目次

略語一覧 2
1. 緒言 6
2. 参考文献 7

略語一覧

略語	定義
ABC	活性化 B 細胞
ADCC	抗体依存性細胞傷害
ADME	吸収、分布、代謝、排泄
AME	吸収、代謝、排泄
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
API	医薬品有効成分
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
ATP	アデノシン三リン酸
$AUC_{0\text{-}inf}$	投与後 0 時間から無限時間までの血漿中薬物濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	投与後 0 時間から時間 t までの血漿中薬物濃度時間曲線下面積
BDC	胆管カニューレ挿入
BID、bid	1 日 2 回投与
BCR	B 細胞受容体
BCRP	乳癌耐性タンパク質
BLK	B リンパ性チロシンキナーゼ
BQL	定量限界未満
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ
CFDA	中国国家食品薬品監督管理総局
CK	クレアチンキナーゼ
CL	クリアランス
CLL	慢性リンパ性白血病
C_{max}	最高濃度
CYP	チトクロム P450
Cys	システイン
DDI	薬物相互作用
DIPEA	N,N-ジイソプロピルエチルアミン
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫
DMSO	ジメチルスルホキシド
ECG	心電図

略語	定義
EGFR	上皮成長因子受容体
F	経口バイオアベイラビリティ
FDA	米国食品医薬品局
FGR	Gardner–Rasheed ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子相同体
FIB	フィブリノーゲン
FL	濾胞性リンパ腫
FOB	機能観察総合評価法
FRK	Fyn 関連キナーゼ
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GMP	医薬品の製造管理および品質管理に関する基準
GSH	グルタチオン
H_2O_2	過酸化水素
HCT	ヘマトクリット値
HER2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2
HER4	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 4
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HGB	ヘモグロビン
HLM	ヒト肝ミクロソーム
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HTRF	均一時間分解蛍光測定
IC_{50}	50%阻害濃度
IFN-γ	インターフェロンガンマ
Ig	免疫グロブリン
ILS	生存期間の延長
INN	国際一般名称
IS	内部標準
ITK	インターロイキン 2 誘導性 T 細胞キナーゼ
IV	静脈内
JAK3	ヤヌスキナーゼ 3
Km	ミカエリス定数

略語	定義
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LCK	リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ
LDH	乳酸脱水素酵素
LLOQ	定量下限
LSC	液体シンチレーション計数法
MCL	マントル細胞リンパ腫
mpk	ミリグラム毎キログラム
MRT	平均滞留時間
MST	生存期間中央値
MTD	最大耐量
MW	分子量
NEUT	好中球
NK	ナチュラルキラー
NOAEL	無毒性量
OECD	経済協力開発機構
OAT	有機アニオントランスポーター
OATP	有機アニオン輸送ポリペプチド
P_{app}	見かけの透過係数
PBMC	末梢血単核球
PD	薬力学
PFS	無増悪生存期間
P-gp	p 糖タンパク質
PK	薬物動態
PLCγ	ホスホリパーゼ Cγ
PPB	血漿タンパク結合
PR	部分奏効
qd	1 日 1 回
QT	QRS 波の開始から T 波の終了までの時間
(Q)SAR	（定量的）構造活性相関
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー

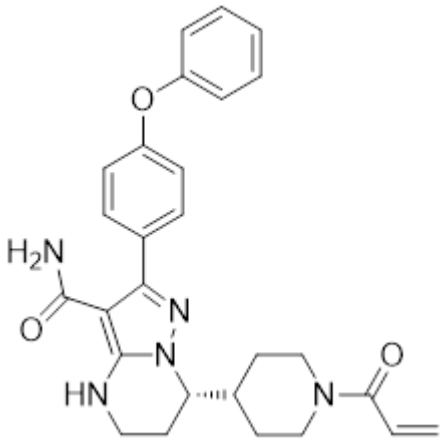
略語	定義
RAM	適正な放射能モニター
RBC	赤血球
RET	網状赤血球
SD	標準偏差
SEM	平均の標準誤差
SLL	小リンパ球性リンパ腫
SPE	固相抽出
$T_{1/2}$	半減期
TCR	T 細胞受容体
TDI	時間依存性阻害剤
TEC	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TEC
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間
TRA	総放射能
TR-FRET	時間分解蛍光共鳴エネルギー移動
TXK	TEC ファミリーチロシンキナーゼ TXK
Tyr	チロシン
UDPGA	ウリジン二リン酸グルクロン酸
US	米国
UV	紫外線
Vd_{ss}	定常状態の分布容積
WBC	白血球
WM	原発性マクログロブリン血症

1. 緒言

BGB-3111 は白色～微黄白色の固体であり、分子式は $C_{27}H_{29}N_5O_3$、分子量は 471.55 ダルトンで、わずかに吸湿性があり、キラル中心 1 つをもち、約 141℃ で融解する。BGB-3111 は生物薬剤学分類システムクラス II 化合物に分類される。

BGB-3111 の国際的一般名称（INN）及び医薬品一般的名称（JAN）は、それぞれ Zanubrutinib 及びザヌブルチニブである。

BGB-3111 の化学構造：



化学名： (*S*)-7-(1-アクリロイルピペリジン-4-イル)-2-(4-フェノキシフェニル)-4,5,6,7-テトラヒドロピラゾロ[1,5-*a*]ピリミジン-3-カルボキシアミド

本剤は、20 mg 錠及び 80 mg 錠の 2 種類の原薬含量の経口固形ゼラチンカプセルとして製剤化されている。

ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）は、TEC キナーゼファミリーに属し、B 細胞受容体（BCR）シグナル伝達カスケードにおいて重要な役割を果たす。BTK の阻害は、マントル細胞リンパ腫（MCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、濾胞性リンパ腫（FL）、原発性マクログロブリン血症（WM）及びびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）を含む B 細胞性悪性腫瘍に対する有望な治療戦略として期待されている（Rickert 2013）。ファースト・イン・クラスの BTK 阻害剤イムブルビカ®（イブルチニブ）は、BCR 誘発 B 細胞悪性腫瘍に有望な活性を示し、CLL/小リンパ球性リンパ腫（SLL）患者（17p 欠失を伴う CLL/SLL を含む）及び WM 患者の治療薬として米国食品医薬品局（FDA）の承認を受けている。本邦においては、CLL（SLL を含む）、原発性マクログロブリン血症／リンパ形質細胞性リンパ腫（LPL）及び MCL を効能又は効果として承認されている。2 つ目の BTK 阻害剤であるカルケンス®（アカラブルチニブ）は、少なくとも 1 種類以上の前治療歴を有する MCL 患者及び CLL/SLL 患者の治療薬として、FDA から承認を受けている。本邦においては、CLL（SLL を含む）を効能又は効果として承認されている。これら 2 剤に加えて、本邦にお

いては、ベレキシブル®（チラブルチニブ塩酸塩）が、再発又は難治性の中枢神経系原発リンパ腫及び原発性マクログロブリン血症／LPL を効能又は効果として承認されている。

BGB-3111 は、新規の第 2 世代の不可逆的な BTK 阻害剤である。BGB-3111 の投与により、BTK の活性部位に存在する 481 位アミノ酸システイン残基と安定的な共有結合を形成することで、BTK を阻害する。その結果、アデノシン三リン酸（ATP）の BTK への結合とそれに伴う 223 位のチロシン残基での自己リン酸化が阻害され、キナーゼの不可逆的な不活性化が誘導される（Seiler and Dreyling 2017）。BTK を阻害すると、腫瘍性 B 細胞の増殖、維持、骨髄への接着が抑制される。

BGB-3111 は、CLL 及び WM に加え、MCL、FL、多発性骨髄腫及び活性化 B 細胞（ABC）様 DLBCL サブタイプを含むがこれらに限定されないその他の B 細胞性悪性腫瘍の治療薬として、単剤及び／又は他の薬剤との併用で BeiGene 社が開発中である。

CLL 及び WM に対する BGB-3111 の推奨用量は、疾患進行又は忍容不能な毒性が認められるまで 320 mg/日、1 日 2 回（1 用量当たり 80 mg カプセル 2 錠、1 日 2 回）である。

BGB-3111 は、その非臨床特性並びに臨床試験の有効性及び安全性データに基づき、様々な進行癌患者の治療において強力で特異的かつ不可逆的な BTK 阻害剤となると期待される。

2. 参考文献

Rickert, J.B. (2013). Medical evidence and knee surgery. Health Aff (Millwood) 32, 193-194.

Seiler, T., and Dreyling, M. (2017). Bruton’s tyrosine kinase inhibitors in B-cell lymphoma: current experience and future perspectives. Expert Opin Investig Drugs 26, 909-915.

目次

1. まとめ 3
2. 効力を裏付ける試験 4
2.1. *In vitro* 生化学特性評価 6
2.2. *In vitro* 細胞機構及び機能特性評価 7
2.3. *In vivo* 特性評価 12
2.4. 代謝物の特性評価 20
3. 副次的薬理試験 20
3.1. 生化学的選択性 21
3.2. 細胞選択性 23
4. 安全性薬理試験 27
4.1. *In vitro* 試験 28
4.1.1. hERG チャネルアッセイ 28
4.2. 安全性薬理コアバッテリー試験 28
4.2.1. 中枢神経系機能試験 28
4.2.2. 呼吸器系機能試験 28
4.2.3. 心血管機能試験 29
5. 薬力学的薬物相互作用 29
6. 考察及び結論 29
7. 参考文献 30

表目次

Table 1: *In vitro* 薬効薬理試験 5
Table 2: *In vivo* プロファイルの概要 6
Table 3: 血液腫瘍細胞の増殖阻害 11
Table 4: ヒト REC-1 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブの有効性及び薬物動態パラメータ 13
Table 5: 全身ヒト REC-1 MCL 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブの生存期間に対する影響 14
Table 6: ヒト TMD-8 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブ投与後の腫瘍体積及び無腫瘍動物 16
Table 7: 副次的薬理試験の要約 20
Table 8: 1 µmol/L の BGB-3111 による>30%の阻害を有するキナーゼ 21
Table 9: BGB-3111 の生化学的効力及び選択性 22
Table 10: 細胞選択性の概要 24
Table 11: 安全性薬理試験の概要 27

図目次

Figure 1: BTK を変性させ BTK／化合物複合体から沈殿として除去した後、上清中に残留した BGB-3111（A）及び BGB-1903（B） 7
Figure 2: MCL 細胞株での BTK-Tyr223 及び PLCγ2-Tyr1217 のリン酸化に対する BGB-3111 の影響 8
Figure 3: Ramos 細胞における BGB-3111 による BTK Tyr223 リン酸化の阻害 9
Figure 4: Z-138 細胞での BGB-3111 による BTK 占有の評価 10
Figure 5: ヒト REC-1 MCL 異種移植片モデルでの腫瘍増殖に対する BGB-3111 及びイブルチニブの作用 12
Figure 6: 全身ヒト REC-1 MCL 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブの生存期間に対する影響 14
Figure 7: ヒト TMD-8 DLBCL 異種移植片モデルでの腫瘍増殖に対する BGB-3111 及びイブルチニブの作用 15
Figure 8: ICR マウスに BGB-3111 を単回経口投与した後の PK 及び PD の関係 17
Figure 9: ICR マウスにおける異なる用量レベルでの BGB-3111 とイブルチニブの PK 及び PD の関係 18
Figure 10: BGB-3111 及びイブルチニブと GSH の反応曲線 23
Figure 11: リツキシマブを介した IFN-γ 分泌に対する BGB-3111 及びイブルチニブの影響 25
Figure 12: リツキシマブを介した *in vitro* 細胞毒性に対する BGB-3111 及びイブルチニブの影響 26

略語一覧は Module 2.6.1 に記載。

1. まとめ

一連の包括的な薬理試験として、生化学アッセイ、細胞アッセイ、*in vitro* 及び *in vivo* 有効性アッセイ、*in vitro* ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイ及び安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。

生化学アッセイでは、BGB-3111 はブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）を阻害し、50%阻害濃度（IC_{50}）は 0.3 nmol/L であった。BGB-3111 は、そのキナーゼ阻害活性に関し、上皮成長因子受容体（EGFR）、Gardner−Rasheed ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子相同体（FGR）、Fyn 関連キナーゼ（FRK）、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2（HER2）、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 4（HER4）、インターロイキン 2 誘導性 T 細胞キナーゼ（ITK）、ヤヌスキナーゼ 3（JAK3）、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ（LCK）及び TEC ファミリーチロシンキナーゼ TEC（TEC）と比較した場合の BTK に対する選択性が、イブルチニブよりも高かった。細胞アッセイにより、BGB-3111 は、ITK（10 倍）及び EGFR（6 倍）の阻害活性が、イブルチニブよりも有意に低いことも確認された。ITK の阻害により、リツキシマブ誘発性の抗体依存性細胞傷害（ADCC）が減少することが報告されている。BGB-3111 では、リツキシマブ誘発性 ADCC の阻害活性がイブルチニブよりも 10 倍弱いことが示されており、これは、生化学アッセイ及び細胞アッセイのいずれにおいても、BGB-3111 はイブルチニブよりも選択性の高い BTK 阻害剤であり、その ITK 阻害活性がはるかに弱いことと一致している。

