レニオリシブリン酸塩

ジョエンジャ®錠 10 mg

ジョエンジャ®錠 30 mg

ジョエンジャ®錠 70 mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

株式会社オーファンパシフィック

略号一覧表

略語・用語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
APDS	Activated PI3Kδ syndrome	活性化 PI3Kδ 症候群
PI3K (α/β/γ/δ)	Phosphoinositide 3-kinase (alpha/beta/gamma/delta)	ホスホイノシチド 3 キナーゼ（α/β/γ/δ）

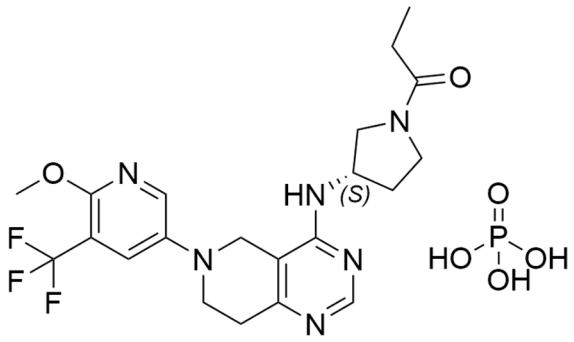
目次

頁
略号一覧表 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 レニオリシブの一般特性 4
2.6.1.2 レニオリシブの薬理学的特性 5
2.6.1.3 予定する効能・効果 5
2.6.1.4 予定する用法・用量 5
2.6.1.5 参考文献 6

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 レニオリシブの一般特性

r-INN/USAN：	Leniolisib
JAN：	（日本名）レニオリシブリン酸塩 （英名）Leniolisib Phosphate
開発コード：	PH-E6、CDZ173
IUPAC：	1-[(*3S*)-3-{[6-(6-Methoxy-5-trifluoromethylpyridin-3-yl)-5,6,7,8-tetrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidin-4-yl]amino}pyrrolidin-1-yl]propan-1-one-phosphoric acid (1/1)
化学名（CAS）：	1-[(*3S*)-3-[[5,6,7,8-Tetrahydro-6-[6-methoxy-5-(trifluoromethyl)-3-pyridinyl]pyrido[4,3-*d*]pyrimidin- 4-yl]amino]-1-pyrrolidinyl]-1-propanone phosphate (1:1)
化学構造式：	
分子式：	$C_{21}H_{25}F_3N_6O_2 \cdot H_3PO_4$
分子量：	450.47（フリー体）、548.46（リン酸塩）
CAS 登録番号：	1354691-97-6

2.6.1.2 レニオリシブの薬理学的特性

活性化 PI3Kδ 症候群（APDS）は、ホスホイノシチド 3 キナーゼ δ（PI3Kδ）の触媒サブユニット p110δ（PIK3CD）又は制御サブユニット p85α（PIK3R1）をコードする遺伝子の変異により、PI3Kδ が恒常的に活性化する疾患である［Michalovich D, 2018］。

多くの APDS 患者では 18 歳以前に徴候又は症状が確認される。PIK3CD 機能獲得変異により起こる APDS1 と PIK3R1 機能喪失変異により起こる APDS2 の病態には異なる部分があり、APDS1 では肝腫大、気管支拡張症及び副鼻腔炎などを発症するのに対し、APDS2 ではリンパ節症、肺炎、発育不全、神経発達遅延及び悪性腫瘍が認められる［Jamee M, 2020］。APDS の一般的な臨床的特徴として、再発性の副鼻腔肺感染症、重症又は持続性のウイルス感染症及び自己免疫（血球減少症、関節炎、腸症など）がある。APDS の患児では、成長遅延及び神経発達遅延が頻繁に認められる［Elkaim E, 2016］［Jamee M, 2020］［Condliffe AM, 2018］。APDS の症状は多様であり、同じ遺伝子変異を持つ家族内でも異なる症状を示す場合がある。また、少数ではあるが一見無症状の孤発性の成人患者、原発性抗体欠損や気管支拡張症を伴う早期に発症する再発性呼吸器感染症の小児患者やリンパ球増殖、自己免疫又は悪性腫瘍を患う患者もいる。しかし、これまでのところ、APDS の既承認医薬品あるいは APDS において過剰に活性化した PI3Kδ 経路を選択的に抑制する分子標的治療薬はない。

レニオリシブは、経口投与可能な低分子化合物であり、PI3Kδ の p110δ を標的とする阻害剤である。レニオリシブは、ヒト PI3Kα、β 及び γ アイソフォームと比較し、ヒト PI3Kδ に対してより強い阻害活性を示す。また、他の PI3K 関連酵素やそれら以外の広範な酵素、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する阻害は認められない。*In vitro* における細胞を用いた試験では、レニオリシブは野生型及び変異型の PI3Kδ を阻害し、B 細胞、T 細胞、好中球、単球、好塩基球、形質細胞様樹状細胞、及び肥満細胞などの免疫細胞の機能を抑制した。*In vivo* では、レニオリシブは B 細胞の活性化及び抗体産生を抑制し、ラットのコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて病態を改善した。

レニオリシブは、APDS の病因となる機能獲得型の変異を持つ触媒サブユニット PI3K p110δ を選択的に阻害することから、新規の治療選択肢が求められる APDS に対し、効果的な治療手段の一つとなることが期待できる。

2.6.1.3 予定する効能・効果

1.8 添付文書（案）を参照。

2.6.1.4 予定する用法・用量

1.8 添付文書（案）を参照。

2.6.1.5 参考文献

Condliffe, AM and Chandra, A.: Respiratory Manifestations of the Activated Phosphoinositide 3-Kinase Delta Syndrome. Front Immunol. 2018; 9:338.

Elkaim, E., Neven, B., Bruneau, J., Mitsui-Sekinaka, K., Stanislas, A., Heurtier, L., et al.: Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome 2: A cohort study. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2016; 138(1):210-218.

Jamee, M., Moniri, S., Zaki-Dizaji, M., Olbrich, P., Yazdani, R., Jadidi-Niaragh F., et al.: Clinical, immunological, and genetic features in patients with activated PI3Kdelta syndrome (APDS): a systematic review. Clinical Reviews in Allergy and Immunology. 2020. 10.1007/s12016-019-08738-9.

Michalovich, D. and Nejentsev, S.: Activated PI3 kinase delta syndrome: from genetics to therapy. Frontiers in Immunology. 2018; 9:369.

レニオリシブリン酸塩

ジョエンジャ®錠 10 mg

ジョエンジャ®錠 30 mg

ジョエンジャ®錠 70 mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

株式会社オーファンパシフィック

略号一覧表

略語・用語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADP	Adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
APDS	Activated PI3Kδ syndrome	活性化 PI3Kδ 症候群
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
aIgM	Anti-Immunoglobulin M antibody	抗免疫グロブリン M 抗体
BAFF	B-cell activating factor	B 細胞活性化因子
BAL	Bronchoalveolar lavage	気管支肺胞洗浄
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
BID	Bis in die	1 日 2 回
BMMC	Bone marrow-derived mast cells	骨髄由来肥満細胞
bpm	Beats per minute	1 分あたりの拍動数
CD	Cluster of differentiation	分化抗原群
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CsA	Cyclosporin A	シクロスポリン A
EC_{50}	Half maximal effective concentration	50%有効濃度
ED_{50}	Half maximal effective dose	50%有効用量
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
FACS	Fluorescence activated cell sorting	蛍光活性化細胞選別
fMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine	ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
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
GOF	Gain-of-function	機能獲得
GPCR	G protein coupled receptor	G タンパク質共役受容体
GvHD	Graft-versus-host disease	移植片対宿主病
5HT2B	5-Hydroxytryptamine receptor 2B	5-ヒドロキシトリプタミン受容体 2B
HEL	Hen egg lysozyme	鶏卵リゾチーム
hERG	Human ether-à-go-go-related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ID	Intradermally	皮内（投与）
IFA	Incomplete Freund’s adjuvant	フロイント不完全アジュバント
IFNα	Interferon α	インターフェロン α
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
InsR	Insulin receptor	インスリン受容体
KGlo	Kinase glo	キナーゼ Glo
LC-MS-MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
LOQ	Lower limit of quantification	定量下限
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
mBM prol.	Mouse bone marrow proliferation	マウス骨髄増殖
MIP-1α	Macrophage inflammatory proteins-1α	マクロファージ炎症性タンパク質-1α
MHC	Major histocompatibility complex	主要組織適合性複合体
MLR	Mixed lymphocyte reaction	混合リンパ球反応
MRM	Multiple reaction monitoring	多重反応モニタリング
mTOR	Mammalian target of rapamycin	哺乳類ラパマイシン標的タンパク

略語・用語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
		質
MZ	Marginal zone	辺縁帯
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
n.s.	Not statistically significant	統計学的に有意差なし
OGTT	Oral glucose tolerance test	経口グルコース負荷試験
OG	Octyl-glucoside	オクチルグルコシド
pAkt	Phosphorylated Akt	リン酸化 Akt
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
pd	Plasma-derived	血漿由来
PD	Pharmacodynamic(s)	薬力学
pDC	Plasmacytoid dendritic cell	形質細胞様樹状細胞
PFC	Plaque-forming cell	プラーク形成細胞
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	ホスホイノシチド 3 キナーゼ
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
PKB	Protein kinase B	プロテインキナーゼ B
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスフォスフェート
p.o.	per os	経口（投与）
PPB	Plasma protein binding	血漿タンパク質結合
ppm	Part per million	百万分の一
Prol.	Proliferation	増殖
QD	Quaque die	1 日 1 回
QTc	Corrected QT interval	補正 QT 間隔
RA	Rheumatoid arthritis	関節リウマチ
rCIA	Rat collagen-induced arthritis	ラットコラーゲン誘発関節炎
Resp.	Respiratory	呼吸器
RMV	Respiratory minute volume	分時換気量
rIL-4	Rat interleukin-4	ラットインターロイキン-4
S1P	Sphingosine-1 phosphate	スフィンゴシン-1 リン酸
SCF	Stem cell factor	幹細胞因子
SEM	Standard error of the mean	平均値の標準誤差
SRBC	Sheep red blood cell	ヒツジ赤血球
Th_1, Th_2 and Th_{17}	Type 1, Type 2 and Type 17 helper T-cells	1 型、2 型及び 17 型ヘルパーT 細胞
TLR	Toll-like receptor	Toll 様受容体
TNFα	Tumor necrosis factor α	腫瘍壊死因子 α
TR-FRET	Time-resolved fluorescence resonance energy transfer	時間分解蛍光共鳴エネルギー転移
wt	Wild type	野生型

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 6
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 *In vitro* 酵素活性及び選択性 8
2.6.2.2.2 *In vitro* 細胞活性と選択性 8
2.6.2.2.3 *In vivo* 薬理試験 14
2.6.2.2.3.1 レニオシリブのメカニズムモデルにおける評価 14
2.6.2.2.3.2 レニオシリブの疾患モデルを用いた評価 16
2.6.2.2.4 その他の薬理試験 19
2.6.2.2.4.1 薬物動態学的/薬力学的関係 19
2.6.2.3 副次的薬理試験 22
2.6.2.3.1 PI3K 関連酵素の阻害 22
2.6.2.3.2 その他の脂質キナーゼ、タンパク質キナーゼ、プロテアーゼの阻害 22
2.6.2.3.3 受容体とイオンチャネルのプロファイル 23
2.6.2.3.4 成長因子を介した増殖の阻害 23
2.6.2.3.5 腫瘍抑制因子の阻害 23
2.6.2.3.6 *In vitro* におけるグルコース代謝の阻害 24
2.6.2.3.7 *In vivo* におけるグルコース代謝の阻害 24
2.6.2.4 安全性薬理試験 25
2.6.2.4.1 *In vitro* 心血管系安全性試験 25
2.6.2.4.2 *In vivo* 心血管系安全性試験 26
2.6.2.4.3 *In vivo* 中枢神経系及び呼吸器系の安全性試験 26
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 26
2.6.2.6 考察及び結論 26
2.6.2.7 図表 28
2.6.2.8 参考文献 28

表一覧

表 2.6.2-1 PI3K アイソフォームの阻害 8
表 2.6.2-2 細胞を用いた PI3K アイソフォーム阻害 9
表 2.6.2-3 APDS 関連変異体の阻害活性 9
表 2.6.2-4 血液中の B 細胞の阻害作用 11
表 2.6.2-5 B 細胞機能の阻害 12
表 2.6.2-6 T 細胞機能の阻害 13
表 2.6.2-7 T 細胞分化に対する阻害 13

表 2.6.2-8 自然免疫担当細胞への作用 14
表 2.6.2-9 PI3K 関連酵素の阻害 22
表 2.6.2-10 その他のキナーゼ及びプロテアーゼの酵素阻害 23
表 2.6.2-11 受容体とイオンチャネルの酵素阻害 23
表 2.6.2-12 細胞レベルのオフターゲットアッセイ 24
表 2.6.2-13 安全性薬理試験の概要 25

図一覧

図 2.6.2-1 APDS 機能獲得型変異体導入細胞の PI3Kδ 阻害 10
図 2.6.2-2 ヒツジ赤血球に対する抗体産生の阻害 15
図 2.6.2-3 マウス肺におけるオゾン誘発性好中球浸潤の阻害 16
図 2.6.2-4 ラットコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるレニオリシブ予防的投与の有効性 17
図 2.6.2-5 ラットコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるレニオリシブ治療的投与の有効性 19
図 2.6.2-6 ラットにおけるレニオリシブの PK/PD 20
図 2.6.2-7 カニクイザルにおけるレニオリシブの PK/PD 21

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

活性化 PI3Kδ 症候群（APDS）は、ホスホイノシチド 3 キナーゼ δ（PI3Kδ）の触媒サブユニット p110δ（PIK3CD）又は制御サブユニット p85α（PIK3R1）をコードする遺伝子の変異を病因とする希少疾患であり、患者は複合型免疫不全、リンパ球増殖、自己免疫疾患及び造血器悪性腫瘍などの症状を示す［Angulo I, 2013］［Crank MC, 2014］［Takashima T, 2014］。APDS の治療には、免疫グロブリンの補充､抗生物質の予防投与､造血幹細胞移植などの従来の免疫不全治療がある。PI3Kδ は、好中球、マクロファージ及び肥満細胞などの自然免疫を担う細胞に加え、B 細胞及び T 細胞など適応免疫を担当する細胞に発現し、PI3K/Akt/mTOR/S6K 経路のシグナル伝達分子として機能する。このことから、PI3Kδ 経路阻害剤が APDS 患者の治療薬として効果的な分子標的療法となると考えられる。さらに、PI3Kδ 経路阻害剤は、PI3Kδ を介するシグナルを特異的に標的とすることで、その他の PI3Kα、β 及び γ アイソフォームに関連する不要な作用を回避できると考えられる［Hirsch E, 2000］［Li Z, 2000］［Patrucco E, 2004］［Jou ST, 2002］。

