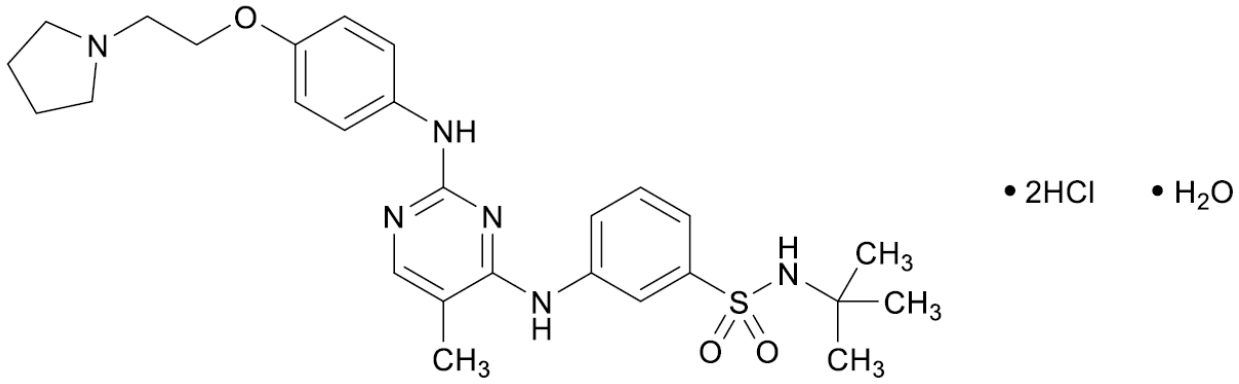
1 緒言

真性多血症、本態性血小板血症及び骨髄線維症は、造血幹細胞の腫瘍化によって生じる骨髄増殖性腫瘍であり、骨髄系細胞（顆粒球、赤芽球及び骨髄巨核球）の著しい増殖を特徴とする[1]。一方、ヤヌスキナーゼ（JAK）ファミリーは造血刺激に重要な役割を果たすサイトカインが受容体に結合した際の細胞内シグナル伝達を担っており[2]、特に、JAK2 シグナル伝達経路の異常な活性化が骨髄増殖性腫瘍の発症に寄与していることが知られている[3]。フェドラチニブ（Figure 1-1）は野生型及び活性化変異型 JAK2 に対する阻害活性を有する経口投与可能な低分子化合物で、骨髄線維症治療薬として開発された。本薬は他の JAK ファミリーと比較して JAK2 に対して高い選択性を示し、活性化変異型 JAK2 を発現する細胞モデル（骨髄増殖性腫瘍患者由来細胞を含む）を用いた評価系において細胞増殖抑制作用及びアポトーシス性細胞死誘導作用を示す。さらに、活性化変異型 JAK2 誘発性骨髄増殖性腫瘍モデルマウスにおいて生存期間延長作用を示し、白血球数増多、ヘマトクリット値上昇、脾腫及び線維化などの骨髄増殖性腫瘍に関連した症状を改善する。

Figure 1-1 フェドラチニブの構造



効能又は効果（案）：骨髄線維症

用法及び用量（案）：通常、成人にはフェドラチニブとして 1 回 400 ㎎を 1 日 1 回経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

2 参考文献

[1] 造血器腫瘍診療ガイドライン 2023

[2] 朝比奈 昭彦. JAK キナーゼ. アレルギー 2018;67:157-8.

[3] 北中 明, 下田 和哉. 骨髄線維症の病因と病態. 日内会誌 2012;101:1906-12.

Table of Contents

1 まとめ 6
2 効力を裏付ける試験 7
2.1 In vitro 試験 7
2.1.1 キナーゼ阻害作用 7
2.1.2 細胞に対する作用 8
2.1.2.1 JAK ファミリーを強制発現させた細胞における酵素阻害作用及び細胞増殖抑制作用 8
2.1.2.2 $JAK2^{V617F}$ 発現細胞における酵素阻害作用及び細胞増殖抑制作用 9
2.1.2.3 $JAK2^{V617F}$ 発現造血系細胞に対するフェドラチニブの影響 12
2.1.3 $JAK2^{V617F}$ 発現細胞に対するフェドラチニブ代謝物の作用 14
2.1.4 薬物耐性 JAK2 に関する評価 15
2.1.4.1 ルキソリチニブ耐性 JAK2 に対するフェドラチニブの作用 15
2.1.4.2 フェドラチニブ耐性誘導 $JAK2^{V617F}$ 発現細胞を用いた in vitro 評価 15
2.2 In vivo 試験 16
2.2.1 $JAK2^{V617F}$ 発現骨髄細胞を同所移植した骨髄増殖性腫瘍モデルマウスにおけるフェドラチニブの病態改善効果 16
2.2.2 $JAK2^{V617F}$ ノックインした骨髄増殖性疾患モデルマウスにおけるフェドラチニブの病態改善効果 19
2.2.3 $JAK2^{V617F}$ 発現赤血球前駆細胞の生着に対するフェドラチニブの阻害作用 20
2.2.4 $JAK2^{V617F}$ 誘発血液疾患の播種性腫瘍モデルマウスにおけるフェドラチニブの作用 21
2.2.5 SET-2 細胞異種移植マウスにおけるフェドラチニブの STAT3/5 シグナル伝達阻害に基づく in vivo 増殖抑制作用 23
3 副次的薬理試験 26
3.1 標的外タンパク質に対する結合選択性 26
3.2 ヒトチアミントランスポーターに対する阻害作用（in vitro） 27
3.3 チアミンの状態（thiamine status）に対するフェドラチニブの影響 27
3.4 ラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験におけるチアミン輸送に対する影響 28
4 安全性薬理試験 28
4.1 中枢神経系に対する作用 28
4.2 循環器系に対する作用 29
4.2.1 In vitro 試験 29
4.2.2 In vivo 試験 29
5 薬力学的薬物相互作用試験 30
6 考察及び結論 30
7 参考文献 32

List of Tables

Table 2.1.1-1: フェドラチニブのキナーゼ阻害作用（50%阻害濃度が 25 nM 未満） 8

Table 2.1.3-1: 各種血液疾患患者由来 $JAK2^{V617F}$ 発現細胞株におけるフェドラチニブ及びその代謝物の細胞増殖抑制作用 14

Table 2.2.1-1: $JAK2^{V617F}$ 発現造血幹細胞移植マウスにおけるフェドラチニブの薬力学的作用 19

List of Figures

Figure 2.1.2-1 JAK2^{V617F} 発現細胞に対するフェドラチニブの細胞増殖抑制作用 10
Figure 2.1.2-2 JAK2^{V617F} 発現細胞におけるフェドラチニブのシグナル伝達性転写因子 5 リン酸化に対する阻害作用 11
Figure 2.1.2-3 JAK2^{V617F} 発現細胞に対するフェドラチニブのアポトーシス誘導作用 12
Figure 2.1.2-4 ヒト臍帯血幹細胞の JAK2^{V617F} 遺伝子導入による赤血球分化能亢進に対するフェドラチニブの阻害作用 13
Figure 2.2.1-1 JAK2^{V617F} 発現造血幹細胞を移植したマウスにおけるフェドラチニブの有効性（生存能に対する影響）及び薬力学的作用 18
Figure 2.2.2-1 JAK2^{V617F} ノックインマウスにおけるフェドラチニブの影響 20
Figure 2.2.3-1 JAK2^{V617F} を発現する赤血球前駆細胞の生着に対するフェドラチニブの阻害作用 21
Figure 2.2.4-1 JAK2^{V617F} 誘発血液疾患の播種性腫瘍モデルマウスにおけるフェドラチニブの作用 23
Figure 2.2.5-1 SET-2 細胞異種移植マウスにおけるフェドラチニブによるシグナル伝達性転写因子 5 リン酸化に対する阻害作用並びにフェドラチニブの血漿中及び腫瘍内濃度の経時的変化 25
Figure 2.2.5-2 SET-2 細胞異種移植マウスにおけるフェドラチニブによる腫瘍増殖抑制作用 26

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語又は定義
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC(0-24h)	—	時間 0 から投与 24 時間後までの濃度時間曲線下面積
BB	backbone vector	バックボーンベクター
BFU-E	burst-forming unit erythroid	赤芽球バースト形成細胞
BID	twice daily	1 日 2 回（投与）
BM	bone marrow	骨髄
CFU-E	colony forming unit-erythroid	赤芽球コロニー形成細胞
CFU-G	colony forming unit-granulocyte	顆粒球コロニー形成細胞
CFU-GM	colony forming unit-granulocyte macrophage	顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞
CFU-M	colony forming unit-macrophage	マクロファージコロニー形成細胞
CFU-Mix	mixed colony forming unit	混合コロニー形成細胞
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
EC50（値）	half-maximal effective concentration	50%有効濃度
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3	FMS 様チロシンキナーゼ 3
GFP	green fluorescent protein	緑色蛍光タンパク質
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
Hrs	hours	時間
HSC	hematopoietic stem cells	造血幹細胞
IC50（値）	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
JAK	Janus kinase	ヤヌスキナーゼ
JAK2i	JAK2 inhibitor	JAK2 阻害薬
$JAK2^{V617F}$	—	617 番アミノ酸残基のバリンがフェニルアラニンへ変異した活性化変異を有する JAK2

略号	英語	日本語又は定義
$JAK2^{+/VF}$ (mice)	$JAK2^{V617F}$ knock-in (mice)	$JAK2^{V617F}$ 遺伝子をノックインした（マウス）
JH	JAK homology domain	JAK ホモロジードメイン
LSK	Lin^{-} $Sca\text{-}1^{+}$ $c\text{-}Kit^{+}$	—
MAPK	mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ
MF	myelofibrosis	骨髄線維症
MPN	myeloproliferative neoplasms	骨髄増殖性腫瘍
MUT JAK2	mutated JAK2	変異型 JAK2
NHDF	normal human dermal fibroblast	ヒト正常皮膚線維芽細胞
PB	peripheral blood	末梢血
pERK1/2	phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2	リン酸化細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2
pJAK	phosphorylated JAK	リン酸化 JAK
PO	per os	経口投与
P-STAT、pSTAT	phosphorylated STAT	リン酸化 STAT
PV	polycythemia vera	真性多血症
$RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ mice	recombination activating gene 2 and common gamma chain double knock-out immunocompromised mice	組換え活性化遺伝子 2 及び共通 γ 鎖をダブルノックアウトした免疫不全マウス
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
SD	standard deviation	標準偏差
STAT	signal transducers and activator of transcription	シグナル伝達性転写因子
THTr	thiamine transporter	チアミントランスポーター
TYK2	tyrosine kinase 2	チロシンキナーゼ 2
WT	wild type	野生型

1 まとめ

真性多血症（PV）、本態性血小板血症及び骨髄線維症（MF）は、造血幹細胞（HSC）の腫瘍化によって生じる骨髄増殖性腫瘍（MPN）であり、骨髄系細胞（顆粒球、赤芽球及び骨髄巨核球）の著しい増殖を特徴とする[1]。これら各疾患では、本来はサイトカイン刺激に応じて一時的に生じる細胞の増殖や抗アポトーシス遺伝子の誘導などが、サイトカイン非依存性、かつ恒常的に生じている[2]。ヤヌスキナーゼ（JAK）ファミリーは非受容体型のチロシンキナーゼで、造血刺激に重要な役割を果たすサイトカインがエリスロポエチン受容体やトロンボポエチン受容体等の受容体に結合した際の細胞内へのシグナル伝達を担う[3]。JAK ファミリーには JAK1、JAK2、JAK3 及びチロシンキナーゼ 2（TYK2）の 4 種類が存在する[3]が、特に JAK2 の恒常的活性化を起こす変異が MF に関連することが知られている[2]。例えば、MF 患者の 35～50%は、シュードキナーゼドメインに位置する 617 番アミノ酸残基のバリンがフェニルアラニンへ変異する活性化変異を有する JAK2（$JAK2^{V617F}$）を発現しており、この変異が MF や他の MPN の病因に密接に関与していると考えられている[4,5]。また、$JAK2^{V617F}$ 以外にも $JAK2^{T875N}$[6]、JAK2 エクソン 12 の変異[7]、トロンボポエチン受容体の変異（MPL^{W515L}及びMPL^{W515K}）[8]などがあり、これらの変異も JAK2 を恒常的に活性化させることが報告されている。JAK2 が活性化されると細胞内シグナル伝達経路であるシグナル伝達性転写因子（STAT）タンパク質のリン酸化及び核内移行が生じ、細胞増殖や機能亢進などが誘導される[2]。このように、JAK2 シグナル伝達経路の異常な活性化は MPN と関連していることから、JAK2 の選択的阻害薬は MPN に対する治療効果を発揮することが期待される。実際に、JAK2 阻害作用を持つルキソリチニブが MF 及び PV に対する治療薬として本邦において承認されている。

フェドラチニブ（別名、TG101348）は、野生型及び活性化変異型 JAK2 に対する阻害活性を有する経口投与可能な低分子化合物で、MF 治療薬として開発された。フェドラチニブは他の JAK ファミリーと比較して JAK2 に対して高い選択性を示す。また、活性化変異型 JAK2 を発現する細胞モデル（MPN 患者由来細胞を含む）を用いた評価系において、フェドラチニブは STAT3 及び STAT5 のリン酸化並びに細胞増殖を抑制し、アポトーシス性細胞死を誘導した。さらに、フェドラチニブは $JAK2^{V617F}$ 誘発性骨髄増殖性腫瘍モデルマウスにおいて生存期間延長作用を示し、白血球数増多、ヘマトクリット値上昇、脾腫及び線維化などの MPN 疾患関連症状を改善した。安全性薬理試験においてはフェドラチニブの安全性上の懸念となる所見は認められなかった。