細胞アッセイにより、マントル細胞リンパ腫（MCL）細胞株において、BGB-3111 は B 細胞受容体（BCR）凝集誘発性 BTK 自己リン酸化を阻害し、下流のホスホリパーゼ Cγ（PLCγ）2 シグナル伝達を遮断することが確認された。BGB-3111 の IC_{50} は、均一な時間分解蛍光（HTRF）に基づく BTKpY223 アッセイで 1.8 nmol/L であった。BGB-3111 は、複数の MCL 細胞株（REC-1、Mino 及び JeKo-1）及び活性化 B 細胞（ABC）型のびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）細胞株（TMD-8）の細胞増殖を強力かつ選択的に阻害し、IC_{50} は 0.36～20 nmol/L であった。

BGB-3111 の 3 つの主要代謝物である BGB-7941（BGB-3111 の一酸化生成物）、BGB-10719（アクリル酸）及び M417（脱アクリル化 BGB-3111、別名 BGB-4013 又は C13043088-L）についても、生化学キナーゼアッセイ並びに細胞機構アッセイ及び機能アッセイにより薬理作用を評価した。BGB-7941 のみが BGB-3111 よりもわずかに弱い薬理活性を示した。細胞アッセイでは、アクリル酸及び M417 はいずれも BTK に対して活性を示さなかった。

In vivo 試験では、マウスの皮下又は全身に移植した REC-1 MCL 異種移植片に対して、BGB-3111 が用量依存的な抗腫瘍効果を示すことが確認された。BGB-3111 は、両モデルにおいてイブルチニブよりも効果があることが分かった。また、TMD-8 DLBCL 皮下異種移植片モデルにおいて、BGB-3111 はイブルチニブよりも優れた抗腫瘍活性を示した。薬物動態／薬力学（PK/PD）試験では、BGB-3111 の経口投与の結果、マウスの血液（バフィーコート）及び脾臓の両方で時間依存的

な BTK 占有が生じた。BGB-3111 は、マウス PD アッセイにおいてイブルチニブの約 3 倍の活性を示した。

安全性薬理試験では、3.8～9.1 μmol/L で hERG 電流（IC_{50}）に中等度の阻害が認められたが、テレメトリーを装着した覚醒下のイヌに 100 mg/kg までの用量で 24 時間単回投与したところ、血圧、心拍数及び心電図（ECG）に対する影響は認められなかった。非臨床試験及び臨床試験によると、BGB-3111 による QT 間隔延長の潜在的リスクは低いと考えられる。Sprague Dawley ラットに 30、100 又は 300 mg/kg で単回経口投与したところ、中枢神経系及び呼吸機能に対する影響は認められなかった。

薬物動態学的薬物相互作用に関しては、BGB-3111 を臨床用量である 160 mg BID で投与することにより、肝チトクロム P450（CYP）2C8 及び腸 CYP3A の臨床的に意義のある阻害、CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導、並びに p 糖タンパク質（P-gp）及び BCRP の阻害の可能性が生じると予測される。したがって、これらの CYP 及びトランスポーターの基質である薬剤との相互作用が生じる場合の臨床効果は、これら 2 つの相反する効果全体の影響を反映していると考えられる。

2. 効力を裏付ける試験

BGB-3111 は強力で特異的かつ不可逆的な BTK 阻害剤であり、生化学アッセイでの IC_{50} は 0.3 nmol/L である。生化学的試験を複数実施したところ、BGB-3111 は BTK タンパク質に共有結合することが確認された。

BGB-3111 は、BCR の凝集により誘発される BTK の自己リン酸化を阻害し、MCL 細胞株における下流の $PLC\gamma_2$ シグナル伝達を遮断した。BGB-3111 は、MCL 及び DLBCL 細胞株数種で細胞増殖を強力に阻害した。BGB-3111 は、そのキナーゼ阻害活性に関し、生化学アッセイ及び／又は細胞アッセイにおいて、EGFR、FGR、FRK、HER2、HER4、ITK、JAK3、LCK 及び TEC と比較した場合の BTK に対する選択性が、イブルチニブよりも有意に高かった。BGB-3111 はイブルチニブよりもリツキシマブ誘発性 ADCC の阻害がはるかに少ないことが示されており、これは ITK 活性が弱いこととも一致している。また、BGB-3111 はイブルチニブよりもグルタチオンに対する反応がより緩徐であることも示された。

In vivo 試験では、マウスの皮下又は全身に移植した REC-1 MCL 異種移植片に対して、BGB-3111 が用量依存的な抗腫瘍効果を誘導することが示された。BGB-3111 は、両モデルにおいてイブルチニブよりも著しい効果が認められた。BGB-3111 は、TMD-8 DLBCL 異種移植片モデルでもより良好な抗腫瘍活性を示した。PK/PD 試験では、BGB-3111 の経口投与の結果、時間依存的な BTK 占有が生じ、マウスの血液及び脾臓における BTK 占有はイブルチニブより約 3 倍強力であった（Table 1、Table 2）。

Table 1: *In vitro* 薬効薬理試験

Report number	**Title**	**Test system**	**Noteworthy findings**		
R01-BIOL-145	Inhibition of Enzymatic Activity of BTK by BGB-3111	Biochemical assay	Ibrutinib IC_{50}=0.18 ± 0.04 nmol/L BGB-3111 IC_{50}=0.30 ± 0.06 nmol/L BGB-3111 is a covalent inhibitor of BTK		
R01-BIOL-141	Inhibition of Cellular BTK Activation and BTK Occupancy by BGB-3111	Cellular mechanistic assay	Ibrutinib pY223 IC_{50}=3.5 ± 1.9 nmol/L BGB-3111 pY223 IC_{50}=1.8 ± 0.2 nmol/L Ibrutinib occupancy IC_{50}=2.3 nmol/L BGB-3111 occupancy IC_{50}=2.2 ± 1.0 nmol/L		
R01-BIOL-142	Effects of BGB-3111 on Tumor Cell Proliferation in a Panel of Hematological Cancer Lines	Cellular functional assay	BCR signaling pathway dependent cell lines: REC-1 (MCL) IC_{50}=0.36 ± 0.03 nmol/L Mino (MCL) IC_{50}=3.8 ± 1.8 nmol/L JeKo-1 (MCL) IC_{50}=20 nmol/L TMD8 (DLBCL(ABC)) IC_{50}=0.54 ± 0.3 nmol/L		
R01-BIOL-155	*In vitro* Biochemical and Cellular Characterization of BGB-3111 and its Metabolites	Biochemical assay	BGB-3111 IC_{50}=0.21 ± 0.03 nmol/L BGB-7941 IC_{50}=0.76 ± 0.02 nmol/L M417 IC_{50}=3879 ± 1782 nmol/L Acrylic Acid IC_{50}>10000 nmol/L		
		Cellular mechanistic and functional assay	IC_{50}	BGB-3111	BGB-7941
		No activity for both M417 and Acrylic acid in the cellular assay	REC-1 proliferation assay	0.52 ± 0.07 nmol/L	5.9 ± 0.82 nmol/L
			BTK pY223 assay	2.8 ± 0.42 nmol/L	5.2 ± 1.7 nmol/L
			BTK occupation assay	1.5 ± 0.39 nmol/L	3.6 ± 0.73 nmol/L

Note: The IC_{50} are shown as mean ± standard deviation when data is from 3 repeated experiments. Single IC_{50} number is from one time experiment.

Table 2: *In vivo* プロファイルの概要

Report number	Title	Animal species	Dose, schedule	Noteworthy Findings
R01-VIVO-118	Efficacy Study of BGB-3111 in Rec-1 Subcutaneous Xenografts Model	Female NOD/SCID mice	Ibrutinib 14.7 mg/kg qd	0.51 (T/C)
			Ibrutinib 48.9 mg/kg qd	0.32 (T/C)
			BGB-3111 2.5 mg/kg bid	0.37 (T/C)
			BGB-3111 7.5 mg/kg bid	0.18 (T/C)
			BGB-3111 24.9 mg/kg bid	0.13 (T/C)
R01-VIVO-119	Efficacy Study of BGB-3111 in Systemic Rec-1 xenografts Model	Female NOD/SCID mice	Ibrutinib 48.9 mg/kg qd	19.8% (ILS)
			Ibrutinib 48.9 mg/kg bid	19.8% (ILS)
			BGB-3111 7.4 mg/kg bid	20.7% (ILS)
			BGB-3111 24.7 mg/kg bid	37.9% (ILS)
R01-VIVO-124	Efficacy Study of BGB-3111 in TMD-8 Subcutaneous Xenografts Model	Female NOD/SCID mice	Ibrutinib 48.9 mg/kg qd	0.12 (T/C)
			Ibrutinib 48.9 mg/kg bid	0.04 (T/C)
			BGB-3111 2.4 mg/kg bid	0.19 (T/C)
			BGB-3111 7.2 mg/kg bid	0.14 (T/C)
			BGB-3111 24.1 mg/kg bid	0.00 (T/C)
			BGB-3111 48.3 mg/kg bid	0.02 (T/C)
R01-VIVO-121	Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Study of BGB-3111 in Mouse	Female ICR mice	BGB-3111 14.5 mg/kg, once	Sustained BTK occupancy in mouse PBMC
			Ibrutinib 2.2, 4.4, 8.9, and 17.7 mg/kg, once BGB-3111 0.7, 1.4, 2.9, and 5.8 mg/kg, once	BGB-3111 is about 3-fold more potent than ibrutinib in BTK inhibition in both of PBMC and spleen in mice

qd: once daily; bid: twice daily; T/C: treatment/control ratio for tumor volume; ILS (%): increase in life span

2.1. *In vitro* 生化学特性評価

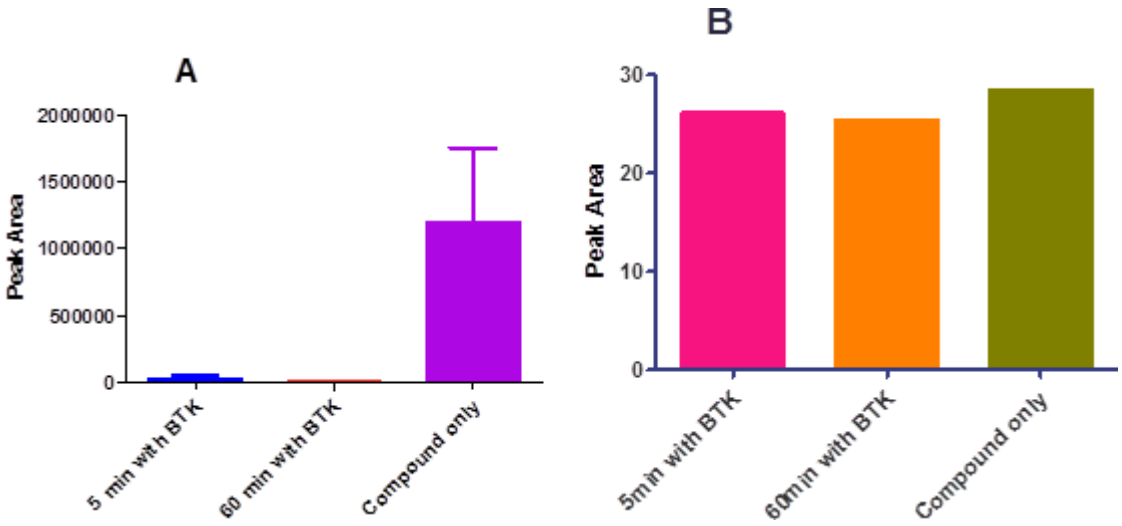
時間分解蛍光共鳴エネルギー移動（TR-FRET）ベースのアッセイで組換え BTK キナーゼ及びペプチド基質を用いて、BTK 酵素活性の阻害に対する BGB-3111 の生化学的活性を測定した。プレインキュベーションを 1 時間、アデノシン三リン酸（ATP）濃度をミカエリス定数（Km）とし、BTK に対する化合物の IC_{50} を測定した。BTK 酵素に対する BGB-3111 の IC_{50} は 0.30 ± 0.06 nmol/L（n=3）であったのに対し、イブルチニブに対する IC_{50} は 0.18 ± 0.04 nmol/L（n=3）であった。

BGB-3111 は、BTK の ATP 結合部位付近のシステイン 481 と共有結合するようにデザインされ、以下の実験により BTK の共有結合／不可逆的阻害剤であることが確認された（Copeland 2000）。