そこで、レニオリシブの薬理学的な有効性と安全性の特性を評価するために、*in vitro* 及び *in vivo* の試験を実施した。これらの試験結果から、レニオリシブは PI3Kδ に対する選択的な阻害剤であり、APDS に対する有効な治療薬になると考えられた。また、安全性薬理試験の結果から、レニオリシブは QT の延長を引き起こす可能性が示唆された。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

In vitro においてレニオリシブは PI3Kδ を最も強く阻害し、他の PI3Kα、β 及び γ アイソフォームと比較して少なくとも 28 倍の選択性があった。また、レニオリシブは、抗 IgM 抗体刺激マウス脾臓細胞増殖、タンパク質抗原又は TLR アゴニストによって誘導される野生型マウス由来 B 細胞の IL-6 及び TNFα 産生、ラット、サル及びヒト由来 B 細胞の Akt のリン酸化及び活性化マーカーの発現などの指標において、複数の B 細胞機能を阻害した。さらに、レニオリシブはヒトの細胞において、好中球と単球の酸化バースト及び抗 IgE 誘発好塩基球活性化、初代形質細胞様樹状細胞（pDC）のインターフェロン α（IFNα）産生を阻害した。マウスでは、幹細胞因子（SCF）依存性の肥満細胞におけるリン酸化 Akt（pAkt）を顕著に減少させた。

レニオリシブは T 細胞の増殖を阻害した。レニオリシブは、同種混合リンパ球反応（MLR）をマウス及びヒトで阻害し、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来 T 細胞の抗 CD3 刺激増殖も阻害した。さらに、マウス及びヒトの T 細胞の 1 型、2 型及び 17 型のヘルパーT 細胞（それぞれ Th_1、Th_2 及び Th_{17}）への分化を阻害した。

In vivo では、レニオリシブはラットのヒツジ赤血球（SRBC）モデルで有効性を示し、抗体産生を阻害した。レニオリシブは、APDS 疾患モデルの代替であるラットを用いたコラーゲン誘発関節炎の予防的投与法及び治療的投与法において病態を改善した。さらに、レニオリシブは、オゾン誘発肺炎症モデルマウスにおいて好中球の浸潤を抑制した。

レニオリシブは、ラットへ単回経口投与すると pAkt を指標とした B 細胞活性化を血漿濃度依存的及び時間依存的に阻害した。カニクイザルでは、レニオリシブを単回経口投与した場合、抗 IgM 抗体刺激による pAkt を指標とした CD20 陽性 B 細胞活性化を阻害した。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

レニオリシブのオフターゲット作用を評価するため、他の PI3K ファミリーメンバーや網羅的

に、その他のキナーゼ、プロテアーゼ、受容体及びイオンチャネルのパネルを用いた *in vitro* 試験を実施した。その結果、レニオリシブは PI3Kδ に対する高い選択性を示し、その他のキナーゼ、プロテアーゼ、受容体及びイオンチャネルに対する作用もほとんど認められなかった。また、レニオリシブによる成長因子を介した細胞増殖に対する影響は認められず、腫瘍抑制因子 p53 の阻害も認められなかった。さらに、レニオリシブは *in vitro* においてインスリン受容体及びグルコース代謝に対して阻害作用を示さなかった。*In vivo* では、2 週間のマウス試験における経口グルコース負荷試験及び腹腔内インスリン負荷試験で、100 mg/kg/日の単回及び反復投与によるインスリン非感受性（抵抗性）が示されたが、病理組織学的な影響は認められなかった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

レニオリシブの心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対する安全性を評価するため、*in vitro* 及び *in vivo* で安全性薬理試験を実施した。レニオリシブは *in vitro* で hERG（human ether-a-go-go related gene）チャネルを阻害し、IC_{50} は 11.9 μM であった。カニクイザルを用いた *in vivo* テレメトリー試験では 150 mg/kg の単回強制経口投与で QTc 延長を引き起こした。ラットを用いた *in vivo* 試験では、呼吸器系及び中枢神経系への影響は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

In vitro でレニオリシブのクラス I PI3K アイソフォームに対する選択性を評価した。また、*in vitro* 及び *in vivo* で、自然免疫及び適応免疫に関与する様々な免疫細胞の活性化及び機能に対するレニオリシブの阻害作用を評価した。

2.6.2.2.1 *In vitro* 酵素活性及び選択性

レニオリシブの *in vitro* における阻害活性及び選択性を評価した。

無細胞系の酵素阻害プロファイリング

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

PI3K クラス I アイソフォーム（PI3Kα、PI3Kβ、PI3Kγ 及び PI3Kδ）に対するレニオリシブの阻害作用を組換え酵素を用いて評価した。PI3Kα 及び PI3Kβ のキナーゼ活性阻害は、n-オクチルグルコシド（OG）中のホスファチジルイノシトール（PI）を基質として、アデノシン三リン酸（ATP）消費に基づく発光を測定した。PI3Kγ 及び PI3Kδ の活性測定に使用するキナーゼアッセイは、時間分解蛍光共鳴エネルギー転移（TR-FRET）法を用いてアデノシン二リン酸（ADP）の産生量を測定した。

その結果、レニオリシブは、p110δ アイソフォーム（クラス Ia）に対して高い活性を示し、EC_{50} は 0.011 μM であった。*In vitro* におけるレニオリシブの PI3Kδ に対する選択性は、同じクラス Ia に属するアイソフォーム PI3Kα に対して 28 倍、PI3Kβ に対して 43 倍であった。また、クラス Ib に属する PI3Kγ に対する選択性は 257 倍であった（表 2.6.2-1）。以上のように、レニオリシブは PI3Kδ に対して、他のクラス I PI3K アイソフォームと比較し、少なくとも 28 倍の選択性を持って阻害することが示された。

表 2.6.2-1 PI3K アイソフォームの阻害

Enzyme isoform	IC_{50} / EC_{50} (μM) [c]	Selectivity of PI3Kδ over other Class I isoforms
PI3Kα [a]	0.28 ± 0.11	28-fold
PI3Kβ [a]	0.48 ± 0.28	43-fold
PI3Kγ [b]	2.57 ± 2.13	257-fold
PI3Kδ [b]	0.011 ± 0.004	-

[a] = KGlo format (IC_{50}); [b] = ADAPTA format (EC_{50}); [c] = Values are mean ± SEM of at least 4 independent measurements; - = not applicable.

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

2.6.2.2.2 *In vitro* 細胞活性と選択性

レニオリシブの *in vitro* における効力と選択性を、細胞を用いたアッセイで評価した。

細胞アッセイにおける PI3K アイソフォームの阻害プロファイリング

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

レニオリシブの細胞レベルでの PI3K δ 阻害活性及び他のアイソフォームに対する選択性を評価した。ヒト myr-p110 PI3K アイソフォーム導入 Rat-1 細胞を用いて、レニオリシブによる各アイソフォームの pAkt 産生に対する阻害活性を評価した。PI3Kγ に対する活性は、MIP-1α 刺激による U937 単球及びアデノシン刺激によるマウス骨髄由来肥満細胞（BMMC）を使用し、細胞にお

ける阻害を評価した。BMMC は、C57BL/6 マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、FACS を用いて c-KIT（SCF 受容体）と Fcε 受容体の両方を発現する細胞集団を解析した。細胞をレニオリシブ存在下で培養し、アデノシンの添加により PI3Kγ 活性を刺激した後に、細胞を溶解し pAkt の産生を測定した。

その結果、レニオリシブの阻害作用及び酵素アッセイで認められた他の PI3K アイソフォームに対する選択性が、細胞系アッセイでも確認された（表 2.6.2-2）。PI3Kγ に依存した MIP-1α による U937 細胞の活性化及びアデノシンによるマウス BMMC の活性化はレニオリシブでは阻害されなかった。

表 2.6.2-2 細胞を用いた PI3K アイソフォーム阻害

Enzyme	IC_{50} (μM)	Selectivity of PI3Kδ over other isoforms [a]
PI3Kα [b]	1.62 ± 0.29 [e]	29-fold
PI3Kβ [b]	2.37 ± 0.66 [e]	42-fold
PI3Kγ [c]	7.76 ± 3.08 [f]	138-fold
PI3Kγ [d]	>7.42 ± 4.4 [g]	>132-fold
PI3Kδ [b]	0.056 ± 0.02 [e]	-

[a] = Readout pAkt; [b] = Rat-1 fibroblasts transfected with human myr-p110 PI3K isoforms; [c] = Adenosine-induced mouse bone marrow-derived masT-Cells (PI3Kγ dependent); [d] = MIP-1α induced U937 monocytes; [e] = Values are mean ± SEM of at least 9 independent measurements, values >10 μM taken as 10 μM for mean value calculation; [f] = Values are mean ± SEM of at least 7 independent measurements, values >10 μM taken as 10 μM for mean value calculation; [g] = Values are mean ± SEM of at least 3 independent measurements;
- = not applicable

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

［試験番号[redacted]20[redacted]-00588、資料番号 4.2.1.1-8］

APDS の発症に関連した各種変異型 PI3Kδ（N334K、C416R、E525K 又は E1021K）を発現する Rat-1 細胞は、野生型 PI3Kδ を遺伝子導入した Rat-1 細胞と比較して pAkt レベルの上昇を示した。表 2.6.2-3 に示すように、レニオリシブは、細胞内で野生型酵素及び高いベースライン活性を持つ変異型酵素の双方を阻害した。IC_{50} は 0.205 μM（野生型）から 0.05 μM（C416 変異型）の間であった（図 2.6.2-1）。

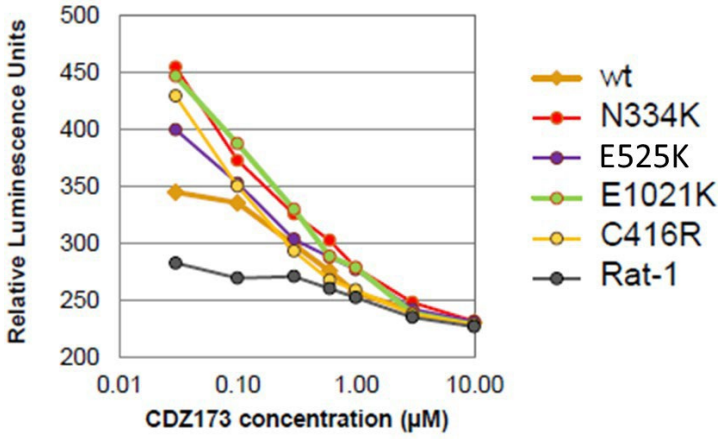
レニオリシブは野生型と比較して変異型に対して高い阻害作用を示した。この結果より、レニオリシブが機能獲得型の PI3Kδ 変異体を効果的に阻害することが示された。

表 2.6.2-3 APDS 関連変異体の阻害活性

Transfectant	IC_{50} (μM)
wtPI3Kδ	0.205 ± 0.064
N334K	0.087 ± 0.034
E525K	0.128 ± 0.054
E1021K	0.064 ± 0.015
C416R	0.05 ± 0.015
RAT-1 cells	0.891 ± 0.267

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

図 2.6.2-1 APDS 機能獲得型変異体導入細胞の PI3Kδ 阻害



Rat-1 細胞に野生型 PIK3CD（「wt」; PI3K p110δ）又は機能獲得型変異遺伝子を導入した。「Rat-1」は、陰性対照の遺伝子導入をしていない細胞を示す。レニオリシブ（CDZ173）濃度の増加（x 軸、μM）に対するリン酸化 Akt の産生を指標とする PI3K 活性（y 軸、任意の相対発光単位）を示す。各種の機能獲得型変異体を発現する Rat-1 細胞は、wt を発現する Rat-1 又は遺伝子導入していない Rat-1（左端のデータポイント）よりも高いベースライン活性を示し、レニオリシブ（CDZ173）によって同等に阻害された。

（試験番号[redacted]20[redacted]-00588、資料番号 4.2.1.1-8）

APDS 患者由来リンパ球に対する作用

［参考資料：資料番号 4.3-42］

6 例の APDS 患者由来のリンパ球を用いて、内因性に活性化された PI3Kδ に対するレニオリシブの作用を検討した ［Rao VK, 2017］。リンパ球サブセット解析には、ナイーブ B 細胞、移行期 B 細胞、CD57 陽性 T 細胞及び PD-1 陽性 T 細胞を対象として測定した。6 例の被験者全例で、APDS で以前に報告されているように、移行期 B 細胞が相対的に増加し、ナイーブ B 細胞が減少する異常な循環 B 細胞のサブセット分布、T 細胞における老化関連マーカーの発現の増加、健康人と比較した CD4 陽性細胞と CD4 陰性細胞の比率の乱れなどが確認された。レニオリシブで処理すると、上昇した移行期 B 細胞の頻度が減少し、ナイーブ B 細胞の頻度が正常化した。さらに、CD27 陽性 CD38 陽性形質芽球の頻度も 6 例中 4 例で著しく減少した。PD-1 陽性 CD4 陽性（慢性的な活性化疲弊又は循環濾胞ヘルパーT 細胞の増加を反映する）及び CD57 陽性 CD4 陰性 T 細胞（通常、老化と関連する）の頻度は、レニオリシブ処理によって濃度依存的に減少した ［Rao VK, 2017］。

B 細胞の活性化と機能の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

レニオリシブのヒト、カニクイザル、ラット及びマウスの B 細胞に対する機能阻害を表 2.6.2-4 及び表 2.6.2-5 に示す。これらの結果は、PI3Kδ 欠損マウス及び PI3Kδ 阻害剤に関する文献報告と一致していた ［Clayton E, 2002］［Jou ST, 2002］［Okkenhaug K, 2002］。

細胞膜上の B 細胞受容体刺激による B 細胞活性化への影響を評価するため、全血を用いた様々な試験を行った。ヒト、カニクイザル及びラットの全血中の B 細胞を、レニオリシブの存在下で、B 細胞受容体を刺激する抗 IgM 抗体単独（aIgM）又は IL-4 との併用（aIgM/IL-4）で培養した。Akt のリン酸化を指標として阻害作用を評価した。その結果、レニオリシブは、ヒト、カニクイザル及びラットの B 細胞における pAkt の産生を阻害することが示された。さらに、活性化マー

カーCD69（ヒト）及び共刺激分子 CD86（ヒト及びラット）の発現もレニオリシブによって抑制された。（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4 血液中の B 細胞の阻害作用