2 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 試験

2.1.1 キナーゼ阻害作用

［試験番号 PH-[redacted]-101348-019（M4.2.1.1-1）、ONVT0048（M4.2.1.1-2）及び PH-[redacted]-101348-041（M4.2.1.1-3）］

各種キナーゼに対するフェドラチニブの阻害能を、223 種類のキナーゼからなる評価パネルを用いて評価した（試験番号 PH-[redacted]-101348-019）。まず、フェドラチニブの被験濃度を 0.5 μM に設定し、各キナーゼに対する阻害率を測定した。その結果、37 種のキナーゼに対して 50%超の阻害作用が認められた。さらに、一連の濃度のフェドラチニブを用いてこれら 37 種のキナーゼに対する阻害作用の濃度反応曲線を作成し、各キナーゼに対する 50%阻害濃度（IC50 値）を算出した。その結果、37 種のうち 4 種のヒトキナーゼ［JAK2 及び FMS 様チロシンキナーゼ 3（FLT3）］に対する IC50 値が 25 nM 未満であることが判明し、フェドラチニブは野生型及び変異型（$JAK2^{V617F}$）のヒト JAK2 を同程度の作用強度を以て阻害することが示された（Table 2.1.1-1）。なお、日本人 MF 患者にフェドラチニブ 400 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの定常状態における血漿中フェドラチニブ濃度（遊離型）はおよそ 200～360 nM の範囲にあり[a]、この濃度範囲では 90%超の JAK2 阻害効果が得られると考えられる（【M4.2.1.1-1、Table C2】及び【M4.2.1.1-1、Table C3】参照）。また、別途実施した 192 種のキナーゼを用いた試験（試験番号 ONVT0048）では、フェドラチニブ（1 μM）は 6 種のキナーゼ（JAK2、ZIPK、$FGFR1^{V561M}$、NUAK1、$FLT3^{D835Y}$ 及び DAPK1）の活性を 90%以上阻害し、38 種類のキナーゼの活性を 50%以上阻害した。

[a] 日本人 MF 患者にフェドラチニブ 400 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの血漿中フェドラチニブ濃度は幾何平均値として 1418 ng/mL から 2417 ng/mL の範囲にある（【M2.7.2、2.2.5.7.2 項】参照）ことから、ヒト血漿タンパク結合率：92.1%（【M2.6.4、4.1 項】参照）及び分子量（遊離塩基）：524.68 を用いて定常状態における血漿中フェドラチニブ濃度（遊離型）範囲を nM 単位で算出した。

Table 2.1.1-1: フェドラチニブのキナーゼ阻害作用（50%阻害濃度が 25 nM 未満）

Kinase	IC50 (nM)
Human JAK2 JH1 JH2^{V617F}	3
Human JAK2 JH1 JH2	3
Human JAK2 JH1	12
Human FLT3	15

n = 2
FLT3 = FMS-like tyrosine kinase 3; IC50 = half-maximal inhibitory concentration; JAK2 = Janus kinase 2; JH = JAK homology domain
The Select Screen™ Kinase Profiling Service from Invitrogen Corporation (Madison, WI) consists of a diverse panel of individual kinase assays used.
Source: M4.2.1.1-1 (modified)

JAK ファミリーのみを対象としたスクリーニング試験（試験番号 PH-[redacted]-101348-041）において、フェドラチニブは JAK2、JAK1、JAK3 及び TYK2 を阻害した。IC50 値はそれぞれ 1.26 nM［10 μM アデノシン三リン酸（ATP）存在下］、45.5 nM（同 10 μM）、95.6 nM（同 5 μM）及び 171 nM（同 25 μM）であり、フェドラチニブの阻害作用は JAK2 に選択的であることが示された（JAK1、JAK3 及び TYK2 に対する IC50 値は JAK2 に対する IC50 値よりもそれぞれ 36 倍、76 倍及び 136 倍高値であった）。さらに、別のスクリーニング試験（試験番号 ONVT0048）では、フェドラチニブの JAK2（野生型）、JAK2^{V617F}、JAK1、JAK3 及び TYK2 キナーゼに対する IC50 値はそれぞれ 2.4 nM（50 μM ATP 存在下）、2.3 nM（同 80 μM）、13 nM（同 140 μM）、91 nM（同 10 μM）及び 169 nM（同 50 μM）であった。JAK2^{V617F}、JAK1、JAK3 及び TYK2 に対する IC50 値は JAK2（野生型）に対する IC50 値よりもそれぞれ 1 倍、6 倍、38 倍及び 71 倍高値であり、本試験でもフェドラチニブは JAK2 選択的であることが示された。なお、上記 2 試験において得られた IC50 値に差異が認められたのは、試験法及び実験条件が必ずしも同一ではなかったためと考えられる。

2.1.2 細胞に対する作用

2.1.2.1 JAK ファミリーを強制発現させた細胞における酵素阻害作用及び細胞増殖抑制作用

［試験番号 ONVT0063（M4.2.1.1-4）］

リガンド非依存的に STAT3 をリン酸化し、細胞増殖を惹起することができるようになった恒常的活性化型 JAK1、JAK2、JAK3 又は TYK2 を強制発現させたマウス pro-B 細胞株（Ba/F3 細胞）を用いて、フェドラチニブの酵素選択性及び細胞増殖に対する影響を評価した（試験番号 ONVT0063）。酵素阻害作用を検討する目的で、各細胞をフェドラチニブで処置した 4 時間後に STAT3 の Tyr705 のリン酸化を MSD phospho-STAT3 (Tyr705) assay whole cell lysate kit を用いて測定した（n = 3）。また、各細胞の生細胞数をフェドラチニブ 72 時間処置後に CellTiter-Glo 法により測定した細胞内 ATP 含量

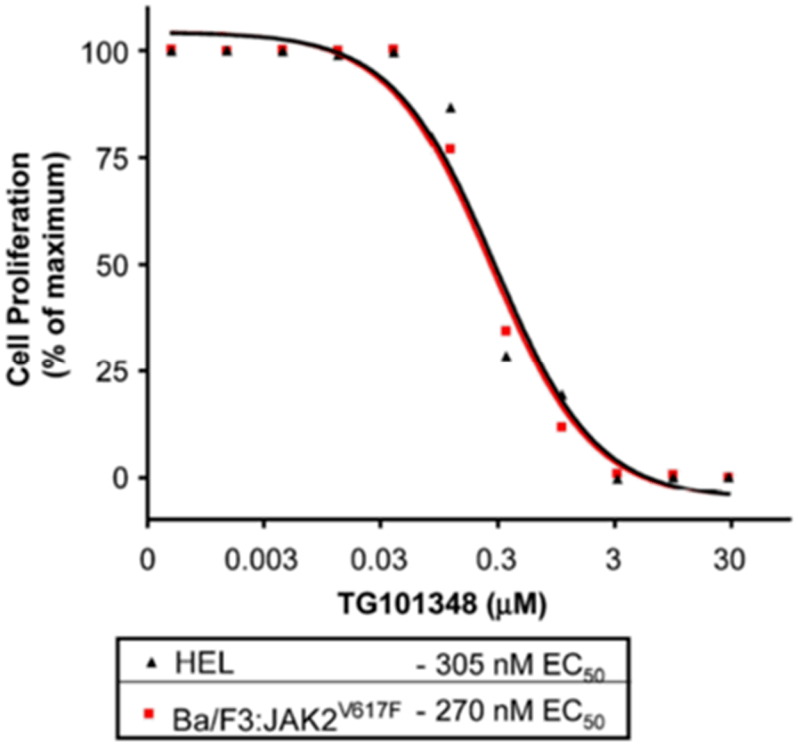
を基に算出し、細胞増殖抑制作用を検討した（n = 3）。その結果、JAK2 強制発現細胞において、最高被験濃度（1.1 μM）のフェドラチニブは STAT3 リン酸化を 71%阻害し、同細胞の増殖を 94%阻害した。一方、JAK1、JAK3 及び TYK2 強制発現細胞においては、同濃度のフェドラチニブの STAT3 リン酸化阻害作用はそれぞれ 13%、5%及び 1%、細胞増殖抑制作用はそれぞれ 14%、33%及び 5%であった。なお、フェドラチニブの細胞増殖抑制作用の IC50 値は JAK2 強制発現細胞では 0.36 μM であったが、JAK1、JAK3 及び TYK2 を強制発現させた細胞ではすべて 1.1 μM を上回った。

2.1.2.2 $JAK2^{V617F}$ 発現細胞における酵素阻害作用及び細胞増殖抑制作用

［試験番号 PH-[redacted]-101348-027（M4.2.1.1-5）及び ONVT0049（M4.2.1.1-6）］

$JAK2^{V617F}$ 発現細胞［$JAK2^{V617F}$ を内因性に発現するヒト赤白血病細胞株（HEL 細胞）及びヒト $JAK2^{V617F}$ を遺伝子導入により強制発現させたマウス pro-B 細胞株（Ba/F3:$JAK2^{V617F}$ 細胞）］に対するフェドラチニブの活性を、XTT 細胞増殖アッセイ法を用いて検討した（試験番号 PH-[redacted]-101348-027）。その結果、フェドラチニブは HEL 細胞及び Ba/F3:$JAK2^{V617F}$ 細胞の増殖を抑制し、両細胞に対する 50%有効濃度（EC50 値）はいずれも約 0.3 μM であった（Figure 2.1.2-1）。別の試験でも、$JAK2^{V617F}$ を内因性に発現する 3 種の血液疾患患者由来細胞株（SET-2 細胞、UKE-1 細胞及び HEL 細胞）に対するフェドラチニブの細胞増殖抑制作用を CellTiter-Glo®（細胞内 ATP アッセイ、Promega 社）を用いて評価した（試験番号 ONVT0049）。その結果、SET-2 細胞、UKE-1 細胞及び HEL 細胞に対するフェドラチニブの細胞増殖抑制作用の EC50 値は、それぞれ 0.269、0.538 及び 0.940 μM と算出され、先の試験と同程度の作用強度であった。

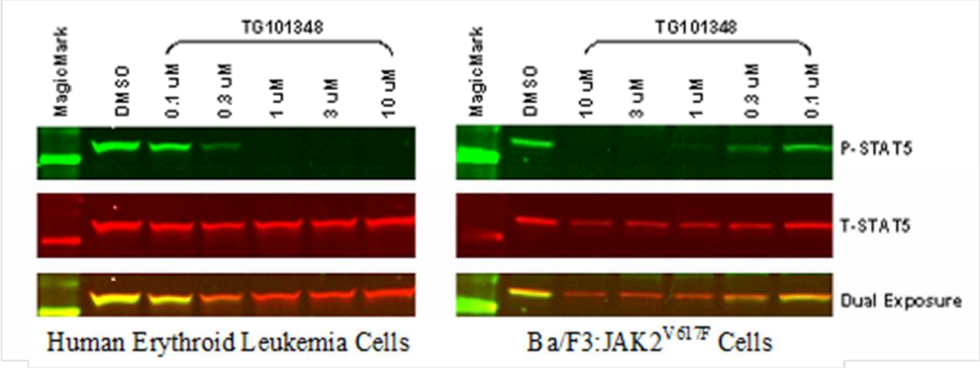
Figure 2.1.2-1　　JAK2^{V617F} 発現細胞に対するフェドラチニブの細胞増殖抑制作用



n = 3
EC50 = half-maximal effective concentration
To demonstrate the ability of fedratinib to inhibit JAK2^{V617F}-driven proliferation, XTT colorimetric cell proliferation assays were performed.
Source: M4.2.1.1-5

さらに、フェドラチニブによる JAK2^{V617F} 発現細胞の増殖抑制が JAK2 シグナル伝達の阻害と関連するか否かを検討するため、先と同じ HEL 細胞及び Ba/F3:JAK2^{V617F} 細胞における JAK2 基質である STAT5 のリン酸化状態をウエスタンブロッティングアッセイにより評価した（試験番号 PH-[redacted]-101348-027）。細胞を一連の濃度（0.1～10 µM）のフェドラチニブで 4 時間処置した後、細胞を溶解し、各種抗体を用いてリン酸化及び全 STAT5 を検出した。その結果、フェドラチニブ濃度依存的な STAT5 リン酸化の阻害が両細胞において認められた（Figure 2.1.2-2）。また、両細胞においてフェドラチニブは 0.3 µM の濃度で STAT5 リン酸化を中程度阻害したが、本結果は細胞増殖抑制作用の EC50 値が約 0.3 µM となった先の試験結果（Figure 2.1.2-1）と一致するものであった。以上のことから、JAK2^{V617F} を発現する細胞において、フェドラチニブは JAK2 の下流に位置する STAT5 の活性化を阻害することで細胞増殖を阻害することが示唆された。