BTK タンパク質を BGB-3111 又は BGB-1903（可逆性 BTK 阻害剤）とインキュベートし、BTK／化合物複合体を形成した（BTK タンパク質と化合物をすべて確実に結合させるために BTK 酵素を過剰に用いた）。その後、BTK タンパク質を変性させ、遠心分離により沈殿させた。上清を分取し、元の化合物の量について分析した。BGB-1903 は、BTK タンパク質の有無にかかわらず、インキュベート後の上清中に残存し、BTK への結合が可逆的であるという特徴と一致していた（Figure 1［B］）。対照的に、BGB-3111 は、インキュベート後、沈殿した BTK タンパク質と共に上清から完全に消失した（Figure 1［A］）。また、データから、BTK と BGB-3111 の共有結合形成は 5 分以内にほぼ完了することが示された。

Figure 1:　BTK を変性させ BTK／化合物複合体から沈殿として除去した後、上清中に残留した BGB-3111（A）及び BGB-1903（B）

パネル A 及びパネル B の左と中央の 2 本のバーは、BTK とそれぞれ 5 分間及び 60 分間インキュベートした後の残留化合物を示す。パネル A 及びパネル B の右のバーは、BTK を用いない化合物対照である。



2.2.　*In vitro* 細胞機構及び機能特性評価

REC-1、Mino、JeKo-1 及びバーキットリンパ腫 Ramos 細胞を含む MCL 細胞において、BGB-3111 による BTK の細胞機構の阻害が示された。ウェスタンブロット解析では、BGB-3111 は 2 時間のインキュベーション後、BCR 凝集により誘発される BTK の自己リン酸化を用量依存的に阻害し、下流の PLCγ_2 シグナル伝達を遮断することが示された（Figure 2）。BTK リン酸化 Tyr223 残基を検出する HTRF アッセイでは、BGB-3111 の IC_{50} は 1.8 ± 0.2 nmol/L（n=3）であった（Figure 3）。

Figure 2: MCL 細胞株での BTK-Tyr223 及び PLCγ2-Tyr1217 のリン酸化に対する BGB-3111 の影響

すべてのパネルにおいて、細胞を所定の濃度の BGB-3111 で 2 時間処理した後、80 μg/mL の抗 IgM 抗体で刺激した。BGB-3111 は、REC-1（A）、Mino（B）及び JeKo-1（C）細胞株において、抗 IgM 抗体により誘導された BTK 及び $PLC\gamma_2$ のリン酸化を用量依存的に阻害した。

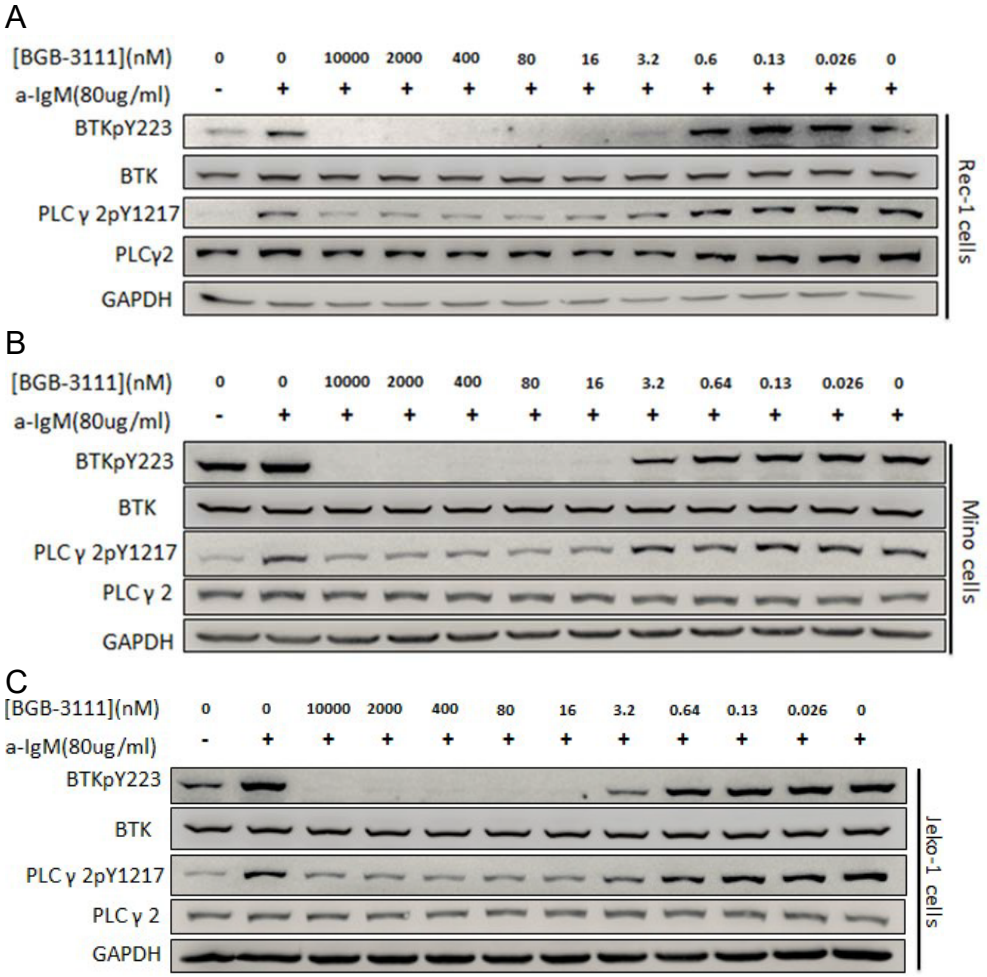
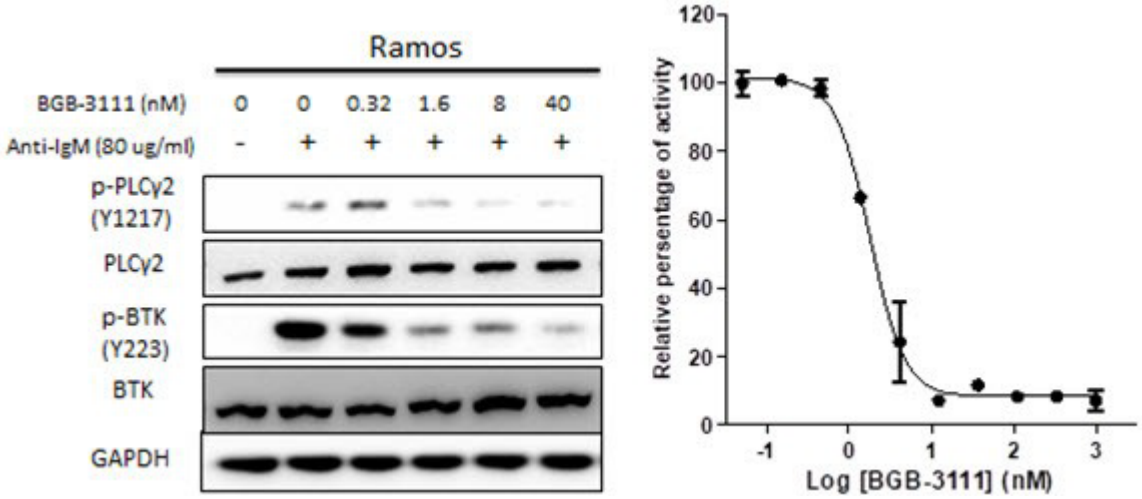


Figure 3:　Ramos 細胞における BGB-3111 による BTK Tyr223 リン酸化の阻害

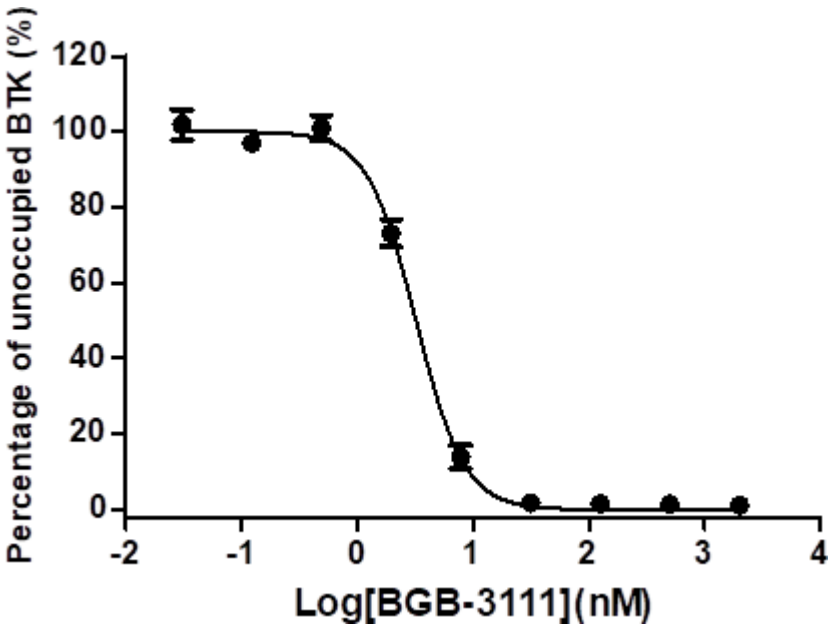
すべてのパネルにおいて、Ramos 細胞を所定の濃度の BGB-3111 で 2 時間処理した後、溶解した。BGB-3111 は Ramos 細胞において BTK Tyr223 及び PLCγ2 Tyr1217 のリン酸化を阻害した（左のパネル）。BGB-3111 の BTK Tyr223 のリン酸化に対する阻害能を HTRF アッセイで測定した（右のパネル）。



BGB-3111 は、システイン 481 残基上に BTK と共有結合を形成することができ、これによりキナーゼ活性が阻害され、他の分子が同様の共有結合を形成するのを防ぐ（Honigberg et al 2010; Wu et al 2014）。不可逆的プローブにより BTK 占有を測定した試験では、BGB-3111 は Z-138 細胞において用量依存的な BTK 占有を示した。占有アッセイにおける BGB-3111 の IC_{50} は 2.2 ± 1.0 nmol/L（n=3）であった（Figure 4）。

Figure 4:　Z-138 細胞での BGB-3111 による BTK 占有の評価

Z-138 マントル細胞リンパ腫細胞を、所定の濃度の BGB-3111 と 37°C で 2 時間培養した。培養後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、溶解緩衝液で溶解した。細胞溶解物をプローブコート 96 ウェルアッセイプレート内で 4°C で一晩培養した。非占有 BTK タンパク質を特異的 BTK 抗体を用いて測定した。



BGB-3111 の抗腫瘍活性及び特異性を更に評価するため、23 の血液癌細胞株パネルを用いて BGB-3111 の抗増殖 IC_{50} を測定した（Table 3）。BGB-3111 は、MCL（REC-1、Mino 及び JeKo-1）及び ABC 型の DLBCL（TMD8）由来の細胞株数種を強力に阻害した。BGB-3111 は、急性骨髄性白血病（AML）由来細胞株 MV4,11 において中程度の活性（IC_{50} は約 1.1 µmol/L）を示した。他の 18 種類の細胞株は BGB-3111 に感受性を示さず、BGB-3111 は MCL 及び ABC 型の DLBCL に選択的であることが示唆された（Maddocks and Blum 2014）。

Table 3:　血液腫瘍細胞の増殖阻害

Cell line	**Cell Type**	**IC_{50}(nmol/L)**
REC-1	MCL	0.36 ± 0.03
Mino	MCL	3.8 ± 1.8
JeKo-1	MCL	20
Z-138	MCL	>10000
JVM2	MCL	>10000
Maver-1	MCL	>10000
TMD8	DLBCL(ABC)	0.54 ± 0.3
Karpas299	ALCL	>10000
HEL	AML	>10000
MV4,11	AML	1054 ± 499.5
Daudi	Burkitt's	>10000
Namalwa	Burkitt's	>10000
Ramos	Burkitt's	>10000
K562	CML	>10000
MM1	MM	>3000
RPMI-8226	MM	>10000
U266	MM	>10000
U937	AML	>10000
HuT78	T cell Lymphoma	>10000
HPB-ALL	ALL	>10000
CCRF-CEM	ALL	>10000
Jurkat	ALL	>10000
MOLT4	ALL	>3000

Note: The IC_{50} are shown as mean ± standard deviation when data is from 3 repeated experiments.
Single IC_{50} number is from one time experiment.