Matrix	Rat (50% blood)		Cynomolgous monkey (90% blood)	Human (90% blood)		
Stimulus	aIgM/IL-4		aIgM	aIgM/IL-4		aIgM
Readout	CD86 [a]	pAkt [b]	pAkt [c]	CD69 [d]	CD86 [d]	pAkt [e]
IC_{50} (μM)	0.099 ± 0.021	0.150 ± 0.059	0.084 ± 0.028	0.193 ± 0.117	0.202 ± 0.053	0.144±0.013

[a] = Shown data are mean values ± SD of at least six independent experiments; [b] = Shown data are mean values ± SD of at least three independent experiments; [c] = Shown data are mean values ± SD of at least five independent experiments; [d] = Shown data are mean values ± SD of at least four independent experiments;
[e] = Shown data are mean values ± SD of at least two independent experiments.
（試験番号 [redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

マウス脾臓由来 B 細胞の活性化に対するレニオリシブの作用を検討した。脾臓細胞を、レニオリシブ存在下で抗 IgM 抗体により刺激した。24 時間後、CD19 陽性 B 細胞上の CD86 の発現を FACS で定量した。CD86 発現の阻害に基づき、IC_{50} を決定した。さらに、マウス脾臓由来 B 細胞を、レニオリシブ存在下で、抗 IgM 抗体によって B 細胞受容体を介して刺激し、放射性 ^{3}H-チミジンの取り込みによって増殖を評価した。その結果、レニオリシブは抗 IgM 抗体により誘導される B 細胞の活性化及び増殖を阻害した（表 2.6.2-5）。

リポ多糖類（LPS）により誘導される B 細胞機能を、[Moon HB, 1989] に従って評価した。Balb/c nu/nu マウスから単離した脾臓由来 B 細胞を、レニオリシブ存在下で、mIL-4、mIL-5 及び LPS で培養した。培養 6 日後の上清の抗体産生量を酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法で定量した。その結果、レニオリシブは *in vitro* で LPS/IL-4 による IgM 抗体の産生を阻害することが示された（表 2.6.2-5）。

マウス脾臓細胞を用いて、TLR-7 及び TLR-9 リガンド誘発性サイトカインに対するレニオリシブの作用を検討した。C57BL/6 マウスの脾臓細胞を、TLR-7 アゴニスト ssRNA40 オリゴ又は TLR-9 アゴニスト CpG1826 オリゴと一晩培養した。その後、主に B 細胞によって産生される上清中の IL-6 の量を ELISA 法で測定した。マウス脾臓由来の B 細胞による TLR-7 及び TLR-9 誘導性 IL-6 産生は、レニオリシブによって阻害された（IC_{50} はそれぞれ 0.047μM 及び 0.097 μM）（表 2.6.2-5）。

サイトカイン産生と抗原提示に対するレニオリシブの阻害作用について、鶏卵リゾチーム（HEL）特異的 BcR トランスジェニックマウスから単離した B 細胞を用いて以下のように試験を実施した。MD4.B10.BR マウスの脾臓から精製した 10^{6} 個の CD19 陽性 B 細胞を、レニオリシブの存在下で 100 μM の HEL タンパク質と培養した。一晩培養後、MHC クラス II（I-Ak）に提示された処理抗原を、FACS によりペプチド/MHC 特異的 Aw3.18.14 抗体で定量した。IL-6 と TNFα の産生については、MD4.B10.BR マウスから精製した CD19 陽性 B 細胞を HEL タンパク質で処理した。48 時間後、培養上清を回収し、ELISA 法で IL-6 及び TNFα を定量した。どちらのアッセイにおいても、レニオリシブを HEL タンパク質で刺激する 30 分前に添加した。

その結果、レニオリシブは B 細胞による MHC クラス II 上の抗原提示を阻害し、IC_{50} は 0.395 μM であった。また、レニオシリブの IL-6 及び TNFα の産生阻害に対する IC_{50} は 0.030 μM 未満であ

った（表 2.6.2-5）。

表 2.6.2-5　B 細胞機能の阻害

Matrix	Mouse spleen					Mouse BCR transgenic (tg) B cell		
Stimulus	aIgM		LPS / IL-4	TLR-7 agon. [e]	TLR-9 agon. [f]	HEL protein		
Readout	CD86 [a]	Prolif. [b]	IgM [c]	IL-6 [c]	IL-6 [c]	APC function [d]	IL-6 [d]	TNFα [d]
IC_{50} (μM)	0.048 ± 0.008	0.008 ± 0.006	0.234	0.047	0.097	0.395 ± 0.005	0.022 ± 0.001	0.028 ± 0.027

[a] = Shown data are mean values ± SEM of at least eight independent experiments; [b] = Shown data are mean values ± SEM of at least three independent experiments; [c] Shown data are from one experiment; [d] = Shown data are mean values ± SEM of at least two independent experiments; [e] = ssRNA40; [f] = CpG 1826. Agon. = agonist; APC = antigen presenting cells; BRC = B cell receptor; HEL = Hen egg lysozyme; IL-6 = interleukin 6; IgM = immunoglobulin M, LPS = lipopolysaccharide solution; TNFα = tumor necrosis factor α; Prolif. = proliferation.

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

活性化 B 細胞の免疫グロブリン産生とクラススイッチングに対する作用

［参考資料：資料番号 4.3-5］

In vitro 活性化ヒト B 細胞及び PI3Kδ の機能獲得（GOF）型の変異を持つ $Pik3cd^{E1020K}$ GOF マウス B 細胞に対するレニオリシブの作用を検討した［Avery DT, 2018］。FACS（蛍光活性化細胞選別）を用いて、ヒト PBMC 又は $Pik3cd^{E1020K}$ GOF のマウス脾臓から B 細胞を単離した。CD40L/IL-21 で刺激した B 細胞をレニオリシブ存在下で培養し、免疫グロブリン（Ig）の産生とクラススイッチングを評価した。健康ヒト由来の B 細胞による IgM と IgG の産生の濃度依存的増加が認められたが、$Pik3cd^{E1020K}$ GOF B 細胞による IgM 産生には影響がなかった。一方、クラススイッチされたアイソタイプ IgG と IgA の産生の有意な増加が認められた。これは、$Pik3cd^{E1020K}$ GOF マウス B 細胞におけるクラススイッチの不全が、レニオリシブにより完全に回復したことを意味する。

T 細胞機能の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

T 細胞の増殖及び分化に対するレニオリシブの作用を検討した。野生型マウス脾臓細胞及びヒト PBMC を用いてレニオリシブ存在下の混合リンパ球反応（MLR）により *in vitro* における同種 T 細胞活性化を評価した。CD3 及び CD28 の共刺激により T 細胞受容体を介したヒト T 細胞の増殖を ^{3}H-チミジンの取り込みにより測定した。

表 2.6.2-6 に示すように、マウス脾臓細胞又はヒト PBMC を用いて評価した MLR は、レニオリシブにより阻害され、IC_{50} はそれぞれ 0.033 μM 及び 0.079 μM であった。抗 CD3 刺激によるヒト PBMC からの T 細胞の増殖阻害に対する IC_{50} は 0.159 μM であった。ヒト T 細胞では、共刺激による PI3Kδ への依存性は減少し（IC_{50} は 1.15 μM）、文献の結果と一致していた［Okkenhaug K, 2002］。

表 2.6.2-6　T 細胞機能の阻害

Matrix	Mouse spleen	Human PBMC		
Target T-Cell	T + B cell	T cell	T cell	T cell
Stimulus	Allo MLR [a]	Allo MLR [a]	Anti-CD3 [b]	Anti-CD3/anti-CD28 [b]
Readout	Proliferation [c]			
IC_{50} (µM)	0.033 ± 0.01	0.079 ± 0.052	0.159 ± 0.052	1.15 ± 0.659

[a] = Shown data are the mean of at least four independent experiments with SEM; [b] = Shown data are the mean of at least two independents experiments with SEM; [c] = measured as ^{3}H-thymidine uptake.

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

ヒト T 細胞の分化に対するレニオリシブの作用を検討した。健康ドナー血液のバフィーコートから単離した CD4 陽性 T 細胞を CD3 抗体及び CD28 抗体で刺激し、Th_1、Th_2 又は Th_{17} 誘導条件下で培養した。分化誘導後 72 時間の時点で、ヒト IFN-γ、IL-13 又は IL-17A 産生を ELISA 法によって測定した。

マウス脾臓由来の精製 CD4 陽性 T 細胞を、Th_1、Th_2 又は Th_{17} を誘導するサイトカインの存在下で、CD3 抗体及び CD28 抗体で刺激した。72 時間培養後、Th_1、Th_2 又は Th_{17} 細胞からそれぞれ産生されたマウス IFN-γ、IL-13 又は IL-17A サイトカインを ELISA 法で定量した。

その結果、レニオリシブは、マウス及びヒトの Th_1、Th_2 及び Th_{17} 細胞への分化を抑制し、それらに対する IC_{50} は、0.130 µM 以下であった（表 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7　T 細胞分化に対する阻害

Matrix	Mouse spleen cells			Human PBMC	
Diffentiation to	Th1	Th2	Th17	Th2	Th17
Stimulus	Anti-CD3/anti-CD28				
Added factors	Anti-IL-4, IL-12	Anti-IFNγ, IL-4	IL-6, TGFβ, anti-IFNγ, anti-IL-4	Anti-IFNγ, IL-4	IL-6, TGFβ, IL-1β, IL-23
Readout	IFNγ	IL-13	IL-17	IL-13	IL-17
Leniolisib IC_{50} (µM)	0.130	0.010	0.101	0.095 ± 0.084[a]	0.073 ±0.034[a]

Shown results are data from one experiment; [a] = Shown results are mean data from four independent experiments ± SEM

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

その他の免疫細胞の機能の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

B 細胞及び T 細胞以外の免疫細胞の機能に対するレニオリシブの作用を調べるため、マウス BMMC、ヒト末梢血単核細胞由来初代 pDC 及びヒト全血を用いて評価した。

BMMC における PI3Kδ 依存的活性化を、マウス幹細胞因子（SCF）で刺激後に測定した。SCF は、肥満細胞が発現する c-Kit（SCF 受容体、CD117）に結合し、肥満細胞の接着、遊走、増殖及び生存を促進するサイトカインである。マウスの肥満細胞は、以下のように調製した。骨髄細胞を C57BL/6 マウスの大腿骨から採取し、m-IL3 を 2～3 日ごとに供給し、懸濁細胞を 1 週間に 1 回継代培養した。c-Kit 及び Fcε 受容体の両方を発現する細胞集団として BMMC を FACS で同定した結果、培養細胞集団は 90%を超える肥満細胞を含んでいた。この BMMC をレニオリシブ存在

下で培養し、PI3Kγ 経路をアデノシンの添加により刺激した。刺激処理後に細胞を溶解し、pAkt の産生を BMMC 活性化の指標として測定した。その結果、SCF によって誘導されたマウス BMMC の活性化はレニオリシブにより阻害され、IC_{50} は 0.042 μM であった（表 2.6.2-8）。

TLR9 リガンド刺激後のヒト初代培養 pDC の IFNα 産生を測定した。ヒト PBMC から調整した pDC をレニオリシブ存在下で培養し、次に細胞を TLR-9 アゴニスト CpG2216 で刺激した。培養 20 時間後、上清中の IFNα レベルを、ヒトインターフェロン AlphaLISA キットを用い定量した。pDC による TLR-9 リガンド誘導性 IFNα 産生は、レニオリシブによって阻害され、IC_{50} は 0.033 μM であった（表 2.6.2-8）。

全血から採取したヒト好塩基球の活性化と脱顆粒を測定した。イネ科花粉又はイエダニアレルゲンに加え、FcεR を架橋し、抗 IgE 抗体で細胞を活性化した。脱顆粒は、IgE 陽性細胞における CD63 発現として FACS により測定した。また、全血から単離したヒト好中球の酸化バーストを検討した。細胞培養液にホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン（fMLP）を刺激剤として加えた。末梢血から分離したヒト好中球の呼吸バーストを可視化するために、ルシゲニン（硝酸ビス-N-エチルアクリジウム）を基質とした化学発光を測定した。全血から単離したヒト単球の酸化バーストを、酸化添加色素の存在下で FACS により測定した。

レニオリシブは、アレルゲン誘発性ヒト好塩基球の活性化と脱顆粒を中程度に阻害した（IC_{50} は 0.424 μM）。また、レニオリシブは、ヒト好中球及び単球の fMLP 誘発酸化バーストを強く阻害し、IC_{50} は、それぞれ 0.061 μM 及び 0.100 μM 未満であった（表 2.6.2-8）。

表 2.6.2-8 自然免疫担当細胞への作用

Matrix	Mouse BMMC [a]	Human PBMC	Human whole blood		
Target cell	Mast cell	Isolated pDC	Basophil	Neutrophil	Monocytes
Stimulus	SCF	TLR9 agon.[b]	Anti-IgE[c]	fMLP[c]	fMLP[d]
Readout	pAkt	IFNα	CD63	Oxidative burst	Oxidative burst
leniolisib IC_{50} (μM)	0.042 ± 0.048	0.033 ± 0.003	0.424 ± 0.081	0.061 ± 0.073	<0.100

[a] = Bone marrow-derived mast cells, shown data are mean value ± SD of at least eight independent experiments; [b] = shown data are mean value ± SD of at least three independent experiments; [c] = Formyl- methionyl-leucyl-phenylalanine, shown data are mean value ± SD of at least two independent experiments; [d] = Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, shown data is from one experiment.