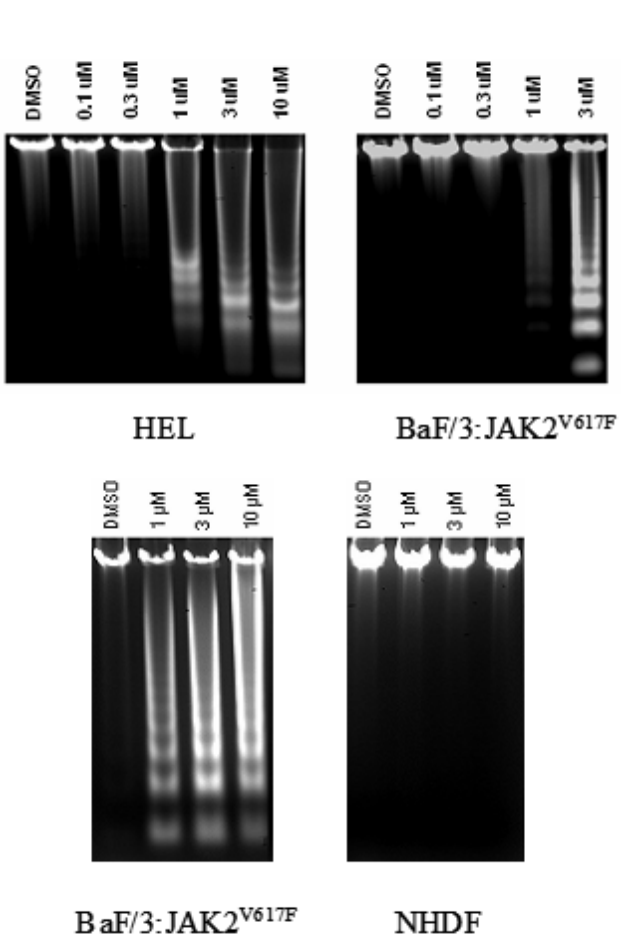
Figure 2.1.2-2 **JAK2^{V617F} 発現細胞におけるフェドラチニブのシグナル伝達性転写因子 5 リン酸化に対する阻害作用**



P-STAT5 = phosphorylated-signal transducer and activator of transcription 5; T-STAT5 = total STAT5
A human erythroid leukemia cell line with JAK2^{V617F} mutation and a mouse pro-B cell line that exogenously expresses human JAK2^{V617F} (Ba/F3:JAK2^{V617F}) were treated with fedratinib for 4 hours and STAT5 phosphorylation in the cells were evaluated using western blot analysis with anti-P-STAT5 antibody. Blots were scanned to detect total (red) and phospho-STAT5 (green) proteins.
Source: M4.2.1.1-5 (modified)

次に、フェドラチニブが HEL 細胞及び Ba/F3:JAK2^{V617F} 細胞のアポトーシスを誘導するか否かを検討する目的で、アポトーシスの特徴として知られる DNA 断片化を検出する DNA ラダーアッセイを実施した（試験番号 PH-[redacted]-101348-027）。本試験では、JAK2^{V617F} を発現していないヒト正常皮膚線維芽細胞（NHDF）を陰性対照細胞として用いた。各細胞をフェドラチニブで 24 時間処置した後、各細胞から分離したゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動に供した。その結果、1 及び 3 μM のフェドラチニブで処置した HEL 細胞及び Ba/F3:JAK2^{V617F} 細胞の両方で DNA 断片化が検出されたが、NHDF では、10 μM のフェドラチニブであっても DNA 断片化は観察されなかった（Figure 2.1.2-3）。以上のことから、フェドラチニブはヒト JAK2^{V617F} を発現するマウス及びヒト細胞に対するアポトーシス誘導作用を示すことが示された。

Figure 2.1.2-3　　JAK2^{V617F} 発現細胞に対するフェドラチニブのアポトーシス誘導作用



NHDF = normal human dermal fibroblast (control cells)
Source: M4.2.1.1-5 (modified)

2.1.2.3　　JAK2^{V617F} 発現造血系細胞に対するフェドラチニブの影響

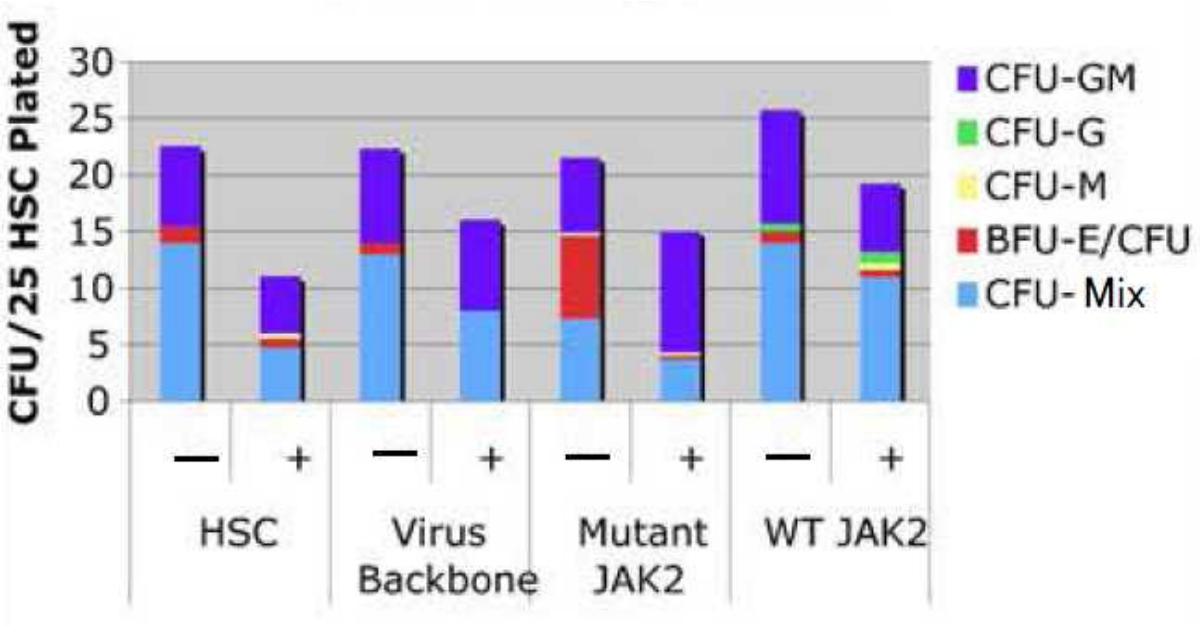
［試験番号 PH-[redacted]-101348-076（M4.2.1.1-7）］

先に述べたように、HSC が腫瘍化した PV に特徴的な病態として JAK2^{V617F} による赤血球の顕著な増加がある。PV 細胞の赤血球分化能に対するフェドラチニブの影響を評価する目的で、JAK2^{V617F} 陽性 PV 患者由来の各種造血系細胞［HSC（CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}Lin^{-}）、造血前駆細胞（CD34^{+}CD38^{+}Lin^{-}）及び骨髄系共通前駆細胞（CD34^{+}CD38^{+}CD123^{+}CD45RA^{-}Lin^{-}）］を単離し、ヒトサイトカイン添加メチルセルロース培地にてフェドラチニブ処置［0（溶媒 DMSO）、30～600 nM］を行った[9]（試験番号 PH-[redacted]-101348-076）。フェドラチニブ処置 14 日目に分化成熟度別のコロニー数計測を顕微鏡像のソフトウェア解析にて行った。その結果、フェドラチニブは検討したすべての細胞種の赤血球コロニー形成を濃度依存的に阻害し、そのときの IC50 値は総じて 300 nM 以下であった。また、その後

に実施したコロニーの遺伝子型解析において、フェドラチニブ処置後に生存していた HSC コロニーでは $JAK2^{V617F}$ アレルの検出率が 20%以下にまで低減されたことから（フェドラチニブ非処置 HSC コロニーでは同検出率は 90%以上）、フェドラチニブは $JAK2^{V617F}$ 発現細胞を標的とすることが示唆された。

上記の結果を再確認する目的で、$JAK2^{V617F}$ を遺伝子導入したヒト正常臍帯血幹細胞を用いて同様の試験を実施した（試験番号 PH-[redacted]-101348-076）。対照となるバックボーンベクターで処理した幹細胞と比較して、$JAK2^{V617F}$ 遺伝子導入した幹細胞では赤血球コロニー数［赤芽球バースト形成細胞（BFU-E）あるいは赤芽球コロニー形成細胞（CFU-E）］が増加したが、フェドラチニブ（300 nM）処置により赤血球コロニーはほぼ認められなくなった（Figure 2.1.2-4）。したがって、本試験でもフェドラチニブは $JAK2^{V617F}$ 発現細胞を標的とすることが示唆された。

Figure 2.1.2-4 **ヒト臍帯血幹細胞の $JAK2^{V617F}$ 遺伝子導入による赤血球分化能亢進に対するフェドラチニブの阻害作用**



n = 4
BFU-E/CFU-E = burst-forming unit erythroid or colony forming unit-erythroid; CFU-G = colony forming unit-granulocyte; CFU-GM = colony forming unit-granulocyte macrophage; CFU-M = colony forming unit-macrophage; CFU-Mix = mixed colony forming unit; HSC = hematopoietic stem cells; WT = wild type
Human cord blood HSC transduced with lentiviral backbone, $JAK2^{V617F}$, or $JAK2^{wt}$ vectors were treated with (+) or without (-) 300 nM of fedratinib and colonies were scored on Day 14. Untransduced HSC served as a control.
Source: M4.2.1.1-7 (modified)

2.1.3 JAK2^{V617F}発現細胞に対するフェドラチニブ代謝物の作用

［試験番号 ONVT0048（M4.2.1.1-2）及び ONVT0049（M4.2.1.1-6）］

フェドラチニブをヒト肝ミクロソームで処理すると 4 種の代謝物が検出され、そのうち構造式が確認された 3 種を SAR317753、SAR317793 及び SAR317981 と命名した（【M2.6.4、5.1 項】参照）。本試験ではこれらの代謝物の JAK2 に対する in vitro 阻害作用（IC50 値で評価、n＝3）を検討した（試験番号 ONVT0048）。その結果、SAR317753（50 μM ATP 存在下での IC50 値は 3.8 nM）及び SAR317981（同 3.5 nM）は未変化体（＝フェドラチニブ）（同 2.4 nM）と同程度の作用強度であったが、SAR317793（同 46 nM）は未変化体よりも 10 倍以上弱かった。また、SAR317753 及び SAR317981 の標的選択性を 192 種類のキナーゼパネルを用いて検討したところ、これら代謝物の JAK2 に対する選択性はフェドラチニブのそれと同程度であった。

SET-2 細胞、UKE-1 細胞及び HEL 細胞の増殖能に対するフェドラチニブ及びその代謝物の影響を検討した（試験番号 ONVT0049）。その結果、これらの細胞に対する代謝物の細胞増殖抑制作用は未変化体のそれと比較して弱く、SAR317753 及び SAR317793 の活性は未変化体の約 1/10 未満であり、最も活性の高かった SAR317981 の活性は未変化体の約 1/2 であった。（Table 2.1.3-1）。ヒト全身循環血中の主要成分は未変化体［時間 0 から投与 24 時間後までの濃度時間曲線下面積（AUC(0-24h)は血漿中総放射能の約 80%）］であり、血漿中に総薬物関連曝露量の 10%を超える代謝物はないことから（【M2.6.4、5.3 項】参照）、上記の代謝物は臨床的に意義のある薬理活性を発揮しないと予想される。

Table 2.1.3-1: 各種血液疾患患者由来 JAK2^{V617F}発現細胞株におけるフェドラチニブ及びその代謝物の細胞増殖抑制作用

Cells	IC50 (μM)			
	Fedratinib	**SAR317753**	**SAR317793**	**SAR317981**
SET-2	0.269	8.54	3.35	0.569
UKE-1	0.538	> 10*	4.26	1.71
HEL	0.940	> 10*	4.28	1.43

n = 3
Plates were incubated at 37°C, for 72 hours after which, a mix of lysing reagent and luciferase/luciferin were added to each well and incubated for 10 minutes at room temperature. The luminescence emitted was measured.
*: A value of > 10 μM was assigned when IC50 values were larger than the highest concentration (10 μM) tested.
Source: M4.2.1.1-6 (modified)

2.1.4 薬物耐性 JAK2 に関する評価

2.1.4.1 ルキソリチニブ耐性 JAK2 に対するフェドラチニブの作用

臨床において観察される ATP 競合型キナーゼ阻害薬に対する耐性機序として、ミスセンス変異が一般的によく知られている。近年、新規薬剤に対する臨床的耐性を予測するのに有用な様々な in vitro 試験系でこれらの変異を再現することが可能となっており、実際に各種 JAK2 阻害薬に対する耐性を in vitro で評価した論文も公表されている[10,11]。特に、複数の変異型 JAK2（例えば Y931C、G935R、R938L、I960V 及び E985K）が ATP 競合型 JAK キナーゼ阻害薬であるルキソリチニブに対する耐性を示すこと、すなわち、これらの変異によってルキソリチニブの JAK2 に対する IC50 値が 9～33 倍増加することが報告されている[10]。一方、同文献[10]ではこれらの変異型 JAK2 に対するフェドラチニブの阻害作用についても報告しており、その IC50 値の増加は 2～3 倍の増加にとどまっている。さらに、ゲートキーパー変異（M929I）はルキソリチニブに耐性を示すが（IC50 値が 4.3 倍増加）、フェドラチニブの作用には影響を及ぼさない。また、別の報告[12]では、フェドラチニブがルキソリチニブ、AZD1480、CYT-387 及び lestaurtinib といった他の JAK 阻害薬に対して耐性を示す複数の変異型 JAK2 に対しても、強力な阻害活性を示すことを明らかにしている。これらの知見は、臨床においてルキソリチニブ抵抗性又は不応性患者に対してもフェドラチニブの有効性が認められる[13]根拠の一つと考えられる。フェドラチニブは JAK2 の基質結合部位と ATP 結合部位の両部位に結合することができ、さらに基質結合部位に対する結合親和性は ATP 結合部位に対する結合親和性に比して強いことが示されている[12]。JAK2 の ATP 結合部位におけるミスセンス変異は ATP 競合型 JAK キナーゼ阻害薬に対する耐性を発現することから、このフェドラチニブの JAK2 結合の特徴がルキソリチニブに対する優位性に繋がると期待される。

