260 nM（CRB09001）、並びに 17.1 及び 5.03 nM（CRB09002）であった。IC50 値の相違は、後者の試験で用いた ATP 濃度が生理学的に低かったことによる可能性が高いと考えられた［ATP 濃度は、JAK3 については 80 μM（CRB09001）及び 14 μM（CRB09002）、TYK2 については 625 μM（CRB09001）及び 23 μM（CRB09002）であった］。更に、MMB は MPN の原因となる JAK2 V617F 変異体の活性も阻害し、IC50 値は 2.8 nM（CRB09001）であった。

ヒトにおける主要な血中代謝物である M21 についても ATP 非依存的な競合結合試験を実施した。Kd 値はそれぞれ、150 nM（JAK1）、1.1 nM（JAK2）、8 nM（JAK3）及び 1.2 nM（TY2）であった（PC-352-2006）。マイナーではあるが活性が認められたヒト代謝物である M19 の活性は弱く、Kd 値はそれぞれ、10000 nM 超（JAK1）、280 nM 超（JAK2）、190 nM 超（JAK3）及び 1200 nM 超（TYK2）であった（PC-352-2006）。これらの結果の再現性は 2 番目の試験（WIQ001-01-s-00001）で確認され、Kd 値は 30000 nM 超（JAK1）、530 nM 超（JAK2）、240 nM 超（JAK3）及び 17000 nM 超（TYK2）であった。MMB 及び M21 を直接比較した試験においては、MMB の Kd 値は 28 nM（JAK1）及び 0.13 nM（JAK2）、M21 の Kd 値は 53 nM（JAK1）及び 0.79 nM（JAK2）であり、MMB の Kd は M21 の Kd 値と比較して低値であった（WIQ002-01-s-00001）。

MMB 及び M21 は JAK2 を可逆的に阻害し、酵素への結合時間（binding residence times）はそれぞれ 131 及び 33 秒であった（20RT110）。

2.6.2.2.1.2. MMB の 1 型 BMP 受容体 ACVR1 に対する作用

MMB 及び M21 の 1 型 BMP 受容体 ACVR1 に対する作用を ATP 非依存的競合結合法で直接比較したところ、Kd 値はそれぞれ 8.6 及び 38 nM であった（WIQ002-01-s-00001）。

別試験で得られた MMB、M21 及び M19 の ACVR1 に対する Kd 値は、それぞれ 25 nM、99 及び 5300 nM であった（PC-352-2006）。また、ACVR1 に対する MMB の作用を LanthaScreen で測定した結果、IC50 値は 6.83 nM であった（SSBK13301_43714）。

2.6.2.2.1.3. STAT リン酸化経路に対する MMB の in vitro 細胞活性

MMB 及び M21 の JAK/STAT 経路のシグナル伝達阻害作用を、初代ヒト PBMC を用いて検討した（PC-352-2009）。MMB 及び M21 は、それぞれ 259 及び 689 nM の EC50 値で、IL-6 刺激による JAK1/2 を介した STAT3 のリン酸化を阻害した。MMB 及び M21 は、TPO 刺激による JAK2 を介した STAT5 のリン酸化をそれぞれ 59.6 及び 725 nM の EC50 値で阻害した。MMB 及び M21 は、IL-4 刺激による JAK1/3 を介した STAT6 のリン酸化を阻害し、EC50 値はそれぞれ 236 及び 700 nM であった（表 2.6.2-1）。

サイトカイン非依存的な JAK/STAT シグナル伝達系に対する MMB の阻害作用を、JAK2 V617F 発現赤白血病細胞株である HEL92.1.7 を用いて検討したところ、MMB は約 100～400 nM の IC50 値で STAT5 の恒常的なリン酸化を阻害した（CRB09006）。

表 2.6.2-1 MMB 及び M21 のヒト PBMC における JAK-STAT シグナル伝達に対する in vitro 阻害作用

JAK-STAT Signaling Pathway	MMB EC50 ± SD (nM)	M21 EC50 ± SD (nM)
IL-6-pSTAT3 (JAK1/2)	259.3 ± 174.8	689.4 ± 226.9
TPO-pSTAT5 (JAK2)	59.6 ± 58.9	724.5 ± 584.7
IL-4-pSTAT6 (JAK1/3)	235.6 ± 158.9	700.4 ± 222.7

Source: PC-352-2009
Key:
EC50 = Half-maximal effective concentration; IL = Interleukin; JAK-STAT = Janus kinase – Signal transducer and activator of transcription; MMB = Momelotinib; M21 = MMB major human metabolite; SD = Standard deviation; TPO = Thrombopoietin.

2.6.2.2.1.4. MMB の細胞に対する作用

2.6.2.2.1.4.1. MMB の恒常的活性化型 JAK2 発現細胞における細胞増殖抑制作用

細胞増殖試験により、MMB は JAK2 V617F 変異の発現細胞を含む恒常的活性化 JAK2 発現細胞の増殖を強力かつ選択的に抑制することが示された（CRB09004）。MMB は、恒常的に活性化した JAK2 を安定発現させることにより増殖因子非依存的に増殖するようになった Ba/F3 マウス骨髄細胞（TEL-JAK2 細胞）の増殖を抑制し、その IC50 値は 798 nM であった。一方、Ba/F3 親細胞における IC50 値は 1430 nM であり、恒常的に活性化した JAK3 を発現した Ba/F3 細胞（TEL-JAK3 細胞）における IC50 値は 2425 nM であった。MMB は JAK2 V617F 変異を導入した HEL92.1.7 細胞株の増殖も抑制し、IC50 値は 1805 nM であった。MMB（3 μM）の JAK 非依存的に増殖する 10 種類の腫瘍細胞株に対する増殖抑制作用は、恒常的に活性化させた JAK を発現させた細胞株と比較して軽度であった（CYTO0053）。

以上より、MMB の作用及び特異性は、恒常的に活性化した JAK によるシグナル伝達及び細胞増殖において確認され、MMB による非特異的な細胞毒性は軽度であることが示唆された。

2.6.2.2.1.4.2. ACVR1 によるヘプシジン産生に対する in vitro 細胞活性

MMB 及び M21 は、HepG2 肝細胞株において BMP6 によるヘプシジン RNA 産生を濃度依存的に抑制し、EC50 値はそれぞれ 652 及び 1420 nM であった（PC-352-2010）。

2.6.2.2.1.4.3. NF-κB シグナル伝達に対する in vitro 細胞活性

NF-κB は、サイトカイン産生、炎症、増殖及び細胞の生存を含む様々な細胞プロセスに関与する転写調節因子である。MMB 及び M21 の作用を NF-κB レポーターHEK293 組換え細胞株を用いて検討したところ、MMB は NF-κB レポーター活性を阻害することが確認され、IC50 値は 600 nM であったが、M21 の IC50 値は 2900 nM と作用が弱かった（Sierra Oncology_NFkB_04242019）。MMB の抗 NF-κB 活性は、上流の NF-κB レギュレーターである、IKK-α（Kd 値：0.73 nM）、IKK-β（Kd 値：1.9 nM）及び IKK-ε（Kd 値：34 nM）、並びに IRAK1（Kd 値：7.7 nM）への強い結合によると考えられる（PC-352-2006）。

2.6.2.2.1.4.4. MMB のヒト赤血球系及び骨髄系前駆細胞に対する作用

3 つの異なるロットのヒト正常骨髄細胞を用いて、MethoCult™ 84434 によってヒト赤血球系及び骨髄系前駆細胞の増殖に対する MMB の作用を検討した（YMB01）。MMB は、赤血球系（IC50 値の範囲：0.90～1.21 μM）及び骨髄系（IC50 値の範囲：0.81～1.29 μM）の前駆細胞の増殖に対して同程度の作用を示した。なお、赤血球系及び骨髄系前駆細胞のコロニー形態（大きさ及び密度）に障害がみられた場合は、MMB による毒性が発現したものと判断した。

2.6.2.2.1.5. M21 の薬理活性の検討

MMB 及び M21 の in vitro 薬理活性比（PAI）を同時に検討した。M21 は活性を示したが MMB と比較して弱く、PAI は JAK1/2 阻害で 34%、ACVR1 阻害で 40%であった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2 JAK1/2 及び ACVR1 阻害における M21 の MMB に対する in vitro 薬理活性比

Cellular Assay	Compound	EC50 (nM)	AUCm/AUCp[a]	EC50p/EC50m[b]	PAI[c] (%)
Inhibition of IL-6 stimulated JAK1/2 mediated phosphorylation of STAT3 in primary human PBMCs in 10% FCS	MMB	259	NA	NA	NA
	M21	689	0.94	0.36	34
ACVR1 inhibition by hepcidin gene expression analysis in HepG2 cells in 1% FCS in EMEM	MMB	652	NA	NA	NA
	M21	1420	0.94	0.43	40

Source: PC-352-2009, PC-352-2010
Key:
FCS: fetal calf serum; EMEM: eagle's minimum essential medium; NA: not applicable
a = AUCm: metabolite AUC; AUCp: parent AUC; unbound AUC ratio of metabolite to parent calculated using AUC data from MF subjects (CSR GS-US-352-0101）and in vitro plasma protein binding data (AD-352-2012).
b = Parent-to-metabolite ratio for EC50. Free fractions of MMB and M21 were 63.4% and 66.5% in 10% FCS, respectively, and 80.1% and 84.6% in 1% FCS in EMEM, respectively[Zheng, 2018].
c = PAI (%) = $(AUC_m/AUC_p) \times (\text{free fraction}_m/\text{free fraction}_p) \times (EC_{50p}/EC_{50m})$

2.6.2.2.2. In vivo 試験

2.6.2.2.2.1. MMB のマウス MPN モデルにおける作用

JAK2 V617F レトロウイルスを導入した骨髄細胞を、致死量の放射線を照射した BALB/c マウスに移植した JAK2 V617F 変異導入マウス MPN モデルを用いて、MMB の作用を検討

した（Tyner, 2010）。未処置（ナイーブ）動物と比較して、32 日目までに重度の白血球数増加、赤血球数増加及び脾臓肥大を伴う MPN の症状が全動物でみられた。その後、MMB を 34 日目から 82 日目まで 0（媒体）、25 及び 50 mg/kg（マウス 12 例／群）の用量で 1 日 2 回強制経口投与した。

いずれの MMB 投与群においても投与開始後 6 日（初回検査日）に白血球数の著しい減少がみられ、投与 20 日以降にヘマトクリット値の減少傾向がみられた。その後、ヘマトクリット値は 50 mg/kg 群では完全に正常化したが、25 mg/kg 群ではわずかに高値傾向が持続した。脾臓の大きさは、いずれの投与量においても媒体対照群に比べ有意に減少した。肝重量に投与群間で有意差はなく、肝臓、腎臓又は肺に肉眼的所見はみられなかった。血小板数及び体重に影響はみられなかった。末梢血塗抹標本染色において網状赤血球数の減少が認められた。

MMB 投与マウスの脾臓において初期赤血球前駆細胞（CD71+）及び成熟赤血球前駆細胞（Ter119+）の減少が認められ、一方で骨髄においてその発現が増加していた。このことから、MMB の投与によって髄外造血が減少し、骨髄における造血が回復することが確認された。同様に、Lineage 陰性（Lin-neg）KIT+/CD34+細胞（前駆細胞）及び Lin-neg KIT+/CD3-細胞（造血幹細胞及び初期前駆細胞を含む）は脾臓での減少及び骨髄での増加が認められ、さらなる髄外造血の減少が示唆された。

また、血漿分析の結果、MMB は媒体対照群の動物と比較していくつかの炎症性サイトカイン（例えば、IL-17、IL-3、IP-10）濃度を低下させることが示された。

本試験の結果から、MMB は用量及び時間依存的に血球数及び脾臓のサイズを部分的又は完全に正常化し、髄外造血を減少させ、骨髄における正常な造血機能を回復させることが示された。

2.6.2.2.2.2. MMB のラット ACD モデルにおける作用

PG-APS の腹腔内投与後 2 週間以内に貧血が誘発された雌 Lewis ラット（ラット ACD モデル）を用いて MMB の作用を検討した（Asshoff, 2017）。ACD ラットに MMB の 0（媒体）、5、10 又は 25 mg/kg を 1 日 1 回、21 日間強制経口投与した。MMB 投与により、投与 14 及び 21 日のヘモグロビン濃度及び赤血球数が媒体対照群と比較して有意に増加した。平均赤血球ヘモグロビン量及び平均赤血球容積の増加は、赤血球系前駆細胞への鉄の供給が改善されたことを示唆している。白血球数と好中球数の減少も同時にみられた。これら動物の骨髄分析では、MMB 投与によって網状赤血球数、成熟赤血球数及び血中鉄濃度が濃度依存的に増加した一方で、赤血球前駆体は MMB 用量の増加とともに減少することが示された。

鉄ホメオスタシスに対する MMB の直接作用を検討するため、ACD ラット（PG-APS 投与 2 週間後）及び正常ラットに MMB の 0、5、10 又は 25 mg/kg を 1 日 1 回、3 日間強制経口投与した。この短期間の MMB 投与により、ACD ラットの血清鉄は用量依存的に増加し、血清ヘプシジンは MMB の用量依存的に減少した。また、25 mg/kg の MMB を 7、14 及び

21 日間投与した場合にも、同様に血清ヘプシジンの減少がみられた。MMB による ACD ラットの JAK/STAT 及び ACVR1/SMAD 経路の阻害は、肝臓の pSTAT3 及び pSMAD1/5/8 レベルの低下並びに肝ヘプシジン遺伝子（Hamp）転写の低下をもたらしたが、これは JAK1/2 阻害薬であるルキソリチニブではみられなかった。更に、炎症性サイトカインに対する抑制作用を示したこれまでの研究の結果と一致して、ACD ラットに MMB を投与すると、脾臓の IL-6 mRNA レベルが低下した。

2.6.2.3. 副次的薬理試験

2.6.2.3.1. AdverseReactionEnzymes パネルにおける MMB の作用

AdverseReactionEnzymes アッセイにおいて 42 種類の酵素パネルに対する MMB（10 μM）の作用を検討した（1093895、06 Aug 2007）。42 種類の酵素のうち 31 種については有意な阻害（50%超）はみられなかったが、CAMK2D、CAMK4、HIPK2、PKD2、FGFR1、FGFR2、STK17A、IKK1、PHKG2、UGT1A1 及び PDE4 を有意に阻害した。MMB の JAK2、JAK1 及び ACVR1 に対する親和性が非常に高いことから、上記酵素のうち、最初の 9 種類に対する阻害活性は乖離があることから、その意義はないと考えられる。一方、PDE4 及び UGT1A1 に関してそれぞれ 100 及び 10 μM までの 5 段階の濃度で検討した補足試験では、PDE4 及び UGT1A1 の IC50 値はそれぞれ 16.4 μM 及び 0.3 μM であった（1093895、30 Nov 2007）。PDE4 阻害の IC50 値は推定ヒト遊離薬物濃度の Cmax 値（0.22 μM、CSR GS-US-352-0101）の約 75 倍であり、この阻害作用は臨床的に重要ではないと判断した。UGT1A1 阻害の可能性については、in vitro 薬物相互作用試験（2.6.4.7.2.2.）でさらに検討した。

2.6.2.3.2. 酵素及び受容体の HitProfilingScreen パネルにおける MMB の作用

HitProfilingScreen アッセイ（1093895、30 Jul 2007）において以下の 30 種類の受容体パネルに対する MMB（10 μM）の作用を検討した。

- アデノシン、アドレナリン、ドパミン、ムスカリン、ニコチン、イミダゾリン、γ-アミノ酪酸、N-メチル-d-アスパラギン酸、オピオイド μ、プロスタノイド、シグマ、GPCR103、ヒスタミン H1、ホルボールエステル、ロリプラム、L 型カルシウムチャネル、ATP 感受性カリウムチャネル、hERG チャネル及びナトリウムチャネル site 2、及びノルエピネフリントランスポーター

30 種類の受容体パネルのいずれにおいても有意な阻害（50%超）はみられなかった。

2.6.2.3.3. 酵素及び受容体パネルを用いた結合試験

血管作動性受容体及びカルシウムチャネル（すなわちアドレナリン α 及び β、アンジオテンシン AT1、並びにジヒドロピリジン、ベンゾチアゼピン及びフェニルアルキルアミン L 型カルシウムチャネル）に限定したパネルに対する MMB（10 μM）の作用を検討した（1087969）。いずれにおいても有意な阻害（50%超）はみられなかった。

2.6.2.3.4. チアミン取り込みに対する作用

JAK2（JAK1 及び JAK3 よりも選択的）及び FMS 様チロシンキナーゼ 3（FLT3）の阻害薬であるフェドラチニブの臨床開発においてみられたウェルニッケ脳症の機序として、チアミントランスポーター（THTR）の阻害が考えられている。そこで、Caco-2 及び THTR 過剰発現細胞を用いて、MMB 及び M21 がチアミン輸送を阻害する可能性、並びに THTR に対する薬剤構造由来の相互作用について検討した（Giacomini, 2017）。フェドラチニブは、Caco-2 細胞（IC50 値：0.940 μM）及び THTR-2 過剰発現細胞（IC50 値：1.36 μM）、更に THTR-1 過剰発現細胞（IC50 値：7.10 μM）へのチアミン取り込みを阻害したが、MMB 及び M21 はチアミン取り込みに対する阻害作用を示さなかった。この阻害の分子機序を構造的に理解するために、チアミンの最小構造から導かれるファーマコフォアモデルを用いて検討した。その結果、MMB には存在しないフェドラチニブ中の 2,4-ジアミノピリミジン部分がチアミンのいくつかの特定部位を認識するコンフォメーションをとることが示唆され、このことがフェドラチニブによるチアミン取り込みに対する阻害に関与していると考えられた。以上の結果から、MMB 及び M21 はチアミン輸送を阻害しないことが示された。

2.6.2.4. 安全性薬理試験

MMB の安全性薬理試験として、特定の器官系に対する潜在的影響を検討する個別の安全性薬理試験を実施した。検討した試験デザイン及びパラメータは、医薬品規制調和国際会議（ICH）のガイダンス文書（ICH S7A 及び ICH S7B）に記載されている原則及び方法に合致するものであった。すべての in vivo 試験は、経済協力開発機構（OECD）の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。

ラット及びイヌは、ヒトで予想される代謝物と同じ代謝物が生成されると考え、in vivo 試験の動物種として選択した。試験はヒトにおける予想投与経路と同じ経口投与で実施した。すべての in vivo 試験において、被験物質の調製液は塩酸で酸性化した滅菌水で調製し、最終的な pH は 1.35～1.80 とした。これらの試験は、2.6.3 の概要表にまとめた。

2.6.2.4.1. FASTPatch チャネルアッセイ

MMB の 3 μM（最高濃度）において、末梢神経機能に関連するイオンチャネル、すなわち電位依存性ナトリウムチャネル（hNav1.6、hNav1.7 及び hNav1.8）、カリウムチャネル（hHCN2）、並びに Shaker ファミリーカリウムチャネル（hKv1.1 及び hKv1.2）の阻害は認められなかった（170313.HJT）。この MMB 濃度は、末梢神経機能に可逆的な影響（病理組織学的変化を伴わない神経伝導速度の低下）が認められたラット反復投与毒性試験（1668-023）における MMB の最大遊離薬物濃度 1.1 μM の約 3 倍の濃度である。これらのことから、MMB は推定ヒト血漿中濃度（推定遊離薬物濃度での Cmax 値：0.22 μM；CSR GS-US-352-0101）において、ヒト神経伝導に影響しないと考えられる。

2.6.2.4.2. 中枢神経系に及ぼす影響

Sprague-Dawley ラット（雄 8 例／群）に MMB を 0（溶媒）、25、75 又は 250 mg/kg の用量で単回強制経口投与した（8287291）。中枢神経系に対する影響の評価は、ホームケージ、ハンドリング、オープンフィールド内及び誘発反応での観察を含む Irwin 変法により、投与後約 1、2、4、6 及び 24 時間に実施した。死亡、一般状態及び体温などの一般的な毒性学的指標についても記録した。投与後 24 時間まで、死亡は認められず、一般状態又は神経学的な定性評価のいずれに対しても MMB に関連した影響は認められなかった。75 mg/kg 投与後 2 時間（−0.4℃）及び 250 mg/kg 投与後 1～6 時間（最大−0.6℃）において体温の有意な低下が認められた。ラット 4 週間反復経口投与毒性試験（1009-0461）における雄 100 mg/kg 群の投与 1 日の Cmax 値（21900 ng/mL；遊離薬物濃度として 548 ng/mL）は、骨髄線維症（MF）被験者における推定遊離薬物濃度（92 ng/mL）の 6 倍であった（CSR GS-US-352-0101）。

2.6.2.4.3. 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1. hERG 試験

ヒト組換え hERG を発現させた HEK293 細胞を用いて in vitro hERG チャネルアッセイを行った（hERG）。MMB の 0.001、0.01、0.1、1、10 μM 及び 10 μM のシサプリド（陽性対照物質）を最大 8 分間適用した（非 GLP）。標準的なホールセル・パッチクランプ法を用い、電圧刺激後の電流を記録した。その結果、MMB の hERG チャネルの K^+電流阻害作用は弱く、IC50 値は 10 μM 超であった。この濃度は、臨床用量である MMB 200 mg 投与時の平均 Cmax 値（479 ng/mL）から推定した遊離薬物濃度 Cmax 値（0.22 μM、CSR GS-US-352‐0101）の 45 倍であった。以上より、MMB は in vivo において hERG チャネル阻害により QT 間隔を延長させる可能性は低いと考えられた。

2.6.2.4.3.2. ビーグル犬を用いた心血管系に及ぼす影響

テレメトリーシステムを装着した覚醒雄ビーグル犬 4 匹に、ラテン方格法を用いて 0（媒体）、5、30 又は 100 mg/kg の MMB を単回強制経口投与した（ZNA15648.004）。心血管パラメータとして、HR、PR 間隔、QRS 間隔、RR 間隔、QT 及び補正 QT（QTc）間隔、並びに収縮期、拡張期及び平均動脈圧を評価し、投与前少なくとも 1 時間及び各投与後約 20 時間まで連続的に記録した。その他、生死及び一般状態を観察した。MMB の曝露評価のため、各投与の投与後約 3 時間に全動物から血液サンプルを採取した。

5 及び 30 mg/kg では、投与後 20 時間まで、一般状態又は HR、PR 間隔、QRS 間隔、RR 間隔、QT 又は QTc 間隔に対して MMB に関連する影響はみられなかった。5 mg/kg では動脈圧（収縮期、拡張期又は平均）に影響は認められなかったが、30 及び 100 mg/kg ではいずれも用量依存的に低下した。平均動脈圧は、30 mg/kg の投与後 12 時間に最大 18%、100 mg/kg の投与後 4 時間に最大 29%の低下を示した。HR は 100 mg/kg において明らかな増加が認められた（投与後 6 時間で最大 59%の増加）。PR 及び RR 間隔は 100 mg/kg におい

て短縮した。100 mg/kg では、QRS 間隔に影響はみられなかったが、QT 間隔が投与後 6 及び 12 時間に明らかに短縮した。Fridericia 式（QTcF）を用いて HR に対して QT 間隔を補正した結果、この QT 間隔の短縮は有意ではなかった。したがって、QT 間隔の変化は HR の変化に起因し、MMB の心伝導に対する直接的影響を示唆する変化ではなかった。5、30 及び 100 mg/kg の用量の経口投与後約 3 時間における MMB の平均血漿中濃度（± SD）は、それぞれ 181 ± 57 ng/mL、1174 ± 452 ng/mL 及び 1913 ± 284 ng/mL であった。

100 mg/kg では、動脈圧の明らかな低下、HR の増加、並びにそれに伴う心電図第 II 誘導パラメータの変化が認められた。QTc 間隔は MMB 投与により有意な影響を受けなかった。なお、イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験（GWR1005）における 100 mg/kg 群の投与 1 日の Cmax 値（1810 ng/mL；遊離薬物濃度として 348 ng/mL）は、MF 被験者における推定遊離薬物濃度（92 ng/mL）の約 4 倍であった（CSR GS-US-352-0101）。M21 はイヌ血漿では検出されなかったため、M21 はこれら変化に寄与していないと考えられた。

2.6.2.4.4. 呼吸系に及ぼす影響

Sprague-Dawley ラット（雄 8 例／群）に、MMB を 0（媒体）、25、75 又は 250 mg/kg の用量で単回強制経口投与した（8287292）。呼吸機能に対する影響の評価は、1 回換気量、呼吸数及び分時換気量の解析に基づいて実施した。プレチスモグラフィーを用いて、投与前 2 日（ベースライン）に約 2.5 時間、投与後 1 日に各動物をチャンバーに入れた時点から投与後約 6 時間、並びに投与後約 22.5 時間から 2.5 時間（投与後 24 時間、2 日目）にわたり、これらのデータを連続的に収集した。毒性の評価は、死亡及び一般状態に基づいて行った。

MMB は、一般状態及び投与後 24 時間までの 1 回換気量、呼吸数及び分時換気量に影響を及ぼさなかった。したがって、雄ラットの呼吸機能に対する無影響量は 250 mg/kg であった。なお、ラット 4 週間反復経口投与毒性試験（1009-0461）における雄 100 mg/kg 群の投与 1 日の Cmax 値（遊離薬物濃度として 548 ng/mL）は、MF 被験者における推定遊離薬物濃度（92 ng/mL）の 6 倍であった（CSR GS-US-352-0101）。

2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。

2.6.2.6. 考察及び結論

MMB は、他のチロシン及びセリン／スレオニンキナーゼよりも JAK1、JAK2 及び ACVR1 対して強い選択性を示す低分子阻害薬である。MMB は、真性赤血球増加症、本態性血小板血症及び MF の 3 つの BCR-ABL 陰性 MPN の病因に関連する JAK2 V617F 変異体に対して、in vitro において強い阻害作用を示した。げっ歯類 ACD モデルにおいて、MMB による ACVR1 の阻害は、SMAD1/5/8 シグナル伝達の低下、肝ヘプシジン転写の減少、その結果として赤血球産生の増加をもたらすことが示されている。

酵素及び受容体結合試験により、MMB は受容体及び酵素を介した薬物誘発性の有害事象をほとんど示さないことが示され、Caco-2 細胞を用いた in vitro 試験では、MMB 及び M21 はチアミン輸送を阻害しないことが示された。安全性薬理試験では、試験した最高用量においてラット呼吸機能又は中枢神経系への悪影響は示されず、この用量での推定遊離薬物濃度は、MF 患者における推定遊離薬物濃度の少なくとも 6 倍と想定された。心血管系に対する安全性薬理試験では、MMB は臨床曝露量において心血管系パラメータに有意な影響を及ぼさないことが示された。100 mg/kg において動脈圧の低下及び HR の増加が認められたが、QTc 間隔は MMB 投与により有意な影響を受けなかった。この用量での推定遊離薬物濃度は、MF 患者における推定遊離薬物濃度の約 4 倍であった。

2.6.2.7. 図表

本文中に記載した。

2.6.2.8. 参考文献

Asshoff M, Petzer V, Warr MR, et al. Momelotinib inhibits ACVR1/ALK2, decreases hepcidin production, and ameliorates anemia of chronic disease in rodents. Blood. 2017;129(13):1823-30.

Giacomini MM, Hao J, Liang X, et al. Interaction of 2,4-diaminopyrimidine containing drugs including Fedratinib and Trimethoprim with thiamine transporters. Drug Metab Dispos. 2017;45(1):76-85.

Tyner JW, Bumm TG, Deininger J, et al. CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. Blood. 2010;115(25):5232-40.

Zheng J, Xin Y, Zhang J, et al. Pharmacokinetics and disposition of momelotinib revealed a disproportionate human metabolite – resolution for clinical development. Drug Metab Dispos. 2018;46:237-47.

2.6.3. 薬理試験概要表

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表

被験物質：MMB

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
効力を裏付ける試験					
Characterization of potency and reversible inhibition of JAK1 and JAK2 by MMB using a TR-FRET biochemical assay	JAK1 and JAK2 enzymes	In vitro	Gilead Sciences, US	PC-352-2005	4.2.1.1
Inhibition of kinase enzymatic activity by MMB	In vitro enzymes	In vitro	Cytopia, AUS	CRB09001	
Inhibition of kinase enzymatic activity by MMB	In vitro enzymes	In vitro	[redacted], US	CRB09002	
Determination of MMB, M19, and M21 potency and selectivity against human protein kinases – competitive binding	In vitro enzymes	In vitro	[redacted], US	PC-352-2006	
Determination of M19 activity against ACVR1, JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2	In vitro enzymes	In vitro	[redacted], US	WIQ001-01-s-00001	
Determination of enzyme residence time for MMB and M21 against JAK2	In vitro enzymes	In vitro	[redacted], NLD	20RT110	
Determination of MMB activity against ACVR1	In vitro enzymes	In vitro	[redacted], US	SSBK13301_43714	
Determination of MMB and M21 activity against ACVR1 and 6 other kinases	In vitro enzymes	In vitro	[redacted], US	WIQ002-01-s-00001	
Inhibition of JAK/STAT signaling by MMB and M21 in human PBMC	Human PBMC	In vitro	Gilead Sciences, US	PC-352-2009	
Inhibition of STAT5 phosphorylation by MMB	HEL 92.1.7 and Ba/F3 cell lines	In vitro	Cytopia, AUS	CRB09006	
Effect of MMB on cell proliferation after 72 hours	Mouse and human cell lines	In vitro	Cytopia, AUS	CRB09004	
Effect of MMB on cell proliferation in 10 cancer cell lines after 48-72 hours	Human cancer cell lines	In vitro	[redacted], AUS	CYTO0053	

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
Inhibition of BMP6-induced hepcidin gene expression by MMB and M21 in HepG2 (liver) cells	Human liver (HepG2) cells	In vitro	Gilead Sciences, US	PC-352-2010	
Determination of MMB and M21 anti-NF-κB activity	NF-κB reporter-HEK293 cells	In vitro	[redacted], US	Sierra Oncology NF-kB 04242019	
Determination of MMB effects on human bone marrow derived progenitor cells in a methylcellulose colony assay	Human erythroid and myeloid bone marrow derived progenitor cells	In vitro	[redacted], CAN	YMB01	
MMB activity in a murine model of JAK2 V617F-driven myeloproliferative neoplasms	Mouse	PO (gavage)	Oregon Health and Science University, US	Tyner, 2010	
MMB activity in a rat model of ACD	Rat	PO (gavage)	Medical University of Innsbruck, AUT	Asshoff, 2017	
副次的薬理試験					
Adverse Reaction Enzymes screen	In vitro enzymes and receptors	In vitro	[redacted], TWN	1093895 (06 Aug 2007)	4.2.1.2
Determination of IC_{50} against PDE4 and UGT1A1	In vitro PDE4 and UGT1A1 target receptors	In vitro	[redacted], TWN	1093895 (30 Nov 2007)	
Hit Profiling Screen	In vitro enzymes and receptors	In vitro	[redacted], TWN	1093895 (30 Jul 2007)	
Binding to L-type calcium channel, adrenergic receptors, and AT1 receptor	In vitro ion channels and receptors	In vitro	[redacted], TWN	1087969	
Inhibition of thiamine transporters by MMB	Caco-2 and thiamine transporter over-expressing cells	In vitro	Gilead Sciences, US	Giacomini, 2017	
安全性薬理試験					
In vitro hERG assay	HEK293 cells	In vitro	[redacted], US	hERG	4.2.1.3
FASTPatch ion channel panel assay	HEK293 and CHO cells	In vitro	[redacted], US	170313.HJT	
Central nervous system[a]	Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	[redacted], US	8287291	

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付場所
Respiratory system[a]	Rat / Sprague-Dawley	PO (gavage)	[redacted], US	8287292	
Cardiovascular system[a]	Dog / Beagle	PO (gavage)	[redacted], UK	ZNA15648.004	
薬力学的薬物相互作用試験 [b]					

a： GLP 試験

b： 薬力学的薬物相互作用試験は実施していない

UK：英国、US：米国、NLD：オランダ、AUT：オーストリア、AUS：オーストラリア、CAN：カナダ、TWN：台湾

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.1.参照

2.6.3.3. 副次的薬理試験

2.6.3.1.参照

2.6.3.4. 安全性薬理試験

被験物質：MMB

試験の種類	動物種、系統及び性別	投与方法	用量及び濃度	例数及び標本数/群	結果	GLP適用 [a]	添付場所
hERG inhibition	HEK293 cells	In vitro	0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 µM	Tested in triplicate	IC_{50} > 10 µM	No	4.2.1.3
Ion channel inhibition	HEK293 and CHO cells	In vitro	0.05, 0.1, 1, 3 µM	Tested in triplicate	No inhibition of voltage-gated sodium (hNav1.6, hNav1.7, hNav1.8) or potassium channels (hHCN2), or Shaker family potassium channels (hKv1.1, hKv1.2)	No	
Central nervous system	Rat, Sprague-Dawley, Male	PO (gavage)	0, 25, 75, 250 mg/kg	n = 8	Lower body temperature at 75 mg/kg (0.4°C) and 250 mg/kg (0.6°C)	Yes	
Respiratory system	Rat, Sprague-Dawley, Male	PO (gavage)	0, 25, 75, 250 mg/kg	n = 8	NOEL = 250 mg/kg	Yes	
Cardiovascular system	Dog, Beagle, Male	PO (gavage)	0, 5, 30, 100 mg/kg	n = 4 [b]	• 5 mg/kg did not have any effect on arterial blood pressure, HR, or lead II ECG. • 30 and 100 mg/kg decreased arterial blood pressure with an associated increase in HR for the 100 mg/kg dose and subsequent related changes to the lead II ECG parameters. • QTc interval was not notably altered at any dose level.	Yes	

a： Yes が GLP 試験

b： 各投与の間に最短 3 日のウォッシュアウト期間を設けたラテン方格法を用いて投与した

2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.3.1.参照