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

2.6.2.2.3 *In vivo* 薬理試験

レニオリシブの *in vivo* における作用と選択性を評価した。

2.6.2.2.3.1 レニオシリブのメカニズムモデルにおける評価

ラットにおけるヒツジ赤血球に対する抗体反応

［試験番号[redacted]20[redacted]-00469、資料番号 4.2.1.1-7］

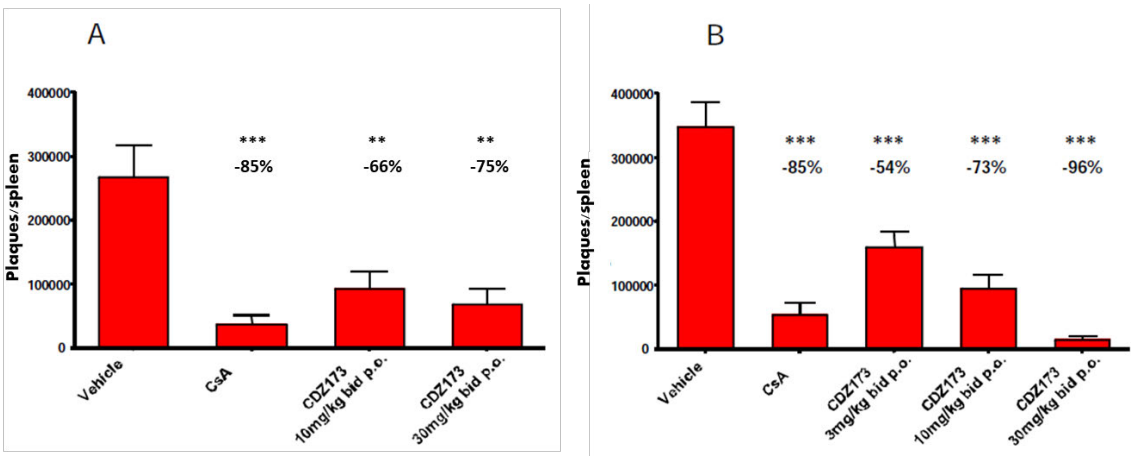
ヒツジ赤血球（SRBC）で免疫した雌性アルビノ OFA ラットを用いて、レニオリシブの、抗原特異抗体応答への作用を検討した。

1 群 5 匹の OFA ラットに 2 × 10^8/mL の SRBC を 0.5 mL の容量で静脈内投与し抗原免疫を行っ

た。抗原免疫の日から 4 日間、レニオリシブ（3、10 及び 30 mg/kg）を 1 日 2 回経口投与した。5 日目に、脾臓の抗 SRBC 産生プラーク形成細胞（PFC）数を *ex vivo* 溶血プラーク形成アッセイで分析した。溶媒及びシクロスポリン A（陽性対照、6 mg/kg、1 日 1 回）を、対照として 4 日間投与した。

図 2.6.2-2 は、独立した 2 回の試験結果を示す。SRBC に対する特異的抗体反応（IgM）のレニオリシブによる用量依存的な阻害が認められた。低用量の 3 mg/kg（1 日 2 回）投与群からプラーク形成細胞に対する有意な阻害作用が認められた。3、10 及び 30 mg/kg/日の投与量で、それぞれ 54%, 73%及び 96%（溶媒対照投与群から得られたデータに対する相対値）の抑制が示された。

図 2.6.2-2　ヒツジ赤血球に対する抗体産生の阻害



bid = 1 日 2 回; p.o. = 経口投与。
各群 5 匹のラットにヒツジ赤血球（SRBC）を免疫し、免疫当日からレニオリシブ（CDZ173）、シクロスポリン A（CsA）又は溶媒対照を 4 日間投与した。5 日目に、脾臓の SRBC 特異的 B 細胞をプラーク形成アッセイで定量した。独立した 2 回の試験結果（A 及び B）を示す。グラフは、脾臓あたりのプラーク数の平均値及び標準偏差並びに溶媒対照投与群に対する阻害率の計算値を示す。** $p < 0.01$、*** $p < 0.001$
（試験番号 [redacted]20[redacted]-00469、資料番号 4.2.1.1-7）

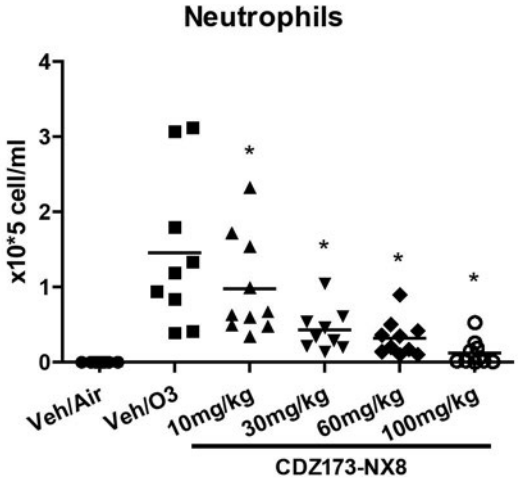
マウス気管支肺胞洗浄液（BAL）におけるオゾン誘発性好中球浸潤

［試験番号 [redacted]20[redacted]-00419、資料番号 4.2.1.1-6］

雄性 C57BL/6 マウスを用いたオゾン誘発性急性肺炎モデルにおいて、レニオリシブをオゾン曝露の 1 時間前と 4 時間後に投与した（10、30、60 及び 100 mg/kg）。投与終了後に、気管支肺胞洗浄を実施し、オゾン曝露の終了から 24 時間後に分画細胞数を測定した。

レニオリシブは用量依存的にオゾンによる BAL 好中球数の増加を抑制し、ED_{50} は 16 ± 1 mg/kg であった（図 2.6.2-3）。オゾン誘発性血漿漏出に対する影響について、BAL 洗浄液中のアルブミン値の測定により検討したが、レニオリシブは効果を示さなかった。

図 2.6.2-3　マウス肺におけるオゾン誘発性好中球浸潤の阻害



Neutrophils = 好中球。
各群 9～10 匹の雄性 C57BL/6 マウスを用い、空気曝露（Veh/Air）またはオゾン暴露（3 ppm を 4 時間）を行った。オゾン曝露群には、媒体またはレニオリシブ（CDZ173-NX8）を曝露前または 4 時間後に投与した。データは、BAL 中の好中球数の個別値（ドット）及び平均値（バー）を示す。
* 溶媒を投与してオゾンに曝露させた群（Veh/O_3）に対して有意差あり（$p < 0.05$）。
（試験番号[redacted]20[redacted]-00419、資料番号 4.2.1.1-6 Figure 3-1 より改変）

2.6.2.2.3.2　レニオシリブの疾患モデルを用いた評価

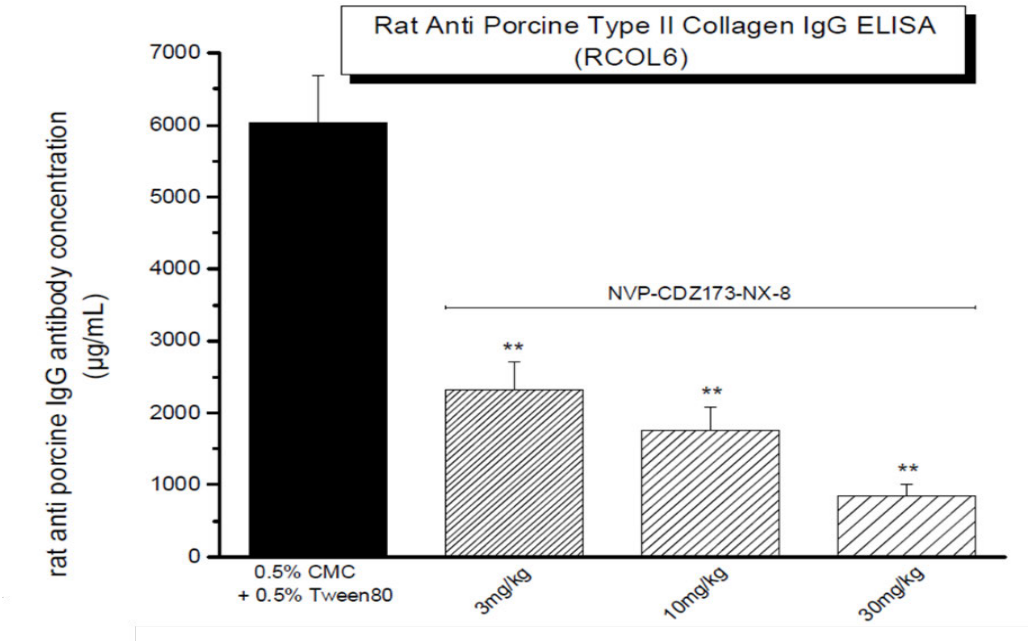
レニオリシブのラットコラーゲン誘発関節炎（rCIA）への予防的投与

［試験番号[redacted]20[redacted]-00135、資料番号 4.2.1.1-5］

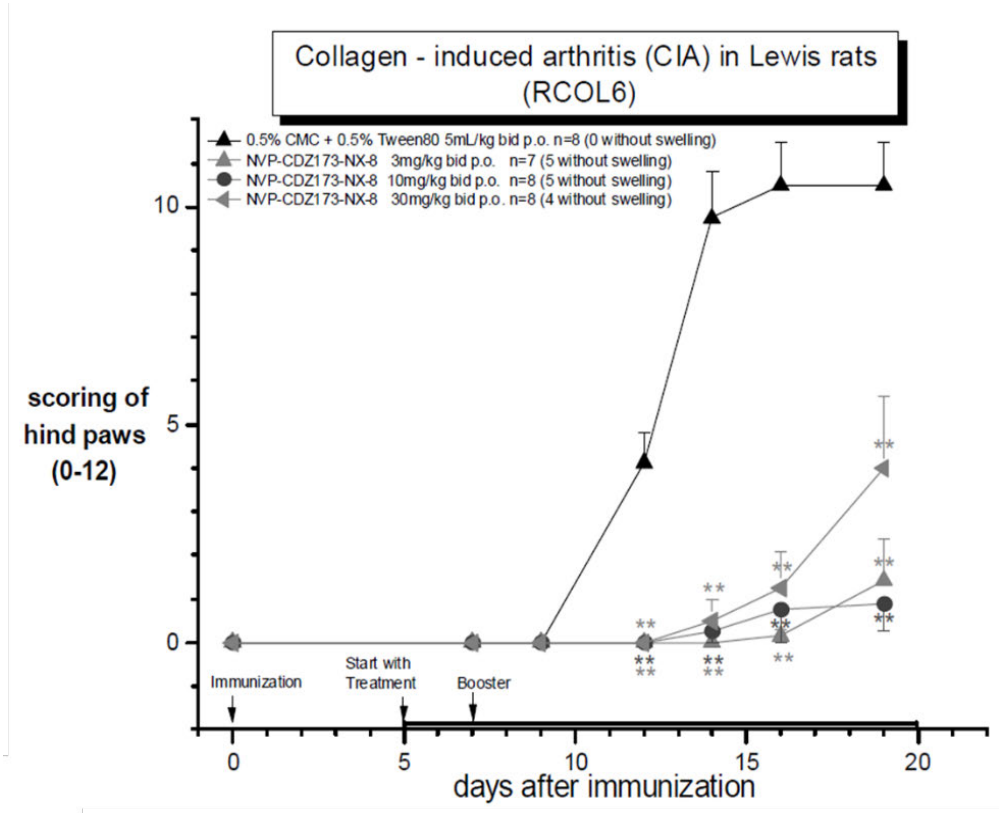
APDS は機能獲得型の PI3Kδ 遺伝子変異が主要な病因であるため、この遺伝子変異により活性化した PI3Kδ 経路を抑制することが病態の改善において有益であると考えられる。そこで、B 細胞による抗コラーゲン抗体の産生は PI3Kδ 活性に依存するため、ラットのコラーゲン誘発関節炎モデルを用いてレニオリシブの薬理作用を評価した。レニオリシブの B 細胞に対する阻害作用を評価するために自己抗体産生と臨床症状及び組織学的パラメータとの相関を解析した。麻酔した雌 Lewis ラットの尾根部に、フロイント不完全アジュバント（IFA）とブタ II 型コラーゲンのエマルジョンを、0 日目及び 7 日目（追加免疫）に投与し、免疫した。レニオリシブは、3、10 及び 30 mg/kg を 1 日 2 回、各投与群 8 匹のラットに経口投与した。レニオリシブの投与は追加免疫の 2 日前に開始し、19 日目まで続けた。後足の腫脹のスコアは、ラット 1 匹につき 0～12 の複合スケールで行い、中足骨領域は片足を 0～3 点、足首は片足を 0～3 点で評価した。これは、片足あたり最大スコア 6 となる。使用したスコアリングシステムは以下のとおり。0＝検出可能な炎症徴候なし、1＝軽度の腫脹部位、2＝中等度のより明らかな腫脹部位、3＝強直又は重度の腫脹部位。足のスコアを合計し、個々の動物の合計スコアを求めた。さらに、後足の病理組織検査を行った。その結果、レニオリシブは、病原性抗ラットコラーゲン抗体の産生（図 2.6.2-4 a）及び後足腫脹（図 2.6.2-4 b）を溶媒投与群と比較して統計学的に有意に抑制した。組織学的解析では、レニオリシブは、後足の炎症性細胞の浸潤、プロテオグリカンの減少及び関節びらんを抑制した（図 2.6.2-4 c）。これらの結果から、レニオリシブは、rCIA モデルにおいて抗コラーゲン抗体の発現と病態を抑制し、3 mg/kg、1 日 2 回、15 日間の強制経口投与という低用量で有効であることが示された。

図 2.6.2-4　ラットコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるレニオリシブ予防的投与の有効性

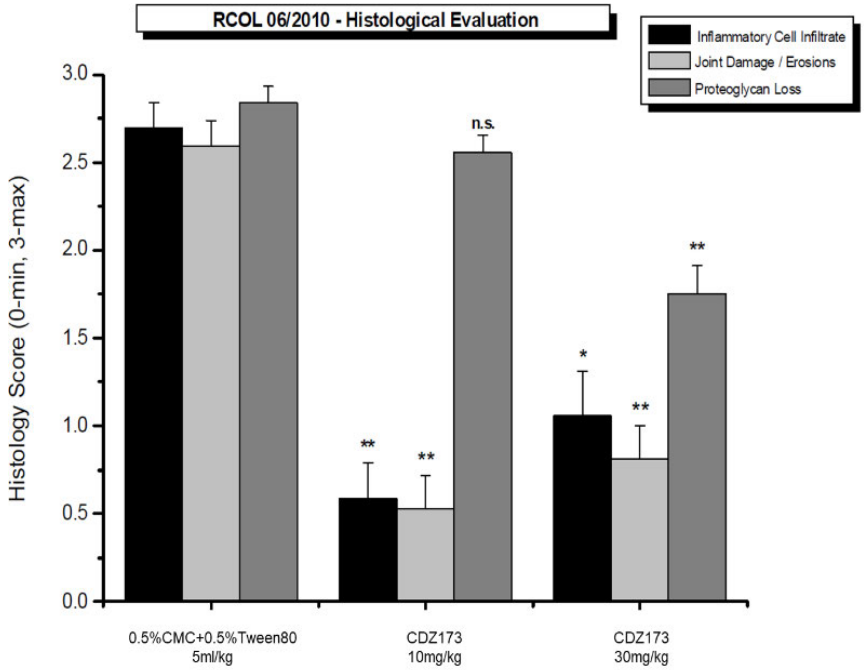
a)　Anti-rat collagen IgG antibodies



b)　Paw swelling



c) Detailed histological analysis



bid = 1 日 2 回; p.o. = 経口投与。
各群 7～8 匹のラットを、フロイント不完全アジュバント（IFA）中のブタ II 型コラーゲンで 0 日目に免疫し、7 日目に追加免疫した。レニオリシブ（NVP-CDZ173-NX-8 又は CDZ173）の 1 日 2 回強制経口投与を 5 日目に開始し、19 日目の試験終了時点まで継続した。グラフは、19 日目の血清中の抗ラットコラーゲン IgG 抗体（a）、実験の経過に伴う足蹠の腫脹（b）、炎症細胞浸潤、骨侵食、プロテオグリカン喪失の程度を評価した病理組織学的解析（c）を示している。
n.s. = 統計的有意差なし； * p <0.05、**p <0.01