2.1.4.2 フェドラチニブ耐性誘導 $JAK2^{V617F}$ 発現細胞を用いた in vitro 評価

［試験番号 ONVT0064（M4.2.1.1-8）］

フェドラチニブに対する耐性獲得機序を探索する目的で、$JAK2^{V617F}$ を発現する HEL 細胞及び SET-2 細胞の耐性獲得モデルを用いて検討した（試験番号 ONVT0064）。ここでは、フェドラチニブによる選択圧及び化学変異原（N-エチル-N-ニトロソウレア）処置といった 2 種類の in vitro 耐性獲得法を用い、最長 8 週間のフェドラチニブ処置で細胞増殖抑制作用（IC50 値）の約 2～10 倍に相当する濃度のフェドラチニブに対して耐性を示す HEL 及び SET-2 クローン細胞を誘導（選択圧法）又は選択（化学変異原法）した。

HEL 細胞をフェドラチニブで 8 週間処置したところ、フェドラチニブの濃度 4 μM 及び 10 μM では選択圧法及び化学変異原法のいずれでも耐性クローンは得られなかったが、同 2 μM（選択圧法及び化学変異原法）及び 3 μM（化学変異原法）では耐性クローンを獲得できた。一方、SET-2 細胞をフェドラチニブで 8 週間処置した場合、化学変異原法では同 0.5 μM でのみ耐性クローンが出現したが、

選択圧法では同 0.5 μM、1 μM 及び 2 μM で耐性クローンが出現した。これらの HEL 細胞及び SET-2 細胞の耐性クローンにおける JAK2 cDNA 配列を解析したところ、ミスセンス変異は認められなかった。

次に、上記で得られた SET-2 細胞耐性クローン 4 種を用いて MTT 細胞増殖試験（n = 3）を行い、フェドラチニブに対する反応を検討した（試験番号 ONVT0064）。SET-2 親細胞（細胞増殖に対するフェドラチニブの IC50 値：0.21 μM）に比べてフェドラチニブに対する感受性は総じて約 1/10 以下に低下していた（それぞれの耐性クローン 4 種に対する同 IC50 値：3.32 μM、3.26 μM、2.85 μM 及び 2.84 μM）。また、これらの耐性クローン 4 種での JAK1/2 及び STAT3/5 タンパク質の発現量とその活性化状態も評価したところ、SET-2 親細胞と比較して JAK/STAT 及び分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ（MAPK）のシグナル伝達レベルが増強、すなわち、リン酸化 STAT（pSTAT）3、pSTAT5、リン酸化 JAK（pJAK）1、pJAK2 及びリン酸化細胞外シグナル制御キナーゼ（pERK）1/2 の量が高いことが示された。なお、各マーカーの総タンパク質量には変化はなかった。さらに、これらの耐性クローンで増強されていた JAK/STAT 及び MAPK のシグナル伝達は、上記の細胞増殖に対する IC50 値と同レベル（1 μM 及び 10 μM）のフェドラチニブであれば阻害されることが示された。

2.2 In vivo 試験

2.2.1 $JAK2^{V617F}$ 発現骨髄細胞を同所移植した骨髄増殖性腫瘍モデルマウスにおけるフェドラチニブの病態改善効果

［試験番号 PH-[redacted]-101348-068（M4.2.1.1-9）］

In vivo におけるフェドラチニブの有効性を評価する目的で、$JAK2^{V617F}$ を遺伝子導入した同種骨髄細胞の移植により悪性 MPN 様の徴候を示すモデルマウスを用いた評価を実施した[14]（試験番号 PH-[redacted]-101348-068）。本モデルでは、ヘマトクリット値上昇、白血球数増加、脾臓腫大へ至る髄外造血及び骨髄レチクリン線維症などヒト PV の臨床病理学的特徴を再現できる[5]。エコトロピック・マウスレトロウイルスを用いて、初代培養マウス骨髄細胞にマウス $JAK2^{V617F}$ を発現させた。致死線量を照射したマウスに上記細胞を骨髄移植した 26 日後に、末梢血球分画別測定によりすべてのマウスで赤血球数が増加していることを、また、同 27 日後のフェドラチニブ処置開始前には平均ヘマトクリット値が 70%以上に上昇していることを確認した。同 28 日後からマウスにフェドラチニブを経口投与［0（溶媒：0.05% Tween80 含有 0.5%メチルセルロース水溶液）、60 及び 120 mg/kg、1 日 2 回、n = 20］し、赤血球増加症状及び当該症状による血液毒性に対する影響を評価した。なお、マウス赤血球の半減期は約 40～50 日であることから、フェドラチニブの影響を観察しやすくする目的で本薬の投与期間を 42 日間に設定した。その結果、フェドラチニブ投与により投与量依存的な延命効果が認められ、120 mg/kg 投与群では 42 日間投与後における生存率は 100%であった（Figure 2.2.1-1、パ

ネル A）。同様に、42 日間投与後に採取した末梢血では、フェドラチニブ投与による投与量依存的かつ統計学的有意（対照群との比較）な白血球数及びヘマトクリット値の低下が認められた（Table 2.2.1-1）。これらの試験では、フェドラチニブ投与による投与量依存的かつ統計学的有意な脾腫の減少も対照群との比較において認められた。さらに、末梢血、骨髄及び脾臓における $JAK2^{V617F}$ 対立遺伝子の定量的ポリメラーゼ連鎖反応解析では、フェドラチニブ（60 及び 120 mg/kg）投与により脾臓での $JAK2^{V617F}$ の発現頻度が 50%以上減少することが、また、末梢血及び骨髄では 120 mg/kg で同程度の影響が認められたものの、$JAK2^{V617F}$ 遺伝子の完全な消失には至らなかった（Figure 2.2.1-1、パネル B）。

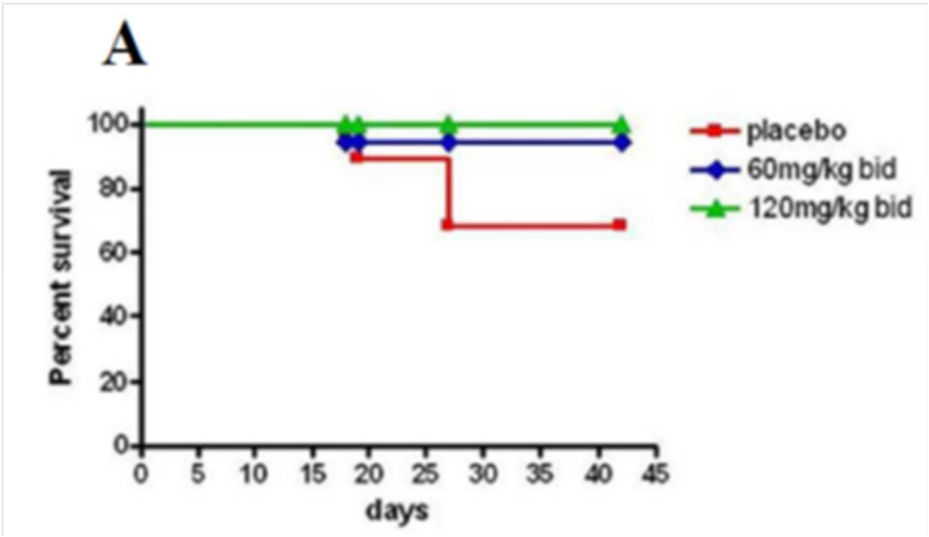
フェドラチニブ投与群では脾臓重量の減少と一致して、脾臓及び肝臓における投与量依存的な髄外造血マーカーの病理組織学的な減少が認められた。レチクリン線維症の重症度に関しては、対照群（3 匹）では 42 日間投与後における重症度スコアは 2+であったが（0～4 の昇順で重症度が高い）、120 mg/kg のフェドラチニブ投与群では 4 匹中 3 匹でレチクリン線維症の徴候は認められなかった。これらの結果は、$JAK2^{V617F}$ 遺伝子導入細胞を移植したマウスに 120 mg/kg のフェドラチニブを投与した群で、骨髄の前期赤血球前駆細胞（CD71 陽性）、脾臓の後期赤血球前駆細胞（Ter119 陽性）及び骨髄と脾臓の骨髄系細胞（Gr1 陽性 Mac1 陽性）の発現頻度が軽度ではあるが統計学的有意［$P < 0.01$、対照群との比較、分散分析（ANOVA）検定］に減少したことと相関している。

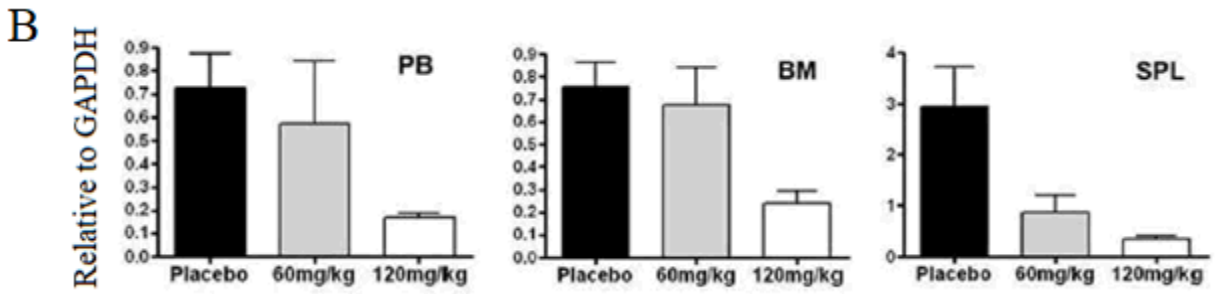
フェドラチニブ投与群の造血細胞画分で ex vivo 機能解析を実施した結果、$JAK2^{V617F}$ 遺伝子導入細胞移植マウスの骨髄で BFU-E が減少していることが明らかとなった。すなわち、フェドラチニブの 42 日間投与後、60 mg/kg 投与群では骨髄 BFU-E は 40%減少し（対照群との比較で $P < 0.01$ で有意差あり、ANOVA 検定）、120 mg/kg 投与群では骨髄及び脾臓 BFU-E は検出されなかった（同 $P < 0.01$）。本 BFU-E の減少は骨髄 CD71 陽性細胞の pSTAT5 の減少と相関していた。

ヒト MPN 細胞に対しても同様の作用をフェドラチニブが及ぼすか否かを検討する目的で、PV 患者由来骨髄前駆細胞を用いてフェドラチニブ存在下及び非存在下でのコロニー形成能を評価した。その結果、フェドラチニブ処置により PV 患者由来検体中のマクロファージコロニー形成細胞（CFU-M）数及び赤血球コロニー形成が濃度依存的に阻害され、また、それに併せてフェドラチニブ（600 nM）処置による pSTAT5 の減少も認められた（同 $P < 0.0001$）。

以上の結果から、フェドラチニブは $JAK2^{V617F}$ 発現赤血球前駆細胞を標的とすること、また、$JAK2^{V617F}$ を発現するマウス及びヒト細胞の両方において STAT5 シグナルを阻害することが示された。

Figure 2.2.1-1 **JAK2^{V617F} 発現造血幹細胞を移植したマウスにおけるフェドラチニブの有効性（生存能に対する影響）及び薬力学的作用**





BM = bone marrow; PB = peripheral blood; SPL = spleen
A: Kaplan-Meier survival plot showing death of 6 JAK2^{V617F}-expressing mice in the control group (n = 20), compared to 1 and 0 death in the 60 mg/kg, per os (PO) (n = 20) and 120 mg/kg, PO (n = 20) twice daily (BID) groups, respectively.
B: Quantitative polymerase chain reaction for JAK2^{V617F} retrovirus in DNA from PB, BM, and SPL of animals treated with placebo or fedratinib (60 and 120 mg/kg BID, PO for 42 days) at study endpoint.
Source: M4.2.1.1-9 (modified)

Table 2.2.1-1: **JAK2^{V617F} 発現造血幹細胞移植マウスにおけるフェドラチニブの薬力学的作用**

Dose of fedratinib (mg/kg)	White blood cell counts (×1000/μL)			Hematocrit values (%)			Spleen weights (g)		
	Mean	SD	P value	Mean	SD	P value	Mean	SD	P value
0 (vehicle)	18.2	7.0	—	86.0	6.1	—	0.503	0.18	—
60	10.4	3.7	0.0017	80.9	11.0	0.0348	0.333	0.09	0.0051
120	5.6	1.5	0.0024	68.1	12.9	< 0.0001	0.124	0.07	0.0008