2.3. *In vivo* 特性評価

非肥満糖尿病／重症複合免疫不全（NOD/SCID）マウスで皮下増殖させた REC-1 MCL 異種移植片を用いて、BGB-3111 の *in vivo* における有効性を検討し、イブルチニブと比較した。BGB-3111 を、忍容性が良好な用量である 2.5、7.5 又は 24.9 mg/kg で 1 日 2 回（bid）連日経口投与すると、用量依存的な腫瘍増殖阻害が誘導された（Figure 5 及び Table 4）。投与 20 日に腫瘍を外科的に切除し、重量を測定した。概して、腫瘍体積は腫瘍重量と一致していた。BGB-3111 2.5 mg/kg bid では、48.9 mg/kg 1 日 1 回（qd）のイブルチニブと同様の腫瘍増殖阻害効果が認められた。遊離型薬物の血漿中薬物濃度時間曲線下面積（AUC）（データ未掲載）に基づくと、イブルチニブの臨床用量に相当する用量は、マウスでは 50 mg/kg qd である。BGB-3111 24.9 mg/kg bid は、イブルチニブ 48.9 mg/kg qd よりも有意に良好な有効性を示した（P<0.01）。定常状態での BGB-3111 の薬物曝露量［最高濃度（C_{max}）及び $AUC_{0\text{-}8h}$］は用量に比例して増加した。BGB-3111 は試験期間を通して動物の体重（全群）に有意な影響を及ぼさなかった。

Figure 5: ヒト REC-1 MCL 異種移植片モデルでの腫瘍増殖に対する BGB-3111 及びイブルチニブの作用

雌 NOD/SCID マウスに REC-1 腫瘍細胞（1×10^7）を皮下移植した。移植後 3 日目に、マウスを 6 群に無作為に割り付け、凡例のとおりに 20 日間投与した。腫瘍体積を週 2 回測定した。データは、各群の 10 匹の平均腫瘍体積±平均の標準誤差（SEM）として示す。

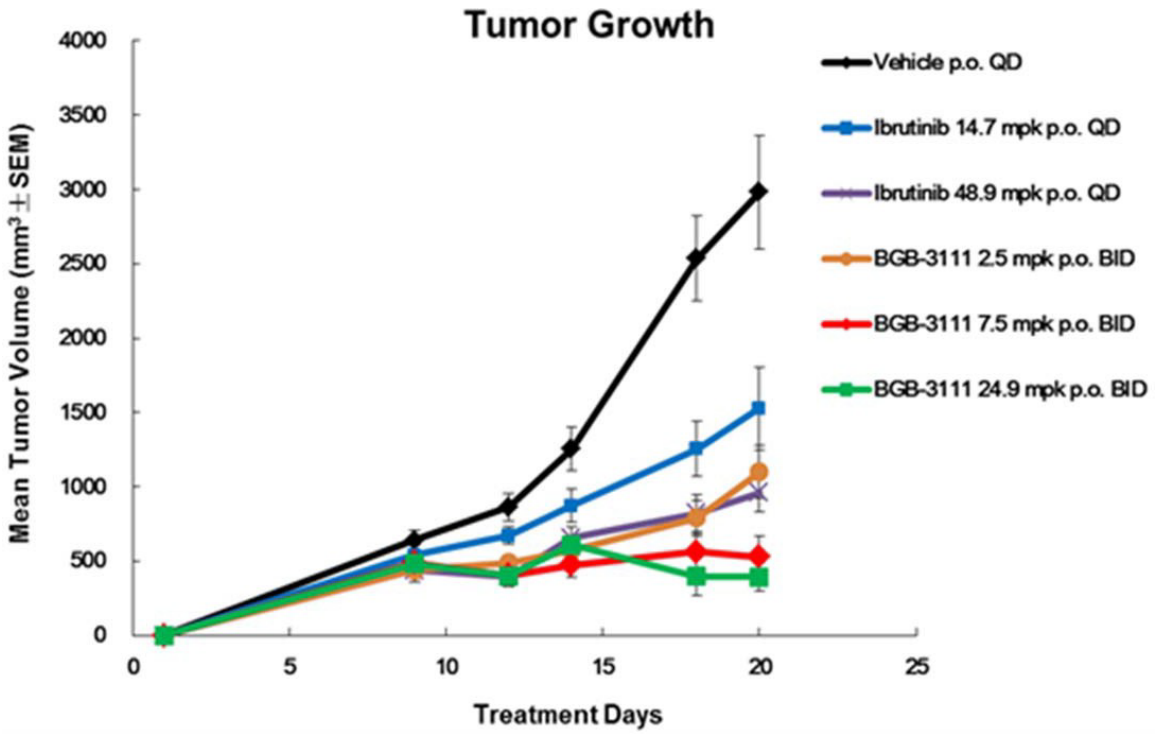


Table 4: ヒト REC-1 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブの有効性及び薬物動態パラメータ

投与 20 日に腫瘍径を測定して体積を推定した。その後、腫瘍を外科的に切除し、重量を測定した。PK 解析では、投与 19 日の血漿中薬物濃度を測定し、PK パラメータを算出した。

Compound	Dose (mg/kg)	N	Mean Tumor Volume (mm^3±SEM)	Mean Tumor Weight (mg±SEM)	PK Parameters (Day 19)	
			(Day 20)	(Day 20)	Cmax (µmol/L)	AUC_{0-8h} (µmol/L·h)
Vehicle		10	2981.4±382.2	1157.8±240.1		
Ibrutinib	14.7 qd	10	1526.0±281.0	428.2±128.5	0.85±0.09	0.7
	48.9 qd	10	959.1±126.4	308.4±53	1.28±0.19	2.5
BGB-3111	2.5 bid	10	1100.4±179.6	302.8±63.6	0.36±0.16	0.2
	7.5 bid	10	527.1±137.6	174.0±43.2	1.93±0.26	0.9
	24.9 bid	10	392.3±95.5	90.1±17.9	5.93±0.49	5.7

REC-1 全身異種移植片モデルを用いて、BGB-3111 の *in vivo* 抗腫瘍活性を更に評価した。イブルチニブ（48.9 mg/kg qd 又は bid）又は BGB-3111（7.4 mg/kg bid 又は 24.7 mg/kg bid）の投与により、溶媒群と比較して生存期間が有意に延長した（P<0.01、Figure 6 及び Table 5）。BGB-3111 7.4 mg/kg bid 投与群の生存期間の中央値は、臨床用量に相当する用量である 48.9 mg/kg qd のイブルチニブ投与群と同程度であった。イブルチニブの用量を 48.9 mg/kg qd から 48.9 mg/kg bid に増量しても、生存期間に対するベネフィットは認められなかった。BGB-3111 24.7 mg/kg bid の有効性は、他の 3 つの投与群よりも著しく良好であった（P<0.01）。

当初、BGB-3111 及びイブルチニブの忍容性は、いずれの投与用量でも良好であった（データ未掲載）。試験が進行する過程での体重減少の大半は疾患の増悪によるものであった。しかし、40 日目前後に、イブルチニブ 48.9 mg/kg bid 群の数例に有意な体重減少が認められ、投与に関連する可能性があると考えられた。

Figure 6: 全身ヒト REC-1 MCL 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブの生存期間に対する影響

REC-1 腫瘍細胞（1×10^7）を尾静脈を介して雌 NOD/SCID マウスに移植した。移植 8 日にマウスを 1 群あたり 10 匹ずつ 5 群に無作為に割り付け、凡例のとおりに投与した（移植 78 日に全投与を中止した）。生存期間は、腫瘍細胞移植日から死亡又は安楽死の前日までの期間と定義した。Kaplan-Meier 曲線は、各個体の生存期間を用いて算出した。

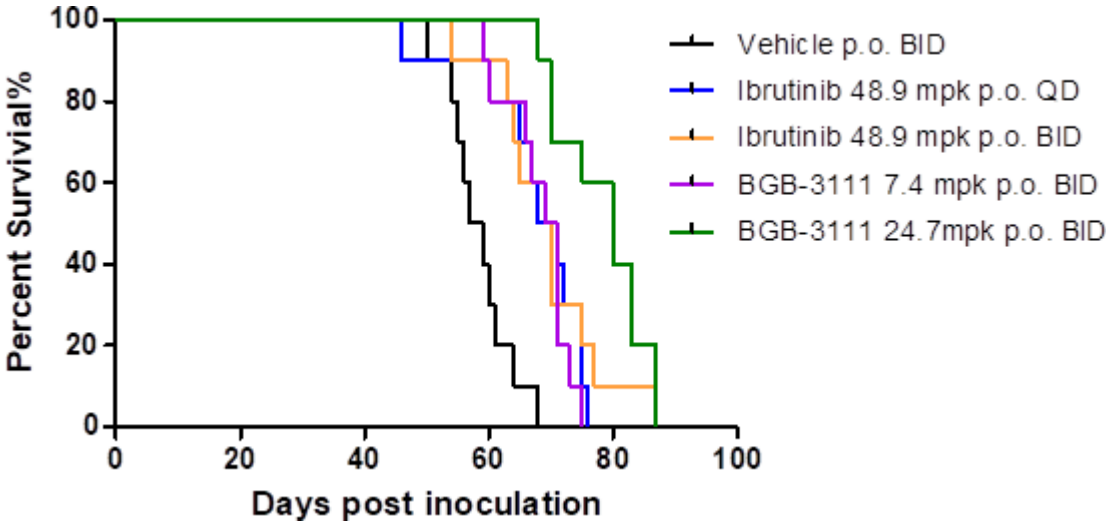


Table 5: 全身ヒト REC-1 MCL 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブの生存期間に対する影響

生存期間は Kaplan-Meier 法により解析した。生存期間は、腫瘍細胞移植日から動物の死亡又は安楽死の前日までの期間と定義した。各群について、生存期間の中央値（MST）及び寿命の延長（ILS）を算出した。

Group	Treatment	MST (days)	ILS (%)
1	Vehicle	58	—
2	Ibrutinib 48.9 mg/kg qd	69.5	19.8
3	Ibrutinib 48.9 mg/kg bid	69.5	19.8
4	BGB-3111 7.4 mg/kg bid	70	20.7
5	BGB-3111 24.7 mg/kg bid	80	37.9

また、NOD/SCID マウスで皮下増殖させた TMD-8 DLBCL 異種移植片を用いて、BGB-3111 及びイブルチニブの *in vivo* における有効性を検討した。忍容性が良好な用量である 2.4、7.2、24.1 又は 48.3 mg/kg bid で連日経口投与したところ、BGB-3111 は用量依存的な抗腫瘍効果を示した（Figure 7 及び Table 6）。イブルチニブ 48.9 mg/kg bid は、イブルチニブ 48.9 mg/kg qd よりも有効性が高かった。このモデルでは、BGB-3111 はイブルチニブよりも有効性が高かった。

Figure 7: ヒト TMD-8 DLBCL 異種移植片モデルでの腫瘍増殖に対する BGB-3111 及びイブルチニブの作用

雌 NOD/SCID マウスに TMD-8 腫瘍細胞（5×10^6）を皮下移植した。移植 3 日に、マウスを体重に応じて 7 群に無作為に割り付け、凡例のとおりに 39 日間投与した。腫瘍体積を週 2 回測定した。データは、各群の平均腫瘍体積±平均の標準誤差（SEM）として示す。