（試験番号[redacted]20[redacted]-00135、資料番号 4.2.1.1-5）

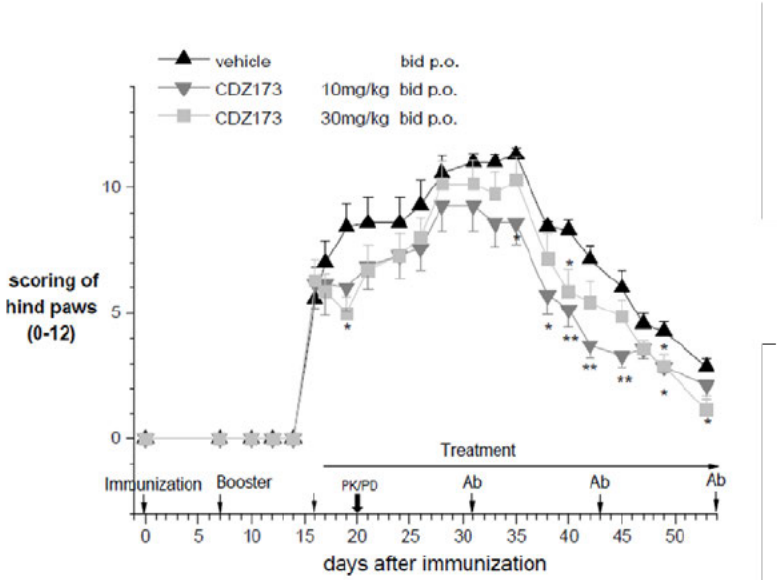
レニオリシブのラットコラーゲン誘発関節炎（rCIA）への治療的投与

［試験番号[redacted]20[redacted]-00785、資料番号 4.2.1.1-9］

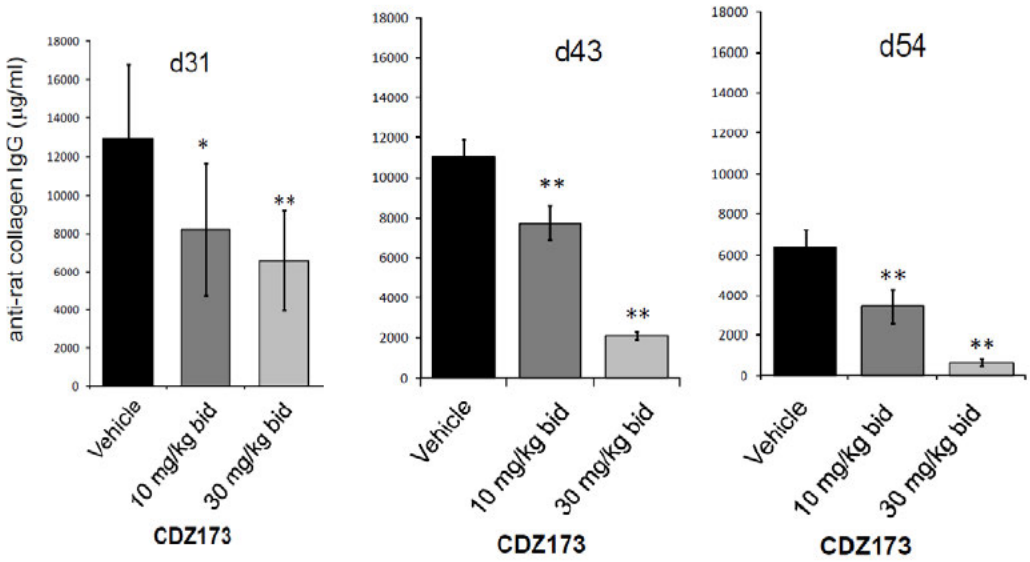
rCIA モデルにおいて自己抗体産生が誘導された後の有効性を評価するために、レニオリシブの治療的投与による試験を実施した［4.2.1.1-9］。予防的投与［4.2.1.1-5］と同様に雌性 Lewis ラットを使用した。十分な数の動物が初回免疫後に関節炎の徴候を示した時点（16 日目）で、腫脹スコアの平均値が同様になるよう 1 群 7 匹の群に無作為割付を行った。レニオリシブの投与を治療的投与設定として 16 日目から開始し、54 日目まで継続して、10 又は 30 mg/kg、1 日 2 回の用量で強制経口投与した。腫脹は週に 3 回スコア化した。血清を採取し、抗コラーゲン抗体を ELISA 法で測定した。その結果を図 2.6.2-5 に示した。その結果、レニオリシブは 10 及び 30 mg/kg、1 日 2 回の治療的投与により、足の腫脹を抑制し（図 2.6.2-5 a）、自己抗体反応を用量依存的に減少させた（図 2.6.2-5 b）。

図 2.6.2-5　ラットコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるレニオリシブ治療的投与の有効性

a)　Paw swelling



b)　Anti-rat collagen IgG antibodies



bid =　1 日 2 回; p.o. =　経口投与。
各群 7 匹のラットを、フロイント不完全アジュバント（IFA）中のブタ II 型コラーゲンで 0 日目に免疫し、7 日目に追加免疫した。レニオリシブ（CDZ173）の投与（10 又は 30 mg/kg、1 日 2 回、強制経口投与）を、ラットに顕著な足の腫脹が生じた 16 日目に開始し、54 日目の試験終了時まで続けた。グラフは試験期間中の後足のスコア（図 5a）と、31 日目、43 日目、54 日目の血清中の抗ラットコラーゲン IgG 抗体（Ab）を示す（図 5b）。
* p <0.05、**p <0.01

（試験番号[redacted]20[redacted]-00785、資料番号 4.2.1.1-9）

2.6.2.2.4　その他の薬理試験

2.6.2.2.4.1　薬物動態学的/薬力学的関係

［試験番号[redacted]20[redacted]-00108、資料番号 4.2.1.1-4］
［試験番号[redacted]20[redacted]-00087、資料番号 4.2.1.1-2］
［試験番号[redacted]20[redacted]-00088、資料番号 4.2.1.1-3］

In vitro におけるレニオリシブの薬物動態学的/薬力学的（PK/PD）関係を評価するためヒトヘパ

リン処理血液にレニオリシブを添加し、培養した。FACS による細胞表面活性化マーカーの解析のため、測定検体は B 細胞マーカーであるヒト CD19、CD86 及び CD69 の組み合わせで染色した。B 細胞受容体を介した B 細胞の活性化は、PI3Kδ 依存的に pAkt レベルを上昇させ、CD69 と CD86 細胞表面マーカーの発現を増加させる。レニオリシブは、抗 IgM 抗体及び rIL-4 刺激により誘導される B 細胞の CD69 及び CD86 の発現を阻害し、それぞれの IC_{50} は 0.193 ± 0.117 μM 及び 0.203 ± 0.053 μM であった［4.2.1.1-4］。

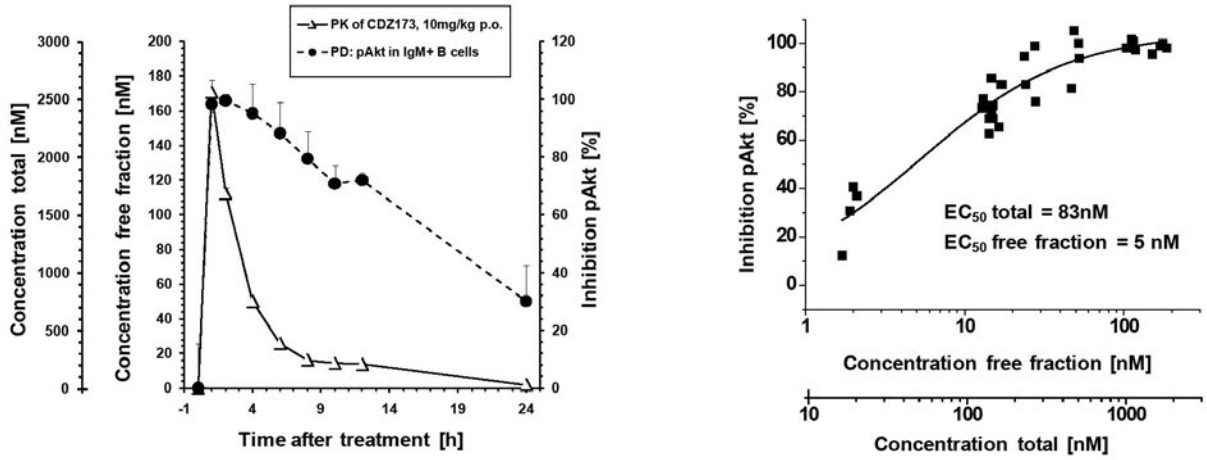
レニオリシブの *in vivo* での PK/PD 関係を評価するため、雄性 Lewis ラットにレニオリシブを 10 mg/kg 単回経口投与し、投与前と投与後の複数の時点で採血した。PD バイオマーカーの発現とレニオリシブレベルの変化を測定した。抗 IgM 抗体及び rIL-4 刺激により誘導される pAkt を PD マーカーとして使用し、FACS 解析を実施した［4.2.1.1-2］。

PK 分析のために、各サンプルの一定分量を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（LC-MS-MS）により測定した。PD 解析では、全血を抗ラット IgM 及び rIL-4 で刺激した。陰性対照に刺激なしのサンプルを準備した。FACS により、これらの IgM 陽性 B 細胞の pAkt を解析した。

PK 分析の結果を図 2.6.2-6 左図に示した。レニオリシブは 60 分後に 2.66 ± 0.11 μM の最大血中濃度に達した。PK は短い吸収相と分布相及びその後の緩やかな消失相を示した。PD の観点から、レニオリシブはラットの *ex vivo* 誘導 B 細胞活性化も濃度及び時間依存的に阻害した（図 2.6.2-6 右図）。最大阻害は薬剤投与 2 時間後に認められ、Akt リン酸化阻害率は 99.6%であった。6, 12 及び 24 時間後には、それぞれ 88.2%, 72.1%及び 30.2%の阻害率を示した。

レニオリシブの Akt リン酸化阻害が最大の 1/2 となる血中化合物濃度（EC_{50}）を計算すると 83 nM（遊離画分 5 nM）であった。

図 2.6.2-6 ラットにおけるレニオリシブの PK/PD



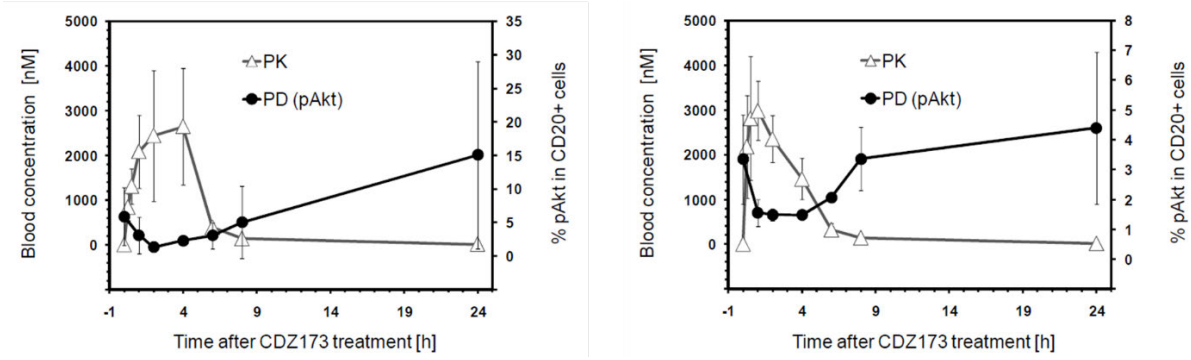
p.o. = 経口投与。
左図は、レニオリシブ（CDZ173）の平均血中濃度（薬物動態プロファイル；PK）を空三角+SEM で示し、*ex vivo* で誘導された Akt リン酸化を黒丸+SD で示す。右図は、各時点における個々のラットの曝露量-PD（Akt リン酸化阻害）相関を、全レニオリシブ及び遊離画分の近似 EC_{50} 曲線とともに示す。

（試験番号 [redacted]20[redacted]-00087、資料番号 4.2.1.1-2 Figure 3-4 及び 3-5）

カニクイザル 3 匹（雄 1 匹、雌 2 匹）で PK/PD 試験を実施した［4.2.1.1-3］。サルにレニオリシブを、懸濁液として 10 mg/2 mL/kg を単回経口投与し、14 日間の休薬後、溶液として 10 mg/2 mL/kg を単回経口投与した。各投与後、血中薬物濃度を測定し、*ex vivo* 活性化血液でレニオリシブの薬理作用を評価した。各時点で 90%の末梢全血を抗 IgM 抗体で刺激し、FACS により pAkt を測定した。

レニオリシブの血中濃度は、懸濁液で投与した場合は 2～4 時間で最大値に達し、溶液で投与した場合は 1 時間で最大値に達した。この結果は、レニオリシブが CD20 陽性 B 細胞の活性化を時間及び用量依存的に阻害することを示している。B 細胞の活性化を投与後 6～8 時間にわたって有意に阻害した。これらの結果より、pAkt 阻害とレニオリシブの曝露量には良好な相関が認められ、抗 IgM 抗体刺激後の活性化 B 細胞における Akt リン酸化を使用して、PI3Kδ 特異的阻害剤レニオリシブによる標的阻害の程度と期間を検出できることを示している。図 2.6.2-7 に、サル 3 匹の群平均の PK データ及び PD データを示した。

図 2.6.2-7 カニクイザルにおけるレニオリシブの PK/PD



各群 3 匹のカニクイザルに 10 mg/kg のレニオリシブ（CDZ173）を単回経口投与した。指示された時点で 90%全血を採血し、抗 IgM 抗体で刺激し、FACS で pAkt をデュプリケイトで測定した。レニオリシブの血中濃度（PK）を LC-MS-MS により測定した。グラフは、懸濁液中（左）と溶液中（右）のレニオリシブの平均曝露量（PK）と平均 pAkt レベル（PD）の経時的な重ね合わせを示す（バーは標準偏差）。