SD = standard deviation
White blood cell counts, hematocrit values and spleen weights in animals treated with placebo or fedratinib (60 and 120 mg/kg BID, PO for 42 days) were assessed at study endpoints. P values (vs. vehicle control) were derived using analysis of variance (ANOVA) analysis.
Source: M4.2.1.1-9 (modified)

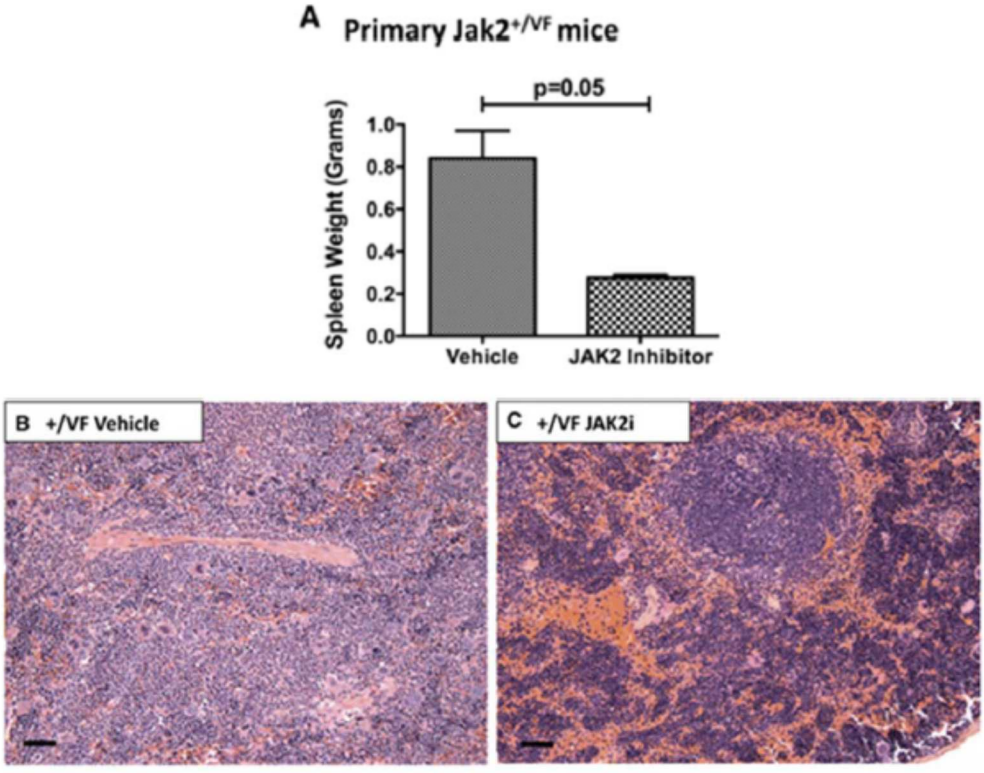
2.2.2 JAK2^{V617F} ノックインした骨髄増殖性疾患モデルマウスにおけるフェドラチニブの病態改善効果

［試験番号 Mullally-2010（M4.2.1.1-10）］

JAK2^{V617F} ノックイン PV モデルマウスを用いて、フェドラチニブの疾患関連病態改善効果を更に検討した（試験番号 Mullally-2010）。JAK2^{V617F} ヘテロ接合生殖細胞系により作製したマウスは、ヒト PV と類似した致死的 MPN を発症し、ヘマトクリット値上昇、脾臓腫大及び脾臓での顕著な髄外造血を示す。また、その遺伝形質浸透性は 100%、生存期間の中央値は 146 日である。

フェドラチニブ投与群（60 mg/kg、1 日 2 回、6 週間反復経口投与）では、対照群と比較して脾臓重量が統計学的有意に減少し（Figure 2.2.2-1、パネル A）、骨髄と脾臓での赤血球過形成に対する改善効果が病理組織学的検査において認められた（Figure 2.2.2-1、パネル B 及び C）。なお、当該ノックインマウスから採取した造血幹細胞を高濃度で含む細胞集団である LSK（Lin$^-$ Sca-1$^+$ c-Kit$^+$）細胞を継代移植し、各代のマウスにフェドラチニブを投与した試験の結果からは、フェドラチニブは骨髄 HSC 系に存在するすべての疾患起源細胞（disease-initiating population）を消失させることはできないと考えられた。

Figure 2.2.2-1　　JAK2^{V617F} ノックインマウスにおけるフェドラチニブの影響



JAK2i = JAK2 inhibitor (i.e. fedratinib), JAK2$^{+/VF}$ = JAK2^{V617F} knock-in
A: n = 3. Primary JAK2$^{+/VF}$ age-matched littermates were treated with vehicle or fedratinib (60 mg/kg BID, PO) for 6 weeks and spleen weights were measured at endpoints of study. Statistical analysis was done using unpaired two-tailed t test. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM).
B and C: Representative histological sections of spleen (hematoxylin and eosin staining) from primary JAK2$^{+/VF}$ mice treated with vehicle or fedratinib (60 mg/kg BID for 6 weeks). Scale bars represent 250 µm.
Source: M4.2.1.1-10

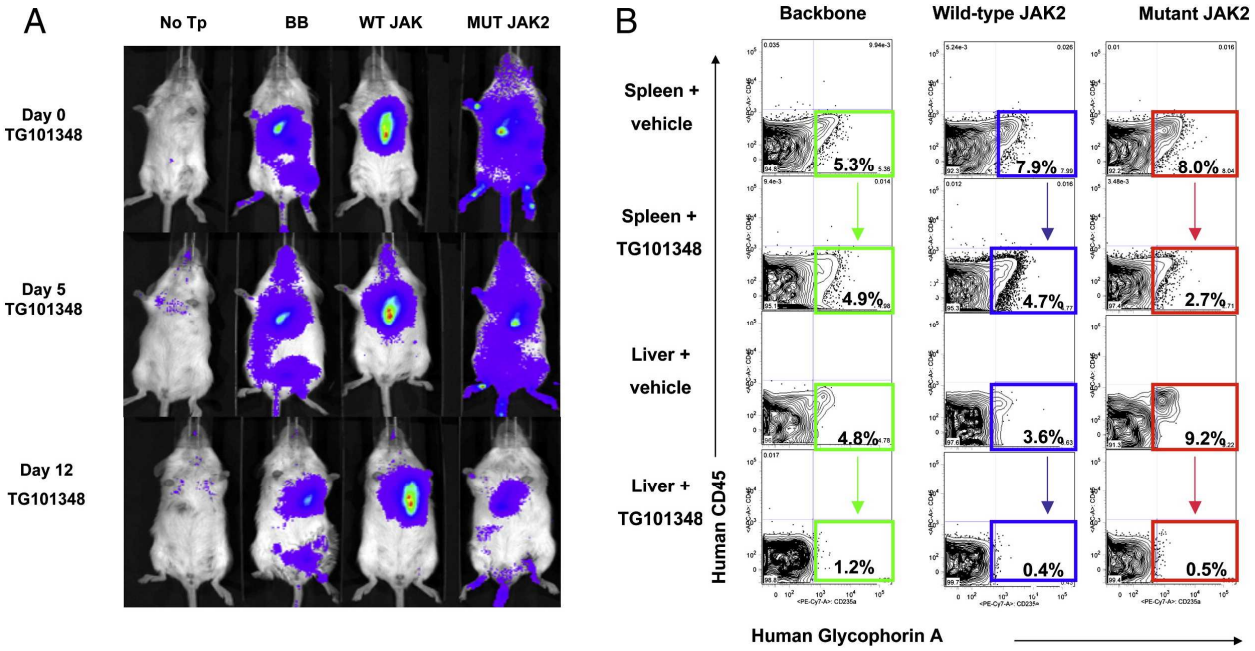
2.2.3　　JAK2^{V617F} 発現赤血球前駆細胞の生着に対するフェドラチニブの阻害作用

［試験番号 PH-[redacted]-101348-081（M4.2.1.1-11）］

JAK2^{V617F} 及び緑色蛍光タンパク質ルシフェラーゼ（GFP-Luc）を遺伝子導入したヒト正常臍帯血細胞を肝内移植した異種移植マウスモデルを用いてフェドラチニブの作用を評価した（試験番号 PH-[redacted]-101348-081）。溶媒（0.05% Tween80 含有 0.5%メチルセルロース水溶液）又はフェドラチニブ（150 mg/kg、1 日 2 回、12 日間）を経口投与したマウスの定量的生物発光画像を、非侵襲的 in vivo イメージングシステムにより投与前（移植 4 週間後）、投与中（Day 5）及び投与後（Day 12）の 3 時点で得た。また、造血組織におけるヒト赤血球前駆細胞の生着を移植後 6 週目にフローサイトメトリー法によっても評価した。フェドラチニブを投与することで JAK2^{V617F} 赤血球前駆細胞の生着が阻害されたが、野生型 JAK2 赤血球前駆細胞の生着への影響は弱かった（Figure 2.2.3-1、パネル A 及び B）。一方、胸腺への CD3 陽性 T 細胞の生着に減少は認められないとする結果も得られているこ

とから（データ示さず）、フェドラチニブは JAK2^{V617F} 変異前駆細胞に由来する骨髄系細胞を標的とする一方で、CD3 及び CD45 陽性 T 細胞は標的としないことが示唆された。

Figure 2.2.3-1　　JAK2^{V617F} を発現する赤血球前駆細胞の生着に対するフェドラチニブの阻害作用



No Tp = Nontransplanted littermates; BB = backbone vector; WT JAK = wild type JAK2; MUT JAK2 = mutated JAK2 (i.e. JAK2^{V617F})
In four experiments, neonatal RAG2$^{-/-}\gamma c^{-/-}$ mice (n = 6) were transplanted intrahepatically with normal cord blood progenitors that were cotransduced with lentiviral luciferase GFP and a lentiviral BB vector, WT JAK2, or MUT JAK2 and treated by twice daily oral gavage for 12 days with vehicle or TG101348 (150 mg/kg). No Tp served as negative controls.
A: Representative bioluminescence images of transplanted mice before (4 weeks posttransplant), during (day 5 TG101348), and after (day 12 TG101348) treatment with vehicle or TG101348.
B: Fluorescence activated cell sorter analysis of human erythroid ($CD45^{-}GlycophorinA^{+}$) engraftment following treatment with vehicle or TG101348.
Source: M4.2.1.1-11

2.2.4　　JAK2^{V617F} 誘発血液疾患の播種性腫瘍モデルマウスにおけるフェドラチニブの作用

［試験番号 PH-[redacted]-101348-065（M4.2.1.1-12）］

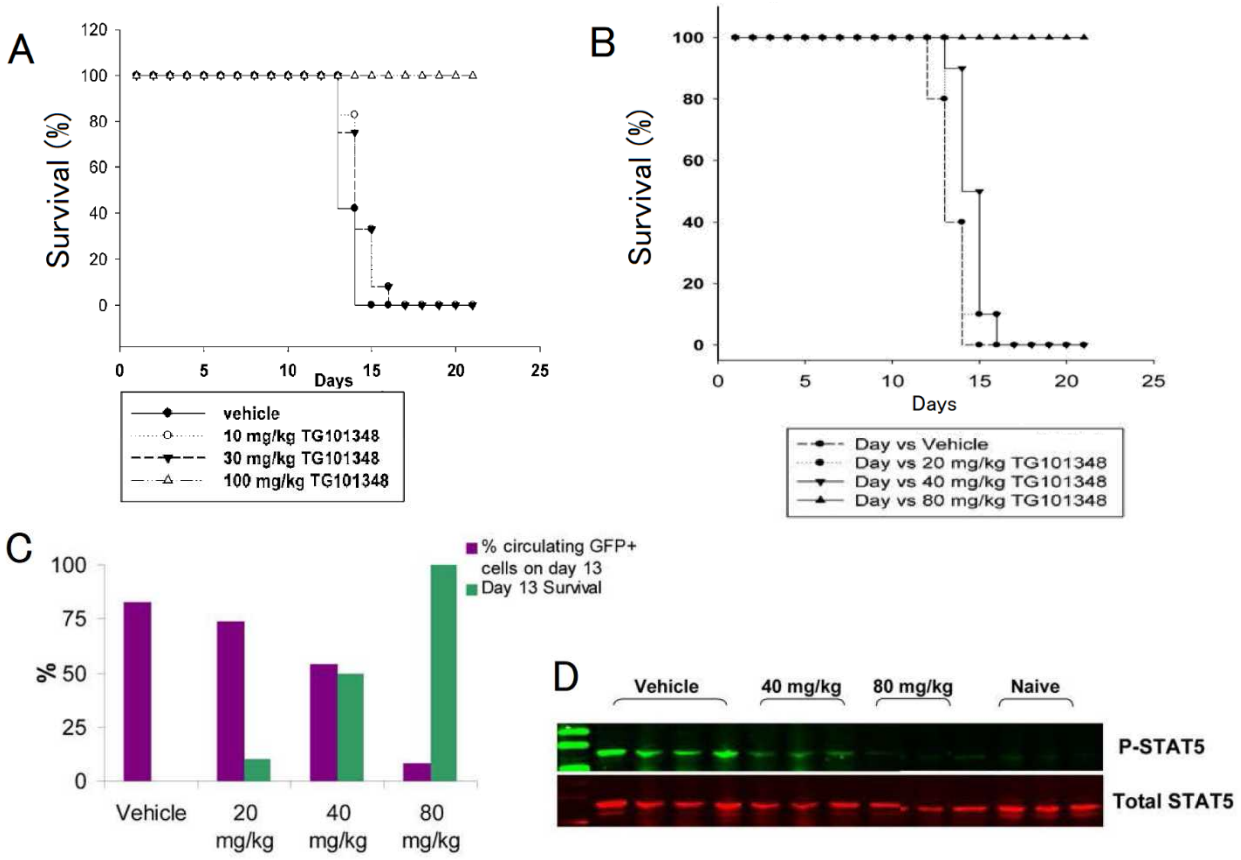
In vivo におけるフェドラチニブの有効性を更に検討する目的で、JAK2^{V617F} 誘発血液疾患モデルマウスを用いた試験を実施した（試験番号 PH-[redacted]-101348-065）。本モデルは重症複合免疫不全［Severe Combined Immunodeficiency（SCID）］マウスに JAK2^{V617F} 及び GFP を発現させた Ba/F3 細胞を静脈内投与することで作製した。2 試験を実施し、両試験ともマウスを 4 群（n = 6）に分けフェドラチニブを強制経口投与した。最初の試験ではフェドラチニブを 0［溶媒（0.05% Tween80 含有 0.5%メチ