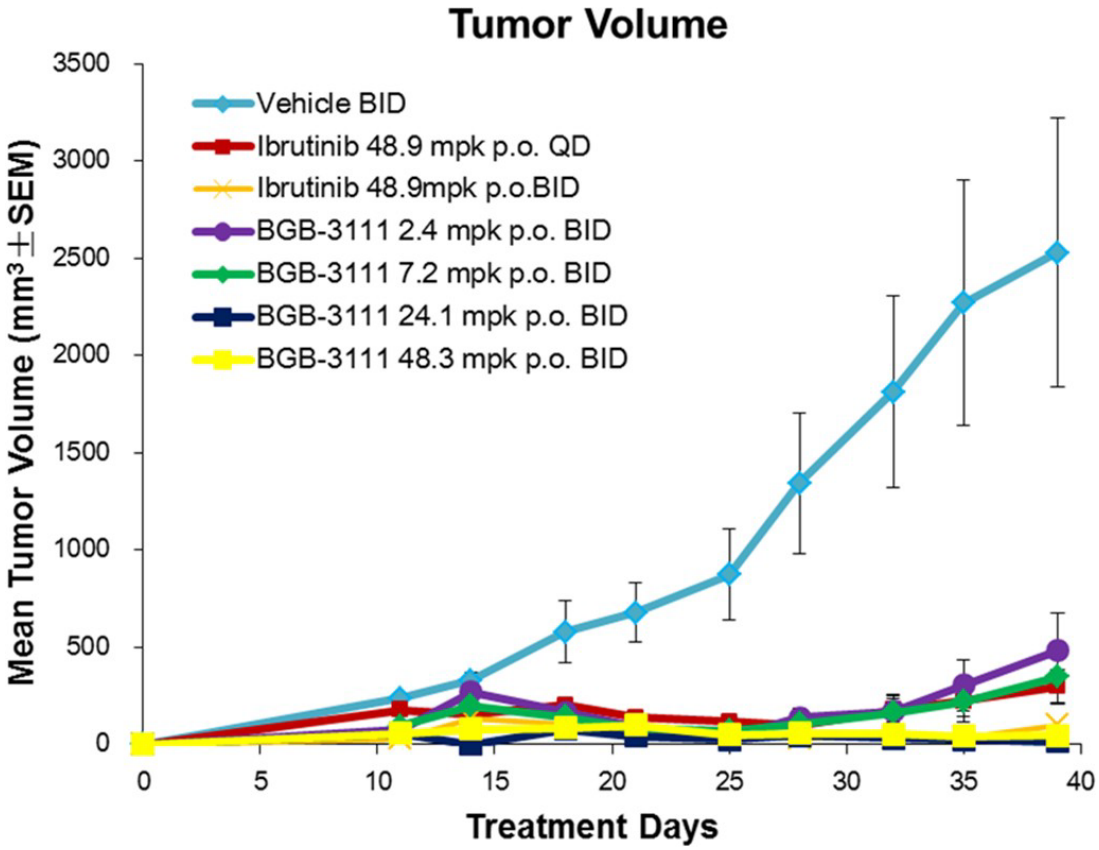


Table 6: ヒト TMD-8 異種移植片モデルでの BGB-3111 及びイブルチニブ投与後の腫瘍体積及び無腫瘍動物

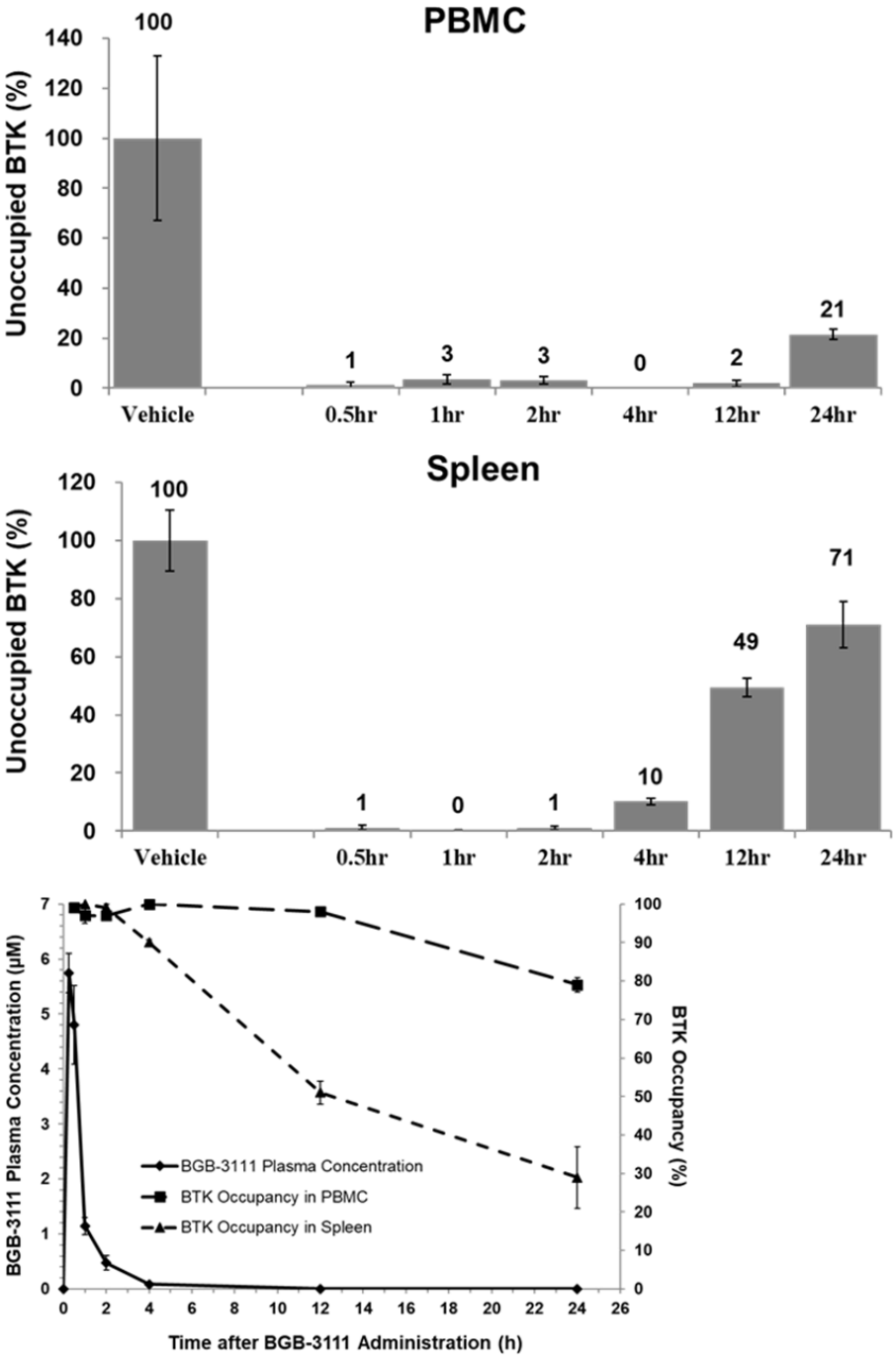
投与 39 日に、腫瘍径の測定により腫瘍体積を推定した。データは平均腫瘍体積 ± 平均の標準誤差（SEM）として示す。各群の無腫瘍動物を記録した。

Compound	**Dose (mg/kg)**	**N**	**Mean Tumor Volume (mm^3±SEM)**	**Tumor-free animals**
			(Day 39)	**(Day 39)**
Vehicle		10	2528 ± 691	0
Ibrutinib	48.9 qd	10	297 ± 89	1
	48.9 bid	10	99 ±27	2
BGB-3111	2.4 bid	10	482 ± 192	0
	7.2 bid	10	347 ± 137	0
	24.1 bid	9	11 ± 8	7
	48.3 bid	10	45 ± 15	3

ICR マウスを用いて BGB-3111 の PK/PD プロファイルを検討した（Figure 8 及び Figure 9）。BGB-3111 は速やかに吸収及び排泄され、末梢血単核球（PBMC）及び脾臓のいずれにおいても用量依存的な BTK 阻害が認められた。BGB-3111 はイブルチニブの約 3 倍強力であり、C_{max} の増加と相関していた。

Figure 8:　ICR マウスに BGB-3111 を単回経口投与した後の PK 及び PD の関係

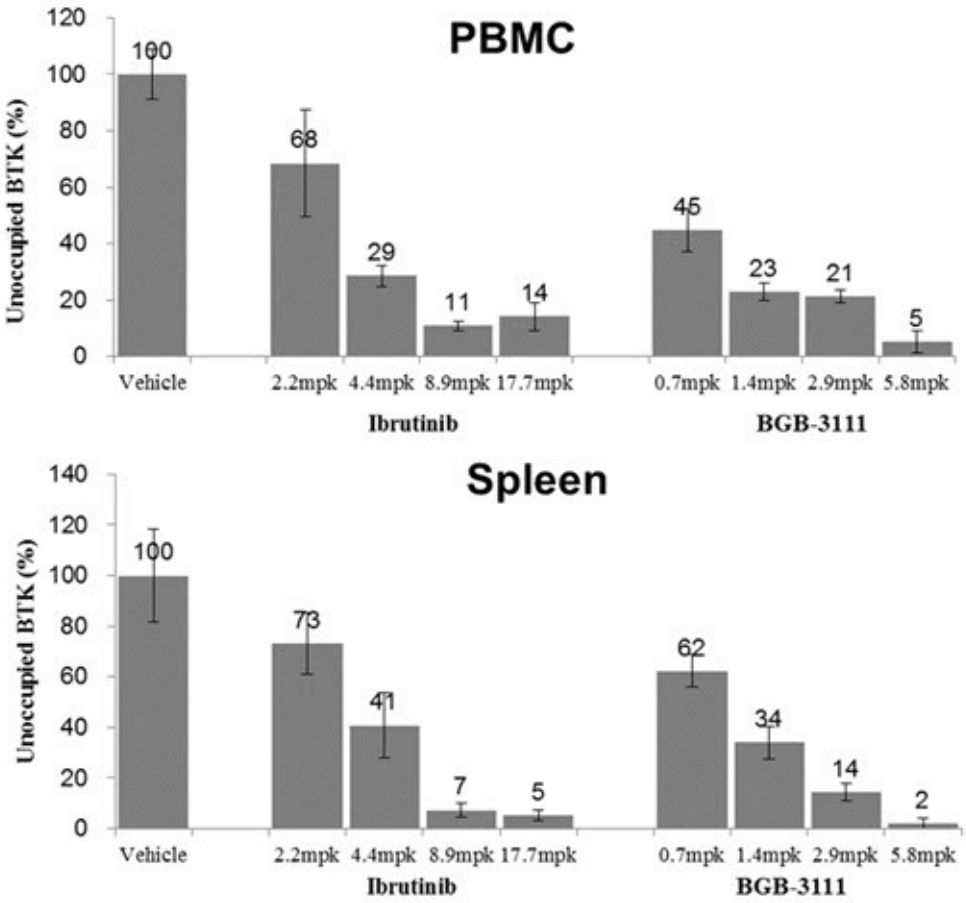
ICR マウスに BGB-3111 14.5 mg/kg を投与し、投与後の異なる時点で安楽死させた。BTK 占有アッセイ用に PBMC 及び脾臓を採取した。血漿中 BGB-3111 の濃度も異なる時点で測定した。データは各群の 4 匹の平均±標準誤差（SEM）として示す。

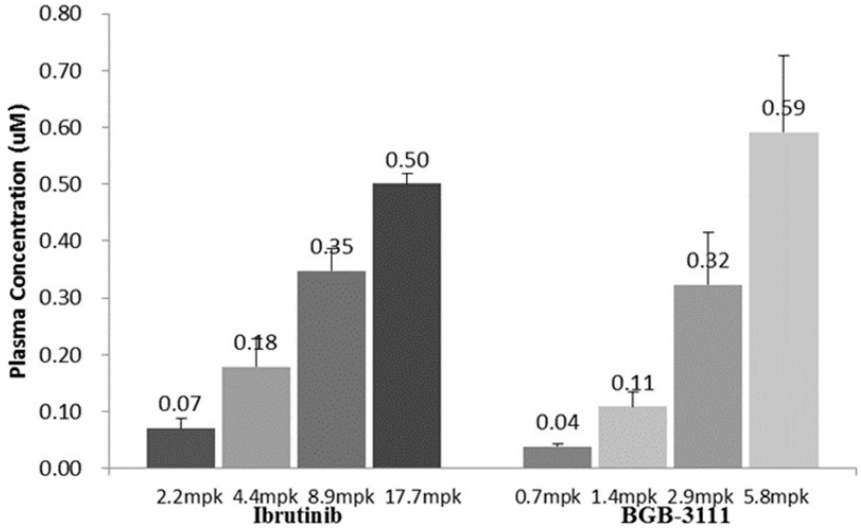


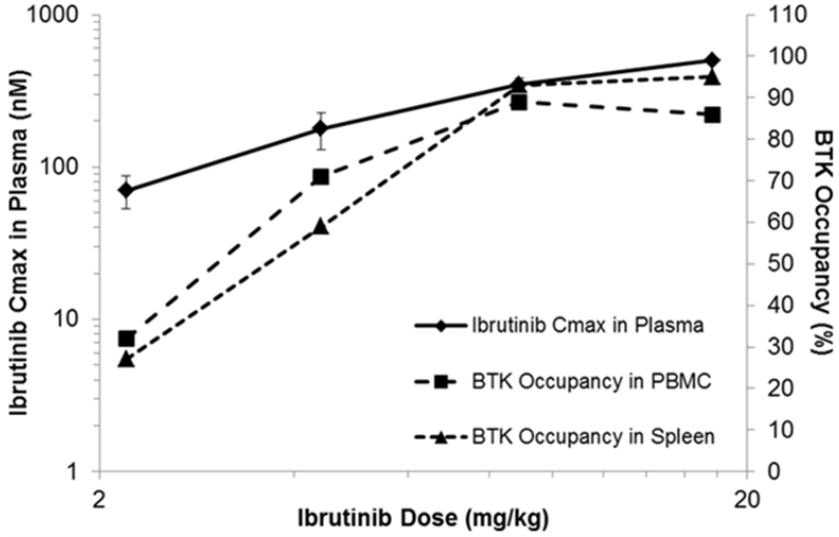
BGB-3111 又はイブルチニブの投与の結果、PBMC 及び脾臓において用量依存的な BTK 占有が生じた（Figure 9）。PBMC 及び脾臓では、BGB-3111 の用量がそれぞれ 1.4 mg/kg 及び 2.9 mg/kg を超えると、70%を超える標的阻害が達成された。イブルチニブについては、PBMC 及び脾臓において、それぞれ 4.4 mg/kg 及び 8.9 mg/kg を超える用量で 70%を超える標的阻害が達成された。BGB-3111 の阻害作用は、両標的臓器においてイブルチニブの約 3 倍強力であった。いずれの化合物も、脾臓よりも PBMC においてより強力な BTK 阻害が認められた。BGB-3111 及びイブルチニブの血漿中 C_{max} は、いずれも用量依存的であった。BGB-3111 の C_{max} は、表示用量の 3 倍の用量のイブルチニブとほぼ同等であり、BGB-3111 とイブルチニブの薬力学的作用の差と一致していた。PBMC 及び脾臓で 70%を超える標的阻害を達成するには、BGB-3111 でそれぞれ 0.11 µmol/L 及び 0.32 µmol/L、イブルチニブでそれぞれ 0.18 µmol/L 及び 0.35 µmol/L を超える血漿中 C_{max} が必要である。

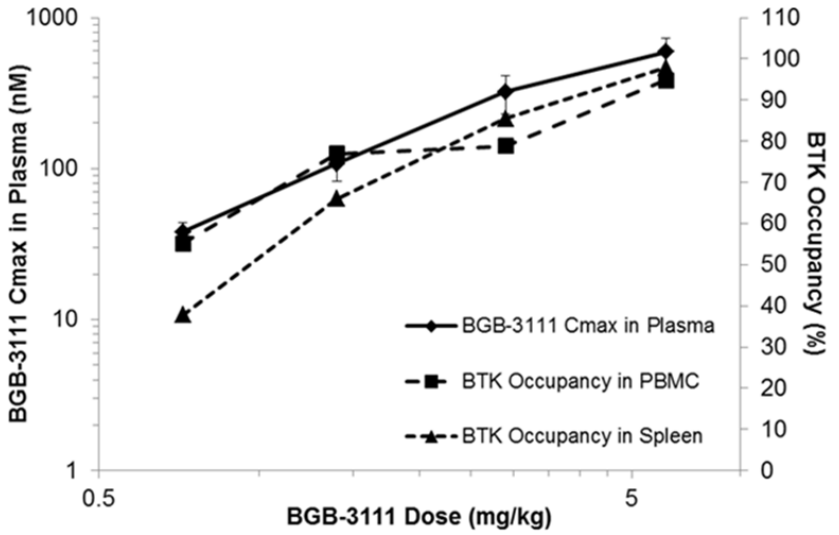
Figure 9: ICR マウスにおける異なる用量レベルでの BGB-3111 とイブルチニブの PK 及び PD の関係

ICR マウスに、イブルチニブ及び BGB-3111 を異なる用量で投与し、投与後 4 時間に安楽死させた。BTK 占有を評価するために PBMC 及び脾臓を採取した。BGB-3111 及びイブルチニブの血漿薬物濃度は、投与後 0.5 時間に測定した。データは、各群の 4 匹の平均±標準誤差（SEM）として示す。




Plasma Concentration (uM)
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.07
0.18
0.35
0.50
0.04
0.11
0.32
0.59
2.2mpk 4.4mpk 8.9mpk 17.7mpk
Ibrutinib
0.7mpk 1.4mpk 2.9mpk 5.8mpk
BGB-3111


Ibrutinib Cmax in Plasma (nM)
1000
100
10
1
BTK Occupancy (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Ibrutinib Cmax in Plasma
BTK Occupancy in PBMC
BTK Occupancy in Spleen
2
20
Ibrutinib Dose (mg/kg)


BGB-3111 Cmax in Plasma (nM)
1000
100
10
1
BTK Occupancy (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
BGB-3111 Cmax in Plasma
BTK Occupancy in PBMC
BTK Occupancy in Spleen
0.5
5
BGB-3111 Dose (mg/kg)

2.4. 代謝物の特性評価

報告書番号：R01-BIOL-155

BGB-3111 の 3 種の代謝物である BGB-7941（BGB-3111 の一酸化物）、BGB-10719（アクリル酸）及び M417（脱アクリル化 BGB-3111、別名 BGB-4013 又は C13043088-L）を生化学キナーゼアッセイで評価し、さらにその薬理作用について細胞機構及び機能アッセイで評価した。

遺伝子組換え BTK 酵素を用いて BTK 活性の阻害を検討した。BTK キナーゼに対する BGB-3111、BGB-7941 及び M417 の IC_{50} は、それぞれ 0.21 nmol/L、0.76 nmol/L 及び 3879 nmol/L であった。10 µmol/L までの濃度では、アクリル酸は BTK に対して活性を示さなかった。

細胞アッセイを用いて、これらの代謝物の活性を検討した。BGB-7941 のみが BGB-3111 よりもわずかに弱い活性を示した。M417 及びアクリル酸は、細胞アッセイで検出可能な活性を示さなかった。

全体として、BGB-7941 のみが BGB-3111 と比較してわずかに弱い薬理活性を示した。細胞アッセイでは、アクリル酸及び M417 はいずれも BTK に対して活性を示さなかった。

3. 副次的薬理試験

Table 7: 副次的薬理試験の要約

Report number	Title	Test system	Noteworthy findings	
R01-BIOL-148	Biochemical Selectivity of BGB-3111	Biochemical assay	In a panel of 342 kinases, 1 µmol/L BGB-3111 significantly (>70%) inhibits 12 kinases besides BTK (see Table 8). BGB-3111 was more selective than ibrutinib for inhibition of BTK vs. EGFR, FGR, FRK, HER2, HER4, ITK, JAK3, LCK, and TEC.	
			GSH reactivity:	Ibrutinib 0.07 µmol/L/min
				BGB-3111 0.03 µmol/L/min
R01-BIOL-143	Cellular Selectivity of BGB-3111 against ITK and EGFR	Cellular assay	IL-2 production:	Ibrutinib IC_{50}=259.7 nmol/L
				BGB-3111 IC_{50}=2536 nmol/L
			p-EGFR:	Ibrutinib IC_{50}=101 ± 38 nmol/L (individual: 74 nmol/L 128 nmol/L)
				BGB-3111 IC_{50}=606± 49 nmol/L (individual: 571 nmol/L, 640 nmol/L)
R01-BIOL-147	Effect of BGB-3111 on Rituximab Induced ADCC	Cellular assay	BGB-3111 is at least 10-fold weaker than ibrutinib in inhibiting rituximab-induced ADCC	

Note: The IC_{50} are shown as mean±standard deviation when data is from 2 repeated experiments. Single IC_{50} number is from one time experiment.

3.1. 生化学的選択性

BGB-3111 は、BTK の ATP 結合部位付近のシステイン 481 と共有結合するようにデザインされた。ヒトキノームにおける 491 種類のキナーゼのうち、この位置にシステインを有するのは、BTK 及びその他 9 種類のキナーゼ［ITK、TEC、JAK3、EGFR、HER2、染色体 X 上の骨髄チロシンキナーゼ（BMX）、TEC ファミリーチロシンキナーゼ TXK（TXK）、HER4 及び B リンパ性チロシンキナーゼ（BLK）］のみである（Singh et al 2010）ことから、この不可逆的な阻害機序により、この位置にシステインを有さないキナーゼに対して BGB-3111 の選択性が担保される。また、この位置にシステインを有する 10 種類のキナーゼに対しては、他の 9 種類のキナーゼと比較して BTK への特異性を高めることにより選択性を担保することが可能となる。

1 µmol/L の 342 種類のキナーゼパネルに対する BGB-3111 の選択性を Reaction Biology 社で検討した。BGB-3111 は、329 種類のキナーゼに対する阻害は 70%未満である一方で、BTK と 12 種類のキナーゼに対する阻害は 70%を超えていた（Table 8）。これら 13 種類のキナーゼとこの他に前述の特定部位のシステイン残基を有するキナーゼに対する BGB-3111 の IC_{50} を測定した。Table 9 に示すとおり、BTK の阻害と他のキナーゼ（EGFR、FGR、FRK、HER2、HER4、ITK、JAK3、LCK 及び TEC）の阻害を比較すると、BGB-3111 はイブルチニブよりも BTK 阻害への選択性が高かった。

Table 8: 1 µmol/L の BGB-3111 による>30%の阻害を有するキナーゼ

Kinase	**Inhibition (%)**
TXK	96
BRK	99
BLK	99
BTK	98
BMX/ETK	98
ERBB4/HER4	96
MEK2	86
EGFR	86
TEC	79
FGR	76
ITK	76
LCK	73
FRK/PTK5	71
HCK	65
CSK	66
FLT3	61

Kinase	Inhibition (%)
MEK1	57
YES/YES1	51
FYN	50
ACK1	42
ERBB2/HER2	40
LYN B	39
JAK3	36
LYN	35
SRMS	31

Note: Assays were carried out at Reaction Biology Corp. at 1 µmol/L ATP with 15 min pre-incubation
* The biochemical inhibition of MEK enzymes was not confirmed in in-house biochemical and cellular assays, which consistently showed no inhibition of MEK enzymes by up to 5 µmol/L of BGB-3111

Table 9: BGB-3111 の生化学的効力及び選択性

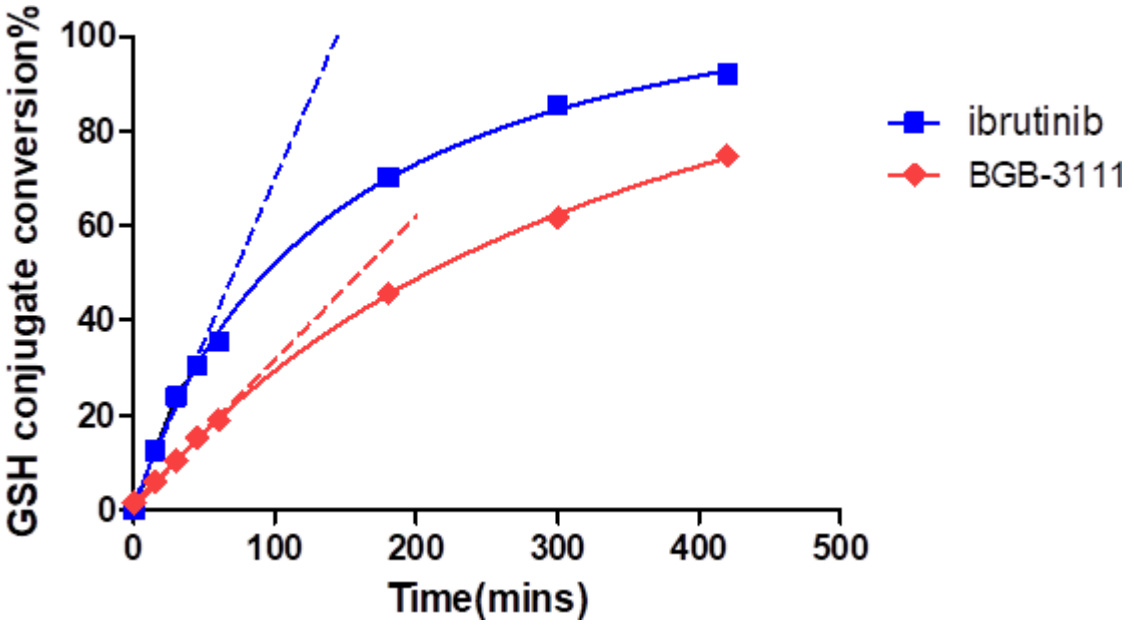
Enzyme	Mean IC_{50} (nmol/L) of BGB-3111	Mean IC_{50} (nmol/L) of ibrutinib	Selectivity of BGB-3111	Selectivity of Ibrutinib
BTK kinase (2-end)	0.30 ± 0.06	0.18 ± 0.04	/	/
ITK kinase full length	56 ± 12	3.0 ± 0.7	187	17
TEC kinase full length	2.0 ± 0.8	0.57 ± 0.18	6.7	3.2
JAK3 kinase (795-end)	580 ± 21	10 ± 2	1933	56
EGFR wild type kinase (aa669-1210)	2.6 ± 1.0	0.75 ± 0.14	8.7	4.2
HER2	530 ± 273	19 ± 7	1767	106
BLK	1.13	0.23	1.2	0.5
BMX/ETK	0.62	0.50	0.7	1.1
BRK	33	18	36	39
ERBB4/HER4	1.58	0.25	1.7	0.5
FGR	155	1.82	168	4.0
FRK/PTK5	379	79	412	172
LCK	187	2.85	203	6.2
TXK	2.95	2.89	3.2	6.3

Note: The IC_{50} are shown as mean±standard deviation when data is from 3 repeated experiments. Single IC_{50} number is from one time experiment.
BTK, EGFR, ITK, TEC, HER2, and JAK3 assays were carried out in-house at BeiGene by using a TR -FRET assay and corresponding peptides as substrate. IC_{50}s of compounds were measured at KM of ATP for the five kinases and with 1-hour pre-incubation. HER4, BMX, TXK, BLK FGR, LCK, FRK/PTK5 assays were carried out at Reaction Biology Corp. using ^{33}P-ATP and filter-binding assay (Anastassiadis et al., 2011). IC_{50}s of compounds were

measured at 1 µmol/L ATP and with 1-hour pre-incubation. Selectivity for these kinases was calculated based on IC_{50} of BTK generated in Reaction Biology Corp. for BGB-3111 (0.92 nmol/L) and ibrutinib (0.46 nmol/L).

