ジャイパーカ錠 50mg
ジャイパーカ錠 100mg

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1　緒言..... 1

2.6.1　緒言

第 2.2 項参照

ジャイパーカ錠 50mg
ジャイパーカ錠 100mg

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 1
2.6.2.1　まとめ 1
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1　In vitro 試験 3
2.6.2.2.1.1　In vitro での BTK 及び BTK C481S に対するピルトブルチニブの阻害活性 3
2.6.2.2.1.2　ピルトブルチニブの BTK 及び BTK C481S に対する阻害様式 4
2.6.2.2.1.3　In vitro での BTK に対するピルトブルチニブの代謝物 M1 の作用 5
2.6.2.2.1.4　BTK 及び BTK C481 耐性変異体に対するピルトブルチニブの結合能 5
2.6.2.2.1.5　BTK 又は BTK C481 耐性変異体を一過性に発現させた細胞における BTK リン酸化阻害作用 6
2.6.2.2.1.6　BTK 及び BTK C481S を安定的に発現させた細胞における BTK リン酸化阻害作用 7
2.6.2.2.1.7　ヒトリンパ腫細胞株での細胞シグナル伝達に対するピルトブルチニブの作用 8
2.6.2.2.1.8　ヒト B 細胞性リンパ腫細胞株の細胞増殖に対するピルトブルチニブの作用 9
2.6.2.2.1.9　ヒト末梢血単核細胞及び全血中の B 細胞活性化に対するピルトブルチニブの阻害作用及び細胞での可逆性の確認 10
2.6.2.2.1.10　ヒト末梢血単核細胞でのピルトブルチニブによる in vitro BTK 占有率 11
2.6.2.2.2　In vivo 試験 13
2.6.2.2.2.1　ヒト B 細胞性リンパ腫異種移植モデルでのピルトブルチニブの効果 13
2.6.2.2.2.2　ヒト DLBCL BTK C481S 異種移植モデルでのピルトブルチニブの効果 14
2.6.2.3　副次的薬理試験 15
2.6.2.3.1　BTK 以外のキナーゼに対するピルトブルチニブの作用 15
2.6.2.3.2　その他の受容体及び酵素に対する作用 17
2.6.2.4　安全性薬理試験 17
2.6.2.4.1　In vitro hERG アッセイ 18
2.6.2.4.1.1　要約 18
2.6.2.4.1.2　目的 18
2.6.2.4.1.3　試験デザイン 18
2.6.2.4.1.4　結果 18
2.6.2.4.2　イヌを用いた心血管系安全性薬理試験（ラジオテレメトリー） 19
2.6.2.4.2.1　要約 19
2.6.2.4.2.2　目的 19
2.6.2.4.2.3　試験デザイン 19
2.6.2.4.2.4　結果 20
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 21
2.6.2.6　考察及び結論 21
2.6.2.7　図表 22
2.6.2.8　参考文献 22

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton's tyrosine kinase：BTK）は TEC（transient erythroblastopenia of childhood）キナーゼファミリーに属しており、BTK 以外には interleukin-2-inducible T-cell kinase（ITK）、bone marrow tyrosine kinase in chromosome X protein（BMX）、tyrosine protein kinase（TXK）、及び TEC キナーゼが含まれる。これらのキナーゼは 4 つのドメイン（pleckstrin homology［PH］ドメイン、Src homology 3［SH3］ドメイン、Src homology 2［SH2］ドメイン、及びキナーゼドメイン）を有する非受容体型チロシンキナーゼである(Qiu et al. 2000)。

BTK は B 細胞抗原受容体（B-cell antigen receptor：BCR）が関与する B 細胞の発生、分化、及びシグナル伝達に重要であり、B 細胞系及び骨髄系の細胞に広く発現している(Genevier et al. 1994; Weber et al. 2017)。B 細胞の発生に BTK が関与していることは、BTK の変異によりマウスでは X 連鎖免疫不全（X-linked immunodeficient：XID）が、ヒトでは X 連鎖無 γ グロブリン血症（X-linked agammaglobulinemia：XLA、成熟 B 細胞の形成不全を特徴とする免疫不全症）がそれぞれ生じることから示されている(Rawlings et al. 1993; de Weers et al. 1994)。正常な B 細胞では、BCR に抗原が結合すると、Lck/Yes-related novel protein kinase（LYN）及び spleen tyrosine kinase（SYK）の活性化、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ（phosphatidylinositol-3-kinase：PI3K）の BCR への動員、セカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸（phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate：PIP3）の生成、並びに細胞膜への BTK の PH ドメインを介した PIP3 依存的な動員が引き起こされる。LYN 及び SYK により BTK の活性化ループ内の 551 位のチロシン残基（Y551）がリン酸化されると、BTK が活性化され、BTK の SH3 ドメイン内の 223 位のチロシン残基（Y223）の自己リン酸化及びホスホリパーゼ C-γ2（phospholipase C-γ2：PLCγ2）のリン酸化が誘導される。PLCγ2 によりセカンドメッセンジャーであるイノシトール-1,4,5-三リン酸（inositol-1,4,5-triphosphate：IP3）及びジアシルグリセロール（diacylglycerol：DAG）が生成されると、いくつかの重要なシグナル伝達エフェクターが活性化され、その結果、B 細胞が増殖及び生存する(Woyach et al. 2012; Ponader et al. 2014)。XLA では BTK 変異により BTK が不活化し、成熟 B 細胞の形成不全が見られたことから、B 細胞性悪性腫瘍での BTK の役割が研究され、BTK 活性阻害剤の開発が行われた。その結果、BTK は、慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia：CLL）、マントル細胞リンパ腫（mantle cell lymphoma：MCL）、辺縁帯リンパ腫（marginal zone lymphoma：MZL）、多発性骨髄腫、及びワルデンストローム・マクログロブリン血症（Waldenström macroglobulinemia：WM）といった複数の B 細胞性悪性腫瘍の増殖に重要な役割を果たすことが明らかにされた(Buggy et al. 2012; Castillo et al. 2017; Rosenquist et al. 2017)。また BTK は、CLL、MCL、MZL、WM、及び活性化 B 細胞様びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma：ABC-DLBCL）等の B 細胞性悪性腫瘍で過剰に活性化していることが報告されている(Pal Singh et al. 2018)。MCL 患者の治療には、3 種類の共有結合型 BTK 阻害剤（イブルチニブ、アカラブルチニブ、及び zanubrutinib）が使用されており、世界中の最も多くの国で承認されているのはイブルチニブである。共有結合型 BTK 阻害剤は、CLL、WM、及び MZL の治療にも使用されている。イブルチニブ及びアカラブルチニブに対する獲得耐性メカニズムに関する最近の研究では、これらの阻害剤

への耐性を示す CLL、WM、及び MCL 患者において、BTK 共有結合箇所である 481 位システインの主にセリンへのアミノ酸置換（C481S）が見られることが報告されている(Woyach et al. 2014; Byrd et al. 2016; Woyach et al. 2017; Xu et al. 2017; Hershkovitz-Rokah et al. 2018; Woyach et al. 2019)。

ピルトブルチニブは強力かつ選択的な非共有結合型の可逆的 BTK 阻害剤であり、他のキナーゼ及び非キナーゼ標的はほとんど阻害せず、良好な非臨床薬理、薬物動態（pharmacokinetics：PK）、及び安全性プロファイルを示す。ピルトブルチニブによる継続的な BTK 阻害は、その増殖及び生存を BCR シグナル伝達並びに BTK 活性に依存する B 細胞性悪性腫瘍（共有結合型 BTK 阻害剤に耐性を示すものを含む）に対する有効性を示すことが期待される。

ピルトブルチニブの薬理特性として、in vitro での BTK 及び BTK C481 耐性変異体への結合親和性及び阻害活性、B 細胞活性化に対する阻害作用、並びにマウスを用いた B 細胞性リンパ腫細胞株異種移植モデルでの腫瘍増殖阻害作用を、効力を裏付ける試験の項に要約する。各種キナーゼ並びに酵素及び受容体パネルを用いてピルトブルチニブの潜在的オフターゲット活性を評価した成績を副次的薬理試験の項に要約する。

ピルトブルチニブの安全性薬理試験として、in vitro ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（human ether-à-go-go-related gene：hERG）試験及びイヌ心血管系安全性薬理試験を実施した。また、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の一環として、心血管系、呼吸系、及び中枢神経系（central nervous system：CNS）の安全性薬理評価項目を評価した。これらの試験の結果を安全性薬理試験の項に要約する。

主要な薬効薬理試験成績を以下に示す。

- ピルトブルチニブは、in vitro で野生型 BTK 及び BTK C481S 変異体を阻害し、ATP 濃度がミカエリス定数（Michaelis constant：K_m）相当のときの 50%阻害濃度（half maximal inhibitory concentration：IC_{50}）はそれぞれ 3.15 及び 1.42 nM であった。
- Lineweaver-Burk 解析から、ピルトブルチニブは BTK 及び BTK C481S に対する ATP 競合的阻害剤であることが示された。
- ピルトブルチニブは BTK、BTK C481S、BTK C481R、及び BTK C481T に高い親和性で結合し、平衡解離定数（dissociation equilibrium constant：K_D）は 0.2～1.7 nM の範囲であった。
- 細胞アッセイで、ピルトブルチニブはヒト胎児腎臓細胞（human embryonic kidney cells：HEK293）に発現させた BTK 及び BTK 変異体の自己リン酸化を阻害し、IC_{50} 値は 3.9～13.9 nM の範囲であった。
- ピルトブルチニブは複数のヒトリンパ腫細胞株で BTK 介在性シグナル伝達を阻害し（IC_{50} 値：3.1～9.1 nM）、細胞増殖も阻害した（IC_{50} 値：2.3～3.1 nM）。
- ピルトブルチニブはヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell：PBMC）及び全血中の B 細胞の活性化を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.6 及び 30.6 nM であった。また、ウォッシュアウト法を用いた B 細胞活性化アッセイにより、ピルトブルチニブの BTK への結合は可逆的であることが示された。
- ヒト B 細胞性リンパ腫細胞株を皮下に移植したマウスにおいて、ピルトブルチニブの 1 日 2 回の反復経口投与は用量依存的な腫瘍増殖阻害効果を示し、また忍容性は良好であった。

- ピルトブルチニブは、各種キナーゼに対する広範囲な in vitro スクリーニングにおいて、検討した BTK 以外の 370 種類のキナーゼの 98%と比較して、BTK に対し高い選択性（300 倍以上）を示した。更なる酵素アッセイ、細胞アッセイ、及び放射性リガンド結合アッセイでの検討においても、ピルトブルチニブは、他のキナーゼ及び非キナーゼ標的に対する明らかな阻害活性は見られず、BTK に対する高い選択性を示した。

主要な安全性薬理試験成績を以下に示す。

- In vitro hERG 試験で、ピルトブルチニブは HEK293 細胞の hERG チャネルを阻害し、その IC_{50} 値は 32 µM（15 µg/mL）であった。
- 心血管系安全性薬理試験では、ピルトブルチニブを単回投与したとき、血行動態、心電図パラメータ、及び体温への影響は認められなかった。
- イヌを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験で、QTc に対する軽微な影響が認められた。血圧及び心拍数への影響は認められなかった。
- イヌを用いた反復投与毒性試験で、中枢神経系（CNS）及び呼吸系の安全性薬理評価項目に対するピルトブルチニブの影響は認められなかった。

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　In vitro での BTK 及び BTK C481S に対するピルトブルチニブの阻害活性

LOXO-305-PHARM-031 試験（4.2.1.1.1）

ヒト BTK に対するピルトブルチニブの阻害作用を完全長の野生型 BTK 及び BTK C481S 変異体を用いて放射性標識 ATP キナーゼアッセイにより評価した。本アッセイでは、各酵素の K_m 値に相当する ATP の濃度において、[^{33}P]-ATP 由来[^{33}P]-PO_4 のペプチド基質への取込みを指標にピルトブルチニブの BTK 及び BTK C481S 阻害活性を測定した（LOXO-305-PHARM-031 試験）。