ルセルロース水溶液）］、10、30 及び 100 mg/kg の投与量で 1 日 2 回投与し、次の試験ではフェドラチニブを 0（溶媒）、20、40 及び 80 mg/kg の投与量で 1 日 2 回投与した。両試験において Day 0 にマウスに腫瘍細胞を移植し、Day 3～20 にフェドラチニブを投与した。

両試験において、溶媒投与対照群マウスでは、白血球数増加及び脾腫を特徴とする致命的な血液疾患が 12～13 日の潜伏期間を経て全動物で発症し、その後の病勢進行により Day 13 までに全動物が死亡した（Figure 2.2.4-1、パネル A 及び B）。一方、フェドラチニブの各最高投与量（80 又は 100 mg/kg）投与群では、試験終了時点である Day 21 で全動物の生存が確認され、生存期間延長も認められた（8 日間）。40 mg/kg 以下の投与量（10～40 mg/kg）では、対照群と同様の潜伏期間を経て全動物で疾患が発症し、生存期間延長は認められなかった。

最高投与量群では、生存期間の延長とともにフェドラチニブの投与量に依存した循環血中腫瘍細胞量（Day 13）の減少が認められた（Figure 2.2.4-1、パネル C）。また、当該モデルマウスに Day 11 の時点でフェドラチニブ（40 及び 80 mg/kg）を単回投与し、その 5 時間後に得た脾臓腫瘍組織では、pSTAT5 の減少が認められた（Figure 2.2.4-1、パネル D）。

Figure 2.2.4-1 **JAK2^{V617F} 誘発血液疾患の播種性腫瘍モデルマウスにおけるフェドラチニブの作用**



A and B: Kaplan-Meier survival plots of Ba/F3:JAK2^{V617F}–expressing severe combined immunodeficiency mice (n = 6) treated with 0 (vehicle), 20, 40 and 80 mg/kg (panel B) and 0 (vehicle), 10, 30, 100 mg/kg (panel A) fedratinib BID. Fedratinib or vehicle were administered beginning on Day 3 after tumor injection and ended on Day 20. All surviving animals were terminated on Day 21.
C: Percentage of circulating green fluorescent protein (GFP)$^{+}$ cells (quantified using fluorescence activated cell sorter analysis) on Day 13 and survival rate of animals described in Panel B.
D: Western blot: In a parallel cohort, animals were injected with cells and treated as described in Panel B with the exception that disease was allowed to progress untreated for 11 days, at which point they were administered a single dose of fedratinib followed by removal of their enlarged spleen 5 hours later for Western blot analysis.
Source: M4.2.1.1-12

2.2.5 SET-2 細胞異種移植マウスにおけるフェドラチニブの STAT3/5 シグナル伝達阻害に基づく in vivo 増殖抑制作用

［試験番号 ONVV0047（M4.2.1.1-13）、ONVV0057（M4.2.1.1-14）及び ONVV0048（M4.2.1.1-15）］

雌 SCID マウス皮下にヒト SET-2 細胞を異種移植した評価モデルを用いて、フェドラチニブの効果を検討した（試験番号 ONVV0047）。この SET-2 細胞は巨核芽球性白血病に移行した本態性血小板血症の患者の末梢血から確立された細胞株であり、JAK2^{V617F} を発現している。In vivo における標的シ

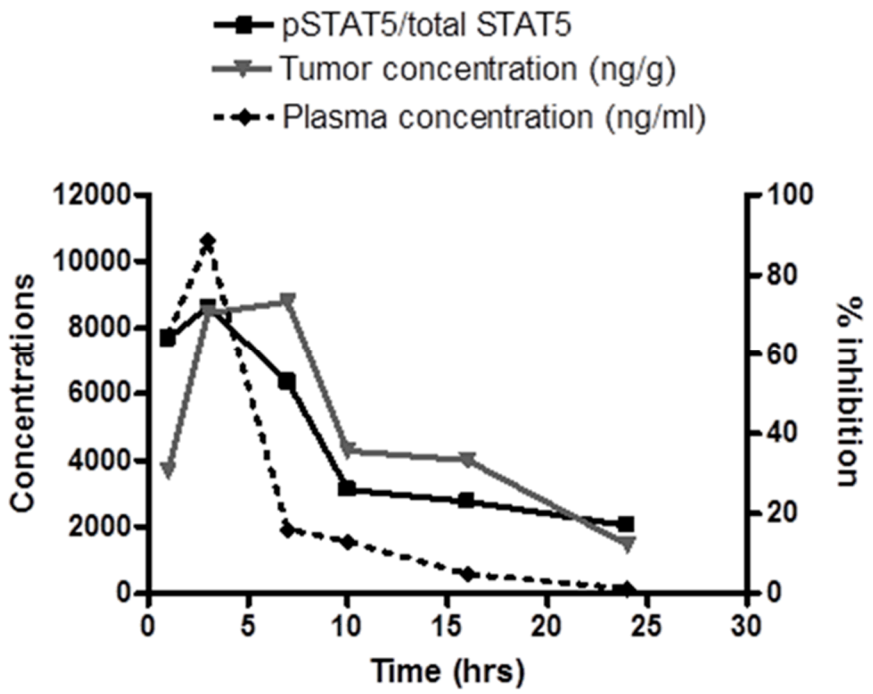
グナル（STAT3及びSTAT5リン酸化）への影響を評価するため、フェドラチニブを0［溶媒（0.05% Tween80含有0.5%メチルセルロース水溶液）、n＝6］及び107.9 mg/kg（n＝3）の投与量で単回経口投与し、投与 1、3、7、10、16 及び 24 時間後に血漿及び腫瘍検体を採取し、各種分析に供した。STAT5 リン酸化阻害はフェドラチニブの投与 3 時間後に最大値（72%）に達し、その時点でのフェドラチニブの血漿中及び腫瘍内の濃度はそれぞれ 10620 ng/mL（20.2 µM）及び 8443 ng/g（16.1 µmol/kg）であった（Figure 2.2.5-1）。STAT5 リン酸化の阻害率は投与 10 時間後までに 26%へと低下した。一方、STAT3 リン酸化阻害についてはフェドラチニブ投与 3～7 時間後はほぼ同レベルで推移し、7 時間後の時点で最大阻害（60%）に達した（データ示さず）。これらの結果は、フェドラチニブが in vivo においても STAT5 及び STAT3 のリン酸化レベルに影響を与えうることを示している。

別の試験では、上記と同じ SET-2 細胞異種移植雌 SCID マウスに溶媒（n＝5）及びフェドラチニブ（60、90 及び 120 mg/kg、n＝3）の投与量で単回経口投与した（試験番号 ONVV0057）。投与 1、3、7、10、16 及び 24 時間後に血漿及び腫瘍組織を採取し、各種分析に供した。血漿中及び腫瘍内のフェドラチニブの曝露量（AUC(0-24h)）は、投与量比例性をわずかに上回る増加を示し、また、腫瘍組織内の方が血漿中よりも曝露量は高く、その比は 3.32～3.91 であった。腫瘍組織における STAT5 リン酸化の阻害は投与量依存的な傾向を示し、フェドラチニブを 60、90 及び 120 mg/kg の投与量で投与した 3 時間後に認められた最大阻害率は、それぞれ 57%、69%及び 72%であった。また、フェドラチニブの投与量に依存した阻害期間の延長が認められ、各投与量における投与 10 時間後の STAT5 リン酸化阻害率はそれぞれ 17%、19%及び 39%であった。フェドラチニブ投与による STAT5 リン酸化阻害作用の推定 EC50 値（血漿中濃度）は各投与量でそれぞれ 3920、2790 及び 3760 ng/mL［平均値は 3490 ng/mL（6.7 µM）］であった。一方、STAT3 リン酸化に対する推定 EC50 値は各投与量でそれぞれ 3220、2000 及び 4460 ng/mL［平均値は 3230 ng/mL（6.2 µM）］であった。なお、マウスにおけるフェドラチニブ（5 µM）の血漿タンパク結合率は 83.3%であることから（【M2.6.4、4.1 項】参照）、これらの推定 EC50 値における非結合型薬物濃度はおよそ 1.0 µM となり、in vitro 試験（2.1.2.1 項及び 2.1.2.2 項）で得られた STAT3 及び 5 のリン酸化に対する阻害作用（IC50 値）と近似した濃度であった。

さらに別の試験では、同じ SET-2 細胞異種移植雌 SCID マウス（n＝8）にフェドラチニブによる投与量依存的な抗腫瘍効果が得られた（試験番号 ONVV0048）。フェドラチニブを各投与量（26.9、53.9、80.9 及び 107.9 mg/kg）で 1 日 2 回、2 週間投与（Day 0 に細胞移植し、Day 37～Day 50 に薬物投与）後の腫瘍体積は溶媒（0.05% Tween80 含有 0.5%メチルセルロース水溶液）対照群に対する割合でそれぞれ 107%、76%、51%及び 16%であった（Figure 2.2.5-2）。なお、80.9 及び 107.9 mg/kg の投与量では、統計学的有意な腫瘍増殖抑制作用が認められた（それぞれの P 値は 0.0474 及び 0.0002、溶媒対照群との比較、Dunnett’s post tests in a two-way repeated measures ANOVA 検定）。107.9 mg/kg 投与群では Day 48 に最大の体重減少（-12.71%）が認められた。薬物動態学的測定から、血漿中及

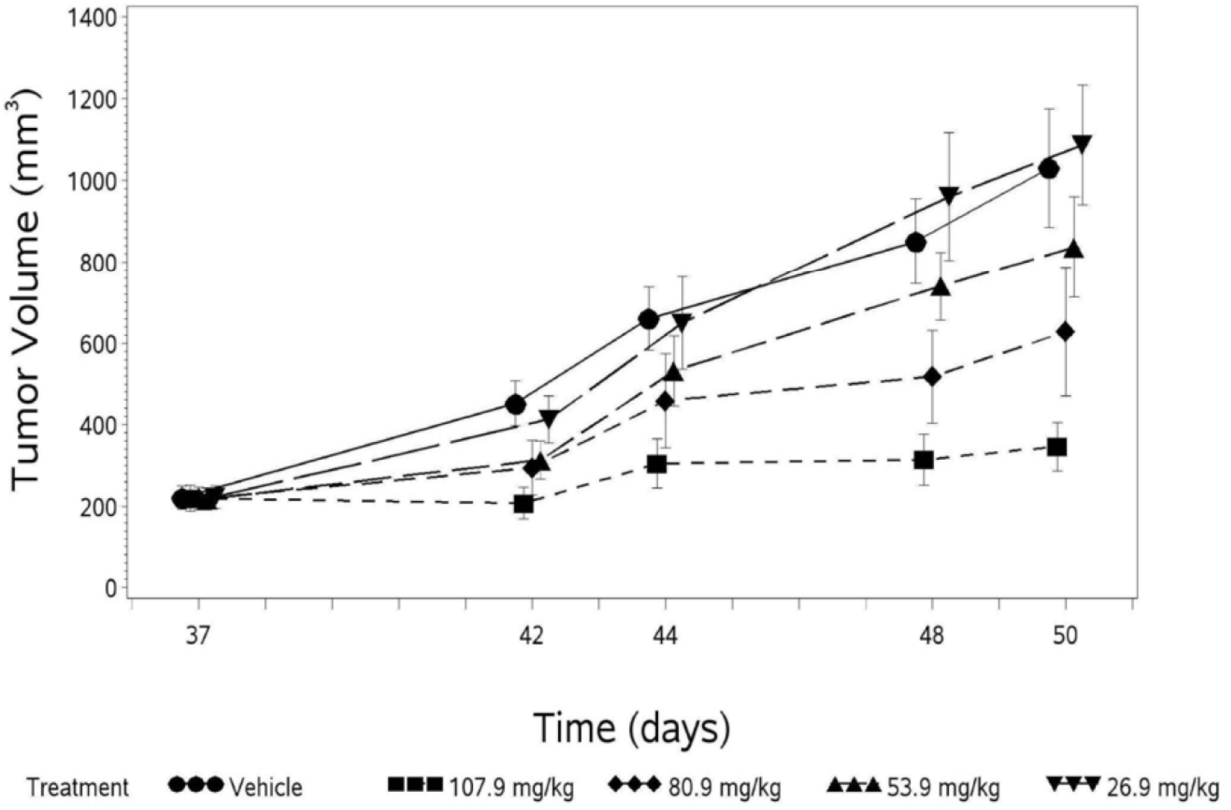
び腫瘍内のフェドラチニブ濃度は投与量に依存して増加し、また、血漿中よりも腫瘍組織中の方が高濃度に達することが認められた。なお、ONVV0057 試験で得られた STAT5 リン酸化阻害に関する推定 EC50 値と比較して、2 週間投与した日（Day 50）の 24 時間後も当該 EC50 値を上回る平均血漿中濃度が達成されたのは 107.9 mg/kg 投与群のみであった。