BGB-3111 及びイブルチニブとグルタチオン（GSH）の反応速度を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法により評価した。これらの化合物は、GSH との反応が遅く通常想定される時間内で測定することが困難なため、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）を触媒として使用し、BGB-3111 及びイブルチニブと GSH の相対反応速度を測定した（Pharmacyclics 2008）。反応は、各時点でギ酸を添加して停止した。GSH との結合形成の割合は、親化合物及び GSH 複合体それぞれに関する HPLC クロマトグラフィーのピーク領域から算出した。Figure 10 に、BGB-3111 及びイブルチニブと GSH の反応曲線をそれぞれ示す。初期反応速度は、反応曲線の線形範囲から算出した。BGB-3111 の相対 GSH 反応速度は 0.03 µmol/L/分であり、イブルチニブの約半分であった（0.07 µmol/L/分）。

Figure 10: BGB-3111 及びイブルチニブと GSH の反応曲線



3.2. 細胞選択性

BGB-3111 は、生化学アッセイにおいて、イブルチニブよりも ITK 及び EGFR に対する選択性が良好であった。ITK 及び EGFR 阻害における BGB-3111 の選択性を細胞レベルで検討した。

ITK は、T 細胞受容体（TCR）凝集により活性化されると、PLCγ1 Tyr783 残基を直接リン酸化し、その後 NF-κB 経路を活性化し、インターロイキン 2（IL-2）の産生を増加させる（Ghose 2013; Min et al 2009; Ragin et al 2005; Wilcox and Berg 2003）。PLCγ1 リン酸化アッセイ（Jurkat 細胞）及び IL-2 産生アッセイ（HuT-78 細胞）では、過酸化水素（H_2O_2）誘導性の PLCγ1 リン酸化及び IL-2 産生に対する BGB-3111 の阻害作用は、イブルチニブよりそれぞれ 44 倍及び 10 倍低いことが示さ

れ、BGB-3111 はイブルチニブよりも ITK 阻害においてはるかに弱いことが示唆された（Table 10）。

EGFR は膜貫通型チロシンキナーゼであり、A431 細胞で発現している。EGFR リン酸化 Tyr1068 残基を検出する HTRF アッセイ及び A431 細胞生存アッセイを用いて、EGFR 阻害を評価した（Kozer et al 2014; Rojas et al 1996）。BGB-3111 は、A431 細胞における EGFR リン酸化及び細胞増殖の阻害において、イブルチニブよりもそれぞれ約 6 倍及び 10 倍弱かった。（Table 10）。

Table 10: 細胞選択性の概要

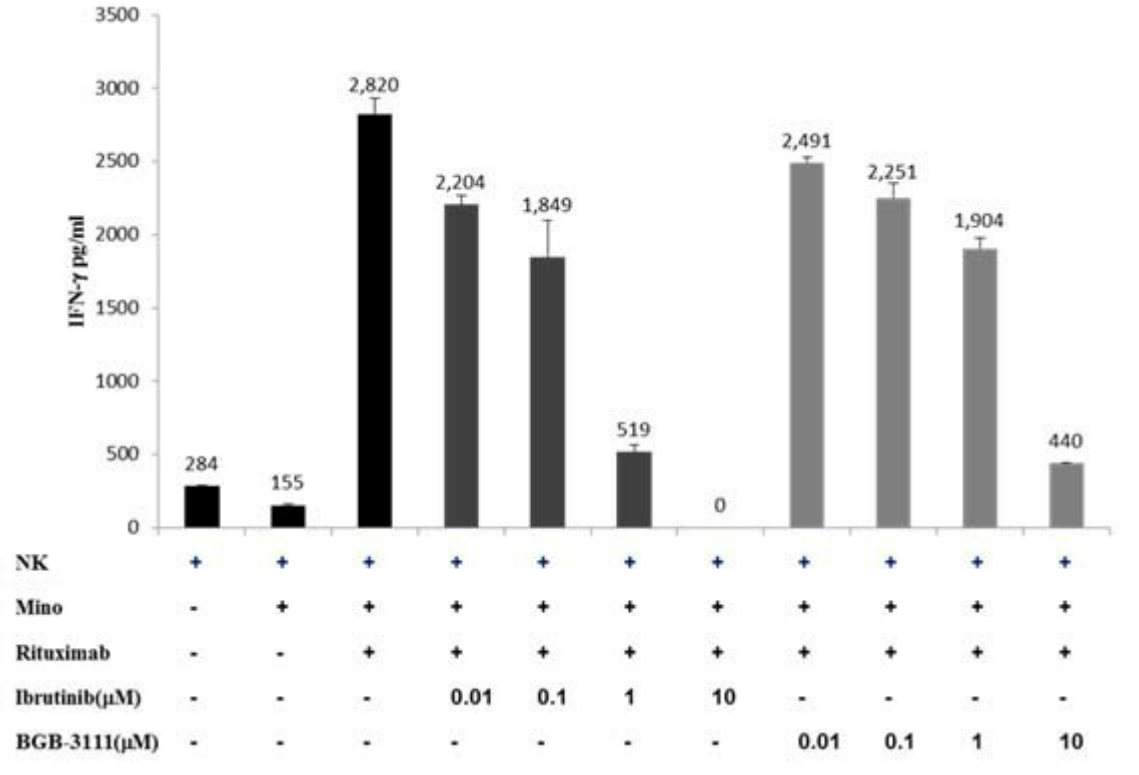
Targets	**Assays**	**IC_{50} (nmol/L) mean±standard deviation (n≥2)**		
		Ibrutinib	**BGB-3111**	**BGB-3111/Ibrutinib**
BTK	BTKpY223 assay	3.5±1.9 (n=3)	1.8±0.2 (n=3)	0.5
	REC-1 proliferation	0.34±0.2 (n=3)	0.36±0.03 (n=3)	1.1
	BTK occupation assay	2.3 (n=1)	2.2 ±1.0 (n=3)	1.0
EGFR	p-EGFR HTRF assay	101±38 (n=2) (individual: 74 nmol/L, 128 n nmol/L)	606±49 (n=2) (individual: 571 nmol/L, 640 nmol/L)	6.0
	A431 proliferation	323±100 (n=2) (individual: 252 nmol/L, 394 nmol/L)	3210±606 (n=2) (individual: 2781 nmol/L, 3638 nmol/L)	9.9
ITK	p-PLCγ_1 assay	76.9±3.3 (n=2) (individual: 74.6 nmol/L, 79.2 nmol/L)	3433±217.8 (n=2) (individual: 3323 nmol/L, 3631 nmol/L)	44.6
	IL-2 production assay	259.7 (n=1)	2536 (n=1)	9.8

Note: The IC_{50} are shown as mean±standard deviation when data is from ≥2 repeated experiments. Single IC_{50} number is from one time experiment.

生化学及び細胞アッセイから、BGB-3111 はイブルチニブよりも ITK 阻害活性が顕著に低いことが示された。ITK の阻害により、リツキシマブ誘発性 ADCC が減少することが報告されている（Da Roit et al 2015; Kohrt et al 2014）。リツキシマブ誘発性 ADCC に対し、BGB-3111 及びイブルチニブが及ぼす影響を評価した。NK 細胞及び Mino MCL 細胞の共培養し、NK 細胞介在性細胞傷害及び IFN-γ 分泌を指標としてリツキシマブ誘導性 ADCC を測定した（Figure 11）。イブルチニブは用量依存的に IFN-γ 分泌を阻害した（Figure 11）。1 μmol/L のイブルチニブにより、IFN-γ 分泌はほぼ完全に消失した。これに対し、IFN-γ 分泌に対する BGB-3111 の阻害活性は、イブルチニブよりも約 10 倍弱く、検討した最高用量（10 μmol/L）での阻害作用が、1 μmol/L でのイブルチニブの阻害作用と近かった。

Figure 11: リツキシマブを介した IFN-γ 分泌に対する BGB-3111 及びイブルチニブの影響

Mino 細胞及び NK92MI 細胞を共培養し、処理した。培地中の IFN-γ 濃度を測定し、平均 IFN-γ 濃度±標準偏差（SD）として示した。平均 IFN-γ 濃度（pg/mL）をグラフの各バーの上に示す。

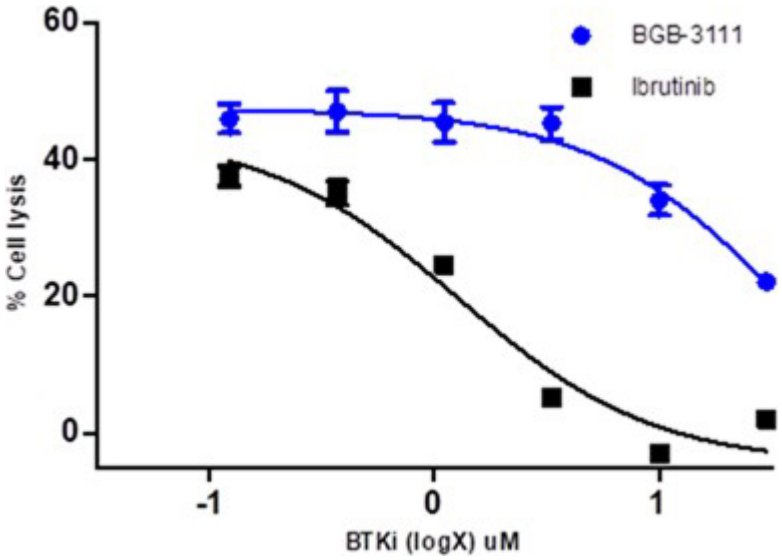


さらに、これらの BTK 阻害剤がリツキシマブ誘発性 ADCC に及ぼす影響を、細胞毒性アッセイにより確認した（Figure 12）。イブルチニブ及び BGB-3111 はいずれも、リツキシマブでコーティングした Mino 細胞に対する NK 細胞特異的溶解を用量依存的に阻害したが、その阻害作用の強さは異なっていた。イブルチニブの IC_{50}（0.85 μmol/L）は、BGB-3111（25 μmol/L）のそれより低く、ほぼ 30 倍の差があった。

Figure 12: リツキシマブを介した *in vitro* 細胞毒性に対する BGB-3111 及びイブルチニブの影響

Mino 細胞と NK92MI 細胞を共培養し、処理した。両化合物の IC_{50} を算出し、表に示した。

(A)



(B)

Compound	IC_{50} (μmol/L)
Ibrutinib	0.85
BGB-3111	25

Notes: This experiment was conducted only once. Three replicates were performed at each concentration point, and the average and SEM of the three replicates were plotted in Figure 12A (The detailed number were shown in the table below). A curve was fitted based on the average values to calculate the IC_{50} values by prism.

Concentration (μmol/L)	**% Cytotoxicity (Mean ± SEM) (three replicates)**	
	BGB-3111	**Ibrutinib**
0.12	45.93 ± 2.12	37.56 ± 1.52
0.37	46.97 ± 3.01	35.12 ± 1.75
1.11	45.39 ± 2.80	24.57 ± 1.12
3.33	45.22 ± 2.40	5.25 ± 0.96
10.00	34.04 ± 2.19	-2.99 ± 0.32
30.00	22.14 ± 0.45	2.13 ± 0.29

これらの結果から、BGB-3111 のリツキシマブ誘発性 ADCC に対する阻害作用は、イブルチニブよりも少なくとも 10 倍弱いことが示唆される。これは、BGB-3111 がより選択的な BTK 阻害剤であり、生化学及び細胞アッセイのいずれにおいても、イブルチニブよりも ITK 阻害活性がはるかに弱いことと一致している。

4. 安全性薬理試験

安全性薬理試験及び注目すべき所見を Table 11 に概説する。ピボタル試験はいずれも、[redacted]社（試験施設）で現行の試験ガイドラインに従い、米国食品医薬品局（FDA）、経済協力開発機構（OECD）及び中国国家食品薬品監督管理総局（CFDA）による医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP 規制）を遵守して実施された。試験の品質及び完全性に影響を及ぼすと考えられる逸脱はなかった。

Table 11: 安全性薬理試験の概要

Study Number	GLP	Study Title	Test System	Noteworthy Findings
[redacted]-BGB-hERG-004	No	hERG Test for BGB-000003111-000-035	Transfected HEK 293 cells	IC_{50} = 3.8 µmol/L
180-0190-EP	Yes	BGB-3111: Effects on Electric Current Passing through Cloned hERG Potassium Channels Stably Expressed in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells using Manual Patch-Clamp Technique	Transfected CHO cells	IC_{50} = 9.11 µmol/L
180-0084-SP	Yes	BGB-3111: Effects of Oral Administration (Oral Gavage) on Central Nervous System Function in Rats	Sprague Dawley rats	No effects on central nervous system function were noted following oral administration at single doses of 30, 100, or 300 mg/kg up to 24 hours
180-0085-SP	Yes	BGB-3111: Effects of Oral Administration (Oral Gavage) on Respiratory Functions in Rats	Sprague Dawley rats	No effects on respiratory function were noted following oral administration at single doses of 30, 100, or 300 mg/kg up to 24 hours
180-0067-SP	Yes	Cardiovascular Safety Pharmacology Evaluation of BGB-3111 Administered by Oral Gavage to Telemetry-Instrumented Conscious Beagle dogs	Beagle dogs	No effects on blood pressure, heart rate or ECG were noted in the telemetry-instrumented conscious dogs following oral administration at single doses of 10, 30, or 100 mg/kg up to 24 hours. Specifically, no QT prolongation was noted.

4.1. *In vitro* 試験

4.1.1. hERG チャネルアッセイ

試験番号：180-0190-EP

カリウムイオンチャネルに対する BGB-3111 の影響を、手動パッチクランプ法を用いた hERG アッセイにより評価した。これは、hERG チャネルを安定的に発現する CHO 細胞株を用いた細胞ベースのアッセイである。

溶媒はジメチルスルホキシド（DMSO）であり、溶媒／陰性対照での最終反応溶液は 0.5%DMSO 細胞外液（ECS）であった。BGB-3111 の溶解度は 100 µmol/L と高かった。

用量設定試験の結果に基づき、BGB-3111 の本試験を濃度 1、3、10 及び 30 µmol/L で実施した。各濃度について 4 セットの細胞で試験した。アッセイの妥当性を担保するため、陰性（溶媒）及び陽性（テルフェナジン）対照を含めた。

IC_{50} は BGB-3111 で 9.11 µmol/L、テルフェナジンで 50.46 nmol/L であり、公表データと同程度であった。

初期の非 GLP 試験では、中等度の阻害も示され、IC_{50} が 3.8 µmol/L であったが、アミトリプチリンの陽性対照は 1.9 µmol/L であった（試験番号：ICE-BGB-hERG-004）。

4.2. 安全性薬理コアバッテリー試験

4.2.1. 中枢神経系機能試験

試験番号：180-0084-SP

中枢神経系機能に対する BGB-3111 の影響を、機能観察総合評価（FOB）法を用いて Sprague Dawley ラットで評価した。計 80 匹のラットを 4 群（1 群あたり雌雄各 10 匹）に割り付け、溶媒又は BGB-3111 を 30、100 又は 300 mg/kg の用量で投与した。その結果、FOB 試験では、投与後約 0.5、2 及び 24 時間の運動活動、行動変化、協調運動、感覚／運動反射反応及び体温評価を含む評価項目で、被験物質に関連した変化は認められなかった。

4.2.2. 呼吸器系機能試験

試験番号：180-0085-SP

Sprague Dawley ラットを用いて、呼吸機能に対する BGB-3111 の影響を検討した。計 40 匹のラットを 4 群（1 群あたり雌雄各 5 匹）に割り付け、溶媒又は BGB-3111 を 30、100 又は 300 mg/kg の用量で投与した。いずれの用量でも、投与後約 0.5、2 及び 24 時間の時点での呼吸数、1 回換気量及びそれらに基づく分時換気量に有意な変化は認められなかった。

4.2.3. 心血管機能試験

試験番号：180-0067-SP

テレメトリーを装着した覚醒下ビーグル犬を用いて、心血管機能に対する BGB-3111 の影響を検討した。4×4 ラテン方格クロスオーバー試験デザインを用いて、1、4、7 及び 10 日に、溶媒及び BGB-3111 を 10、30 及び 100 mg/kg の用量でそれぞれ計 8 匹（1 群あたり雌雄各 4 匹）に経口投与した。イヌでは、血圧、心拍数及び ECG に対する被験物質関連の影響は認められなかった。特に、いずれの用量でも QT 延長は認められなかった。

5. 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施しなかった。

6. 考察及び結論

BGB-3111 は、強力で特異的かつ不可逆的な BTK 阻害剤であり、生化学及び細胞アッセイにおいて強力な BTK 阻害を示す。また、REC-1 MCL 及び TMD8 DLBCL マウス異種移植片モデルにおいて *in vivo* で抗腫瘍活性を示す。キナーゼ阻害活性に関し、342 種類のヒトキナーゼパネルに対して 1 µmol/L で検討した結果、BGB-3111 は BTK 以外の 12 種類のキナーゼのみを顕著に阻害する。BGB-3111 は、生化学及び／又は細胞アッセイにおいて、EGFR、FGR、FRK、HER2、HER4、ITK、JAK3、LCK 及び TEC の阻害に関し、イブルチニブよりも選択性が高いことが示されている。BGB-3111 がリツキシマブ誘発 ADCC に及ぼす影響はイブルチニブよりも約 10 倍弱く、このことは BGB-3111 がイブルチニブよりも選択性の高い BTK 阻害剤で ITK 阻害剤としての活性がより低いことと一致している。BGB-3111 は、P-gp の基質となる可能性はわずかであり、P-gp の阻害剤となる可能性は低い。

BGB-3111 は hERG チャネルに対して中等度の阻害を示した。テレメトリーを装着したビーグル犬に 100 mg/kg までの用量で単回投与したところ、心血管パラメータに変化は認められなかった。ビーグル犬に 1 日あたり 100 mg/kg までの用量で 9 カ月間投与したところ、ECG の変化は認められなかった。非臨床試験及び臨床試験に基づくと、BGB-3111 による QT 間隔延長の潜在的リスクは低いと考えられる。

ラットを用いた単回及び 6 カ月間反復投与毒性試験並びにイヌを用いた単回及び 9 カ月間反復投与毒性試験のいずれにおいても、心血管系、中枢神経系及び呼吸器系のバイタル機能に安全性の懸念は認められなかった。

7. 参考文献

Anastassiadis, T., Deacon, S.W., Devarajan, K., Ma, H., and Peterson, J.R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 29, 1039-1045.

Copeland, R.A. (2000). Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis., 2 edn (Wiley-VCH).

Da Roit, F., Engelberts, P.J., Taylor, R.P., Breij, E.C., Gritti, G., Rambaldi, A., Introna, M., Parren, P.W., Beurskens, F.J., and Golay, J. (2015). Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. Haematologica 100, 77-86.

Ghose, R. (2013). A measured approach: determining the PLCgamma1 docking site on Itk using a biochemical ruler. J Mol Biol 425, 679-682.

Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D.H., Miller, R.A., et al. (2010). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 13075-13080.

Kohrt, H.E., Sagiv-Barfi, I., Rafiq, S., Herman, S.E., Butchar, J.P., Cheney, C., Zhang, X., Buggy, J.J., Muthusamy, N., Levy, R., et al. (2014). Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. Blood 123, 1957-1960.

Kozer, N., Barua, D., Henderson, C., Nice, E.C., Burgess, A.W., Hlavacek, W.S., and Clayton, A.H. (2014). Recruitment of the adaptor protein Grb2 to EGFR tetramers. Biochemistry 53, 2594-2604.

Maddocks, K., and Blum, K.A. (2014). Ibrutinib in B-cell Lymphomas. Curr Treat Options Oncol 15, 226-237.

Min, L., Joseph, R.E., Fulton, D.B., and Andreotti, A.H. (2009). Itk tyrosine kinase substrate docking is mediated by a nonclassical SH2 domain surface of PLCgamma1. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 21143-21148.

Pharmacyclics, I. (2008). Inhibitors of Bruton's tyrosine kinase. WO 2008121742.

Ragin, M.J., Hu, J., Henderson, A.J., and August, A. (2005). A role for the Tec family kinase ITK in regulating SEB-induced interleukin-2 production in vivo via c-jun phosphorylation. BMC Immunol 6, 19.

Rojas, M., Yao, S., and Lin, Y.Z. (1996). Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. J Biol Chem 271, 27456-27461.

Singh, J., Petter, R.C., and Kluge, A.F. (2010). Targeted covalent drugs of the kinase family. Curr Opin Chem Biol 14, 475-480.

Wilcox, H.M., and Berg, L.J. (2003). Itk phosphorylation sites are required for functional activity in primary T cells. J Biol Chem 278, 37112-37121.

Wu, H., Wang, W., Liu, F., Weisberg, E.L., Tian, B., Chen, Y., Li, B., Wang, A., Wang, B., Zhao, Z., et al. (2014). Discovery of a potent, covalent BTK inhibitor for B-cell lymphoma. ACS Chem Biol 9, 1086-1091.

目次

1. 効力を裏付ける試験 2
2. 副次的薬理試験 3
3. 安全性薬理試験 4

略語一覧は Module 2.6.1 に記載。

1. 効力を裏付ける試験

特に記載がない限り、全ての試験は BeiGene Ltd, Beijing, China で実施した。

Test Article: BGB-3111			
Primary Pharmacodynamics – Overview			
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Location in CTD (Report Number)**
Inhibition of BTK enzyme activity	Biochemical	NA	Module 4.2.1.1-1 (R01-BIOL-145)
Covalent nature of BTK inhibition	Biochemical	NA	Module 4.2.1.1-1 (R01-BIOL-145)
Inhibition of cellular BTK activity	*In vitro* cellular	NA	Module 4.2.1.1-2 (R01-BIOL-141)
BTK occupancy	*In vitro* cellular	NA	Module 4.2.1.1-2 (R01-BIOL-141)
Biochemical and cellular characterization of BGB-3111 and its metabolites	Biochemical and *In vitro* cellular	NA	Module 4.2.1.1-4 (R01-BIOL-155)
Inhibition of tumor cell proliferation	*In vitro* cellular	NA	Module 4.2.1.1-3 (R01-BIOL-142)
Efficacy study in REC-1 subcutaneous xenografts	*In vivo* efficacy	Oral (gavage)	Module 4.2.1.1-5 (R01-VIVO-118)
Efficacy study in REC-1 systemic xenografts	*In vivo* efficacy	Oral (gavage)	Module 4.2.1.1-6 (R01-VIVO-119)
Efficacy study in TMD-8 subcutaneous xenografts	*In vivo* efficacy	Oral (gavage)	Module 4.2.1.1-7 (R01-VIVO-124)
Pharmacokinetics and pharmacodynamics study of BGB-3111 in mouse	*In vivo* PK/PD	Oral (gavage)	Module 4.2.1.1-8 (R01-VIVO-121)

Note: NA = not applicable

2. 副次的薬理試験

特に記載がない限り、全ての試験は BeiGene Ltd, Beijing, China で実施した。

Test Article: BGB-3111			
Secondary Pharmacodynamics – Overview			
Type of Study	**Test System**	**Report Number**	**Location in CTD**
Kinase selectivity[a]	*In vitro* biochemical	R01-BIOL-148	Module 4.2.1.2-1
Cellular Target Selectivity vs ITK and EGFR	*In vitro* cellular	R01-BIOL-143	Module 4.2.1.2-2
Effect on Rituximab Induced ADCC	*In vitro* cellular	R01-BIOL-147	Module 4.2.1.2-3

[a] Include external studies performed at Reaction Biology Corp.

3. 安全性薬理試験

Test Article: BGB-3111				
Safety Pharmacology – Overview				
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Location in CTD (Study Number)**
hERG K^+ current assay	Transfected CHO cells	*In vitro*	[redacted], Co., Ltd.	Module 4.2.1.3-2 (180-0190-EP)
hERG K^+ current assay	Transfected HEK293 cells	*In vitro*	[redacted] Co., Ltd.	Module 4.2.1.3-1 ([redacted]-BGB-hERG-004)
Central nervous system function	Sprague Dawley Rat	Oral (gavage)	[redacted], Co., Ltd.	Module 4.2.1.3-3 (180-0084-SP)
Respiratory system function	Sprague Dawley Rat	Oral (gavage)	[redacted], Co., Ltd.	Module 4.2.1.3-4 (180-0085-SP)
Cardiovascular system function	Beagle dog	Oral (Intubation)	[redacted], Co., Ltd.	Module 4.2.1.3-5 (180-0067-SP)

Test Article: BGB-3111					
Safety Pharmacology – *In-vitro* studies					
Organ Systems Evaluated	**Test system**	**Concentration**	**Noteworthy Findings**	**GLP**	**Location in CTD (Study Number)**
Electrophysiology					
hERG K^+ current	Transfected CHO cells	1, 3, 10, 30 µmol/L	IC_{50} =9.11 µmol/L, the inhibition was considered moderate	Yes	Module 4.2.1.3-2 (180-0190-EP)
hERG K^+ current	Transfected HEK293 cells	1.23, 3.70, 11.11, 33.33, 100 µmol/L	IC_{50} = 3.8 µmol/L, the inhibition was considered moderate	No	Module 4.2.1.3-1 ([redacted]-BGB-hERG-004)

Test Article: BGB-3111							
Safety Pharmacology Core Battery studies							
Organ Systems Evaluated	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses [mg/kg]**	**Gender (No. per Group)**	**Noteworthy Findings**	**GLP**	**Location in CTD (Study Number)**
Central Nervous System							
Motor activity, behavior changes, coordination, sensory/motor reflex responses and body temperature	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	0, 30, 100, 300	male & female (20)	None	Yes	Module 4.2.1.3-3 (180-0084-SP)
Respiratory System							
Respiration rate, tidal volume and derived minute volume	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	0, 30, 100, 300	male & female (10)	None	Yes	Module 4.2.1.3-4 (180-0085-SP)
Cardiovascular system							
Heart rate, systemic blood pressure, ECG intervals and waveform	Dog/Beagle[a]	Oral (intubation)	0, 10, 30, 100[b]	male & female (8)	None	Yes	Module 4.2.1.3-5 (180-0067-SP)

[a] Telemetry-instrumented conscious dogs
[b] Study was performed in conscious beagle dogs dosed on separate days with intervals of 3 days between each dose according to a modified 4×4 Latin square crossover paradigm.