（試験番号 [redacted]20[redacted]-00088、資料番号 4.2.1.1-3）

2.6.2.3 副次的薬理試験

レニオリシブのオフターゲット作用の概要を下記に示す。

2.6.2.3.1 PI3K 関連酵素の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

PI3K の 3 クラス以外に PI3K と類似した触媒コアを含む PI3K 関連酵素が多数存在する。これらには、mTOR などのシグナル伝達に関連する酵素や、ATM、ATR 及び DNA-PK などのキナーゼを含む DNA 損傷への応答に関与する酵素が含まれる。普遍的に発現する mTOR は、細胞成長、細胞増殖、細胞運動性、細胞生存及びタンパク質合成を制御する。PI3K に関連する PI4K ファミリーのメンバーは、エキソサイトーシスと細胞内輸送に重要な役割を果たすことが知られているホスホイノシチドの合成の第一段階を触媒する。

Vps34、PI4Kβ 及び mTOR の組み換えタンパク質に対するレニオリシブの *in vitro* における生化学的活性を検討した。レニオリシブの Vps34 及び PI4Kβ に対するキナーゼ阻害活性は、n-オクチルグルコシド（OG）中の PI を基質として、ATP による発光アッセイ（KinaseGlo）を用いて、また、組換え mTOR に対する阻害活性は、4EBP-1 のリン酸化を測定する TR-FRET 法を用いて測定した。Vps34、mTOR 及び PI4K に対して試験を実施した結果、レニオリシブの IC_{50} はいずれも 9.1 µM を超えていた。レニオリシブの DNA-PK に対する IC_{50} は 0.88 µM であった。しかし、この阻害は、DNA 修復経路の下流にあるがん抑制遺伝子 p53 の発現阻害には至らなかった（表 2.6.2-9）。

表 2.6.2-9 PI3K 関連酵素の阻害

Enzyme	IC_{50} (µM)	Selectivity of PI3Kδ
Vps34	>9.1[a]	>910-fold
mTOR	>9.1[a]	>910-fold
DNA-PK	0.88	88-fold
PI4K	>9.1[a]	>910-fold

[a] Values are mean of at least 4 independent measurements

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

2.6.2.3.2 その他の脂質キナーゼ、タンパク質キナーゼ、プロテアーゼの阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

他のキナーゼ及びプロテアーゼファミリーに対するレニオリシブの網羅的な選択性を決定するために、プロテアーゼのパネルと 47 のセリン/スレオニン及びチロシンキナーゼに対して、10 µM のレニオリシブを用いて評価した。その結果、レニオリシブは、これらのアッセイにおいて 10 µM を超える IC_{50} を示した。

さらに、KINOMEScan で、442 のセリン/スレオニン、チロシン及び脂質キナーゼに対して、10 µM のレニオリシブを用いてスクリーニングした。その結果、クラス I の PI3K アイソフォームに加えて、レニオリシブによって阻害された唯一のキナーゼは RPS6KA5 であった（76%阻害）。この阻害は、レニオリシブの安全性試験及び臨床試験での使用を妨げるものではないと考えた。結果を表 2.6.2-10 示す。

表 2.6.2-10　その他のキナーゼ及びプロテアーゼの酵素阻害

Assay	Result
[redacted] Protease panel	IC_{50} all >10 µM
Extended Kinase panel [a]	IC_{50} all >10 µM; Exception: RPS6KA5 (76% inhibition at 10 µM)

[a] = KINOMEScan on 442 kinases; tested at 10 µM. Appendix 8.1 of 4.2.1.1-1

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

2.6.2.3.3　受容体とイオンチャネルのプロファイル

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

レニオリシブの細胞内受容体及びイオンチャネルに対するオフターゲット作用を調べるため、心筋イオンチャネル Nav1.5 及び Cav1.2a、P5 受容体パネルに対して、Ricerca/MDS では 82 の受容体及びイオンチャネルのパネルに対してスクリーニングした。

レニオリシブは、心筋のイオンチャネル Nav1.5 と Cav1.2 及び 82 の受容体及びイオンチャネルからなる Ricerca パネルを阻害しなかった（表 2.6.2-11）。10 µM では、レニオリシブは G タンパク質共役型受容体 GPR8 に対してのみ有意な阻害を示した（72%阻害）。

表 2.6.2-11　受容体とイオンチャネルの酵素阻害

Assay	Result
Cardiac ion channels Nav1.5 and Cav1.2 Receptors and ion channels (Ricerca/MDS panel) [a]	IC_{50} >50 µM IC_{50} all >10 µM Exception: GPCR GPR8 (72% inhibition at 10 µM)

[a] = Ricerca panel of 82 receptors and ion channels. Appendix 8.2 of 4.2.1.1-1

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

2.6.2.3.4　成長因子を介した増殖の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

成長因子を介した増殖に対するレニオリシブのオフターゲット作用を調べるため、マウスの大腿骨と脛骨から骨髄細胞を調製した。骨髄細胞を組換えマウス IL-3 を含む培地で培養した。3 倍希釈を 7 段階実施し、全サンプルを 2 回繰り返して測定した。細胞を 4 日間培養後、IL-3 誘導性増殖を DNA への ^{3}H-チミジン取り込みを指標として評価した。IC_{50} は、4 パラメータのロジスティック曲線近似関数を用いて用量反応曲線から導き出した。さらに、レニオリシブに関して、IL-3 に完全に依存するヒト赤白血病細胞株 TF-1 の増殖に対する影響も検討した［Kitamura T, 1989］。

試験の結果、レニオリシブは、IL-3 刺激マウス骨髄細胞及び IL-3 誘導ヒト赤白血病細胞株 TF-1 の増殖を阻害し、IC_{50} はそれぞれ 2.3 µM 及び 7.4 µM であった（表 2.6.2-12）。これらの結果より、レニオリシブの一般的な成長因子を介した増殖に対する影響は認められなかった。

2.6.2.3.5　腫瘍抑制因子の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

腫瘍抑制因子 p53 は DNA 損傷などの過剰なストレスシグナルによって活性化され、アポトーシス又は DNA 修復を引き起こす。レニオリシブによる p53 の阻害を、ストレス負荷した p53RE-bla HCT116 レポーター細胞株を用いて評価した。その結果、レニオリシブは p53 の有意な阻害を示さなかった（表 2.6.2-12）。

2.6.2.3.6 *In vitro* におけるグルコース代謝の阻害

［試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1］

インスリン経路に対するレニオリシブの作用を評価するため、インスリンによる活性化後のインスリン受容体（InsR）と InsR 下流のリン酸化状態を評価した。A14 細胞を培養し、飢餓状態にした後、レニオリシブ（0.0006～10 μM）で 1 時間処理し、更に 300 ng/mL のインスリンで 30 分間刺激した。細胞溶解液を調製し、Zeptochips にスポットし、Akt、Erk、GSK3 及び S6rp のリン酸化を分析した。その結果、レニオリシブは、インスリン受容体シグナル伝達経路に対して低い阻害活性を示した（表 2.6.2-12）。

PI3K/Akt 経路の p110α は、特に脂肪細胞及び筋肉組織へのグルコース輸送を仲介することによって、グルコース代謝に重要な役割を果たす。そこで、*In vitro* で分化させた 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、グルコース取り込みに対するレニオリシブの作用を検討した。その結果、レニオリシブは、A14 細胞の InsR シグナル伝達及び 3T3-L1 脂肪細胞のグルコース代謝に対する阻害を示さず、IC_{50} はそれぞれ 1.72 μM 及び 1.5 μM であった（表 2.6.2-12）。

表 2.6.2-12 細胞レベルのオフターゲットアッセイ

Assay	IC_{50} (μM)
mBM prol.[a]	2.32 ± 0.56[d]
huTF-1 prol.[b]	7.4
p53[c]	>3
InsR pathway[e]	1.72
Glucose uptake[f]	1.50

[a] = IL-3 induced mouse bone marrow proliferation; [b] = IL-3 induced human erythroleukemic TF-1 cell line proliferation; [c] = Stressed p53RE-bla HCT116 reporter cell line; [d] = Values are mean ± SEM of 5 independent measurements, values >10 μM taken as 10 μM for mean value calculation; [e] = pAkt in insulin-stimulated A14 cells; [f] = 2-deoxyglucose uptake in 3T3-L1 adipocytes

（試験番号[redacted]20[redacted]-00084、資料番号 4.2.1.1-1）

2.6.2.3.7 *In vivo* におけるグルコース代謝の阻害

［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.2-1］

雄性 C57BL/6J マウスにレニオリシブを 1 日 1 回、強制経口投与（容量 5 mL/kg）し、グルコース及びインスリン負荷試験を行った。動物には、0（溶媒のみ）、30 又は 100 mg/kg/日の用量で、単回投与（雄 12 匹/群）又は 15 日間連続反復投与（雄 12 匹/群）を実施した。投与 1 日目又は 15 日目の投与終了前に、グルコース（経口）又はインスリン（腹腔内）を動物に負荷し、負荷後に得られた血清サンプルのグルコース及びインスリン濃度を測定することにより、インスリン機能とグルコースの調節を評価した。投与 1 日目にインスリン及びグルコース負荷試験を完了した動物は、それ以上の検査を行わずに試験を終了した。投与 15 日目に肉眼による検査を含む剖検を行った。膵臓、肝臓及び肉眼的異常を示す臓器/組織に対して顕微鏡検査を実施した。さらに、投与 15 日目には、曝露量測定のために投与約 3 時間後に採血を行った。

死亡例及び一般状態所見はなく、摂餌量への影響も認められなかった。100 mg/kg/日投与群の雄 3 例において、投与期間終了時に軽微な体重減少が記録された。

経口グルコース負荷試験及び腹腔内インスリン負荷試験では、100 mg/kg/日投与時の 1 日目と 15 日目にインスリン非感受性/抵抗性が認められた。

30 及び 100 mg/kg/日では、膵臓及び肝臓に関連する肉眼的又は顕微鏡的所見は認められなかっ

た。レニオリシブのマウス血漿中濃度は、投与量の増加とともに上昇した。反復投与しても、投与初日と比較して曝露量に明確な差は認められなかった。

結論として、レニオリシブの 30 又は 100 mg/kg/日を単回又は 15 日間反復投与した場合、臨床的忍容性は良好であり、被験物質に関連した一般状態、摂餌量への影響は認められず、100 mg/kg/日の雄個体では軽微な体重減少のみが認められた。経口グルコース負荷試験及び腹腔内インスリン負荷試験の結果、100 mg/kg/日の単回及び反復投与により、インスリン非感受性/抵抗性が示されたが、病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

標準的な *in vitro* 及び *in vivo* の心血管系、中枢神経系及び呼吸器系の安全性薬理試験を実施した。概要を表 2.6.2-13 に示す。

表 2.6.2-13 安全性薬理試験の概要

Test system/ Species	Route of administration	Organ systems evaluated	Concentration (µM) / Dose[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Results	Study number/ CTD Location	GLP
hERG assay	*In vitro*	Cardiovascular	3, 10 and 30	-	IC_{50}: 17 µM	[redacted] [4.2.1.3-1]	No
hERG assay	*In vitro*	Cardiovascular	10 and 30	-	42.8% at 30 µM IC_{50}: >30 µM	[redacted] [4.2.1.3-2]	No
hERG assay	*In vitro*	Cardiovascular	up to 100	-	IC_{50}: 11.9 µM	[redacted] [4.2.1.3-6]	Yes
Monkey	Oral (gavage)	Cardiovascular	50, 100 and 150	4 M	QTc prolongation at 150 mg/kg NOAEL at 100 mg/kg	[redacted] [4.2.1.3-3]	No
Monkey	Oral (gavage)	Cardiovascular	50, 100 and 150	4 M	QTc prolongation at 150 mg/kg NOAEL at 100 mg/kg	[redacted] [4.2.1.3-4]	Yes
Rat (Wistar)	Oral (gavage)	CNS/Resp.[b]	300	10 M	No effects	[redacted] [4.2.1.3-5]	Yes

[a] Single dose unless specified otherwise; [b] CNS = central nervous system / Resp. = Respiratory system;
no. = number; - = not applicable; M = male; QTc = corrected QC interval; NOAEL = no observed adverse effect level; GLP = Good Laboratory Practice

2.6.2.4.1 *In vitro* 心血管系安全性試験

［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.3-2］
［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.3-1］
［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.3-6］

In vitro におけるレニオリシブの心血管系への安全性を、hERG を発現する HEK293 細胞を用いたパッチクランプ法により評価した。その結果、予備試験では、レニオリシブは 10 及び 30 µM で hERG 活性をそれぞれ 13.0%及び 42.8%阻害した［4.2.1.3-2］。追加実験では、レニオリシブは hERG 活性を阻害した（IC_{50} は 17 µM）［4.2.1.3-1］。本試験（GLP）ではレニオリシブの hERG 阻害活性

の IC50 は 11.9 μM と判断された［4.2.1.3-6］。

2.6.2.4.2 *In vivo* 心血管系安全性試験

［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.3-3］
［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.3-4］

非 GLP 試験において、レニオリシブは溶媒中の懸濁液として、あらかじめテレメトリー発信器を装着した雄性サルに強制経口投与した。4 x 4 のラテン方格クロスオーバー法を用いた。4 匹の雄性サルに、溶媒、50 mg/kg（技術的問題のため 1 匹を除く）、100 mg/kg 及び 150 mg/kg の被験物質を、各投与間隔を少なくとも 3 日間空けて投与した。対照動物には溶媒を投与した。容量は 5 mL/kg とした。レニオリシブ 150 mg/kg の単回経口投与により、可逆的な QTc 延長が認められた（群平均 32 ms、13%まで）。群平均 QTc の上昇は投与の約 4～14 時間後に認められた。本試験における無影響量（NOEL）は 100 mg/kg であった。レニオリシブは血圧、心拍数、体温、PR、QRS に影響を及ぼさず、被験薬に関連した不整脈は認められなかった［4.2.1.3-3］。

次に、4 匹の雄性サルに、溶媒及び/又はレニオリシブを 50、100 及び 150 mg/kg、容量 5 mL/kg で単回経口投与し、各投与間隔に 7 日間の休薬期間を挟み、4 × 4 のクロスオーバー法を完了した。レニオリシブの単回経口投与では、最大 100 mg/kg の用量レベルにおいて、被験物質に関連した血行動態及び心電図上の変化は認められなかった。150 mg/kg の投与後、4 例中 1 例に明確な可逆的 QTc 延長が認められた。さらに他の 1 例で QTc 延長の可能性が認められたが、ばらつきの大きさを考慮すると、レニオリシブの影響とは断定できなかった。レニオリシブの経口投与による質的な心電図異常は認められなかった［4.2.1.3-4］。

2.6.2.4.3 *In vivo* 中枢神経系及び呼吸器系の安全性試験

［試験番号[redacted]、資料番号 4.2.1.3-5］

レニオリシブの中枢神経系及び呼吸機能への影響を評価するため、雄性アルビノラットに単回強制経口投与を行った。機能観察総合評価（FOB）では、20 匹の雄性 Wistar Hannover ラットを 2 つの投与群に割り付け、10 匹の雄性ラットに溶媒/対照を単回経口投与し、10 匹の雄性ラットにレニオリシブの 300 mg/kg を単回経口投与した。7～8 日間の休薬後、FOB 評価の対照動物と予備動物を呼吸分時換気量（RMV）に割り当て、各群 5 匹の雄性ラットに、投与間に 7 日間を挟むクロスオーバー法デザインに従って、溶媒及びレニオリシブの 300 mg/kg を投与した。

その結果、レニオリシブ投与に関連した一般状態及び定量的及び定性的機能観察バッテリー（FOB）パラメータへの影響は認められなかった。さらに、呼吸パラメータ（一回換気量、呼吸数、分時換気量）には影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験を実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

PI3Kδ は主に免疫細胞に発現し、B 細胞と T 細胞の抗原受容体を含めた受容体型チロシンキナーゼの下流で作用する。また、PI3Kδ は共刺激受容体 CD40、好塩基球上の FcγR、肥満細胞上の c-kit、TLR9、又はサイトカイン IL-4 の受容体の下流のシグナル伝達にも部分的に関与する。

In vitro においてレニオリシブは、PI3Kα、β、及びγアイソフォームよりも PI3Kδ を強く選択的

に阻害した。細胞レベルでは、レニオリシブはB細胞の活性化、増殖、サイトカイン産生、抗原提示及び抗体産生などのPI3Kδに依存した機能を強力に阻害した。また、レニオリシブは、FcγRを介したヒト好塩基球の活性化と脱顆粒、TLR9リガンド誘発性pDCによるIFNγ産生、ヒト好中球及び単球のfMLP誘発性酸化バースト、及びc-kitを介した肥満細胞の活性化も阻害した。

*In vivo*ではレニオリシブは、免疫ラットにおける抗体産生の阻害、マウスにおけるオゾン誘発性好中球浸潤の阻害などAPDSに関連した指標においても効果を示した。さらに、レニオリシブは、ラットのコラーゲン誘発関節炎の予防的投与及び治療的投与において病態を改善した。

ラット及びカニクイザルの試験で示されたように、*ex vivo*で刺激されたB細胞のpAkt産生は、レニオリシブによって濃度依存的に阻害された。そして、阻害作用は血中のレニオリシブ曝露量と相関した。これらのアッセイは、全血アッセイとして使用することが可能であり、臨床試験においてレニオリシブの標的の阻害作用を評価することができる。pAktに加えて、*ex vivo*刺激時のCD86及びCD69などの表面活性化マーカーの発現も測定できる。さらに、PI3Kδ阻害の影響を、PI3Kδ依存性が報告され、APDSで役割を果たしている様々な免疫細胞サブセットの機能と関連付けるために、追加のFACSアッセイを探索的に適用することも考えられる。これらには、T細胞受容体を介した*ex vivo*刺激後のT細胞の活性化、増殖、サイトカイン産生、*ex vivo*で好塩基性顆粒球上のFcγR刺激によるCD63発現、又は*ex vivo*でのfMLP刺激による好中球の酸化バーストなどがある。このような免疫細胞の機能に対するレニオリシブの影響を評価することで、ヒト標的疾患におけるPI3Kδの生物学をより深く理解することができる。

次に、CD57陽性CD3陽性老化T細胞はAPDS患者でしばしば増加し、APDSの臨床症状の1つである。これらの細胞もレニオリシブの投与により改善する傾向にある。老化T細胞はテロメアの短縮を特徴とする。全リンパ球のテロメア短縮は、APDSの高齢患者と若年患者各1例で以前に報告されている。APDS患者のナイーブCD8陽性T細胞では、年齢をマッチさせた対照細胞のものと比較して、テロメアの絶対長が短いことが報告されている［Singh A, 2020］。

レニオリシブは、標的とは無関係のプロテインキナーゼ、プロテアーゼ、受容体及びイオンチャネルに対して高い選択性を示し、*in vitro*での安全性プロファイルが良好であると考えられる。一般的な成長因子を介した増殖に対する影響は認められず、p53の阻害も認められなかった。レニオリシブ存在下でのインスリン受容体及びグルコース代謝の評価では、*in vitro*でのインスリン受容体及びグルコース代謝に対する有意な阻害作用は認められなかった。*In vivo*では、マウスに100 mg/kg/日を単回及び反復投与後にインスリン非感受性/抵抗性が認められたが、関連する病理組織学的変化は認められなかった。

レニオリシブのhERG活性に対するIC_{50}は11.9 μM（5.4 μg/mL）であった。レニオリシブによるhERG活性の阻害は心室再分極を遅延させ、トルサード・ド・ポアント（TdP）を引き起こす可能性がある。さらに、カニクイザルではQT延長が認められた（［4.2.1.3-3］及び［4.2.1.3-4］）。これらの試験において、150 mg/kgの単回経口投与により、約4時間から14時間においてベースライン調整後の溶媒対照投与群と比較して、QTcの一過性の延長が観察され、その平均は32 msであった。これらの結果より、レニオリシブはQTの延長を引き起こす可能性が示唆された。

安全性薬理試験では、レニオリシブはラットの中枢神経系及び呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

以上、これらの非臨床薬理試験の結果から、レニオリシブはPI3Kδに対する選択的な阻害剤であり、APDSに対する有効な治療薬になると考えられた。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に示した。

2.6.2.8 参考文献

Angulo I, Vadas O, Garçon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, et al.: Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. Science. 2013; 342(6160): 866-871.

Avery DT, Kane A, Nguyen T, Lau A, Nguyen A, Lenthall H, et al.: Germline-activating mutations in PIK3CD compromise B cell development and function. J Exp Med. 2018; 215(8): 2073-2095.

Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A, et al.: A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. J Exp Med. 2002; 196(6): 753-763.

Crank MC, Grossman JK, Moir S, Pittaluga S, Buckner CM, Kardava L, et al.: Mutations in PIK3CD can cause hyper IgM syndrome (HIGM) associated with increased cancer susceptibility. J Clin Immunol. 2014; 34(3): 272-276.

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, et al.: Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. Science. 2000; 287(5455): 1049-1053.

Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Carpino N, et al.: Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. Mol Cell Biol. 2002; 22(24): 8580-8591.

Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, et al.: Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. J Cell Physiol. 1989; 140(2): 323-334.

Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D.: Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. Science. 2000; 287(5455): 1046-1049.

Lucas, C.L., Kuehn, H.S., Zhao, F., Niemela, J.E., Deenick, E.K. and Palendira, U. et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. Nature Immunology. 2014; 15(1): 88-97.

Moon HB, Severinson E, Heusser C, Johansson SG, Möller G, Persson U.: Regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 in mouse B cells. Scand J Immunol. 1989; 30(3): 355-361.

Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, et al.: Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. Science. 2002; 297(5583): 1031-1034.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, et al.: PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. Cell. 2004; 118(3): 375-387.

Rao VK, Webster S, Dalm V, Sediva A, van Hagen PM, Holland S, et al.: Effective "activated PI3Kdelta syndrome"-targeted therapy with the PI3Kdelta inhibitor leniolisib. Blood. 2017; 130(21): 2307-2316.

Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, et al.: Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. Science. 2000; 287(5455): 1040-1046.

Singh A, Joshi V, Jindal AK, Mathew B, Rawat A.: An updated review on activated PI3 kinase delta syndrome (APDS). Genes Dis. 2020; 7(1): 67-74.

Takashima T, Tsujita Y, Yeh TW, Mitsuiki N, Kanegane H, Kracker S, et al.: Clinical and immunological features of patients with gain-of-function PIK3CD mutations in Japan. 16th European society for immune-deficiencies. Prague, Czech Republic: ESID-0778. 2014.

レニオリシブリン酸塩

ジョエンジャ®錠 10 mg

ジョエンジャ®錠 30 mg

ジョエンジャ®錠 70 mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

株式会社オーファンパシフィック

略号一覧表

略語・用語	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
APDS	Activated PI3Kδ syndrome	活性化 PI3Kδ 症候群
BAL	Bronchoalveolar lavage	気管支肺胞洗浄
BCR	B-cell receptor	B 細胞受容体
BID	Bis in die	1 日 2 回
EC_{50}	Half maximal effective concentration	50%有効濃度
ED_{50}	Half maximal effective dose	50%有効用量
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
GOF	Gain-of-function	機能獲得
HEL	Hen egg lysozyme	鶏卵リゾチーム
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IFNα	Interferon α	インターフェロン α
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
MIP-1α	Macrophage inflammatory proteins-1α	マクロファージ炎症性タンパク質-1α
MHC	Major histocompatibility complex	主要組織適合性複合体
mTOR	Mammalian target of rapamycin	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
pAkt	Phosphorylated Akt	リン酸化 Akt
PASLI	p110δ-Activating mutation causing senescent T-cells, lymphadenopathy, and immunodeficiency	老化 T 細胞、リンパ節症及び免疫不全を引き起こす p110δ-活性化変異（APDS の別名）
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PD	Pharmacodynamic(s)	薬力学
pDC	Plasmacytoid dendritic cell	形質細胞様樹状細胞
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	ホスホイノシチド 3 キナーゼ
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
rCIA	Rat collagen-induced arthritis	ラットコラーゲン誘発関節炎
rIL-4	Rat interleukin-4	ラットインターロイキン-4
SCF	Stem cell factor	幹細胞因子
SRBC	Sheep red blood cell	ヒツジ赤血球
Th_1, Th_2, Th_{17}	Type 1, Type 2 and Type 17 helper T-cells	1 型、2 型及び 17 型ヘルパーT 細胞
TLR	Toll-like receptor	Toll 様受容体
TNFα	Tumor necrosis factor α	腫瘍壊死因子 α
wt	Wild-type	野生型

目次

頁

略号一覧表 2
2.6.3 薬理試験の概要表 4
2.6.3.1 薬理試験一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.3.3 副次的薬理試験 13
2.6.3.4 安全性薬理試験 16
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用 18
2.6.3.6 参考文献 18

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Primary Pharmacodynamics					
Potency and Selectivity for PI3Kδ (inhibition of PI3K isoforms)	Cell-free enzymatic assays	*in vitro*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00084	[4.2.1.1-1]
	Rat-1 cells transfected with human myr-p110 PI3K isoforms				
	Rat-1 fibroblast cells expressing the different mutant PI3Kδ enzymes described in APDS/PASLI (i.e. point mutations: N334K, C416R, E525K, or E1021K)	*In vitro*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00588	[4.2.1.1-8]
Effects on immune cell functions *in vitro*	Whole blood of rat, cynomolgus monkey and human (B cell activation after BCR stimulation)	*in vitro*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00084	[4.2.1.1-1]
	Mouse B cells (activation, CD86 expression, after BCR stimulation)				
	Mouse B cells (proliferation after BCR stimulation)				
	Mouse B cells (LPS-induced antibody production *in vitro*)				
	Mouse spleen cells (TLR7/9 -induced IL-6 production by B cells).				
	Mouse BCR transgenic B cells (antigen presentation and cytokine production)				
	Human and mouse mixed lymphocyte reaction (MLR) assay (Peripheral Blood Mononuclear cells; PBMCs)				
	Human T cell proliferation (PBMCs)				
	Human and mouse $CD4^+$ T cell differentiation (CD3- and CD28-specific antibody stimulation under Th1, Th2 or Th17 polarizing conditions)				
	Murine bone marrow mast cell activation				
	Human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) Inhibition of TLR9 ligand activation.				

表 2.6.3.1-2　薬理試験一覧表（続き）

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	CTD Location
Effects on immune cell functions *in vitro*	Human basophils (FcεR crosslinking-mediated activation)	*in vitro*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00084	[4.2.1.1-1]
Effects on immune cell functions *in vivo*	Albino OFA rats (antigen-specific antibody generation towards Sheep Red Blood Cells; SRBC)	*In vivo / ex vivo*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00469	[4.2.1.1-7]
	C57BL/6 mice (Ozone induced neutrophil infiltration in bronchoalveolar lavage)	*In vivo*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00419	[4.2.1.1-6]
PI3Kδ target engagement	Collagen-induced arthritis (rCIA) model in Lewis rats	*In vivo*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00135	[4.2.1.1-5]
	rCIA model in Lewis rats	*In vivo*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00785	[4.2.1.1-9]
PK/PD relationship	Peripheral human whole blood (activation of B cells)	*in vitro*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00108	[4.2.1.1-4]
	Lewis rats (*ex vivo* B cell activation after single oral gavage)	*In vivo / ex vivo*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00087	[4.2.1.1-2]
	Cynomolgus monkey (*ex vivo* B cell activation after single oral gavage)	*In vivo / ex vivo*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00088	[4.2.1.1-3]

表 2.6.3.1-3 薬理試験一覧表（続き）

Secondary Pharmacodynamics					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number**	**CTD Location**
Enzymatic inhibition of related enzymes	Cell-free enzymatic assays	*in vitro*	[redacted]	[redacted]20[redacted]-00084	[4.2.1.1-1]
Protease and kinase screen	Cell-free enzymatic assays on proteases and 47 kinases				
KINOMEScan	Cell-free enzymatic assays on 442 kinases				
Cardiac ion channels screening	Cell-free enzymatic assays				
Ricerca/MDS 82 panel receptors and ion channels screening	Cell-free enzymatic assays				
[redacted]P5 Receptor profile	Cell-free enzymatic assays				
Inhibition of growth-factor-mediated proliferation	Mouse bone marrow cells and human TF-1 cells				
Inhibition of tumor suppression proteins	p53RE-bla HCT116 reporter cells				
Inhibition of glucose metabolism	Insulin stimulated A14 cells and 3T3-L1 adipocytes				
Glucose and insulin tolerance test	C57/BL/6 mice, 2-week repeated dose, 30 and 100 mg/kg/day oral gavage	*In vivo*	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.2-1]

表 2.6.3.1-4 薬理試験一覧表（続き）

Safety pharmacology					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Study Number**	**CTD Location**
Central nervous system	Respiratory evaluations in male Crl:WI(Han) rats	*in vivo*	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-5]
Cardiovascular system	IK assay: hERG potassium channels expressed in HEK293 cells	*in vitro*	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-2]
		in vitro	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-1]
		in vitro	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-6]
	Effects on cardiovascular system in conscious male cynomolgus monkeys	*in vivo*	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-3]
		in vivo	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-4]
Respiratory system	Respiratory evaluations in male Crl:WI (Han) rats	*in vivo*	[redacted]	[redacted]	[4.2.1.3-5]
Pharmacodynamic drug interactions					
No pharmacodynamic drug interactions studies were performed					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験の概要

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location (Reference)
Cell-free enzymatic profiling of relevant target PI3Kδ	NA	*in vitro*	NA	NA	PI3Kδ has an IC_{50} of 11 nM and a selectivity window of 28-fold over PI3Kα, of 43-fold over PI3Kβ and of 257- fold over PI3Kγ.	No	[4.2.1.1-1]
Rat-1 cells transfected with human myr-p110 PI3K isoforms (PI3Kα, β and δ). U397 monocytes activated by MIP-1α (PI3Kγ)	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib shows potency and selectivity for inhibition of PI3Kδ (IC_{50} of 56 nM) with 29, 42 and >132-folds over PI3Kα, PI3Kβ and PI3Kγ respectively.	No	[4.2.1.1-1]
Adenosine-induced C57/Bl6 mouse bone marrow-derived mast cells (PI3Kγ)	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib shows 138-fold selectivity for PI3Kδ over PI3Kγ activity.	No	[4.2.1.1-1]
Rat-1 fibroblast cells expressing the different mutant PI3Kδ enzymes described in APDS/PASLI (point mutations: N334K, C416R, E525K, or E1021K)	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib inhibits wild type PI3Kδ (IC_{50} = 0.205 µM) and "gain-of-function" PI3Kδ mutants with IC_{50} = 0.05, 0.064, 0.087 and 0.128 µM for C416R, E1021K, N334K, and E525K, respectively.	No	[4.2.1.1-8]
Human lymphocytes from APDS patients and $Pik3cd^{E1020K}$ GOF murine B-cells	NA	*in vitro*	NA	NA	Pre-incubation with leniolisib reduced the increased levels of pAkt and pS6. Mutations of PI3Kδ do not interfere with inhibitor binding or function.	No	[4.3-5] (Avery DT, 2018) [4.3-49] (Rao VK, 2017)

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
B-cell activation after BCR stimulation in whole blood from rat, cynomolgus monkey and human	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib inhibits the phosphorylation of Akt, the expression of the activation marker CD69 (human) and the costimulatory molecule CD86 (human, rat) in BCR stimulated B cells.	No	[4.2.1.1-1]
Mouse Splenocytes: B cell activation and proliferation	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib inhibits anti-IgM-induced B cell activation and proliferation with an IC_{50} of 0.048 and 0.008 µM, respectively.	No	[4.2.1.1-1]
Mouse Splenocytes: LPS-induced Ab production in B cells	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib inhibits, LPS/IL-4-induced production of IgM antibody with an IC_{50} = 0.234 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Mouse Splenocytes: TLR 7/9-induced IL-6 production by B cells	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib inhibits TLR 7/9-induced IL-6 production with IC_{50} = 0.047 µM and 0.097 µM, respectively.	No	[4.2.1.1-1]
Isolated B cells from hen egg lysozyme (HEL)-specific	NA	*in vitro*	NA	NA	Antigen presentation on MHC class II by B cells.	No	[4.2.1.1-1]
In vitro activated human B cells and $Pik3cd^{E1020K}$ GOF mice B cells	NA	*in vitro*	NA	NA	CD40L/IL-21stimulation increased IgM and IgG secretion by healthy donor B cells. Increased IgG and IgA, but no effects on IgM were observed in Pik3cdE1020K GOF B cells	No	[4.3-5]

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
Mouse and human mixed lymphocyte reaction (MLR) in PBMC and T cell proliferation in human PBMC	NA	*in vitro*	NA	NA	MLR is inhibited in mouse splenocytes and human PBMC with IC_{50} of 0.033 µM and 0.079 µM respectively. In human PBMC the anti-CD3 stimulated T cell proliferation was inhibited with an IC_{50} of 0.159 µM while the inhibition is reduced in the presence of anti CD3/anti CD28 co-stimulation (IC_{50} = 1.15 µM).	No	[4.2.1.1-1]
Mouse and human CD4+ cell differentiation under Th1, Th2 or Th17 polarizing conditions	NA	*in vitro*	NA	NA	Anti-CD3/anti-CD28 mAb-stimulated T cell differentiation is significantly reduced with $IC_{50} \leq$ 0.130 µM (Th1) in mouse splenocytes and ≤ 0.095 µM in human PBMC.	No	[4.2.1.1-1]
Mouse bone marrow-derived mast cells	NA	*in vitro*	NA	NA	Inhibition of murine Stem Cell Factor (SCF) stimulated mast cell activation with IC_{50} = 0.042 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Primary plasmacytoid dendritic cells (pDC) from human PBMC	NA	*in vitro*	NA	NA	TLR9 ligand-induced IFNα production was potently inhibited with IC_{50} = 0.033 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Whole blood human basophil activation and oxidative burst of neutrophils and monocytes	NA	*in vitro*	NA	NA	Basophils, neutrophils, and monocytes were inhibited with IC_{50} = 0.424, 0.061 and < 0.100 µM, respectively.	No	[4.2.1.1-1]

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No./Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**CTD location**
Antibody response to sheep red blood cells (SRBC) in rats	Albino OFA rats	*In vivo* Oral gavage	0, 3, 10 and 30 mg/kg (4 days BID)	Female 5/group	Dose-dependent inhibition of the specific antibody (IgM) response to SRBC; 54, 73 and 96% inhibition at 3, 10 and 30 mg/kg, respectively.	No	［4.2.1.1-7］
Ozone-induced neutrophil infiltration in mouse bronchoalveolar lavage (BAL)	C57BL/6 mice	*In vivo* Oral gavage	0, 10, 30, 60 and 100 mg/kg (BID, 1 day)	Male 9-10/group	Dose-dependent inhibition of ozone-induced increase in BAL neutrophil and macrophage numbers with ED_{50} of 16 ± 1 mg/kg and 40 ± 5 mg/kg, respectively No effect on the ozone-induced plasma leakage, as measured by the increased BAL serum albumin levels.	No	［4.2.1.1-6］
Rat model of collagen-induced arthritis (rCIA) as a model for PI3Kδ target engagement (prophylactic dosing)	Lewis rats	*In vivo* Oral gavage	3, 10 and 30 mg/kg (BID, 14 days)	Female 8/group	Significant inhibition of the formation of pathogenic anti- rat collagen antibodies, paw swelling, inflammatory cell infiltration, proteoglycan loss and joint erosion. Efficacy was already seen at 3 mg/kg.	No	［4.2.1.1-5］

表 2.6.3.2-1 効力を裏付ける試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
Rat model of collagen-induced arthritis (rCIA) as a model for PI3Kδ target engagement (therapeutic dosing)	Lewis rats	*In vivo* Oral gavage	10 and 30 mg/kg (BID, 38 days)	Female 7/group	Leniolisib administered at 10 and 30 mg/kg BID (twice per day) in rats with established CIA leads to a potent inhibition of *ex vivo* stimulated B-cell activation and significant abrogation of the development of pathogenic anti-collagen antibodies. The paw swelling was weakly (17–24%) inhibited at both dose levels with similar degree due to the late administration of leniolisib at Day 16.	No	[4.2.1.1-9]
B cells in peripheral human whole blood	NA	*In vitro*	NA	NA	Leniolisib inhibits anti-IgM/rIL-4 - induced CD69 and CD86 expression on B cells with a mean IC_{50} = 0.193 µM and 0.203 µM, respectively.	No	[4.2.1.1-4]
Ex vivo B cell activation in blood	Lewis rats,	*In vivo* Oral gavage *Ex vivo*	Single dose: 10 mg/kg	Male 4/group	PK / PD correlation (R^2=0.895) was observed through inhibition of pAkt which reached maximal values (99.6%) at 2 hours post drug application and 88.2%, 72.1% and 30.2% at 6, 12 and 24 hours post drug application, respectively. The EC_{50} for pAkt inhibition was 0.083 µM for total drug and 0.0053 µM for the free fraction.	No	[4.2.1.1-2]
Ex vivo B cell activation in blood	Cynomolgus monkey	*In vivo,* Oral gavage *Ex vivo*	Single dose: 10 mg/kg	Male (1)/ Female (2)	PK/PD correlation (R^2 = 0.67) was observed. The EC_{50} for pAkt inhibition was ~0.137 µM for the total drug and 0.0065 µM for the free fraction.	No	[4.2.1.1-3]

2.6.3.3 副次的薬理試験

表 2.6.3.3-1 副次的薬理試験の概要

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
Cell-free enzymatic inhibition of related enzymes	NA	*in vitro*	NA	NA	Vps34, mTOR and PI4Kβ were inhibited with IC_{50} > 9.1 µM. DNA-PK was inhibited with IC_{50} = 0.88 µM, which did not translate to inhibition of p53 expression further down in the pathway of DNA-repair.	No	[4.2.1.1-1]
Cell-free enzymatic protease and kinase screen (47 kinases)	NA	*in vitro*	NA	NA	No proteases and serine/threonine, tyrosine- and lipid kinases inhibition (all IC_{50} > 10 µM).	No	[4.2.1.1-1]
Cell-free enzymatic protease and kinase screen (KINOMEScan) (442 kinases)	NA	*In vitro*	NA	NA	No proteases and serine/threonine, tyrosine- and lipid kinases inhibition (all IC_{50} > 10 µM), except for RPS6KA5 kinase which was inhibited by 76% at 10 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Cell-free enzymatic cardiac ion channel screen	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib did not inhibit cardiac ion channels Nav1.5 and Cav1.2. (IC_{50} > 50 µM).	No	[4.2.1.1-1]

表 2.6.3.3-1 副次的薬理試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
Cell-free enzymatic receptors and ion channel screen Ricerca / MDS panel (82 receptors / ion channels)	NA	*in vitro*	NA	NA	Leniolisib did not inhibit receptors and ion channels (IC_{50} > 10 µM), except for GPR8 (72% inhibition at 10 µM).	No	[4.2.1.1-1]
Mouse bone marrow cells (inhibition of growth-factor-mediated proliferation)	NA	*in vitro*	NA	NA	Low inhibition of proliferation of IL-3-stimulated mouse bone marrow cells. IC_{50} = 2.3 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Human erythroleukemic cell line TF-1 (inhibition of growth- factor-mediated proliferation)	NA	*in vitro*	NA	NA	No significant inhibition of IL-3-induced proliferation in human erythroleukemic cell line TF-1. IC_{50} = 7.4 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Stressed p53RE-bla HCT116 reporter cell line (inhibition of tumor suppression proteins)	NA	*in vitro*	NA	NA	No significant inhibition of p53. IC_{50} > 3 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Insulin stimulated A14 cells (inhibition of glucose metabolism)	NA	*in vitro*	NA	NA	No significant inhibition of insulin receptor signalling (pAKT, pERK, pGSK3, pS6rp); IC_{50} = 1.72 µM.	No	[4.2.1.1-1]
Insulin stimulated 3T3-L1 adipocytes (inhibition of glucose metabolism)	NA	*in vitro*	NA	NA	No significant effect on glucose uptake was observed (IC_{50} = 1.50 µM).	No	[4.2.1.1-1]

表 2.6.3.3-1　副次的薬理試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
Mouse plasma, oral glucose and insulin tolerance test	C57Bl/6J mice	*In vivo* Oral gavage	Single or repeated doses 30, and 100 mg/kg/ day	Male 12/group	Single or 15 day repeated administrations did not show effects on clinical signs or food intake and only minor body weight losses in individual males at 100 mg/kg/day. At 100 mg/kg/day, insulin insensitivity/ resistance was observed on Day 1 and Day 15.	No	［4.2.1.2-1］

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験の概要

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses* (mg/kg)	Gender and No./Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	CTD location
Cardiovascular: IK_r assay: hERG potassium channels expressed in HEK293 cells	NA	*In vitro*	NA	NA	Inhibition of hERG channel activity at 10 and 30 µM by 13.0% and 42.8%, respectively. IC_{50} estimated to be > 30 µM.	No	[4.2.1.3-2]
Cardiovascular: IK_r assay: hERG potassium channels expressed in HEK293 cells	NA	*In vitro*	NA	NA	Inhibition of hERG channel activity at 3, 10 and 30 µM by 17.4, 34.2 and 68.9%, respectively with an IC_{50} of 17 µM	No	[4.2.1.3-1]
Cardiovascular: IK_r assay: hERG potassium channels expressed in HEK293 cells	NA	*In vitro*	NA	NA	Inhibition of hERG channel activity at 3, 10, 30 and 100 µM by 19.3, 42.5, 75.7 and 93.8%, respectively with and IC_{50} of 11.9 µM.	Yes	[4.2.1.3-6]
Cardiovascular: Telemetry in conscious animals	Cynomolgus monkey	*In vivo Oral*	0, 50, 100, 150 mg/kg	Male; 4	Reversible QT prolongation at 150 mg/kg up to a group mean of 32 ms (13%) 4–14 hrs post-dose. No effects on heart rate, blood pressure, PR or QRS intervals or body temperature. NOEL at 100 mg/kg.	No	[4.2.1.3-3]

表 2.6.3.4-1 安全性薬理試験の概要（続き）

Organ Systems Evaluated	**Species/Strain**	**Method of Admin.**	**Doses* (mg/kg)**	**Gender and No./Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**CTD location**
Cardiovascular: Telemetry in conscious animals	Cynomolgus monkey	*In vivo* Oral	0, 50, 100, 150 mg/kg	Male; 4	Reversible QT prolongation at 150 mg/kg in one animal (9 to 58 ms vs baseline at 3 to 12 hours post dose). No effects on heart rate, blood pressure, PR or QRS intervals or body temperature.	Yes	［4.2.1.3-4］
Central nervous system: Neurobehavioral evaluation (functional observational battery)	Wistar Han Rat Crl:WI(Han)	*In vivo* Oral	0, 300 mg/kg	Male; 20 (10/group)	No neurobehavioral or clinical observations.	Yes	［4.2.1.3-5］
Respiratory system: Plethysmography	Wistar Han Rat Crl:WI(Han)	Oral (gavage)	0, 300 mg/kg	Male; 20 (10/group)	No effects on respiratory functions.	Yes	［4.2.1.3-5］

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.3.6 参考文献

Avery DT, Kane A, Nguyen T, Lau A, Nguyen A, Lenthall H, et al.: Germline-activating mutations in PIK3CD compromise B cell development and function. J Exp Med. 2018; 215(8): 2073-2095.

Rao VK, Webster S, Dalm V, Sediva A, van Hagen PM, Holland S, et al.: Effective "activated PI3Kdelta syndrome"-targeted therapy with the PI3Kdelta inhibitor leniolisib. Blood. 2017; 130(21): 2307-2316.