Figure 2.2.5-1 **SET-2 細胞異種移植マウスにおけるフェドラチニブによるシグナル伝達性転写因子 5 リン酸化に対する阻害作用並びにフェドラチニブの血漿中及び腫瘍内濃度の経時的変化**



Hrs = hours
Tumor and plasma samples were collected at 1, 3, 7, 10, 16, and 24 hours post administration of a single dose of 107.9 mg/kg fedratinib by oral gavage (n = 3). The pSTAT5 levels were measured by phospho-STAT5 assays (Catalog No.: K15163D, Meso Scale Discovery, MD), normalized relative to total STAT5 levels and compared to vehicle. Fedratinib concentrations in plasma and tumor samples were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Data were presented with means.
Source: M4.2.1.1-13

Figure 2.2.5-2 SET-2 細胞異種移植マウスにおけるフェドラチニブによる腫瘍増殖抑制作用



SET-2 tumor bearing SCID mice were randomized into 5 groups (n = 8) for 4 fedratinib-treated groups and a vehicle control group. Fedratinib was administered twice daily by oral gavage at doses of 26.9, 53.9, 80.9, and 107.9 mg/kg BID for 14 consecutive days (37 to 50 days following implantation). Tumor sizes were determined using caliper measurements and presented as mean tumor volume ± SEM. Anti-tumor efficacy was evaluated by comparing mean tumor volume in the treated groups to the vehicle group.
Source: M4.2.1.1-15

3 副次的薬理試験

3.1 標的外タンパク質に対する結合選択性

［試験番号 PH-[redacted]-101348-029（M4.2.1.2-1）及び PH-[redacted]-101348-030（M4.2.1.2-2）］

80 種のタンパク質を対象とした in vitro 結合試験で、フェドラチニブ（1 μM）は、13 種類の受容体及びトランスポーター［ヒトアデノシン A1 及び A2A 受容体、ヒトムスカリン M1、M2、M3、M4 及び M5 受容体、ラットセロトニン 5HT1B 受容体、ラットシグマ（非選択性）受容体、ラット Na チャネル（サイト 2）、ヒトノルエピネフリントランスポーター、ヒトドパミントランスポーター並びにヒトセロトニン 5HT トランスポーター］へのリガンド結合を 50%超阻害した（n = 2）（試験番号 PH-[redacted]-101348-029）。

上記の 13 種の受容体及びトランスポーターにおいて認められたフェドラチニブの IC50 値のうち、100 nM 未満であったのは下記の受容体 2 種とトランスポーター1 種のみであった（n＝2）（試験番号 PH-[redacted]-101348-030）。

ヒトムスカリン M1 受容体：33 nM
ヒトムスカリン M5 受容体：21 nM（アゴニストに対しては 71 nM）
ヒトドパミントランスポーター：36 nM

3.2 ヒトチアミントランスポーターに対する阻害作用（in vitro）

［試験番号 OPT-[redacted]-097（M4.2.1.2-3）］

ヒトチアミントランスポーター（THTr）-1 及び THTr-2 に対するフェドラチニブの阻害能を in vitro 試験で評価した（n＝3）（試験番号 OPT-[redacted]-097）。最高被験濃度 300 μM におけるフェドラチニブの THTr1 及び THTr2 の最大阻害率はそれぞれ 24.5%及び 44.2%であったことから、両トランスポーターに対する IC50 値は 300 μM 超と推定された。また、日本人 MF 患者にフェドラチニブ 400 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの定常状態における最高血漿中フェドラチニブ濃度（遊離型、364 nM）では THTr-1 及び THTr-2 に対する阻害作用は全く示されなかった。

3.3 チアミンの状態（thiamine status）に対するフェドラチニブの影響

［試験番号 Hazell-2017（M4.2.1.2-4）］

ラットを用いた試験においてウェルニッケ脳症を発症又はその予後、チアミン依存性酵素活性、チアミンの状態及びチアミンの取り込みに対するフェドラチニブの影響を検討した（試験番号 Hazell-2017）。チアミン欠乏食を摂餌させた雄 Sprague Dawley ラット（体重 225 g）にピリチアミン臭化水素酸塩（0.5 mg/kg）を連日腹腔内投与することでチアミン欠乏症を誘発した（n＝4～6）。フェドラチニブを MF の治療に用いる用量（400 mg/ヒト/day）に近い投与量（2.27 mg/ラット/day）で正常ラットに 28 日間腹腔内投与したところ、チアミン欠乏を示唆する一般状態の変化は認められなかった。一方、チアミン欠乏ラットにフェドラチニブを投与した場合、フェドラチニブ非投与の同ラットと比較して、疾患の進行に関する神経学的な差異は認められず、フェドラチニブが疾患の進行を悪化させることはなかった。次に、ラットのチアミンの状態に対するフェドラチニブの作用を赤血球トランスケトラーゼアッセイ及びチアミンピロリン酸の作用を用いて検討した。チアミンピロリン酸の有無にかかわらず赤血球トランスケトラーゼ活性はフェドラチニブ投与では変化しなかったことから、チアミンの状態がフェドラチニブ投与によって受ける影響は大きくはないことが示された。さらに、培養ラットアストロサイトをフェドラチニブ｛17 μM［日本人 MF 患者にフェドラチニブ 400 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの定常状態における最高血漿中フェドラチニブ濃度（遊

離型、364 nM）の 47 倍に相当］｝で処置しても当該細胞へのチアミン取り込み量は減少しないことが示された。

3.4 ラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験におけるチアミン輸送に対する影響

［試験番号 01046002（M4.2.1.2-5）］

血漿及び脳へのチアミン輸送に対するフェドラチニブの影響を評価するため、Sprague Dawley ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験を、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した試験（以下、GLP 試験）として実施した（試験番号 01046002）。雌雄 Sprague Dawley ラットにフェドラチニブを 0［溶媒（0.5%メチルセルロース脱イオン水溶液）］、40 及び 80 mg/kg の投与量で 1 日 1 回、28 日間強制経口投与した（n = 20～22 匹/性/群）。なお、ラットを用いて過去に行った 28 日間毒性試験の所見に基づき、最高投与量として 80 mg/kg を選択した。

すべての動物は計画剖検時まで生存した。血漿中又は脳内のチアミン及びリン酸チアミンの濃度はフェドラチニブ投与の 7、14 及び 29 日後においても減少せず、ラットにおける消化管から血漿（血液）及び血漿（血液）から脳内へのチアミン輸送はフェドラチニブによって阻害されないことが示唆された。これは、フェドラチニブはチアミントランスポーターを阻害しないことを示した先の in vitro 試験（試験番号 OPT-[redacted]-097）の結果と一致するものであった。なお、本試験で認められたフェドラチニブの血漿中濃度は、先に実施した 28 日間毒性試験（試験番号 TX-[redacted]-101348-074F）と近似しており、また、40 mg/kg/日投与群の雄及び 80 mg/kg/日投与群の雌雄で体重増加抑制が認められている。

4 安全性薬理試験

医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従った安全性薬理試験を実施した。

4.1 中枢神経系に対する作用

［試験番号 SPH-[redacted]-101348-049（M4.2.1.3-1）］

雄 Sprague Dawley ラットにフェドラチニブ［0、3、10 又は 30 mg/kg（180 mg/m^2）］を単回経口投与し、神経機能に対する影響を評価した（試験番号 SPH-[redacted]-101348-049、GLP 試験）。本試験の最高用量 30 mg/kg は 28 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 TX-[redacted]-101348-074F、【M2.6.6、3.2.1 項】参照）の結果に基づき設定した。その結果、いずれの投与量においても深部体温、体重、中枢神経系（CNS）、自律神経系、感覚運動及び神経筋に対する影響は認められなかった。なお、試験 TX-[redacted]-

101348-074F において、用量 30 mg/kg における初回投与後最高血漿中濃度（Cmax）及び AUC(0-24h) の平均実測値はそれぞれ 153 ng/mL 及び 1450 ng•h/mL であった。

4.2 循環器系に対する作用

4.2.1 In vitro 試験

［試験番号 SPH-[redacted]-101348-031（M4.2.1.3-2）、PAT0257（M4.2.1.3-3）及び SPH-[redacted]-101348-021（M4.2.1.3-4）］

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルに及ぼす影響を 2 試験（非 GLP 試験及び GLP 試験を各 1 試験）で評価した。これらの試験で得られたフェドラチニブの IC50 値は、それぞれ 17.5 μM 及び 2.1 μM であった（試験番号 SPH-[redacted]-101348-031 及び PAT0257）。日本人 MF 患者にフェドラチニブ 400 mg を 1 日 1 回反復経口投与したときの定常状態における最高血漿中フェドラチニブ濃度（遊離型）は 364 nM であり、これらの IC50 値は 5.8～48.1 倍に相当する。

別の in vitro 試験では、心臓の活動電位維持に重要なイオンチャネル 11 種に及ぼすフェドラチニブの影響を検討した（試験番号 SPH-[redacted]-101348-021、非 GLP 試験）。その結果、下記の 6 種類のチャネルに対するフェドラチニブの IC50 値が得られた。

hERG：17.8 μM
hNav1.5：10.8 μM
hkvLQT1/hminK：20.6 μM
hKv4.3：31.2 μM
hCav3.2：8.2 μM
hKir6.2/SUR2A：2.8 μM

一方、本試験で検討した濃度範囲（最高 30 μM まで）では、次の 5 種類のチャネルに対する IC50 値には到達しなかった：hKv1.5、hCav1.2、hKir2.1、hHCN4 及び hKir3.1/3.4。

4.2.2 In vivo 試験

［試験番号 SPH-[redacted]-101348-045（M4.2.1.3-5）］

遠隔測定装置を装着させた雄覚醒ビーグル犬を用いた心血管系及び呼吸器系試験（試験番号 SPH-[redacted]-101348-045、GLP 試験）において、フェドラチニブを 20 mg/kg（400 mg/m^2）までの投与量で経口単回投与したところ、心血行動態［血圧（拡張期、収縮期及び平均動脈圧）及び心拍数］及び心電図波形（PR、QRS、QT 及び QTc）に対する影響は認められなかった。また、呼吸器パラメータ（呼

吸数及び動脈血ガス分圧）も本薬の投与による影響を受けなかった。なお、本試験の用量は 28 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 TX-[redacted]-101348-075F、【M2.6.6、3.3.1 項】参照）の結果に基づき設定した。当該毒性試験において、用量 20 mg/kg における初回投与後 Cmax 及び AUC(0-24h)（推定値）は、それぞれ 355 ng/mL 及び 2461.2 ng•h/mL であった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6 考察及び結論

フェドラチニブは、野生型及び活性化変異型 JAK2 に対して阻害活性を示す経口投与可能な新規キナーゼ阻害薬であり、TYK2 を含む他の JAK ファミリーと比較して JAK2 に対する選択性が高いことが明らかとなった。活性化変異型 JAK2 を発現する MPN 患者由来細胞を含む in vitro 実験モデルにおいて、フェドラチニブはシグナル伝達因子である STAT3 及び STAT5 のリン酸化を抑制し、細胞増殖を阻害し、アポトーシスを誘導した。また、フェドラチニブは $JAK2^{V617F}$ 誘発性 MPN モデルマウスにおいて生存率を向上させ、白血球数及びヘマトクリット値の低下や脾腫及び線維症の抑制といった MPN 疾患関連症状改善効果を示した。これらの薬理試験結果から、フェドラチニブは JAK2 活性化を伴う MPN の治療薬となる可能性が期待される。

副次的薬理試験において、フェドラチニブは複数の受容体及びトランスポーターに対してリガンド結合を阻害した。特にムスカリン受容体 2 種及びドパミントランスポーターに対する IC50 値は低値であったことから、本薬投与によって神経行動学的影響が発現する可能性が示唆された。しかしながら、ラットを用いて神経行動学的影響を検討した安全性薬理試験では、本薬は 30 mg/kg（180 mg/m^2）までの投与量で CNS、自律神経系、感覚運動及び神経筋に影響を及ぼさなかった。また、マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において一般状態の変化は認められたものの、それらは健康状態の悪化又は瀕死状態によるもので、上記標的外タンパク質相互作用に関連した影響ではないと考えられた（【M2.6.6、3 項】参照）。なお、臨床試験において、CNS 関連の有害事象が認められるものの、Grade3 以上の重篤なものは稀であることが確認されている（【M2.7.4、2.1.1.2 項】参照）。

フェドラチニブは in vitro で hERG チャネル電流を阻害し（IC50 値＝2.1～17.8 μM）、他のイオンチャネルに対する IC50 値は 2.8～31.2 μM の範囲であった。一方、覚醒イヌを用いた心血管系及び呼吸器系に対する影響を検討した in vivo 安全性薬理試験では、本薬 20 mg/kg（400 mg/m^2）までの投与量で血圧、心拍数、心電図波形、呼吸数及び動脈血ガス分圧に対する影響は認められなかった。

フェドラチニブを 2.27 mg/day でラットに 28 日間腹腔内投与したところ、チアミン欠乏を示す一般状態の変化は認められず、また赤血球トランスケトラーゼ活性及びチアミン状態に対する影響も認められなかった。また、培養アストロサイトをフェドラチニブ（17 μM）で処置してもチアミンの細胞への取り込みは阻害されなかった。ラットを用いて実施した追加の 28 日間反復投与試験では、80 mg/kg のフェドラチニブ投与は血漿中及び脳内のチアミン濃度に影響を及ぼさないことが示された。これは、フェドラチニブはチアミントランスポーターを阻害しないことを示した in vitro 試験と一致するものであった。

In vivo 安全性薬理試験結果を評価するにあたって、日本人 MF 患者における血漿中曝露量（Cmax 及び濃度時間曲線下面積）がラット及びイヌを用いた安全性薬理試験で得られた最高曝露量を上回っていることが明らかとなった。毒性試験においてヒトは動物よりもフェドラチニブの毒性に対する感受性が低いことが示唆される（【M2.4、5.1 項】参照）ことからも、本試験のヒトにおける安全性薬理作用を発現する曝露量の予測性については限定的と考えられる。

以上のように、フェドラチニブは野生型及び活性化変異型 JAK2 に対する阻害薬であることが、また MPN の動物モデルにおいて症状を改善し、延命効果を発揮することが示された。したがって、フェドラチニブは MF などの MPN 疾患に対する治療薬となることが期待される。

7 参考文献

[1] 造血器腫瘍診療ガイドライン 2023

[2] 北中 明, 下田 和哉. 骨髄線維症の病因と病態. 日内会誌 2012;101:1906-12.