ピルトブルチニブは BTK 及び BTK C481S を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.15 及び 1.42 nM であった（表 2.6.2-1）。これらのデータから、ピルトブルチニブは BTK 及び BTK C481S のキナーゼ活性を強力に阻害することが示された。

表 2.6.2-1. ピルトブルチニブの BTK 及び BTK C481S 阻害作用

キナーゼ	ATP 濃度（µM）	ピルトブルチニブ IC_{50}（平均値 ± 標準偏差、nM）	n
BTK	K_m = 50	3.15 ± 1.32	12
BTK C481S	K_m = 15/50[a]	1.42 ± 0.60	12

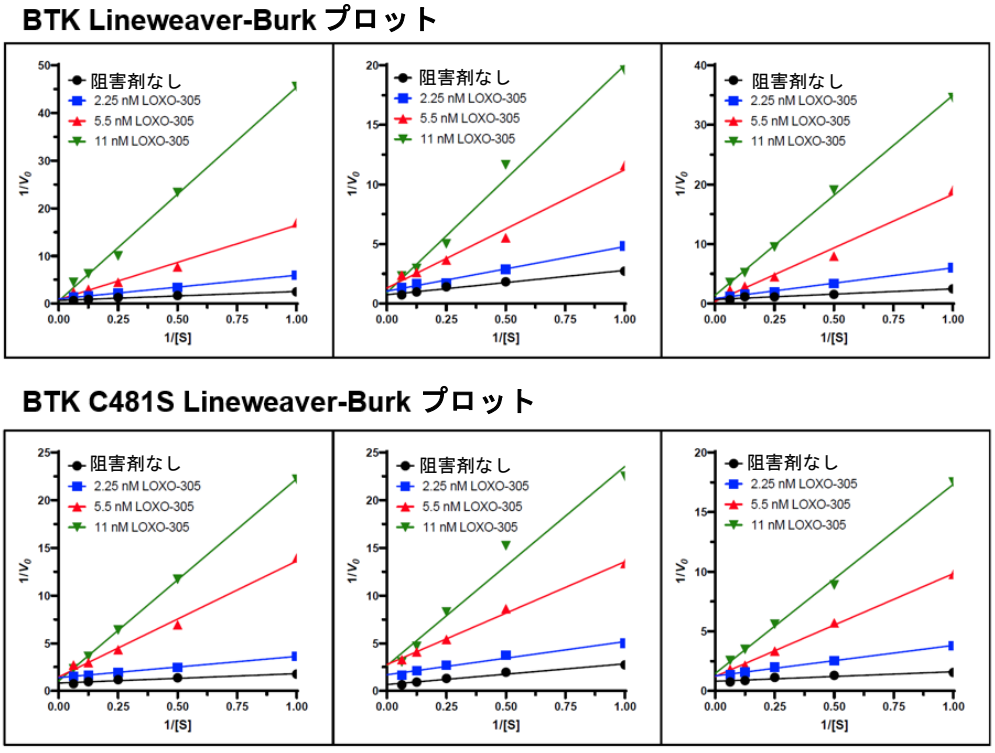
[a] ATP 濃度は、BTK C481S のロットの違いにより、10 検体で 15 µM、2 検体で 50 µM を用いた。

2.6.2.2.1.2　ピルトブルチニブの BTK 及び BTK C481S に対する阻害様式

LOXO-305-PHARM-039 試験（4.2.1.1.2）

ピルトブルチニブの BTK 阻害作用に対する ATP の影響を、Lineweaver-Burk 解析(Lineweaver and Burk 1934)を用いて検討した。キナーゼ活性は均一時間分解蛍光（Homogeneous Time Resolved Fluorescence：HTRF）KinEASE チロシンキナーゼ（TK）アッセイを用いて測定した。反応速度を測定するため、BTK 及び BTK C481S をピルトブルチニブ（濃度範囲：0～11 nM）存在下でインキュベートした後、ATP（最終濃度範囲：1～16 µM）及びビオチン標識 TK 基質を添加した。5～60 分間インキュベートしてキナーゼを反応させた後、検出試薬を加えて反応を停止させ、マルチモードプレートリーダーで測定した。時間に対して活性（%）をプロットすることにより酵素反応速度を算出した。Lineweaver-Burk プロットでは、この速度の逆数を ATP 濃度の逆数に対してプロットした（LOXO-305-PHARM-039 試験）。

BTK 及び BTK C481S の Lineweaver-Burk プロットでは、プロットの直線が Y 軸で交差した（図 2.6.2-1）。これは基質（本試験の場合 ATP）に対して阻害剤が競合的阻害をしたことを表す(Lineweaver and Burk 1934)。これらの結果から、ピルトブルチニブは BTK 及び BTK C481S に対する ATP 競合的阻害剤であることが示された。



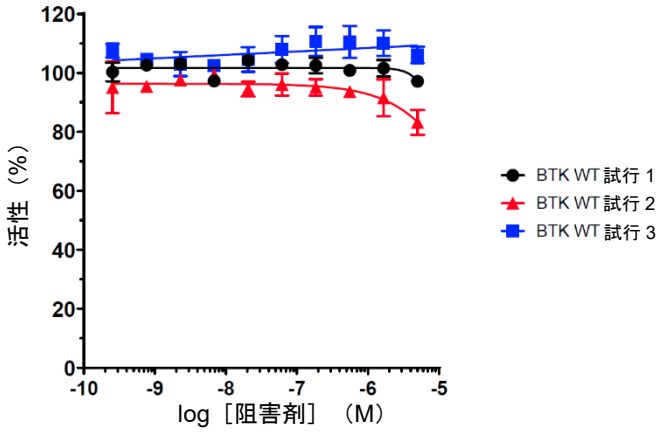
各キナーゼについて 3 回の独立した実験を実施した。
V_0 = 反応初速度
[S] = 基質（ATP）濃度

図 2.6.2-1. BTK 及び BTK C481S での ATP とピルトブルチニブとの競合に関する Lineweaver-Burk 解析

2.6.2.2.1.3　In vitro での BTK に対するピルトブルチニブの代謝物 M1 の作用

LOXO-305-PHARM-029 試験（4.2.1.1.3）

ピルトブルチニブのヒト血漿中の主要代謝物である、M1（LOX-00023900-001 又は LSN3828720）の BTK に対する作用を放射性標識 ATP キナーゼアッセイで検討した（LOXO-305-PHARM-029 試験）。ATP が K_m 値に相当する濃度のとき、M1 の IC_{50} 値は 5 μM を上回っていたことから、本代謝物は BTK 活性を阻害しないことが示された（図 2.6.2-2）。



各試行における活性（%）の値は平均値 ± 標準偏差（n = 2）で示す。

図 2.6.2-2. In vitro BTK 活性に対する代謝物 M1 の作用

2.6.2.2.1.4　BTK 及び BTK C481 耐性変異体に対するピルトブルチニブの結合能

LOXO-305-PHARM-023 試験（4.2.1.1.4）
LOXO-305-PHARM-042 試験（4.2.1.1.5）

BTK の C481 が別のアミノ酸に置換されることによる複数のイブルチニブ及びアカラブルチニブ耐性変異が報告されている(Hamasy et al. 2017; Woyach et al. 2017; Xu et al. 2017; Hershkovitz-Rokah et al. 2018; Woyach et al. 2019)。Biacore T200 装置を用いた表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance：SPR）アッセイにより、ピルトブルチニブの BTK 並びに BTK C481S、C481R、及び C481T に対する結合反応速度及び親和性を評価した（LOXO-305-PHARM-023 試験、LOXO-305-PHARM-042 試験）。ビオチン標識 BTK タンパク質をそれぞれストレプトアビジンセンサーチップに固定化し、漸増濃度（4.1～333 nM）のピルトブルチニブで処理し、その後ランニングバッファーを用いて解離相のモニタリングを実施した。BTK 及び BTK C481S（n = 3）並びに BTK C481R 及び BTK C481T（n = 1）で得られたセンサーグラムから、解離相における指数関数的な減少が認められたため、可逆的阻害剤の速度定数を求めるための 1:1 の結合モデルに適合させた。

ピルトブルチニブの BTK 並びに BTK C481S、C481R、及び C481T に対する K_D 値はそれぞれ 1.0、1.7、0.4、及び 0.2 nM であり、解離半減期はそれぞれ 2.6、1.9、7.5、及び 28 時間であった（表 2.6.2-2）。これらの結果から、ピルトブルチニブは BTK 及び BTK C481 置換変異体に対して同程度の親和性を保持していることが示された。また、解離速度定数（dissociation rate

constant：k_d）の値から、BTK 及びその変異体に対するピルトブルチニブの結合は可逆的で非共有結合性であることが裏付けられた。

表 2.6.2-2. BTK 及び BTK C481 置換変異体に対するピルトブルチニブの結合動態

ピルトブルチニブ		k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	$t_{1/2}$（時間）	平均 K_D (nM)	平均 $t_{1/2}$（時間）
BTK（WT）	試行 1	6.0×10^4	5.3×10^{-5}	0.8	3.6		
	試行 2	7.5×10^4	9.7×10^{-5}	1.3	2.0	1.0	2.6
	試行 3	1.1×10^5	8.6×10^{-5}	0.8	2.2		
BTK C481S	試行 1	2.7×10^4	7.2×10^{-5}	2.6	2.6		
	試行 2	1.3×10^5	2.1×10^{-4}	1.5	1.1	1.7	1.9
	試行 3	9.9×10^4	9.6×10^{-5}	1.0	2.0		
BTK C481R	試行 1	5.9×10^4	2.6×10^{-5}	0.4	7.5	N/A	N/A
BTK C481T	試行 1	3.1×10^4	6.8×10^{-6}	0.2	28	N/A	N/A

略語：k_a = 結合速度定数、k_d = 解離速度定数、K_D = 平衡解離定数（k_d / k_a）、N/A = 該当なし、$t_{1/2}$ = 解離半減期（ln 2 / k_d）

2.6.2.2.1.5 BTK 又は BTK C481 耐性変異体を一過性に発現させた細胞における BTK リン酸化阻害作用

LOXO-305-PHARM-041 試験（4.2.1.1.6）

細胞での BTK 活性に対するピルトブルチニブの阻害作用を評価するため、HEK293 細胞に、BTK 並びに BTK C481S、C481T、C481R、又は C481G をコードする発現コンストラクトを導入した。一連の濃度（最終濃度：0.1～300 nM）のピルトブルチニブ、イブルチニブ又はアカラブルチニブで細胞を 2 時間処理し、BTK の主要な自己リン酸化部位である Y223 (Park et al. 1996)のリン酸化を測定することにより BTK リン酸化活性を評価した（LOXO-305-PHARM-041 試験）。BTK、BTK C481S、及び BTK C481T のリン酸化は、標準的なウェスタンブロッティング法及び化学発光法で検出し、シグナルを定量した。BTK C481R 及び C481G のリン酸化は MesoScale Diagnostics（MSD）の方法で検出した。BTK Y223 リン酸化シグナルを総 BTK に対して正規化し、対照（DMSO 処置）と比較した相対値から IC_{50} 値を算出した。

ピルトブルチニブ、イブルチニブ及びアカラブルチニブは、細胞での BTK の自己リン酸化に対してほぼ同程度の阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.9、2.0 及び 11.9 nM であった（表 2.6.2-3）。BTK C481S、C481T、C481G、及び C481R 発現細胞でのピルトブルチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 8.1、7.1、13.9、及び 12.6 nM であった。一方、イブルチニブとアカラブルチニブの阻害作用は、BTK C481 耐性変異体を発現する細胞で著しく減少し、イブルチニブの BTK C481S 及び BTK C481T 発現細胞での IC_{50} 値はそれぞれ 120 nM 及び 150 nM 超、アカラブルチニブの BTK C481T 発現細胞での IC_{50} 値は 300 nM 超であった。BTK C481S 発現細胞では、アカラブルチニブの BTK 自己リン酸化阻害作用はほとんど見られず、IC_{50} 値は算出できなかった。また、BTK C481G 及び BTK C481R 発現細胞でも、イブルチニブとアカラブルチニブの BTK 自己リン酸化阻害作用がほとんど認められなかったため、IC_{50} 値は算出できなかった。これらのデータから、ピルトブルチニブは細胞での BTK 及び BTK C481 耐性変異体の自己リン酸化を阻害するが、イブルチニブ及びアカラブルチニブの BTK 自己リン酸化阻害作用は BTK C481 耐性変異体では減弱することが示された。

表 2.6.2-3. BTK 又は BTK C481 耐性変異体を一過性に発現させた HEK293 細胞での BTK 自己リン酸化に対する阻害作用

キナーゼ	ピルトブルチニブ IC_{50}（nM）[a]	n	イブルチニブ IC_{50}（nM）[a]	n	アカラブルチニブ IC_{50}（nM）[a]	n
BTK	3.9 ± 1.6	3	2.0 ± 0.1 (1.9, 2.0)	2	12 ± 3.7 (9.3, 15)	2
BTK C481S	8.1 ± 1.3 (9.0, 7.2)	2	120	1	N/D	2
BTK C481T	7.1 ± 3.3 (4.8, 9.5)	2	>150 (146, N/D)	2	>300 (270, N/D)	2
BTK C481G	14 ± 3.8 (17, 11)	2	N/D	1	N/D	1
BTK C481R	13 ± 5.2 (9.0, 16)	2	N/D	1	N/D	1

データは平均値 ± 標準偏差で示す。
N/D：化合物の最高濃度（300 nM）でほとんど阻害が認められなかったため、IC_{50} は算出できなかった。
[a] n = 2 の場合、表中の括弧内に個別値を記載した。

2.6.2.2.1.6　BTK 及び BTK C481S を安定的に発現させた細胞における BTK リン酸化阻害作用

LOXO-305-PHARM-014 試験（4.2.1.1.7）

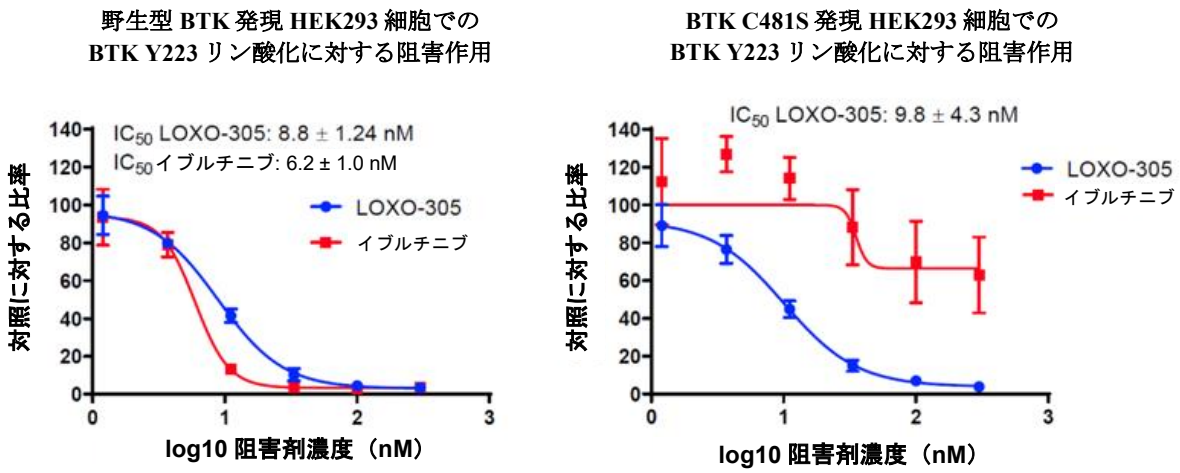
BTK 及び BTK C481S 変異体タンパク質を安定的に発現する HEK293 細胞でのピルトブルチニブ及びイブルチニブの阻害活性を評価する目的で、一連の濃度のピルトブルチニブ又はイブルチニブで細胞を 2 時間処理し、BTK Y223 リン酸化活性をウェスタンブロッティング法で評価した。BTK Y223 リン酸化シグナルを総 BTK に対して正規化し、対照（DMSO 処置）と比較した相対値から、IC_{50} 値を算出した（LOXO-305-PHARM-014 試験）。

ピルトブルチニブは、BTK 及び BTK C481S をそれぞれ安定的に発現させた HEK293 細胞に対して同程度に BTK Y223 リン酸化を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 8.8 及び 9.8 nM であった。イブルチニブの BTK に対する IC_{50} 値は 6.2 nM であり、ピルトブルチニブと同程度の活性であった。一方、BTK C481S 変異体に対するイブルチニブの IC_{50} 値は 300 nM 超であり、これはピルトブルチニブの IC_{50} 値の 30 倍を超える値であった（表 2.6.2-4）（図 2.6.2-3）。これらのデータから、ピルトブルチニブは、HEK293 細胞に安定的に発現させた BTK 及び BTK C481S の自己リン酸化を阻害することが示された。

表 2.6.2-4. BTK 又は BTK C481S を安定的に発現させた HEK293 細胞での BTK 自己リン酸化に対する阻害作用

キナーゼ	ピルトブルチニブ IC_{50}（nM）	n	イブルチニブ IC_{50}（nM）	n
BTK	8.8 ± 1.2	3	6.2 ± 1.0	3
BTK C481S	9.8 ± 4.3	3	>300	3

データは平均値±標準偏差で示す。



データ及び IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す。

図 2.6.2-3. BTK 又は BTK C481S を安定的に発現させた HEK293 細胞での BTK Y223 リン酸化に対するピルトブルチニブ及びイブルチニブの阻害作用

2.6.2.2.1.7　ヒトリンパ腫細胞株での細胞シグナル伝達に対するピルトブルチニブの作用

LOXO-305-PHARM-013 試験（4.2.1.1.8）
LOXO-305-PHARM-040 試験（4.2.1.1.9）

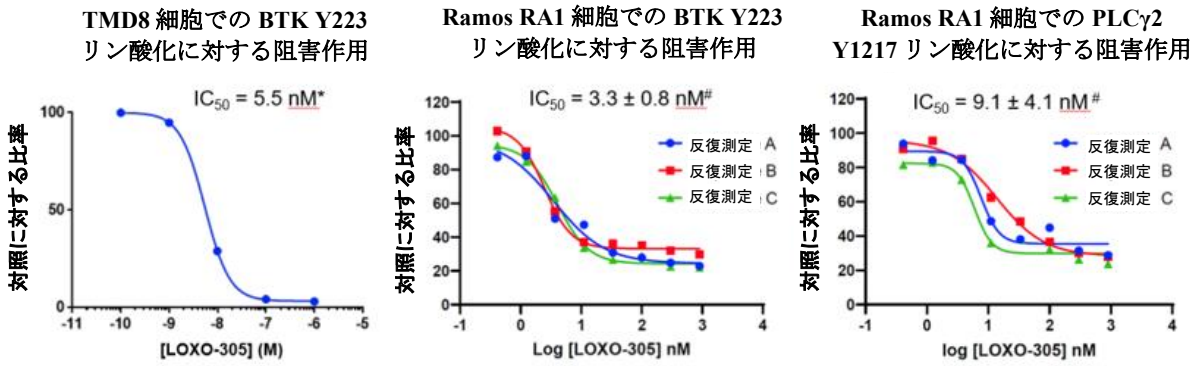
Ramos RA1 細胞株は、バーキットリンパ腫患者の腹水から樹立され(Klein et al. 1975)、BCR の活性化により BTK 依存性シグナル伝達が誘導されることが示されている(Nisitani et al. 1999; Evans et al. 2013)。TMD8 細胞株は、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（diffuse large B-cell lymphoma：DLBCL）患者の骨髄検体から樹立され(Tohda et al. 2006)、その特徴から ABC-DLBCL サブタイプに分類されており、生存を BTK に依存している(Davis et al. 2010)。これらのヒトリンパ腫細胞株を用いて BTK 依存性の細胞シグナル伝達に対するピルトブルチニブの作用を検討した。Ramos RA1 細胞は、一連の濃度のピルトブルチニブとともに 2 時間インキュベートした後、抗 IgM で刺激し、リン酸化 BTK Y223 及びリン酸化 PLCγ2 Y1217 についてウェスタンブロットで分析した（LOXO-305-PHARM-013 試験）。TMD8 細胞は、一連の濃度のピルトブルチニブとともに 30 分間インキュベートした後、リン酸化 BTK Y223 についてウェスタンブロットで分析した（LOXO-305-PHARM-040 試験）。

ピルトブルチニブは TMD8 及び Ramos RA1 細胞での BTK Y223 リン酸化を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.2 及び 3.3 nM であった（表 2.6.2-5）（図 2.6.2-4）。また、ピルトブルチニブは Ramos RA1 細胞で PLCγ2 Y1217 のリン酸化を阻害し、IC_{50} 値は 9.1 nM であった（表 2.6.2-5）（図 2.6.2-4）。これらのデータから、ピルトブルチニブはヒト B 細胞性リンパ腫細胞株での BTK シグナル伝達を阻害することが示された。

表 2.6.2-5. ヒトリンパ腫細胞株での BTK シグナル伝達に対するピルトブルチニブの阻害作用

細胞株	n	評価指標	ピルトブルチニブ IC_{50}（nM）[a]
TMD8	2	リン酸化 BTK Y223	3.2 ± 3.3 (0.9, 5.5)
Ramos RA1	3	リン酸化 BTK Y223	3.3 ± 0.8
Ramos RA1	3	リン酸化 PLCγ2 Y1217	9.1 ± 4.1

[a] n = 2 の場合、表中の括弧内に個別値を記載した。
データは平均値 ± 標準偏差で示す。



*1 つの独立した試行で得られた濃度反応曲線及び IC_{50} 値を示す。
IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す。

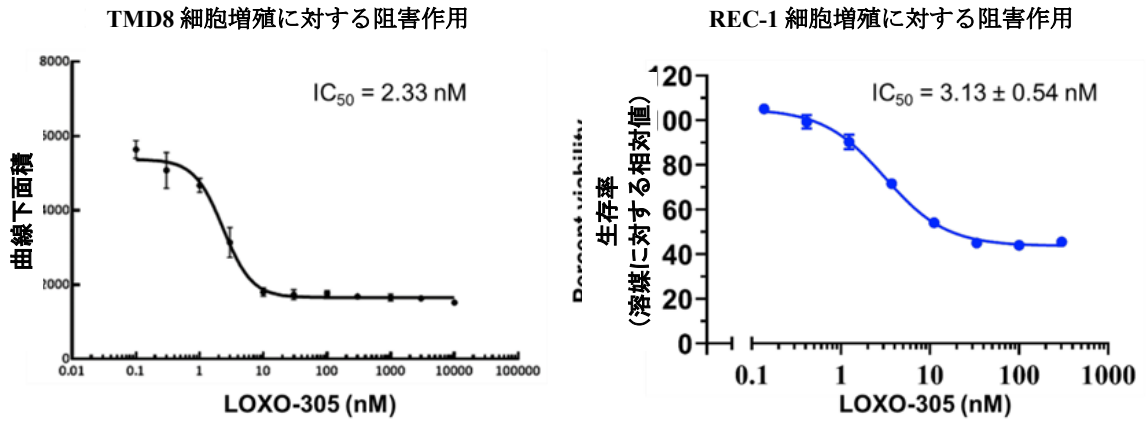
図 2.6.2-4. ヒトリンパ腫細胞株での BTK Y223 リン酸化及び PLCγ2 Y1217 リン酸化に対するピルトブルチニブの阻害作用

2.6.2.2.1.8　ヒト B 細胞性リンパ腫細胞株の細胞増殖に対するピルトブルチニブの作用

LOXO-305-PHARM-040 試験（4.2.1.1.9）
LOXO-305-PHARM-036 試験（4.2.1.1.10）
LOXO-305-PHARM-011 試験（4.2.1.1.11）

ヒト DLBCL 由来 TMD8 細胞株及びヒト MCL 由来 REC-1 細胞株を用いてピルトブルチニブの抗増殖活性を評価した。TMD8 細胞は 0.1～10000 nM の濃度範囲のピルトブルチニブで処理し（1 試行につき triplicate、1 試行を実施）、Cell Imaging System を用いて、細胞密度のリアルタイム評価を行った（LOXO-305-PHARM-040 試験）。REC-1 細胞は、ピルトブルチニブ（最終濃度範囲：0.14～300 nM）とともに 72 時間インキュベートした後、CellTiter-Glo 試薬を添加して細胞を溶解し、発光をマルチモードプレートリーダーで測定し（1 試行につき duplicate 又は triplicate、3 試行を実施）、シグナルを溶媒対照の値に対して正規化した（LOXO-305-PHARM-036 試験）。

ピルトブルチニブは TMD8 及び REC-1 細胞の増殖を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 2.33 及び 3.13 nM であった。以上より、本薬は DLBCL 及び MCL 細胞株モデルのいずれについても細胞増殖を阻害することが示された（図 2.6.2-5.）。



REC-1 細胞に対する相対的 IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す（n = 3）。

図 2.6.2-5. TMD8 及び REC-1 細胞増殖に対するピルトブルチニブの阻害作用

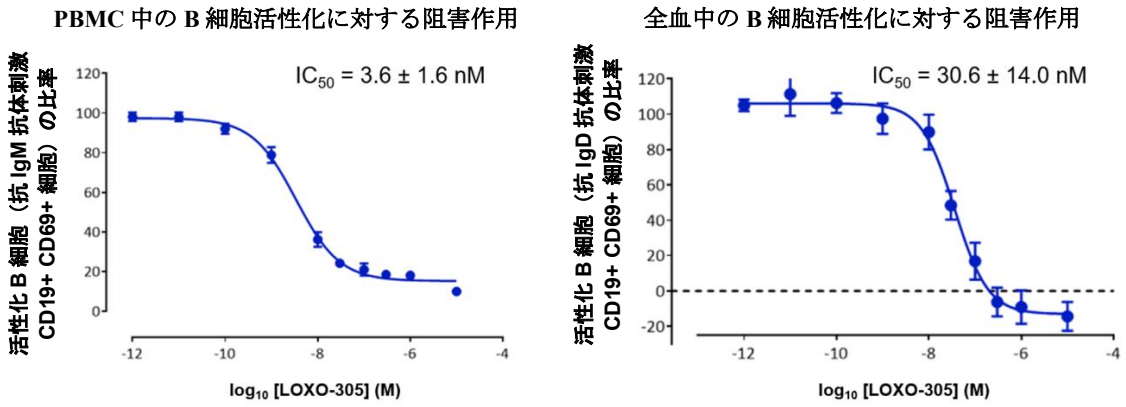
非特異的細胞傷害は、BTK を発現していないヒト急性 T 細胞性白血病細胞株の Jurkat 細胞(Kitanaka et al. 1998)を用いて、レサズリン蛍光アッセイで細胞生存性を測定することにより評価した（LOXO-305-PHARM-011 試験）。ピルトブルチニブは、検討した最高濃度の 1 µM でも Jurkat 細胞の生存性に影響を及ぼさなかったことから、BTK 非発現細胞株をピルトブルチニブで処理しても非特異的な細胞傷害は生じないことが示された。

2.6.2.2.1.9　ヒト末梢血単核細胞及び全血中の B 細胞活性化に対するピルトブルチニブの阻害作用及び細胞での可逆性の確認

LOXO-305-PHARM-016 試験（4.2.1.1.12）

ヒト PBMC 及び全血中の B 細胞の活性化に対するピルトブルチニブの阻害作用を、抗 IgM 抗体又は抗 IgD 抗体による刺激で CD69 が陽性になった CD19+B 細胞の比率を指標に(Treanor 2012; Haerzschel et al. 2016)評価した。複数のドナーから採取したヒト PBMC 又は全血を一連の濃度のピルトブルチニブとともに 1 時間インキュベートした。PBMC は抗 IgM 抗体、全血は抗 IgD 抗体により BCR を活性化し、活性化 B 細胞の比率をフローサイトメトリーで測定した（LOXO-305-PHARM-016 試験）。

ピルトブルチニブは PBMC 及び全血中の B 細胞の活性化を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.6 及び 30.6 nM であった（図 2.6.2-6）。ヒト全血について血漿タンパク結合率 95.8%（LOXO-305-DMPK-060 試験、CTD 第 5.3.2.1.3 項）で補正すると、IC_{50} 値の 30.6 nM は血漿中非結合型ピルトブルチニブ濃度 1.3 nM に相当する。次に、ピルトブルチニブの結合の可逆性を、ウォッシュアウト法を用いた B 細胞活性化アッセイで検討した。PBMC をピルトブルチニブとともにプレート上で 1 時間インキュベートした後、洗浄を 6 回繰り返して非結合のピルトブルチニブを除去し、その後 B 細胞を前述と同様に活性化して分析した。ウォッシュアウトしたプレートでのピルトブルチニブによる B 細胞活性化阻害率は、最高濃度の 10 µM でも 10%未満であったことから、BTK に対するピルトブルチニブの結合は可逆的であることが示唆された（図 2.6.2-7）。



値は平均値 ± 標準偏差で示す（PBMC：n = 4、全血：n = 7）。

図 2.6.2-6. ヒト PBMC 及び全血中の B 細胞活性化に対するピルトブルチニブの阻害作用

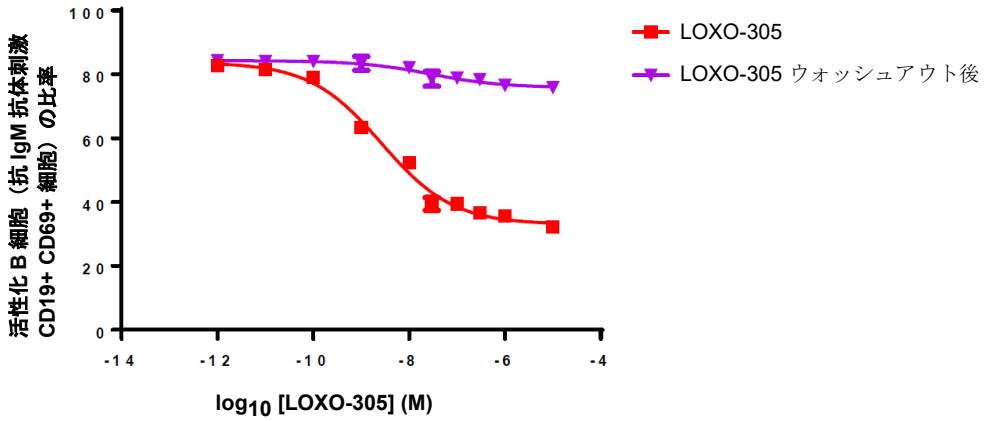


図 2.6.2-7. ウォッシュアウト法によるヒト PBMC 中の B 細胞活性化に対するピルトブルチニブ阻害作用の可逆性

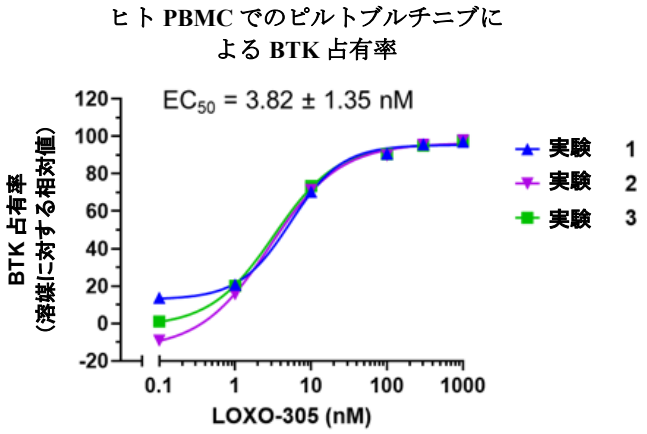
2.6.2.2.1.10　ヒト末梢血単核細胞でのピルトブルチニブによる in vitro BTK 占有率

LOXO-305-PHARM-037 試験（4.2.1.1.13）

ヒト PBMC におけるピルトブルチニブの BTK 占有率を、蛍光標識したピルトブルチニブ由来分子を用いて in vitro で評価した。健康ドナーから採取した新鮮なヒト全血から PBMC を分離し、ウシ胎児血清（fetal bovine serum：FBS）添加培地に懸濁し、最終濃度範囲 0.1～1000 nM のピルトブルチニブとともに 2 時間インキュベートした。その後、LOX-00023040（共有結合型で、細胞透過性の蛍光色素分子結合ピルトブルチニブ由来分子）を蛍光プローブとして添加し、PBMC 中の非占有 BTK を標識した。1 時間インキュベートした後、細胞を洗浄して溶解し、溶解物を回収し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis：SDS-PAGE）を行い、蛍光ゲルスキャニングで解析した。ゲルバンドの蛍光シグナルから背景値を減じて定量し、バンド量の値を溶媒対照データに対して正規

化し、溶媒対照（非占有 BTK が 100%と設定）と比較した BTK の非占有率を算出した（LOXO-305-PHARM-037 試験）。

ピルトブルチニブは in vitro でヒト PBMC の BTK を濃度依存的に占有し、平均 EC_{50} 値は 3.82 nM であった（図 2.6.2-8）。この値をピルトブルチニブの FBS でのタンパク結合率 15.2%（LOXO-305-DMPK-016 試験、CTD 第 5.3.2.1.2 項）で補正すると、非結合型ピルトブルチニブ濃度 3.24 nM に相当する。ピルトブルチニブの平均 BTK 占有率は 300 nM の濃度で 95%を超え、1000 nM では 97%超であった（表 2.6.2-6）。これらのピルトブルチニブ濃度を FBS タンパク結合率で補正すると、平均 BTK 占有率が 95%となる 300 nM は、非結合型ピルトブルチニブ濃度 254 nM に相当し、この値は臨床推奨用量 200 mg QD での血漿中非結合型ピルトブルチニブ $C_{min,ss}$ の 198 nM と同程度であった。また、1000 nM を FBS タンパク結合率で補正すると、非結合型ピルトブルチニブ濃度 850 nM に相当し、この値は臨床推奨用量 200 mg QD での血漿中非結合型ピルトブルチニブ $C_{max,ss}$（567 nM）の約 1.5 倍であった（LOXO-305-DMPK-081 試験、CTD 第 2.7.2.2.2.3.3 項）。



EC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す。

図 2.6.2-8. ヒト PBMC でのピルトブルチニブによる濃度依存的な BTK 占有率

表 2.6.2-6. ヒト PBMC でのピルトブルチニブによる in vitro BTK 占有率

ピルトブルチニブ濃度（nM）	BTK 占有率（溶媒に対して正規化した値）			
	実験 1	実験 2	実験 3	平均値
0.1	13.82	-9.01	1.17	1.99
1	20.80	15.69	20.23	18.91
10	70.36	71.39	73.36	71.70
100	90.74	89.75	90.43	90.30
300	95.70	95.45	95.02	95.39
1000	96.98	97.83	97.73	97.51

2.6.2.2.2　In vivo 試験

2.6.2.2.2.1　ヒト B 細胞性リンパ腫異種移植モデルでのピルトブルチニブの効果

LOXO-305-PHARM-010 試験（4.2.1.1.14）
LOXO-305-PHARM-038 試験（4.2.1.1.15）
LOXO-305-PHARM-030 試験（4.2.1.1.16）

In vivo でのヒト B 細胞性リンパ腫細胞株の増殖に対するピルトブルチニブの作用を検討するため、マウスを用いた腫瘍異種移植試験を実施した。ヒト ABC-DLBCL 由来の OCI-Ly10 及び TMD8 細胞株並びに MCL 由来の REC-1 細胞株の増殖は、BCR 及び BTK シグナル伝達経路の慢性的活性化に依存していることが示されている(Davis et al. 2010; Rauert-Wunderlich et al. 2016)。OCI-Ly10 モデルでは、雄の NOD SCID マウスの後背部に OCI-Ly10 細胞を皮下移植し、体積が約 150～200 mm^3 になるまで増殖させた（LOXO-305-PHARM-010 試験）。マウスを腫瘍体積で無作為化して各用量群に割り付け、ピルトブルチニブ（10 又は 50 mg/kg BID、1 群 12 例）又は溶媒（1 群 10 例）を 28 日間経口投与した。投与期間中及び投与期間終了後 35 日間にわたり、腫瘍体積を週 3 回測定した。TMD8 モデルでは、雌の Balb/c SCID マウスの側腹部に TMD8 細胞を皮下移植し、平均腫瘍体積が 400 mm^3 に達するまで 19 日間増殖させた（LOXO-305-PHARM-038 試験）。マウスを腫瘍体積で無作為化して各用量群に割り付け、ピルトブルチニブ（15 又は 30 mg/kg BID、1 群 10 例）を 18 日間又は溶媒（1 群 10 例）を 14 日間経口投与した。試験期間中、腫瘍体積は週 3 回測定した。REC-1 モデルでは、雌の無胸腺ヌードマウスの側腹部に REC-1 細胞を皮下移植し、平均腫瘍体積が 150 mm^3 に達するまで 18 日間増殖させた（LOXO-305-PHARM-030 試験）。マウスを腫瘍体積で無作為化して各用量群に割り付け、ピルトブルチニブ（10、30、又は 50 mg/kg BID、1 群 6 例）又は溶媒（1 群 10 例）を 21 日間経口投与した。試験期間中、腫瘍体積は週 2 回測定した。

OCI-Ly10 モデルで、ピルトブルチニブは腫瘍増殖を用量依存的に阻害し、投与 28 日目の 10 及び 50 mg/kg BID 群での阻害率はそれぞれ 88%及び 95%であった（図 2.6.2-9）。ピルトブルチニブ投与中止後における腫瘍の再増殖は軽度であり、投与中止 30 日後での 10 及び 50 mg/kg 群の腫瘍増殖阻害率はそれぞれ 83%及び 93%と維持されていた（図 2.6.2-9）。TMD8 異種移植モデルでは、ピルトブルチニブは腫瘍増殖を用量依存的に阻害し、投与 14 日目の 15 及び 30 mg/kg 群での阻害率はそれぞれ 61%及び 81%であった（図 2.6.2-9）。投与開始時の腫瘍体積と比較したとき、投与 18 日目に 30 mg/kg 群で−51%の腫瘍退縮が認められた。REC-1 異種移植モデルでは、ピルトブルチニブは腫瘍増殖を阻害し、投与 21 日目の 10 及び 30 mg/kg BID 群での阻害率はそれぞれ 80%及び 84%であり、50 mg/kg BID 群では投与開始時より−11%の腫瘍退縮が認められた（図 2.6.2-9）。3 種類のリンパ腫異種移植試験のすべての投与群で忍容性は良好であり、投与に関連する死亡は認められなかった（図 2.6.2-10）。総合すると、これらのデータから、ピルトブルチニブは 2 種類のヒト ABC-DLBCL 細胞株及び 1 種類のヒト MCL 細胞株を用いたマウス異種移植腫瘍モデルで腫瘍増殖を阻害するとともに、良好な忍容性を示すことが明らかになった。

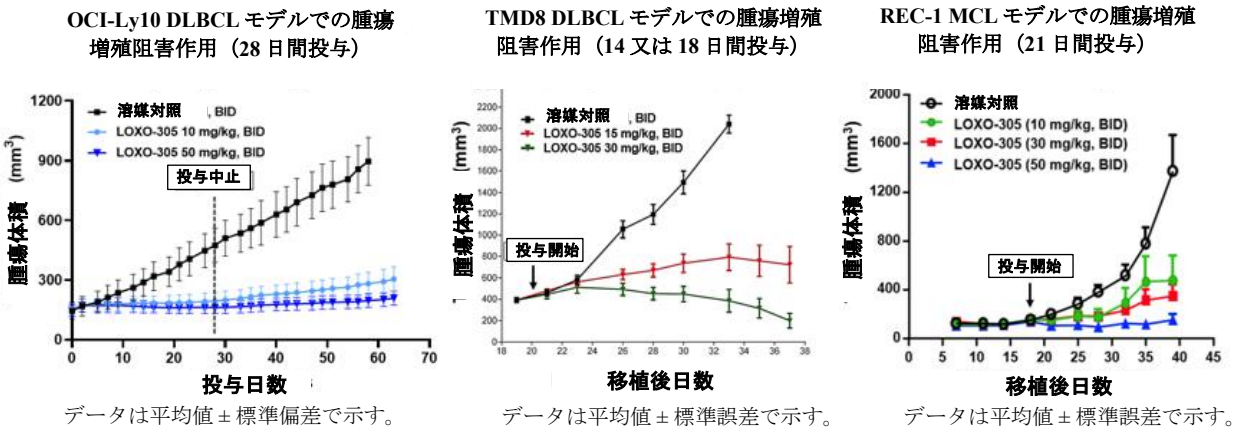


図 2.6.2-9. ヒト B 細胞性リンパ腫細胞株異種移植腫瘍モデルでの腫瘍増殖に対する阻害作用

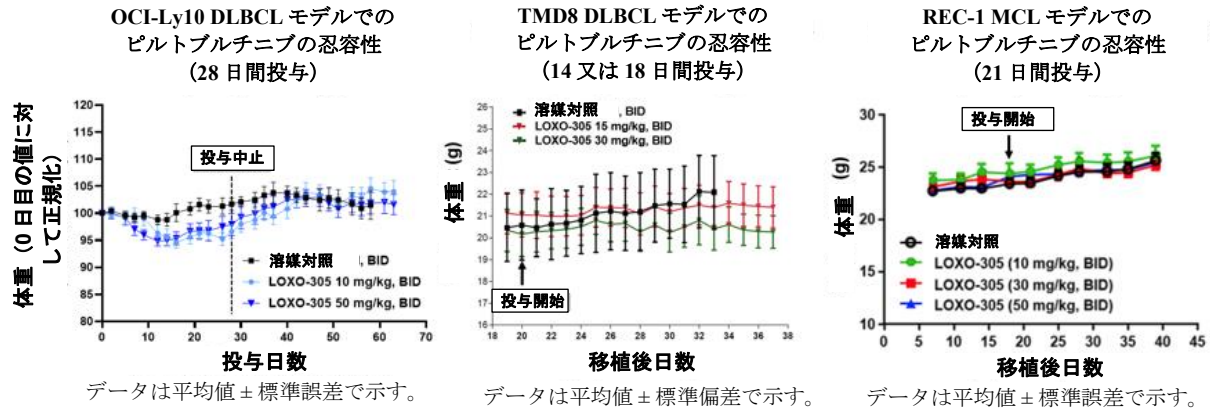


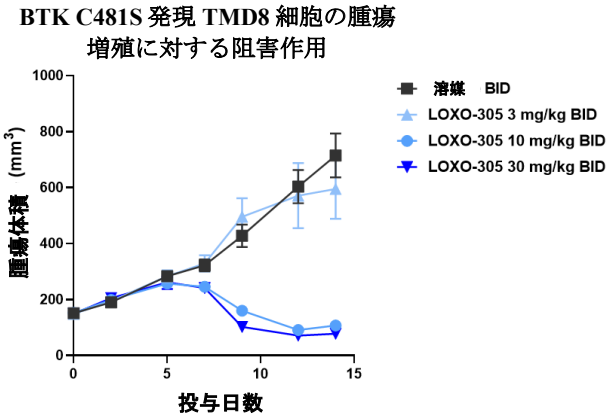
図 2.6.2-10. ヒト B 細胞性リンパ腫細胞株異種移植腫瘍モデルでのピルトブルチニブの忍容性

2.6.2.2.2.2　ヒト DLBCL BTK C481S 異種移植モデルでのピルトブルチニブの効果

LOXO-305-PHARM-017 試験（4.2.1.1.17）

ヒト DLBCL 由来の BTK C481S 発現 TMD8 細胞を用いた異種移植モデルでピルトブルチニブの in vivo 効果を評価した。雌の Balb/c SCID マウスの側腹部に BTK C481S 発現 TMD8 細胞を移植し、平均腫瘍体積が 150 mm^3 になるまで 12 日間増殖させた（LOXO-305-PHARM-017 試験）。マウスを腫瘍体積で無作為化し、ピルトブルチニブ（3、10、又は 30 mg/kg BID、1 群 10 例）又は溶媒（1 群 14 例）を 14 日間経口投与した。試験期間中、腫瘍体積は週 2～3 回測定した。

ピルトブルチニブを 10 及び 30 mg/kg BID の用量で投与したとき、溶媒対照と比較して用量依存的な腫瘍増殖阻害が認められた（図 2.6.2-11）。投与開始時の腫瘍体積と比較したとき、投与 14 日目には 10 及び 30 mg/kg BID 群でそれぞれ−29%及び−48%の腫瘍退縮が認められた。これらのデータから、ピルトブルチニブは BTK C481S 発現 DLBCL モデルで腫瘍増殖を阻害し、腫瘍退縮を誘導することが示された。



データは平均値 ± 標準誤差で示す。

図 2.6.2-11. BTK C481S 発現 TMD8 異種移植モデルでの腫瘍増殖に対する阻害作用

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　BTK 以外のキナーゼに対するピルトブルチニブの作用

LOXO-305-PHARM-003 試験（4.2.1.2.1）
LOXO-305-PHARM-031 試験（4.2.1.1.1）
LOXO-305-PHARM-033 試験（4.2.1.2.2）
LOXO-305-PHARM-034 試験（4.2.1.2.3）
LOXO-305-PHARM-035 試験（4.2.1.2.4）

ピルトブルチニブの BTK 以外の各種キナーゼに対する阻害プロファイルを明らかにするため、371 種類のヒト野生型キナーゼに対して、放射性標識 ATP アッセイ（[redacted] Kinase Profiler）を用いて検討した。各アッセイは、各キナーゼの K_m 値相当の ATP 濃度で実施し、ピルトブルチニブの濃度は 1 μM とした（LOXO-305-PHARM-003 試験）。なお、1 μM はピルトブルチニブの BTK に対する IC_{50} 値の約 320 倍に相当する（CTD 第 2.6.2.2.1.1 項）。その結果、阻害率 50%超（対照に対する割合［percent of control：POC］の値が 50%未満）であったのは、BTK を除く 370 種類のキナーゼのうち 8 種類（ERBB4、MEK2、BRK、MEK1、TXK、CSK、YES1、及び FYN）のみであった（表 2.6.2-7）。この結果から、ピルトブルチニブは、検討した BTK 以外の 370 種類のキナーゼの 98%と比較して、BTK に高い選択性（300 倍以上）を示した。

スクリーニングアッセイで POC 値が 50 未満であった 8 種及び TEC（イブルチニブの既知のオフターゲット[Estupiñán et al. 2021]）に対するピルトブルチニブの阻害活性を精査し IC_{50} 値を求めるため、放射性標識 ATP アッセイ（各キナーゼの K_m 値に近い ATP 濃度を使用）を実施した（LOXO-305-PHARM-031 試験）。結果を表 2.6.2-7 に示す。

表 2.6.2-7. キナーゼアッセイでの非標的キナーゼに対するピルトブルチニブの作用

キナーゼ	K_m [ATP]（μM）	POC（%）［ピルトブルチニブ］= 1 μM	N	ピルトブルチニブ IC_{50}（nM）	N	BTK と比較した倍数
BTK	50	1.8 ± 0.40	4	3.2 ± 1.3	12	1
ERBB4/HER4	2.5	2.6 ± 0.66	4	13 ± 2.5	2	4.2
BRK	100	10 ± 0.37	4	54 ± 3.0	2	17.2
MEK2	1	7.6 ± 0.61	4	83 ± 5.4	2	26.3
MEK1	2.5	12 ± 1.6	4	147 ± 5.7	2	46.7
YES/YES1	50	39 ± 0.55	4	157 ± 4.2	2	49.8
TXK	30	20 ± 0.67	4	209 ± 13	2	66.3
CSK	50	34 ± 0.52	4	552 ± 50	2	175.2
TEC	10	65 ± 1.1	4	1230 ± 256	12	391.8
FYN	30	49 ± 2.0	4	1710 ± 184	2	542.9

データは平均値 ± 標準偏差で示す。

さらに、前述の 9 種類のキナーゼについて、細胞におけるキナーゼ活性に対するピルトブルチニブの阻害作用を評価するため、以下の試験を実施した。

細胞における（BTK、BRK、TXK、YES1、CSK、FYN、及び TEC）へのピルトブルチニブの結合を評価するため、NanoBRET 技術を用い、それぞれのキナーゼ-NanoLuc ルシフェラーゼ融合タンパク質を導入した HEK293 細胞において、キナーゼ-NanoLuc に可逆的に結合する細胞浸透性蛍光トレーサーの結合と競合させるのに必要なピルトブルチニブの濃度を測定し、IC_{50} 値を算出した（LOXO-305-PHARM-033 試験）。その結果、ピルトブルチニブの IC_{50} 値は、BTK、TEC、及び BRK に対してそれぞれ 0.66、70.46、及び 360.47 nM であり、一方、TXK、YES1、CSK、及び FYN に対しては、検討した最高濃度の 5 μM を超える値であった（表 2.6.2-8）。

ERBB4 に対するピルトブルチニブの細胞活性を定量するため、タグ付加 ERBB4 受容体チロシンキナーゼ及びタグ付加 SH2 ドメイン（キナーゼのリン酸化 C 末端テールに結合して化学発光シグナルを生じる）を共発現する PathHunter®細胞を用いて、ERBB4 のアゴニストに対するピルトブルチニブの競合作用を評価した（LOXO-305-PHARM-034 試験）。ERBB4 に対する IC_{50} 値は、検討した最高濃度の 10 μM を超える値であり（表 2.6.2-8）、ピルトブルチニブは細胞アッセイで ERBB4 活性を阻害しないことが示唆された。

MEK1 及び MEK2 に対するピルトブルチニブの活性は、MEK1 及び MEK2 の基質である ERK1 及び ERK2 のリン酸化状態を指標に、2 種類のヒトがん細胞株（HCT116 及び A375）で評価した（LOXO-305-PHARM-035 試験）。これらのがん細胞株では、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（mitogen-activated protein kinase：MAPK）シグナル伝達が活性化されていることが知られている。細胞を様々な濃度のピルトブルチニブ（濃度範囲：0.0001～20 μM）とともにインキュベートし、リン酸化 ERK1/2 を有する細胞数を測定した。HCT116 及び A375 細胞に対するピルトブルチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 12.6 及び 3.79 μM であった（表 2.6.2-8）。これらの結果から、ピルトブルチニブは MEK1 及び MEK2 の細胞内活性を阻害しないと考えられた。

表 2.6.2-8. 細胞アッセイでの BTK 及び BTK 以外のキナーゼに対するピルトブルチニブの作用

キナーゼ	N	IC_{50}（平均値 ± SD、nM）	BTK と比較した倍数#	評価指標
BTK	3	0.66 ± 0.34	1	トレーサーの競合的置換
TEC	3	70.46 ± 20.30	106.8	トレーサーの競合的置換
BRK/PTK6	3	360.47 ± 198.56	546.2	トレーサーの競合的置換
TXK	3	>5000*	>7600	トレーサーの競合的置換
YES1	3	>5000*	>7600	トレーサーの競合的置換
CSK	3	>5000*	>7600	トレーサーの競合的置換
FYN	3	>5000*	>7600	トレーサーの競合的置換
ERBB4	2	>10000*	N/D	C 末端テールのリン酸化
MEK1/MEK2	3	12600 ± 2400	N/D	ERK1/2 のリン酸化（HCT116 細胞）
MEK1/MEK2	3	3790 ± 1310	N/D	ERK1/2 のリン酸化（A375 細胞）

*データ値が IC_{50} の曲線に適合しない場合は、検討した最高濃度を用いて平均値を推定した。
BTK と比較した倍数は、NanoBRET™ 競合的置換アッセイで評価したキナーゼについて算出した。
N/D = 算出せず、SD = 標準偏差

2.6.2.3.2　その他の受容体及び酵素に対する作用

LOXO-305-PHARM-004 試験（4.2.1.2.5）

ピルトブルチニブの潜在的オフターゲット活性を検出する目的で、膜貫通型及び可溶性受容体、イオンチャネル、モノアミントランスポーター、及び酵素を含む 44 種類の標的に対し、放射性リガンド結合アッセイ並びに酵素及び取込みアッセイを用いて評価した（LOXO-305-PHARM-004 試験）。ピルトブルチニブは 1 μM の濃度で評価した。その結果、評価した受容体及び酵素に対する 50%以上の結合又は明らかな阻害活性は認められなかった。なお、1 μM の濃度は、臨床推奨用量 200 mg QD における最高血漿中非結合型濃度（unbound $C_{max,ss}$ = 0.57 μM）の約 1.8 倍の濃度である（LOXO-305-DMPK-081 試験、CTD 第 2.7.2.2.2.3.3 項）。

2.6.2.4　安全性薬理試験

独立した安全性薬理試験として、in vitro hERG 試験及びイヌを用いた心血管系安全性薬理試験を実施した（表 2.6.2-9）。また、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験で以下の心血管系、呼吸系、及び CNS の安全性薬理評価項目を評価した。

- イヌ 1 及び 3 ヵ月間試験での心電図及び心拍数
- イヌ 1 ヵ月間試験での呼吸系評価項目及び血圧
- ラット 1 ヵ月間試験での CNS 評価項目（機能観察総合評価法及び自発運動量）

安全性薬理試験は、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development：OECD）データ相互受入れ合意の加盟国で、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施し、ICH、及び OECD の適用可能なガイドラインを参照した。

表 2.6.2-9. 安全性薬理試験の一覧

試験の種類	試験系及び試験デザイン	GLP 適用の有無	実施施設／試験番号
In vitro hERG	hERG チャネルを安定的に発現する遺伝子組換え HEK293 細胞を用いた hERG パッチクランプアッセイ	適用	[redacted]米国 LOXO-305-SPHARM-003
心血管系安全性薬理試験	雄のイヌを用いた単回経口投与ラテン方格クロスオーバーデザイン	適用	[redacted]英国 LOXO-305-SPHARM-002

2.6.2.4.1　In vitro hERG アッセイ

LOXO-305-SPHARM-003 試験（4.2.1.3.1）、概要表 2.6.3.4

2.6.2.4.1.1　要約

ピルトブルチニブは HEK293 細胞の hERG チャネルを阻害し、その IC_{50} 値は 32 µM（15 µg/mL）であった。これは、非結合型濃度に基づく比較[1]で、ヒトに 200 mg QD を投与したときの C_{max}（0.27 µg/mL）の 55 倍であった。

2.6.2.4.1.2　目的

本試験は、生理学的条件に近い温度で、in vitro での hERG チャネル電流（急速活性型遅延整流心臓カリウム電流［rapidly activating delayed rectifier cardiac potassium current : IKr］のサロゲート）に対するピルトブルチニブの影響を評価するために実施した。

2.6.2.4.1.3　試験デザイン

hERG チャネルを安定的に発現する HEK293 細胞をピルトブルチニブで処理し、hERG チャネル電流への影響を評価した（

表 2.6.2-10）。陰性対照（溶媒対照）は DMSO を使用し、陽性対照としてテルフェナジン処理群を設定した。

表 2.6.2-10. 試験デザイン

ピルトブルチニブ濃度（µM）	評価した細胞数
0（溶媒対照）	3
3	3
10	3
30	3
100	3

2.6.2.4.1.4　結果

ピルトブルチニブは hERG チャネル電流を阻害し、その IC_{50} 値は 32 µM（Hill 係数：1.1）であった（表 2.6.2-11）。陽性対照のテルフェナジンの結果から、本試験系の hERG 阻害作用への感受性が裏付けられた。

[1] ヒトでのタンパク結合率を 95.8%として算出。

表 2.6.2-11. hERG アッセイの結果

ピルトブルチニブ濃度（μM）	hERG チャネル電流阻害率（%）（± SEM）
0（溶媒対照）	2.0 ± 0.3
3	8.5 ± 1.1*
10	22 ± 0.3*
30	49 ± 1.3*
100	77 ± 0.9*

略語：hERG = ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子、SEM = 平均値の標準誤差
*：p<0.05、溶媒対照との比較（一元配置分散分析及び Dunnet の多重比較検定）

2.6.2.4.2　イヌを用いた心血管系安全性薬理試験（ラジオテレメトリー）

LOXO-305-SPHARM-002 試験（4.2.1.3.2）、概要表 2.6.3.4

2.6.2.4.2.1　要約

イヌにピルトブルチニブをラテン方格クロスオーバーデザインで経口投与し、投与後 25 時間以上にわたり、心血管系への影響をモニタリングした。ピルトブルチニブは、本試験で評価したいずれのパラメータ及び評価項目に対しても影響を及ぼさなかった。本試験での心血管系への影響に関する NOEL は 60 mg/kg で、この時の非結合型 C_{max} は、ヒトに臨床推奨用量（200 mg QD）で投与したときの約 6.5 倍であった。

2.6.2.4.2.2　目的

本試験は、覚醒下でイヌにピルトブルチニブを投与したときの心血管系への影響の有無を評価するために実施した。

2.6.2.4.2.3　試験デザイン

4 例の雄ビーグル犬に、溶媒対照又はピルトブルチニブ（5、20、又は 60 mg/kg）を単回経口投与し、投与 3 時間前から投与後 25 時間以上まで Data Sciences International（DSI）ラジオテレメトリーシステムを用いてテレメトリーデータを連続的に記録した。投与容量は 5 mL/kg とし、溶媒対照は 0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液を用いた。投与は、ラテン方格デザインで実施し、試験セッション 1～4 では、各動物に 4 種類の投与レジメンのうちのいずれか 1 種類の投与を実施した。試験セッション 5 及び 6（それぞれ 30 及び 37 日目）には、ピルトブルチニブをそれぞれ 20 又は 60 mg/kg の用量で投与し、トキシコキネティクス用検体採取のみを行い、心血管系データは測定しなかった。各セッションの投与の間は 7 日間以上のウォッシュアウト期間を設けた。使用した投与レジメンを表 2.6.2-12 に示す。

表 2.6.2-12. 覚醒テレメトリー装着イヌを用いた GLP 適用心血管系試験のデザイン

試験セッション	動物番号			
	D0075M	**D0076M**	**D0077M**	**D0078M**
1 1 日目	ピルトブルチニブ 5 mg/kg	ピルトブルチニブ 20 mg/kg	ピルトブルチニブ 60 mg/kg	溶媒 0 mg/kg
2 8 日目	溶媒 0 mg/kg	ピルトブルチニブ 60 mg/kg	ピルトブルチニブ 5 mg/kg	ピルトブルチニブ 20 mg/kg
3 15 日目	ピルトブルチニブ 60 mg/kg	溶媒 0 mg/kg	ピルトブルチニブ 20 mg/kg	ピルトブルチニブ 5 mg/kg
4 22 日目	ピルトブルチニブ 20 mg/kg	ピルトブルチニブ 5 mg/kg	溶媒 0 mg/kg	ピルトブルチニブ 60 mg/kg
5* 30 日目	ピルトブルチニブ 20 mg/kg			
6* 37 日目	ピルトブルチニブ 60 mg/kg			

*注：試験セッション 5 及び 6 はトキシコキネティクス用検体採取のみを行った。心血管系データは測定しなかった。

評価したパラメータ及び評価項目を以下に示す。

セッション 1～4：

- 一般状態
- 血行動態データ：心拍数並びに収縮期、拡張期、及び平均血圧
- 体温
- 心電図パラメータ：PR 間隔、RR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔、及び QTc(I)間隔
- 投与 6 時間後の曝露量

セッション 5 及び 6：

- トキシコキネティクス

2.6.2.4.2.4 結果

イヌにピルトブルチニブを 5、20、及び 60 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、溶媒投与群と比較して、血行動態及び心電図パラメータ並びに体温に影響は認められなかった。したがって、心血管系機能に関するピルトブルチニブの NOEL は 60 mg/kg であった。

試験セッション 1～4 の投与 6 時間後に、5、20、及び 60 mg/kg の用量でピルトブルチニブへの曝露が確認された。試験セッション 5 及び 6 で得られたトキシコキネティクスパラメータ及びヒト曝露量との比較を表 2.6.2-13 に示す。

表 2.6.2-13. 雄イヌのピルトブルチニブのトキシコキネティクスパラメーター及びヒト曝露量との比較（セッション 5 及び 6）

用量（mg/kg）	総 C_{max}（ng/mL）	非結合型 C_{max}（ng/mL）	C_{max} に基づく曝露量比 [a]	AUC_{0-24}（ng·h/mL）
20	2980	524	1.9x	37000
60	10000	1760	6.5x	139000

略語：AUC = 血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度
[a] 曝露量比は、イヌの非結合型 C_{max} を、ヒトに 200 mgQD を投与したときの非結合型 C_{max}（270 ng/mL）で除した値である。タンパク結合率は、イヌで 82.4%（CTD 第 2.6.4.4.2 項）、ヒトで 95.8%であった（LOXO-305-DMPK-060 試験、CTD 第 5.3.2.1.3 項）。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

ピルトブルチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6　考察及び結論

In vitro 及び in vivo 薬力学試験で、ピルトブルチニブは強力かつ選択的な非共有結合型の可逆的 BTK 及び BTK C481S 阻害剤であり、ヒト B 細胞性リンパ腫由来細胞株に対する抗腫瘍効果を示し、他のキナーゼ及び非キナーゼ標的はほとんど阻害せず、良好な薬理及び安全性プロファイルを示すことが明らかになった。In vitro 試験で、ピルトブルチニブは BTK 及び BTK C481S 耐性変異体を阻害し、K_m 濃度の ATP 存在下で測定した IC_{50} 値はそれぞれ 3.15 及び 1.42 nM であった。ピルトブルチニブの BTK 及び各種 BTK 耐性変異体への結合動態は類似しており、K_D 値は 0.2～1.7 nM の範囲であった。また、ピルトブルチニブの BTK 及び各種 BTK 耐性変異体との結合における解離速度定数及び解離半減期から、ピルトブルチニブの結合は可逆的であり非共有結合性であることが裏付けられた。BTK を一過性又は安定的に発現させた HEK293 細胞を用いた細胞アッセイで、ピルトブルチニブは BTK 及び各種 BTK 変異体の BTK Y223 リン酸化を強力に阻害し、IC_{50} 値は 3.9～13.9 nM の範囲であった。ピルトブルチニブはヒトリンパ腫由来 Ramos RA1 及び TMD8 細胞株での BTK 自己リン酸化も阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.3 及び 3.2 nM であった。ピルトブルチニブは DLBCL 由来 TMD8 細胞及び MCL 由来 REC-1 細胞の増殖を阻害し（IC_{50} 値：それぞれ 2.33 及び 3.13 nM）、ヒト PBMC 及び全血中の B 細胞の活性化を阻害した（IC_{50} 値：それぞれ 3.6 及び 30.6 nM、30.6 nM は血漿中非結合型ピルトブルチニブ濃度 1.3 nM に相当）。ピルトブルチニブによるヒト PBMC 中の B 細胞活性化阻害は、ピルトブルチニブをウォッシュアウトすることにより減弱したことから、BTK に対するピルトブルチニブの結合は可逆的であることが示唆された。In vivo 試験では、2 種類のヒト ABC-DLBCL 由来細胞株及び 1 種類のヒト MCL 由来細胞株を用いた 3 種類のマウス異種移植腫瘍モデルにピルトブルチニブを 1 日 2 回投与したとき、腫瘍増殖が阻害された。DLBCL 由来 BTK C481S 発現細胞株を用いた異種移植モデルでもピルトブルチニブは腫瘍増殖を阻害し、腫瘍退縮を誘導した。すべての異種移植モデルでピルトブルチニブは良好な忍容性を示した。

ピルトブルチニブは、1 μM の濃度で実施した広範な in vitro キナーゼスクリーニングで優れた選択性を示し、検討した BTK 以外の 370 種類のキナーゼの 98%と比較して、BTK に対し 300 倍以上の選択性を示した。スクリーニングで明確な選択性が示されなかった 8 種類のキナーゼ及び TEC について細胞アッセイで検討した結果、TEC（107 倍）、BRK、TXK、YES1、CSK、及び

FYN（すべて 500 倍超）との比較で、ピルトブルチニブは BTK に対する高い選択性を示した。ピルトブルチニブは、更なる酵素アッセイ、細胞アッセイ、及び放射性リガンド結合アッセイでの検討においても、受容体や酵素などの非標的分子に対する明らかな阻害活性はみられなかった。

心血管系安全性薬理項目の評価では、イヌを用いた 28 日間反復投与毒性試験の試験終了時の ECG 検査で、中用量群に QTc 延長が認められたが、延長の程度は軽微であり、生理的に重要でないと考えられた（CTD 第 2.6.6.3.5.4.8 項）。イヌ心血管系安全性薬理試験では、より高い用量でも QTc 延長は認められなかった（CTD 第 2.6.2.4.2 項）。また in vitro hERG 試験でのピルトブルチニブによる hERG チャネル電流阻害の IC_{50} 値と、臨床推奨用量投与時の非結合型 C_{max} の比較で適切な曝露量比が得られている（CTD 第 2.6.2.4.1 項）。ヒトの thorough QT 試験（LOXO-BTK-20011 試験）でも QT への影響は認められていない。したがって、イヌで認められた QTc 延長がヒトでの安全性上の懸念となる可能性は低いと考えられる。反復投与毒性試験の CNS パラメータ、呼吸系パラメータ、及び血圧並びに心血管系安全性薬理試験の血行動態にピルトブルチニブの影響は認められなかった。

2.6.2.7　図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.8　参考文献

Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *International Reviews of Immunology.* 2012; 31(2):119–132.

Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, Chaves J, Wierda WG, Awan FT, Brown JR, Hillmen P, Stephens DM, Ghia P, Barrientos JC, Pagel JM, Woyach J, Johnson D, Huang J, Wang X, Kaptein A, Lannutti BJ, Covey T, Fardis M, McGreivy J, Hamdy A, Rothbaum W, Izumi R, Diacovo TG, Johnson AJ, Furman RR. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2016; 374(4):323–332.

Castillo JJ, Hunter ZR, Yang G, Treon SP. Novel approaches to targeting MYD88 in Waldenström macroglobulinemia. *Expert Review of Hematology.* 2017; 10(8):739–744.

Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang J, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2010; 463(7277):88–92.

del Weers M, Mensink RG, Kraakman MEM, Schuurman RKB, Hendriks RW. Mutation analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene in X-linked agammaglobulinemia: identification of a mutation which affects the same codon as is altered in immunodeficient xid mice. *Human Molecular Genetics*. 1994; 3(1):161–166.

Estupiñán HY, Berglöf A, Zain R, Smith CIE. Comparative Analysis of BTK Inhibitors and Mechanisms Underlying Adverse Effects. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:630942.

Evans EK, Tester R, Aslanian S, Karp R, Sheets M, Labenski MT, Witowski SR, Lounsbury H, Chaturvedi P, Mazdiyasni H, Zhu Z, Nacht M, Freed MI, Petter RC, Dubrovskiy A, Singh J, Westlin WF. Inhibition of Btk with CC-292 provides early pharmacodynamic assessment of activity in mice and humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2013; 346(2):219–228.

Genevier HC, Hinshelwood S, Gaspar HB, Rigley KP, Brown D, Saeland S, Rousset F, Levinsky RJ, Callard RE, Kinnon C, Lovering RC. Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *European Journal of Immunology*. 1994; 24(12):3100–3105.

Haerzschel A, Catusse J, Hutterer E, Paunovic M, Zirlik K, Eibel H, Krenn PW, Hartmann TN, Burger M. BCR and chemokine responses upon anti-IgM and anti-IgD stimulation in chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Hematology.* 2016; 95(12):1979–1988.

Hamasy A, Wang Q, Blomberg KEM, Mohammad DK, Yu L, Vihinen M, Berglöf A, Smith CIE. Substitution scanning identifies a novel, catalytically active ibrutinib-resistant BTK cysteine 481 to threonine (C481T) variant. *Leukemia.* 2017; 31(1):177–185.

Hershkovitz-Rokah O, Pulver D, Lenz G, Shpilberg O. Ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma: clinical, molecular and treatment aspects. *British Journal of Haematology.* 2018; 181(3):306–319.

Kitanaka A, Mano H, Conley ME, Campana D. Expression and activation of the nonreceptor tyrosine kinase Tec in human B cells. Blood. 1998; 91(3):940–948.

Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D. An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology.* 1975; 5(6):319–334.

Lineweaver, H and Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. Journal of the American Chemical Society. 1934; 56:658–666.

Nisitani S, Kato RM, Rawlings DJ, Witte ON, Wahl MI. In situ detection of activated Bruton's tyrosine kinase in the Ig signaling complex by phosphopeptide-specific monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999; 96(5):2221–2226.

Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's Tyrosine Kinase in B Cells and malignancies. *Mol. Cancer.* 2018; 17(1):57.

Park H, Wahl MI, Afar DEH, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C, Scharenberg AM, Kinet J-P, Witte ON. Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity.* 1996; 4(5):515–525.

Ponader S, Burger JA. Bruton's tyrosine kinase: from X-linked agammaglobulinemia toward targeted therapy for B-cell malignancies. *Journal of clinical oncology.* 2014; 32(17):1830–1839.

Qiu Y, Kung H-J. Signaling network of the Btk family kinases. Oncogene. 2000; 19(49):5651–5661.

Rauert-Wunderlich H, Rudelius M, Ott G, Rosenwald A. Targeting protein kinase C in mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology.* 2016; 173:394-403.

Rawlings DJ, Saffran DC, Tsukada S, Largaespada DA, Grimaldi JC, Cohen L, Mohr RN, Bazan JF, Howard M, Copeland NG, Jenkins NA, Witte ON. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science.* 1993; 261(5119):358–361.

Rosenquist R, Beà S, Du M-Q, Nadel B, Pan‐Hammarström Q. Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies. *Journal of Internal Medicine.* 2017; 282(5):371–394.

Tohda S, Sato T, Kogoshi H, Fu L, Sakano S, Nara N. Establishment of a novel B-cell lymphoma cell line with suppressed growth by gamma-secretase inhibitors. *Leukemia Research.* 2006; 30(11):1385–1390.

Treanor B. B-cell receptor: from resting state to activate. Immunology. 2012; 136(1):21–27.

Weber ANR, Bittner Z, Liu X, Dang T-M, Radsak MP, Brunner C. Bruton's tyrosine kinase: an emerging key player in innate immunity. *Frontiers in Immunology.* 2017; 8:1454.

Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood.* 2012; 120(6):1175–1184.

Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, Xue L, Li DH-H, Steggerda SM, Versele M, Dave SS, Zhang J, Yilmaz AS, Jaglowski SM, Blum KA, Lozanski A, Lozanski G, James

DF, Barrientos JC, Lichter P, Stilgenbauer S, Buggy JJ, Chang BY, Johnson AJ, Byrd JC. Resistance Mechanisms for the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *New England Journal of Medicine.* 2014; 370(24):2286–2294.

Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, Heerema NA, Zhao W, Coleman J, Jones D, Abruzzo L, Gordon A, Mantel R, Smith LL, McWhorter S, Davis M, Doong T-J, Ny F, Lucas M, Chase W, Jones JA, Flynn JM, Maddocks K, Rogers K, Jaglowski S, Andritsos LA, Awan FT, Blum KA, Grever MR, Lozanski G, Johnson AJ, Byrd JC. BTK^{C481S}-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* 2017; 35(13):1437–1443.

Woyach J, Huang Y, Rogers K, Bhat SA, Grever MR, Lozanski A, Doong TJ, Blachly JS, Lozanski G, Jones D, Byrd JC. Resistance to Acalabrutinib in CLL is Mediated Primarily by BTK Mutations. *Blood.* 2019; 134 (Supplement_1):504.

Xu L, Tsakmaklis N, Yang G, Chen JG, Liu X, Demos M, Kofides A, Patterson CJ, Meid K, Gustine J, Dubeau T, Palomba ML, Advani R, Castillo JJ, Furman RR, Hunter ZR, Treon SP. Acquired mutations associated with ibrutinib resistance in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2017; 129(18):2519–2525.

ジャイパーカ錠 50mg
ジャイパーカ錠 100mg

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology 1
2.6.3.1 Pharmacology Overview 1
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics 6
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics 6
2.6.3.4 Safety Pharmacology 7
2.6.3.4.1 Safety Pharmacology Studies[a] 7
2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions 8

2.6.3 Pharmacology

2.6.3.1 Pharmacology Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	CTD Section
Primary Pharmacodynamics					
In vitro					
Studies characterizing the inhibitory activity of pirtobrutinib against multiple kinases using an in vitro enzymatic assay.	Purified protein	Incubation with purified protein	[redacted]	LOXO-305-PHARM-031	4.2.1.1.1
Studies characterizing the mechanism of BTK inhibition by pirtobrutinib.	Purified protein	Incubation with purified protein	Loxo Oncology at Lilly 1775 38th St. Boulder, CO 80301	LOXO-305-PHARM-039	4.2.1.1.2
Studies characterizing the inhibition of BTK by the pirtobrutinib metabolite LOX-00023900-001.	Purified protein	Incubation with purified protein	[redacted]	LOXO-305-PHARM-029	4.2.1.1.3
Studies characterizing the binding activity of pirtobrutinib with BTK and BTK C481S using Surface Plasmon Resonance (SPR).	Purified protein	Incubation with purified protein	Loxo Oncology, Inc. 3122 Sterling Cir., Suite 200 Boulder, CO 80301	LOXO-305-PHARM-023	4.2.1.1.4
Studies characterizing the binding activity of pirtobrutinib with BTK C481R and BTK C481T using Surface Plasmon Resonance (SPR).	Purified protein	Incubation with purified protein	Loxo Oncology, Inc. 3122 Sterling Cir., Suite 200 Boulder, CO 80301	LOXO-305-PHARM-042	4.2.1.1.5
Studies characterizing the inhibitory effect of pirtobrutinib on wild-type and mutant BTK enzymes transiently expressed in HEK293T cells.	HEK293T cells transiently expressing full-length BTK and BTK mutant proteins	Addition to media	[redacted] France	LOXO-305-PHARM-041	4.2.1.1.6
Studies characterizing the inhibitory effect of pirtobrutinib on wild-type and C481S BTK enzymes stably expressed in human embryonic kidney cells.	HEK293 cells stably expressing full-length BTK and BTK C481S proteins	Addition to media	Loxo Oncology, Inc. 3122 Sterling Cir., Suite 200 Boulder, CO 80301	LOXO-305-PHARM-014	4.2.1.1.7

2.6.3.1　Pharmacology Overview (Contd)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	CTD Section
Primary Pharmacodynamics (Cont'd)					
In vitro					
Studies characterizing the inhibitory effect of pirtobrutinib on cellular signaling in the Ramos RA1 human lymphoma cell line.	Ramos RA1 cells	Addition to media	Loxo Oncology, Inc. 3122 Sterling Cir., Suite 200 Boulder, CO 80301	LOXO-305-PHARM-013	4.2.1.1.8
Studies characterizing the inhibitory effect of pirtobrutinib on cellular signaling and proliferation in the TMD8 human lymphoma cell line.	TMD8 cells	Addition to media	[redacted] France	LOXO-305-PHARM-040	4.2.1.1.9
Studies characterizing the inhibitory effect of pirtobrutinib on cell proliferation in the REC-1 human mantle cell lymphoma cell line.	REC-1 cells	Addition to media	Loxo Oncology at Lilly 681 Gateway Blvd, 4th floor South San Francisco, CA 94080	LOXO-305-PHARM-036	4.2.1.1.10
Studies characterizing the effect of pirtobrutinib on the viability of the human Jurkat T cell line.	Jurkat T cells	Addition to media	[redacted] United Kingdom	LOXO-305-PHARM-011	4.2.1.1.11
Studies characterizing the effect of pirtobrutinib on human B-cell activation in peripheral blood mononuclear cells and whole blood.	Human peripheral blood mononuclear cells and whole blood	Addition to media	[redacted] United Kingdom	LOXO-305-PHARM-016	4.2.1.1.12
Studies characterizing the in vitro occupancy of BTK by pirtobrutinib in human peripheral blood mononuclear cells.	Human peripheral blood mononuclear cells	Addition to media	Loxo Oncology at Lilly 681 Gateway Blvd, 4th floor South San Francisco, CA 94080	LOXO-305-PHARM-037	4.2.1.1.13

2.6.3.1　Pharmacology Overview (Contd)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	CTD Section
Primary Pharmacodynamics (Cont'd)					
In vivo					
Studies characterizing the in vivo efficacy of pirtobrutinib in immunocompromised mice implanted with OCI-Ly10 xenografts.	Male NOD SCID mice engrafted with OCI-Ly10 cells	PO	[redacted]	LOXO-305-PHARM-010	4.2.1.1.14
Studies characterizing the in vivo efficacy of pirtobrutinib in a human xenograft diffuse large B-cell lymphoma model in SCID mice.	Female Balb/c SCID mice engrafted with TMD8 cells	PO	[redacted] France	LOXO-305-PHARM-038	4.2.1.1.15
Studies characterizing the in vivo efficacy of pirtobrutinib in a human tumor MCL REC-1 xenograft model in mice.	Female athymic nude mice engrafted with REC-1 cells	PO	Eli Lilly and Company Lilly Corporate Center Indianapolis, IN 46285	LOXO-305-PHARM-030	4.2.1.1.16
Studies characterizing the in vivo efficacy of pirtobrutinib in a human DLBCL BTK C481S xenograft model in mice.	Female Balb/c SCID mice engrafted with TMD8 cells expressing BTK C481S	PO	[redacted] France	LOXO-305-PHARM-017	4.2.1.1.17

2.6.3.1　Pharmacology Overview (Contd)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	CTD Section
Secondary Pharmacodynamics					
In vitro					
Studies characterizing the biochemical activity of pirtobrutinib against multiple kinases.	Purified protein	Incubation with purified protein	[redacted]	LOXO-305-PHARM-031	4.2.1.1.1
Studies characterizing the biochemical activity of pirtobrutinib against 371 kinases.	Purified protein	Incubation with purified protein	[redacted]	LOXO-305-PHARM-003	4.2.1.2.1
Studies characterizing the cellular activity of pirtobrutinib in a NanoBRET target engagement intracellular kinase assay against BTK, PTK6, CSK, FYN, TXK, YES1 and TEC in HEK293 cells	HEK293 cells transiently transfected with NanoBRET BTK, PTK6, CSK, FYN, TXK, YES1, TEC-NanoLuc fusion vectors	Addition to media	[redacted]	LOXO-305-PHARM-033	4.2.1.2.2
Studies characterizing the activity of pirtobrutinib in a cell-based biosensor assay targeting ERBB4.	PathHunter® cells co-expressing a tagged full-length ERBB4 and a tagged SH2 domain, which binds to phospho- tyrosines in the kinase to generate a chemiluminescent signal	Addition to media	[redacted]	LOXO-305-PHARM-034	4.2.1.2.3
Studies characterizing the effect of pirtobrutinib on MEK1/MEK2 activity in a phospho-ERK cell-based assay.	HCT116 and A375 cell lines	Addition to media	Eli Lilly and Company (LRL: LGB/LOB) Av. de la Industria, 30 Alcobendas 28108 Madrid, Spain	LOXO-305-PHARM-035	4.2.1.2.4

2.6.3.1　Pharmacology Overview(Contd)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	CTD Section
Secondary Pharmacodynamics (Cont'd)					
In vitro					
Studies characterizing the effect of pirtobrutinib against 44 targets, which included primary molecular targets, transmembrane and soluble receptors, ion channels, monoamine transporters, and enzymes, to detect potential off-target activity.	Radioligand binding assays using human recombinant CHO, SH-SY5Y, and HEK293 cells, IM-9 and LNCaP cells, rat recombinant CHO cells, rat cerebral cortex, and human recombinant enzymes	Addition to media	[redacted] France	LOXO-305-PHARM-004	4.2.1.2.5
Safety Pharmacology					
hERG	In vitro / HEK293 cells	In vitro	[redacted] USA	LOXO-305-SPHARM-003	4.2.1.3.1
Cardiovascular safety pharmacology	Beagle dogs	Oral gavage	[redacted] England	LOXO-305-SPHARM-002	4.2.1.3.2
Pharmacodynamic Drug Interactions					
No pharmacodynamic drug interaction studies of pirtobrutinib have been conducted.					

2.6.3.2　Primary Pharmacodynamics

See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2.

2.6.3.3　Secondary Pharmacodynamics

See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2.

2.6.3.4 Safety Pharmacology

2.6.3.4.1 Safety Pharmacology Studies[a]

Test Article: Pirtobrutinib

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Concentrations / Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
hERG	In vitro / HEK293 cells	In vitro	0, 3, 10, 30, 100 µM	NA	IC_{50} = 32 µM	Yes	LOXO-305-SPHARM-003
Cardiovascular	Dog / beagle	Oral gavage	0, 5, 20, 60 mg/kg	4 males/group	None NOEL = 60 mg/kg	Yes	LOXO-305-SPHARM-002

Abbreviations: HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether- à -go-go related gene; IC_{50} = concentration that results in 50% inhibition; NA = not applicable; NOEL = no observed effect level

[a] In addition to the studies summarized in this table, safety pharmacology endpoints were also evaluated in repeat-dose toxicity studies and are discussed in Module 2.6.6. Endpoints assessed in repeat-dose studies consisted of:

- ECG in dog 1- and 3-month studies (LOXO-305-TOX-008 and LOXO-305-TOX-017, respectively) and blood pressure in the dog 1-month study
- respiratory in dog 1-month study (LOXO-305-TOX-008), and
- CNS (functional observation battery and locomotor activity) in rat 1-month study (LOXO-305-TOX-007).

2.6.3.5　Pharmacodynamic Drug Interactions

No pharmacodynamic drug interaction studies of pirtobrutinib have been conducted.