[3] 朝比奈 昭彦. JAK キナーゼ. アレルギー 2018;67:157-8.

[4] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005;7:387-97.

[5] Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of JAK2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 2006;107:4274-81.

[6] Mercher T, Wernig G, Moore SA, Levine RL, Gu TL, Fröhling S, et al. JAK2T875N is a novel activating mutation that results in myeloproliferative disease with features of megakaryoblastic leukemia in a murine bone marrow transplantation model. Blood 2006;108:2770-9.

[7] Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007;356:459-68.

[8] Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood 2006;108:3472-6.

[9] Geron I, Abrahamsson AE, Barroga CF, Kavalerchik E, Gotlib J, Hood JD, et al. Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors. Cancer Cell 2008;13:321-30.

[10] Deshpande A, Reddy MM, Schade GO, Ray A, Chowdary TK, Griffin JD, et al. Kinase domain mutations confer resistance to novel inhibitors targeting JAK2V617F in myeloproliferative neoplasms. Leukemia 2012;26:708-15.

[11] Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, Manshouri T, Adli M, Hricik T, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. Nature 2012;489:155-9.

[12] Kesarwani M, Huber E, Kincaid Z, Evelyn CR, Biesiada J, Rance M, et al. Targeting substrate-site in Jak2 kinase prevents emergence of genetic resistance. Sci Rep 2015;5:14538.

[13] Harrison CN, Schaap N, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Tiu RV, Zachee P, et al. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. Lancet Haematol 2017;4:e317-24.

[14] Wernig G, Kharas MG, Okabe R, Moore SA, Leeman DS, Cullen DE, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. Cancer Cell 2008;13:311-20.

Table of Contents

1 薬理試験：一覧表 2
2 効力を裏付ける試験 5
3 副次的薬理試験 6
4 安全性薬理試験 6
5 薬力学的薬物相互作用試験 7

1 薬理試験：一覧表

Test article: Fedratinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Primary Pharmacology					
In vitro biochemical screening of fedratinib to assess inhibitory activity versus a panel of purified kinases	Recombinant kinases	In vitro	[redacted], USA	PH-[redacted]-101348-019	M4.2.1.1-1
In vitro potency and selectivity of fedratinib and its metabolites against Janus kinase (JAK) family kinases and a panel of 192 kinases	Recombinant kinases	In vitro	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVT0048	M4.2.1.1-2
In vitro biochemical screening of fedratinib to assess inhibitory activity versus JAK family kinases	Recombinant JAK kinases [JAK1, 2, 3 and tyrosine kinase 2 (TYK2)]	In vitro	[redacted] Japan	PH-[redacted]-101348-041	M4.2.1.1-3
Antiproliferative activity of fedratinib in JAK1, JAK2, JAK3 or TYK2 dependent Ba/F3 cells	Ba/F3 cells expressing JAK kinases (JAK1, 2, 3 and TYK2)	In vitro	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVT0063	M4.2.1.1-4
Inhibitory effects of fedratinib on cell proliferation, survival, and signaling mediated by mutationally activated JAK2	HEL and Ba/F3. $JAK2^{V617F}$ cells	In vitro	TargeGen Inc., San Diego, CA, USA	PH-[redacted]-101348-027	M4.2.1.1-5
Antiproliferative activity of fedratinib and its metabolites in $JAK2^{V617F}$ mutant patient derived cell lines	SET-2, HEL and UKE-1 cells	In vitro	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVT0049	M4.2.1.1-6
Effects of fedratinib on hematopoietic stem cells expressing $JAK2^{V617F}$	Hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitors from polycythemia vera (PV) patients HSCs from normal umbilical cord blood transduced with $JAK2^{V617F}$	In vitro	TargeGen Inc., San Diego, CA, USA	PH-[redacted]-101348-076	M4.2.1.1-7

Test article: Fedratinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Emergence of in vitro resistance in $JAK2^{V617F}$ cells after prolonged treatment with fedratinib	HEL and SET-2 cells	In vitro	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVT0064	M4.2.1.1-8
Efficacy of fedratinib in murine model of $JAK2^{V617F}$-induced polycythemia vera and against polycythemia vera patient-derived cells	Mice (C57BL/6) transplanted with syngeneic HSCs transduced with $JAK2^{V617F}$ Colony forming unit assay: bone marrow (BM) cells from fedratinib treated mice or BM cells from PV patients treated in culture	In vivo: Oral gavage	TargeGen Inc., San Diego, CA, USA	PH-[redacted]-101348-068	M4.2.1.1-9
In vivo efficacy of fedratinib in $JAK2^{V617F}$ transgenic mouse model of myeloproliferative neoplasms disease	Mice, $JAK2^{V617F}$ knock-in	In vivo: Oral gavage	Harvard Medical School, Boston, MA, USA	Mullally-2010	M4.2.1.1-10
Effects of orally administered fedratinib on hematopoietic stem cells expressing $JAK2^{v617F}$ in a murine engraftment model	Mice ($RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$); intrahepatically transplanted with human $JAK2^{V617F}$ progenitors from PV patients transduced with green fluorescent protein-luciferase (GFP-Luc); and normal umbilical cord cells transduced with $JAK2^{V617F}$ and GFP-Luc	In vivo: Oral gavage	TargeGen Inc., San Diego, CA, USA	PH-[redacted]-101348-081	M4.2.1.1-11
Effects of fedratinib on $JAK2^{V617F}$-induced hematopoietic disease in a nude mouse model	Mice [severe combined immunodeficiency (SCID)]; intravenously transplanted with mouse Ba/F3 cells transduced with $JAK2^{V617F}$ and GFP	In vivo: Oral gavage	TargeGen Inc., San Diego, CA, USA	PH-[redacted]-101348-065	M4.2.1.1-12

Test article: Fedratinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Effects of fedratinib on phospho-signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and 5 in xenograft model of essential thrombocythemia cell line SET-2 in SCID mice	Mice (CB17 SCID); human SET-2 cells ($JAK2^{V617F}$ mutant) transplanted subcutaneously	In vivo: Oral gavage	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVV0047	M4.2.1.1-13
Effects of fedratinib on phospho-STAT3 and 5 in xenograft model of essential thrombocythemia cell line SET-2 in SCID mice	Mice (CB17 SCID); human SET-2 cells ($JAK2^{V617F}$ mutant) transplanted subcutaneously	In vivo: Oral gavage	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVV0057	M4.2.1.1-14
Efficacy evaluation of fedratinib in xenograft model of essential thrombocythemia cell line SET-2 in SCID mice.	Mice (CB17 SCID); human SET-2 cells ($JAK2^{V617F}$ mutant) transplanted subcutaneously	In vivo: Oral gavage	Sanofi Oncology, Cambridge, MA, USA	ONVV0048	M4.2.1.1-15
Secondary Pharmacology					
In vitro pharmacology: high throughput profile	80 receptors, ion channels and transporters	In vitro	[redacted] France	PH-[redacted]-101348-029	M4.2.1.2-1
IC50 determination of fedratinib against a panel of receptors	13 receptors, ion channel and transporters	In vitro	[redacted] France	PH-[redacted]-101348-030	M4.2.1.2-2
Assessment of fedratinib as an inhibitor of human thiamine transporter (THTr)1 and THTr2 mediated transport	MDCK-II cells expressing THTr1 or THTr2	In vitro	[redacted] USA	OPT-[redacted]-097	M4.2.1.2-3
Assessment of fedratinib on thiamine status in rats	Rats	In vivo; Intraperitoneal	University of Montreal, Montreal, QC, Canada	Hazell-2017	M4.2.1.2-4

Test article: Fedratinib

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
A 28-day DMPK study of fedratinib by oral gavage in Sprague Dawley rats (GLP)	Rats	In vivo: Oral gavage	[redacted] USA	01046002	M4.2.1.2-5
Safety Pharmacology					
Functional observation battery assessment (GLP)	Rats	In vivo: Oral gavage	[redacted] USA	SPH-[redacted]-101348-049	M4.2.1.3-1
Human ether-a-go-go-related gene (hERG)	HEK293 cells	In vitro	[redacted] USA	SPH-[redacted]-101348-031	M4.2.1.3-2
hERG (GLP)	HEK293 cells	In vitro	[redacted] USA	PAT0257	M4.2.1.3-3
Cardiac ion channels	HEK293 or CHO cells	In vitro	[redacted] USA	SPH-[redacted]-101348-021	M4.2.1.3-4
Body temperature; hemodynamic, respiratory and blood gas parameters, electrocardiogram (ECG) (GLP)	Dogs	In vivo: Oral gavage	[redacted] USA	SPH-[redacted]-101348-045	M4.2.1.3-5

BM = bone marrow; ECG = electrocardiogram; GFP-Luc = green fluorescent protein-luciferase; GLP = good laboratory practice; hERG = human ether-a-go-go-related gene; HSCs = hematopoietic stem cells; IC50 = half-maximal inhibitory concentration; JAK = Janus kinase; $JAK2^{V617F}$ = JAK2 with valine to phenylalanine point mutation at residue 617; PV = polycythemia vera; RAG2 = recombination activating gene 2; STAT = signal transducer and activator of transcription; SCID = severe combined immunodeficiency; TYK2 = tyrosine kinase 2; THTr = thiamine transporter.

2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の概要は M2.6.2、2 項に示す。

3 副次的薬理試験

副次的薬理試験の概要は M2.6.2、3 項に示す。

4 安全性薬理試験

Test article: Fedratinib

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Gender and No. per Group	Method of Admin.	Dose/ Duration[a]	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Central nervous system (CNS)	Rats	Male; 10 rats/group	In vivo: Oral gavage	3, 10, 30 mg/kg	There were no changes in CNS activity and excitability, autonomic nervous system activity, sensorimotor activity, or neuromuscular activity after the administration of fedratinib at doses up to and including 30 mg/kg. There were no fedratinib-related clinical signs, changes in body temperature or body weights in tested animals.	Yes	SPH-[redacted]-101348-049
hERG current	HEK293 cells	—	In vitro	0.1, 1, 10, 30 µM	The IC50 determined was 17.5 µM (n = 2).	No	SPH-[redacted]-101348-031
hERG current	HEK293 cells	—	In vitro	0.3, 1, 3, 10 µM	The IC50 determined was 2.1 µM (n = 3-4).	Yes	PAT0257
Cardiac ion channels	HEK293 or CHO cells	—	In vitro	0.1, 1, 10, 30 µM	The following IC50 were determined for these 6 channels (n = 2-3): hERG - 17.8 µM; hNav1.5 - 10.8 µM; hKvLQT1/hminK - 20.6 µM; hKv4.3 - 31.2 µM; hCav3.2 - 8.2 µM; hKir6.2/SUR2A - 2.8 µM. The IC50 could not be determined for hKv1.5, hCav1.2, hKir2.1, hHCN4 and hKir3.1/3.4 channels.	No	SPH-[redacted]-101348-021

Test article: Fedratinib

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Gender and No. per Group	Method of Admin.	Dose/ Duration[a]	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular and respiratory system	Beagle dogs	Male; 4 dogs/group; Latin square cross-over design	In vivo: Oral gavage	2, 6, 20 mg/kg	No fedratinib-related changes were observed in blood pressure (diastolic, systolic, and mean arterial pressure), heart rate, or ECG intervals (PR, QRS, QT, and QTc). Respiratory rate and arterial blood gases (pH, pCO_2, pO_2, SO_2, or HCO_3^-) were not altered by fedratinib administration	Yes	SPH-[redacted]-101348-045

CNS = central nervous system
a Single dose unless specified otherwise

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし