サノフィ株式会社

リルザブルチニブ

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 11

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

表　目　次 3

図　目　次 4

略号と用語の定義 5

1　　緒言 6

2　　薬理学的特性 7

3　　予定臨床適応症、用量及び使用期間 9

4　　非臨床試験プログラム 10

5　　参考文献 11

表　目　次

表 1 - Drug Substance Information 7

図　目　次

図 1 - Rilzabrutinib Freebase Structure 8

略号と用語の定義

BCR	B 細胞受容体（B-cell receptor）
BID	1 日 2 回（Twice a day）
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton’s tyrosine kinase）
FcγR	結晶性フラグメントγ受容体（Fragment crystallizable gamma receptor）
FcεR	結晶性フラグメントε受容体（Fragment crystallizable epsilon receptor）
ITP	免疫性血小板減少症（Immune thrombocytopenia）

1　緒言

リルザブルチニブは、免疫性血小板減少症（ITP）の治療に経口投与で使用する可逆的共有結合型ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）阻害薬である。本薬は BTK に高度の親和性を示すとともに、BTK からの解離が遅いために作用持続時間が長く、標的を長時間占有する。このような親和性により、効果を示す一方で、非特異的なオフターゲット結合による有害作用は最小化されると考えられる。

一次性 ITP は、孤立性の血小板減少症（末梢血血小板数が 100000/μL 未満）を特徴とする獲得免疫疾患である(1)。ITP の原因は不明であるが、病原性の抗血小板自己抗体(2)(3)、T 細胞介在性血小板破壊(4)及び巨核球機能障害(5)が重要な役割を果たしていることが知られている。

BTK は、炎症及び自己免疫に関与する複数の経路で主要な役割を果たしている。BTK は B 細胞受容体（BCR）、結晶性フラグメントγ受容体（FcγR）及び結晶性フラグメントε受容体（FcεR）の下流のシグナル伝達に不可欠な要素である。リルザブルチニブのような強力な BTK 阻害薬は、B 細胞の成熟、自己抗体産生及び貪食細胞介在性血小板破壊など、ITP に関与する複数の免疫機能に対して作用すると考えられる。したがって、リルザブルチニブは ITP の疾患修飾薬として治療効果を発揮する可能性がある。

リルザブルチニブは、マウス ITP モデルにおいて、血小板減少を抑制した。このモデルでは、血小板を標的とする抗 CD41 抗体を注射することにより、血小板破壊が開始される。また、リルザブルチニブは、in vitro 及び in vivo の両方で、自己抗体介在性 FcγR シグナル伝達に対する抑制作用を示すとともに、ラットアルサス反応に対する抑制作用、マウス抗糸球体基底膜抗体誘発腎炎における腎保護作用、並びにラットコラーゲン誘発関節炎モデルにおける臨床スコア及び関節病変に対する用量依存的な減少作用を示した。最後に、別の自己抗体誘発性疾患である落葉状天疱瘡を自然発症した外来家庭犬を対象とした非盲検試験において、リルザブルチニブの治療効果を検討した。リルザブルチニブを投与した大半の動物において、コルチコステロイドの投与を必要とせず、疾患が安全かつ速やかにコントロールされた。

2 薬理学的特性

原薬の情報を表 1 に示す。

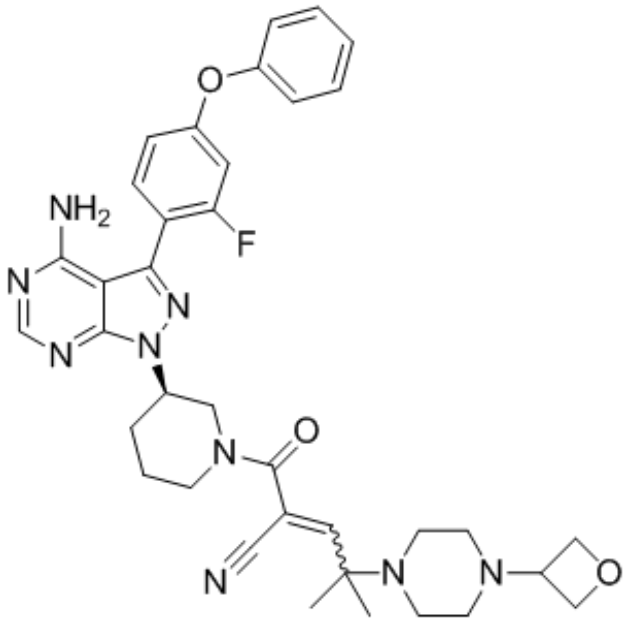
表 1 - Drug Substance Information

Recommended INN:	Rilzabrutinib
Compendia name:	Not available
Chemical or Biological name according to IUPAC and/or CAS:	(R)-2-(3-(4-amino-3-(2-fluoro-4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3, 4-d]pyrimidin-1-yl)piperidine-1-carbonyl)-4-methyl-4-(4-(oxetan-3-yl)piperazin-1-yl)pent-2-enenitrile, (E and Z isomers) 1-Piperidinepropanenitrile, 3-[4-amino-3-(2-fluoro-4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]-α-[2-methyl-2-[4-(3-oxetanyl)-1-piperazinyl]propylidene]-β-oxo-, (3R)-
Molecular formula:	$C_{36}H_{40}FN_9O_3$
Molecular weight:	665.77 gram/mole
Company or laboratory code:	PRN1008, PRN-1008, SAR444671
Other non-proprietary name(s):	PRN1008 Freebase PRN1008 Freebase API LN1 for the E-isomer and LN2 for the Z-isomer
CAS registry number:	1575591-66-0

Abbreviations: API: Active pharmaceutical ingredient; CAS: Chemical abstracts service; INN: International nonproprietary name; IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

リルザブルチニブ遊離塩基の構造を図 1 に示す。リルザブルチニブは R-エナンチオマーの幾何異性体（E 体と Z 体）混合物として存在する。E 体と Z 体は同じ薬理作用を示し、in vivo では容易にそれらの混合物となる（Module [2.6.4]）。

図 1 - Rilzabrutinib Freebase Structure



リルザブルチニブは、BTK を阻害することにより、BCR 及び FcγR のシグナル伝達を阻害する。BTK は非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞内シグナル伝達に不可欠な要素である。B 細胞において、BTK 活性を阻害すると、BCR の阻害に一致する表現型の変化が生じる。BTK は、主に FcγR 及び FcεR のシグナル伝達を介して、好塩基球、肥満細胞、マクロファージ及び好中球といったその他の造血細胞の活性化も制御している。BTK の阻害により、細胞の増殖、分化、成熟、生存及びアポトーシス促進といった様々な免疫細胞活性が抑制される(6)(7)(8)。BTK は T 細胞、ナチュラルキラー細胞及び形質細胞には発現していない(9)(10)。

非臨床試験において、リルザブルチニブは BTK の強力な阻害薬であり、標的を持続的に占有することが示された。速度論的評価により、リルザブルチニブは結合速度が速く、解離速度が遅いことが示された。阻害のメカニズムは、アデノシン三リン酸結合の競合的阻害によるものであった。重要なこととして、リルザブルチニブは BTK のシステインに共有結合するにもかかわらず、リルザブルチニブと BTK との相互作用は完全に可逆的であった。BTK と比較して、その他のオフターゲットキナーゼに対するリルザブルチニブの作用は弱く、阻害作用の持続時間も短かった（すなわち解離速度が速かった）。細胞を用いた試験系において、リルザブルチニブの予想される BCR 及び FcR シグナル伝達に対するオンターゲット作用が確認され、細胞を用いた適切な交差反応性スクリーニングにおいて、オフターゲット活性の欠如が確認された。ラットにリルザブルチニブを投与したとき、循環血から薬物が消失して長時間経過した後でも、in vivo での BTK の占有が持続していたことから、本薬の持続的な薬力学的作用が確認された。新たに落葉状天疱瘡と診断されたイヌにリルザブルチニブを投与したときも、in vivo での持続的な BTK の占有が認められた。

3　予定臨床適応症、用量及び使用期間

リルザブルチニブは、ITP の治療を目的として開発中である。ITP は、血小板の破壊の亢進及び新たな血小板の産生障害を特徴とする自己免疫性出血性疾患である。患者は通常、最初に経口コルチコステロイド及び静注用免疫グロブリンの投与を受ける。

治療の目標は、血小板数の「正常化」ではなく、大出血の予防である。少なくとも症状のある患者に対しては、目標血小板数 20000/μL 超から 30000/μL が維持されるように治療を行う。最新の ITP ガイドライン(11)によると、第 2 選択薬としてトロンボポエチン受容体作動薬及びリツキシマブが推奨されている。初期治療で効果が認められなかった患者には脾臓摘出が推奨されていたが、長期の感染リスクを考慮し、最近、この推奨が変更された。上記の第 2 選択薬による効果が不十分な患者には、アザチオプリン、シクロスポリン A、シクロホスファミド、ダナゾール、ジアフェニルスルホン、ミコフェノール酸モフェチル、リツキシマブ及びトロンボポエチン受容体作動薬（エルトロンボパグ及びロミプロスチム）を投与する。これらの薬剤は、免疫抑制、二次性悪性腫瘍、高血圧及び肝機能障害といった毒性変化を引き起こす可能性がある。また、一部の患者は、既存治療法に対して難治性又は無反応となる場合がある。したがって、この症状に対する治療ニーズは依然として満たされていない。

非臨床試験（Module 2.6）から、自己免疫疾患の治療におけるリルザブルチニブの作用機序、安全性及び忍容性のエビデンスが得られた。In vitro 及び in vivo の薬物動態及び薬力学データを用いて、ヒト初回投与試験における用量を設定するとともに、予想臨床有効用量（400 mg 1 日 2 回［BID］）を決定した。400 mg BID は、第 II 相臨床試験（DFI17124、用量漸増及び拡大パートを含む）及び第 III 相臨床試験（EFC17093、プラセボ対照非盲検継続投与及び長期継続投与パートを含む）で至適用量であることが確認された。

製剤開発及び臨床試験の詳細な考察は、それぞれ Module 2.3 及び Module 2.7 に示す。第 II 相及び第 III 相臨床試験のデータから、ヒト有効用量は 400 mg BID（1 日量 800 mg）であることが確認された。早期臨床試験において、最高 1 日用量 1200 mg までの安全性も確認された。原発性 ITP の生理病理学、患者の出血リスク及びリルザブルチニブの作用機序に基づき、長期投与が予想される。

4　非臨床試験プログラム

本申請資料の非臨床 Module には、ITP 治療薬としてのリルザブルチニブの使用をサポートすることを目的として、リルザブルチニブの薬理、薬物動態（PK）及び非臨床安全性（毒性）プロファイルを評価し特徴づけるための全体的な非臨床試験計画及びリルザブルチニブで実施した非臨床試験プログラムを要約する。薬理、PK 及び毒性試験の詳細な結果は、それぞれ Module [2.6.2]、Module [2.6.4]及び Module [2.6.6]で考察する。

結論として、強力な BTK 阻害薬であるリルザブルチニブについて、これらの非臨床 Module に示す広範な非臨床薬理、PK 及び毒性試験で詳細に検討した。本 Module に記載の非臨床開発プログラムにより、リルザブルチニブが良好かつ安全なプロファイルを有することを示すデータが得られ、ITP 患者に対する 400 mg BID までの用量での長期投与について、臨床での評価及び承認申請を行うことが支持される。

5 参考文献

1. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. Blood. 2009 Mar 12;113(11):2386-93.
2. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. J Lab Clin Med. 1951;38(1):1-10.
3. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. Ann N Y Acad Sci. 1965 Jun 30;124(2):499-542.
4. Olsson B, Andersson PO, Jernås M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LM, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Nat Med. 2003 Sep;9(9):1123-4.
5. Khodadi E, Asnafi AA, Shahrabi S, Shahjahani M, Saki N. Bone marrow niche in immune thrombocytopenia: a focus on megakaryopoiesis. Ann Hematol. 2016 Oct;95(11):1765-76.
6. Neys SFH, Hendriks RW, Corneth OBJ. Targeting Bruton's tyrosine kinase in inflammatory and autoimmune pathologies. Front Cell Dev Biol. 2021 Jun 4;9:668131.
7. Zhang D, Gong H, Meng F. Recent advances in BTK inhibitors for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. Molecules. 2021 Aug 13;26(16):4907.
8. Carnero Contentti E, Correale J. Bruton's tyrosine kinase inhibitors: a promising emerging treatment option for multiple sclerosis. Expert Opin Emerg Drugs. 2020 Dec;25(4):377-81.
9. Sideras P, Smith CI. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. Adv Immunol. 1995;59:135-223.
10. Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. Immunol Rev. 2009 Mar;228(1):58-73.
11. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2019 Dec 10;3(23):3829-66.

サノフィ株式会社

リルザブルチニブ

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 60

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 5

図　目　次 6

略号と用語の定義 7

1　　まとめ 10

1.1　　自己免疫疾患において BTK を標的とする根拠 15

1.2　　リルザブルチニブの作用機序 15

1.3　　非臨床での自己免疫疾患におけるリルザブルチニブの Proof of Concept 16

2　　効力を裏付ける試験 17

2.1　　In vitro 薬理試験 17

2.1.1　　リルザブルチニブのプロテインキナーゼ阻害作用 17

2.1.2　　阻害作用機序 18

2.1.3　　その他のキナーゼ標的に対する結合特性 20

2.1.4　　リルザブルチニブの結合持続性、効力及び選択性に関するセルベースアッセイ 21

2.1.4.1　　細胞内 BTK に対するリルザブルチニブの占有及び結合持続性 21

2.1.4.2　　BCR によるヒト B 細胞活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用 21

2.1.4.3　　ヒト B 細胞増殖に対するリルザブルチニブの阻害作用 22

2.1.4.4　　免疫グロブリン G（IgG）抗体介在性ヒト単球活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用 23

2.1.4.5 免疫グロブリン E（IgE）抗体介在性ヒト好塩基球活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用 23
2.1.4.6 ヒト T 細胞機能に対するリルザブルチニブの作用 23
2.1.4.7 抗体依存性細胞傷害（ADCC） 24
2.1.4.8 非 BCR 誘導性 B 細胞機能に対するリルザブルチニブの作用 24
2.1.4.9 EGFR シグナル伝達に対するリルザブルチニブの作用 25
2.1.4.10 BTK を発現していない細胞に対するリルザブルチニブの細胞傷害性作用の欠如 25
2.1.5 リルザブルチニブの生化学的アッセイ及び細胞アッセイにおける結果の要約 25
2.1.6 代謝物、不純物及び立体異性体の薬理学的プロファイル 26
2.1.6.1 代謝物の薬理学的プロファイル 26
2.1.6.2 不純物の薬理学的プロファイル 27
2.1.6.3 立体異性体の薬理学的プロファイル 28
2.2 In vivo 薬理試験 28
2.2.1 ラット BTK 占有に対するリルザブルチニブの作用 28
2.2.2 ラットコラーゲン関節炎モデルにおけるリルザブルチニブの作用 29
2.2.3 ラット受動的アルサス反応モデルにおけるリルザブルチニブの作用 33
2.2.4 マウス免疫性血小板減少症モデルにおけるリルザブルチニブの作用 34
2.2.5 イヌの自然発症天疱瘡に対するリルザブルチニブの作用 35
2.2.6 マウス受動的皮膚アナフィラキシーモデルにおけるリルザブルチニブの作用 38
3 副次的薬理試験 40
3.1 消化管機能に対する BTK 阻害薬の影響を検討する薬理試験 40
3.1.1 イヌの消化管ホルモンに対するリルザブルチニブの作用 40
3.1.2 ラットにリルザブルチニブを経口投与したときの胃内容排出抑制作用及び空腸内投与したときの作用の欠如 42
3.2 [redacted] in vitro 薬理学的パネルでのリルザブルチニブの評価 44
3.3 健常人ボランティア及び ITP 患者の血小板での血小板凝集に対するリルザブルチニブの作用の欠如 45

4 安全性薬理試験 48

4.1 中枢神経系 48

4.1.1 ラットへの経口投与による Irwin 試験 48

4.2 心血管系 49

4.2.1 hERG チャネルに対するリルザブルチニブの影響の探索的 in vitro 評価 49

4.2.2 hERG チャネルに対するリルザブルチニブの影響の in vitro 評価 49

4.2.3 覚醒イヌに単回経口投与したときの心血管系機能のテレメトリーによる評価 50

4.3 呼吸系 51

4.3.1 覚醒イヌに単回経口投与したときの呼吸機能の評価 51

4.4 腎／泌尿器系 51

4.5 自律神経系 52

4.6 胃腸管系 52

4.7 他の器官系 52

5 薬力学的薬物相互作用試験 53

6 考察及び結論 54

参 考 文 献 58

表 目 次

表 1 - Overview of pharmacology studies 11

表 2 - Potency of rilzabrutinib on BTK and other cross-reacting kinases 18

表 3 - Durability of rilzabrutinib occupancy on BTK and other cross-reacting kinases 20

表 4 - Summary of biochemical and cellular characterization of rilzabrutinib 26

表 5 - BTK potency and durability of rilzabrutinib and metabolites PRN618, PRN834, and PRN4400 27

表 6 - Occupancy of BTK in Lewis and Sprague Dawley rat splenocytes following PO administration of rilzabrutinib 29

表 7 - Rilzabrutinib occupancy in rat splenocytes at 1, 4, 12, and 24 h after last oral dose 33

表 8 - Spleen BTK occupancy in mice treated with rilzabrutinib for 3 days 39

表 9 - Pharmacokinetic parameters of rilzabrutinib in female Wistar Han rats after PO or IJ dosing 43

表 10 - In vitro healthy volunteer platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib 45

表 11 - In vitro ITP patient platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib 46

表 12 - List of safety pharmacology studies 48

表 13 - Cardiovascular and respiratory telemetry study: Summary of TK parameters 50

図 目 次

図 1 - Rilzabrutinib free base structure 10

図 2 - Concentration response curves for inhibition of HWB CD69 expression and BTK occupancy in a representative donor 22

図 3 - Effect of rilzabrutinib on clinical arthritis scores (Ankle score) in the rat collagen-induced arthritis model..... 31

図 4 - Effect of rilzabrutinib on disease reversal in the rat collagen-induced arthritis model 32

図 5 - Effect of rilzabrutinib (PRN1008) on the rat passive Arthus reaction, as measured by effect on intradermal dye extravasation diameter and optical density..... 34

図 6 - Effect of rilzabrutinib (PRN1008) on platelet counts in the mouse immune thrombocytopenia model 35

図 7 - PDAI skin disease activity responses over time in canine PF animals treated with rilzabrutinib..... 37

図 8 - Representative before and after pictures of two rilzabrutinib treated pemphigus foliaceus dogs..... 37

図 9 - Effect of rilzabrutinib on the mouse passive cutaneous anaphylaxis model, as measured by effect on intradermal dye extravasation area and intensity 39

図 10 - PYY levels in 3 dogs after a single 30 mg/kg rilzabrutinib PO dose 41

図 11 - Leptin changes in 3 dogs after a single 30 mg/kg rilzabrutinib PO dose..... 41

図 12 - Dosing rilzabrutinib IJ eliminates decreased gastric emptying observed when dosed orally 43

図 13 - Effects of 3-day oral dosing in rats of rilzabrutinib at 500 mg/kg 44

図 14 - In vitro heathy volunteer platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib (PRN1008) at 0.3 µmol/L and 1 µmol/L..... 46

図 15 - In vitro ITP patient platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib (PRN1008) at 0.3 µmol/L and 1 µmol/L..... 47

略号と用語の定義

ADCC	抗体依存性細胞傷害（Antibody dependent cellular cytotoxicity）
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ（Alanine aminotransferase）
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（Aspartate aminotransferase）
ATP	アデノシン三リン酸（Adenosine triphosphate）
AUC_{inf}	投与開始（時間 0）から無限大時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity）
AUC_{last}	投与開始（時間 0）から最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration）
BCR	B 細胞受容体（B cell receptor）
BID	1 日 2 回（Twice a day）
BLK	B 細胞リンパ球キナーゼ（B-cell lymphocyte kinase）
BMX	染色体 X 上の骨髄チロシンキナーゼ（Bone marrow tyrosine kinase in chromosome X）
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton’s tyrosine kinase）
cDNA	相補的デオキシリボ核酸（Complementary deoxyribonucleic acid）
C_{max}	最高血漿中濃度（Maximum plasma concentration）
CNS	中枢神経系（Central nervous system）
CV	心血管系（Cardiovascular）
DMSO	ジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide）
DNP	ジニトロフェニル（Dinitrophenyl）
ECG	心電図（Electrocardiogram）
EGF	上皮成長因子（Epidermal growth factor）
EGFR	上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor）
ERB	赤芽球性白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ（Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog）
FcγR	結晶性フラグメントγ受容体（Fragment crystallizable gamma receptor）
FcεR	結晶性フラグメントε受容体（Fragment crystallizable epsilon receptor）
FDA	米国食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration）
FRET	蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence resonance energy transfer）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good laboratory practices）
HCT	ヒト結腸癌細胞株（Human colon carcinoma cells）
HEK	ヒト胎児腎臓（細胞）（Human embryonic kidney）
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（Human ether-a-go-go-related gene）
HWB	ヒト全血（Human whole blood）

IC_{50}	50%阻害濃度（Inhibitory concentration 50% [concentration causing half-maximal inhibition]）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
IgE	免疫グロブリン E（Immunoglobulin E）
IgG	免疫グロブリン G（Immunoglobulin G）
IgM	免疫グロブリン M（Immunoglobulin M）
IJ	空腸内（Intrajejunal）
I_{Kr}	急速活性化遅延整流カリウムチャネル電流（Rapidly activating delayed rectifier potassium channel current）
IL-4	インターロイキン-4（Interleukin-4）
IP	腹腔内（Intraperitoneal）
ITK	インターロイキン-2 誘導性 T 細胞キナーゼ（Interleukin-2-inducible T-cell kinase）
ITP	免疫性血小板減少症（Immune thrombocytopenia）
LCK	リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ（Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase）
MCL	マントル細胞リンパ腫（Mantle cell lymphoma）
OD	光学密度（Optical density）
PBMC	末梢血単核細胞（Peripheral blood mononuclear cells）
PD	薬力学（Pharmacodynamics）
PF	落葉状天疱瘡（Pemphigus foliaceus）
PK	薬物動態（Pharmacokinetics）
PNT	呼吸流量計（Pneumotachograph）
PO	経口（Oral）
PR	P 波開始から QRS 複合波開始までの時間（Time from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex）
PRN35	イブルチニブ（ibrutinib）
PYY	ペプチド YY（Peptide YY）
QD	1 日 1 回（投与）（administered once per day）
QRS	（心電図の）Q、R 及び S 波（Q, R and S waves of an electrocardiogram）
QT	Q 波開始から T 波終了までの時間（The time between the start of the Q wave and the end of the T wave）
QTc	補正 QT 間隔（Corrected QT interval）
RR	心拍の間隔（心拍数の算出に使用される）（Interval between heart beats, used to calculate heart rate）
SEM	平均値の標準誤差（Standard error of the mean）
SRC	肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ（Sarcoma viral oncogene homolog）
STAT6	シグナル伝達兼転写活性化因子 6（Signal transducer and activator of transcription 6）
TCR	T 細胞受容体（T cell receptor）

TEC	肝細胞癌に発現するチロシンキナーゼ（Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma）
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間（First time to reach C_{max}）
TNFα	腫瘍壊死因子 α（Tumor necrosis factor alpha）
TPGS	D-α-トコフェロールポリエチレングリコールコハク酸（D-α-tocopheryl polyethylene glycol succinate）
TXK	T 細胞 X 染色体キナーゼ（T cell X chromosome kinase）
USP	米国薬局方（US Pharmacopeia）
YES	ヤマグチ肉腫ウイルスがん遺伝子（Yamaguchi sarcoma virus oncogene）

1　まとめ

リルザブルチニブ（国際一般名は rilzabrutinib）は、PRN1008 及び SAR444671 とも称される。リルザブルチニブは、強力かつ可逆的な新規の共有結合型ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）阻害薬である。本薬は、経口（PO）投与により、免疫性血小板減少症（ITP）の治療効果を示す。リルザブルチニブの薬効薬理作用及び副次的薬理作用を評価する一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した（表 1）。一部の試験では、米国食品医薬品局（FDA）既承認の不可逆的 BTK 阻害薬イブルチニブ（PRN35 と記載）を対照薬として使用した。In vitro ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイ並びにラット及びイヌを用いた in vivo PO 投与試験で、一連の安全性薬理試験も実施した。また、リルザブルチニブの主要代謝物であるチオシアネート（PRN4400 又は RA16689850A）並びに微量代謝物である PRN834 及び PRN618 を用いた in vitro 評価も実施した。参考として、リルザブルチニブ（遊離塩基）の化学構造を図 1 に示す。

図 1 - Rilzabrutinib free base structure

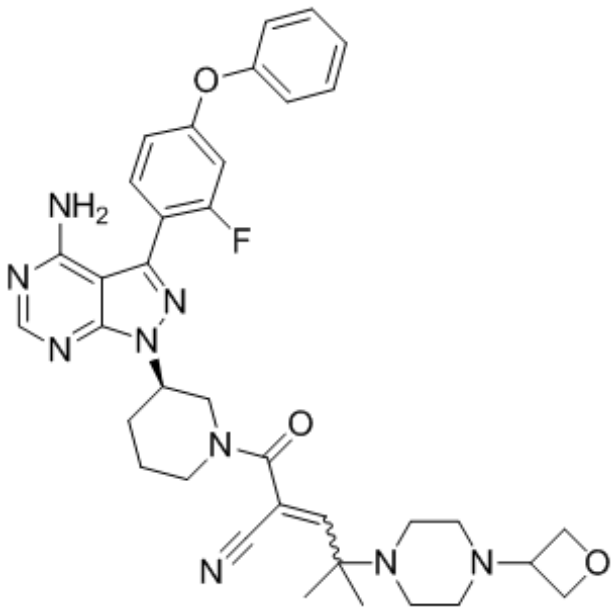


表 1 - Overview of pharmacology studies

Study Title	Test System/Method of Administration[a]	GLP	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics - in vitro				
Biochemical characterization of PRN1008	BTK enzyme and other off-target kinases	No	[DVR0102]	4.2.1.1-1
The in vitro cell pharmacology of PRN-001008	Human whole blood, human PBMCs, human B cells (Ramos), human colon carcinoma cells (HCT-116), human T cells (Jurkat), human cervical carcinoma cells (ME-180)	No	[DVR0070]	4.2.1.1-2
Inhibitory effect of 4 compounds on anti-IgM induced human B cell proliferation	Human B cells purified from PBMCs	No	[DVR0167]	4.2.1.1-3
PRN1008 antibody mediated in vitro cellular pharmacology	Human monocytes purified from PBMCs	No	[DVR0286]	4.2.1.1-4
Principia 10282013 ADCC assay report	Human mantle cell lymphoma cells (Jeko-1)	No	[DVR0166]	4.2.1.1-5
NA				4.2.1.1-6
NA				4.2.1.1-7
NA				4.2.1.1-8
NA				4.2.1.1-9
Biochemical activity of PRN1008 isomers	BTK recombinant human protein	No	[DVR0308]	4.2.1.1-10
Primary Pharmacodynamics - in vivo				
Murine in vivo BTK PK/PD occupancy durability PO study	Female Lewis and Sprague Dawley rats, female C57BL/6 mice; oral (rat: gavage; mouse: diet)	No	[DVR0106]	4.2.1.1-11

Study Title	Test System/Method of Administration[a]	GLP	Study Number	Location in CTD
Dose responsive effects, disease reversal effects, and PK of PRN1008-009 (10, 20, or 40 mg/kg) dosed PO, BID or QD in 11-day rat established type II collagen arthritis	Female Lewis rats; oral (gavage)	No	[DVR0200]	4.2.1.1-12
Anti-Inflammatory Activity of PRN1008 in a rat model of the passive arthus reaction	Female Sprague Dawley rats; oral (gavage)	No	[DVR0287]	4.2.1.1-13
Evaluation of PRN1008 in a mouse model of immune thrombocytopenia	Male BALB/c mice; oral (gavage)	No	[DVR0288]	4.2.1.1-14
Efficacy of Bruton's tyrosine kinase inhibitor (BTKi) PRN1008 in the treatment of dogs with pemphigus foliaceus (PF)	Male and female dogs with pemphigus foliaceus; oral (tablet)	No	[DVR0372]	4.2.1.1-15
Anti-inflammatory activity of orally administered PRN1008 QD or BID dosing for three days in a mouse model of passive cutaneous anaphylaxis	Female BALB/c mice; oral (gavage)	No	[DVR0447]	4.2.1.1-16
Exploratory Metabolite ID in PRN1008-001 Clinical Study	Human plasma	No	[DVR0181]	4.2.1.1-17
Secondary Pharmacodynamics				
Crossover canine gut hormones' study of PRN1008 through PO administration to male beagle dogs	Male beagle dogs; oral (gavage)	No	[DVR0226]	4.2.1.2-1
Effect of PRN1008 and cinnamaldehyde on gastric emptying through oral or intra-jejunal administration to Wistar Hans female rats	Female Wistar Han rats; oral (gavage) or intra-jejunal	No	[DVR0235]	4.2.1.2-2
Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) study with daily PO dosing of PRN1008, PRN35, PRN2296 and PRN1669 for 3 days and daily IV dosing of PRN1008 for 3 days in female Wistar Hans rats	Female Wistar Han rats; intravenous or oral (gavage)	No	[DVR0223]	4.2.1.2-3
Pharmacokinetic-pharmacodynamic study with daily intra-jejunal dosing of PRN1008 at 75 and 100 mg/kg for 3 days in female Wistar Hans rats	Female Wistar Han rats; intra-jejunal	No	[DVR0224]	4.2.1.2-4

Study Title	Test System/Method of Administration[a]	GLP	Study Number	Location in CTD
Pharmacokinetic-pharmacodynamic study with daily intra-jejunal dosing of PRN1008 at 50 and 100 mg/kg for 3 days in female Wistar Hans rats	Female Wistar Han rats; oral (gavage) or intra-jejunal	No	[DVR0219]	4.2.1.2-5
Pharmacokinetic-pharmacodynamic study with daily PO dosing of PRN1008 at 500 mg/kg and PRN35 at 175 mg/kg for 3 days in female Wistar Hans rats	Female Wistar Han rats; oral (gavage)	No	[DVR0225]	4.2.1.2-6
In vitro pharmacology: binding assay study of PRN1008	Radioligand binding assay against panel of receptors, ion channels, and transporters	No	[DVR0095]	4.2.1.2-7
Assessing in vitro effects of PRN1008 and ibrutinib on agonist-induced platelet aggregation	Human platelets	No	[DVR0307]	4.2.1.2-8
Biochemical and cellular activity of major metabolites of PRN1008	BTK recombinant human protein, human whole blood	No	[DVR0528]	4.2.1.2-9
In vitro pharmacology: Binding assay plus enzyme and uptake assay study of PRN4400 (thiocyanate[b]) metabolite	Radioligand binding assay against panel of receptors, ion channels, and transporters; Radioligand enzyme inhibition assay against panel of enzymes	No	[100056422_ 014-I&I-21]	4.2.1.2-10
Safety Pharmacology - in vitro				
Effects of PRN1008 on cloned hERG potassium channels expressed in human embryonic kidney cells (HEK293)	Human embryonic kidney cells (HEK293)	No	[DVR0111]	4.2.1.3-1
Effect of SAR444671[c] on cloned hERG potassium channels expressed in human embryonic kidney cells	Human embryonic kidney cells (HEK293)	Yes	[PAT0302]	4.2.1.3-2
Safety Pharmacology - in vivo				
Irwin test assessment following oral administration to rats	Male Wistar Han IGS (Crl:WI[Han]) rats; oral (gavage)	Yes	[DVR0176]	4.2.1.3-3

Study Title	Test System/Method of Administration[a]	GLP	Study Number	Location in CTD
PRN1008: Cardiovascular, respiratory and toxicokinetic assessment following oral administration to conscious, radiotelemetry-instrumented dogs	Male beagle dogs; oral (gavage)	Yes	[DVR0177]	4.2.1.3-4
Pharmacodynamic Drug Interactions				
No studies were performed.				

Abbreviations: ADCC: Antibody dependent cellular cytotoxicity; BID: Twice a day; BTK: Bruton's tyrosine kinase; BTKi: BTK inhibitor; GLP: Good laboratory practice; HCT: Human colon carcinoma cells; hERG: Human ether-a-go-go-related gene; IgM: Immunoglobulin M; IGS: International Genetic Standardization; IV: Intravenous; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PD: Pharmacodynamic; PF: Pemphigus foliaceus; PK: Pharmacokinetics; PO: Per os (oral); QD: Quite daily

a Method of administration applicable to in vivo studies only.

b The thiocyanate metabolite (PRN4400) is referred to in this report as RA16689850A.

c SAR444671 is the designation used by Sanofi for PRN1008, rilzabrutinib.

1.1　自己免疫疾患において BTK を標的とする根拠

BTK は、B 細胞受容体（BCR）、結晶性フラグメントγ受容体（FcγR）及び結晶性フラグメントε受容体（FcεR）の下流のシグナル伝達に不可欠な要素である。BTK は非受容体型チロシンキナーゼであり、肝細胞癌に発現するチロシンキナーゼ（TEC）ファミリーのメンバーである。B 細胞において、BTK 活性を阻害すると、BCR の阻害に一致する表現型の変化が生じる。BTK は、主に FcγR 及び FcεR のシグナル伝達を介して、好塩基球、肥満細胞、マクロファージ及び好中球といったその他の造血細胞の活性化も制御している。BTK の阻害により、細胞の増殖、分化、成熟、遊走、生存、サイトカイン産生、肥満細胞脱顆粒、及びアポトーシス促進といった様々な免疫細胞活性が抑制される。血小板は BTK を高度に発現しており、BTK はコラーゲン／糖タンパク質 VI シグナル伝達に関与しているが、BTK シグナル伝達を迂回する代替シグナル伝達経路が存在するため、BTK が阻害されても正常な血小板機能及び血栓形成を保持する(1)(2)。BTK は T 細胞、ナチュラルキラー細胞及び形質細胞には発現していない(3)(4)。

BTK 阻害薬は、種々の自己免疫疾患の発症及び伝播を抑制し、疾患で生じた自己抗体が介在する変化を軽減する。自己抗体介在性疾患患者の治療に関するものとして、BTK 阻害薬は、関節炎(5)(6)(7)(8)(9)(10)、全身性エリテマトーデス(7)(11)、及び抗体介在性糸球体腎炎(12)(13)といったいくつかの自己抗体依存性げっ歯類モデルにおける疾患を抑制することが示されている。また、BTK 阻害薬は、げっ歯類のアルサス反応モデル及び受動的皮膚アナフィラキシーアッセイモデルにおいても、それぞれ FcγR 及び FcεR シグナル伝達を阻害することにより、抗体介在性炎症を抑制することが示されている(5)。慢性リンパ性白血病／小リンパ球性リンパ腫、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）及び慢性移植片対宿主病の治療薬であるイブルチニブ並びに MCL の治療薬であるアカラブルチニブ及びザヌブルチニブなど、いくつかの不可逆的 BTK 阻害薬が FDA の承認を取得している。

不可逆的 BTK 阻害薬とは異なり、リルザブルチニブは可逆的な共有結合性 BTK 阻害により、BCR シグナル伝達及び Fc 受容体経路を阻害する新規の低分子薬である。本薬は BTK に高度の親和性を示す。この選択性により、有害な影響を最小限にしながら効果を発揮できる可能性がある。また、リルザブルチニブは BTK からの解離速度が遅く、標的を持続的に占有するため、標的に対する作用が長時間持続する。

改善された結合プロファイル、免疫細胞活性への作用、及び自己抗体介在性疾患モデルにおいて示された有用性は、持続性又は慢性 ITP の治療におけるリルザブルチニブ開発の理論的根拠となる。ITP 以外の自己免疫及び炎症性疾患に対するリルザブルチニブの使用についても検討されている。

1.2　リルザブルチニブの作用機序

生化学的試験において、（1）in vitro キナーゼ活性アッセイでの BTK に対するリルザブルチニブの効力、（2）キナーゼパネルプロファイリング及び 50%阻害濃度（IC_{50}）測定に基づくリルザブル

チニブの選択性、（3）BTK に対するリルザブルチニブの生化学的解離速度及び結合速度、並びに（4）リルザブルチニブと BTK の間の相互作用の可逆性を評価した（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

また、セルベースアッセイで BTK 機能に対する阻害作用を確認した。リルザブルチニブについて、（1）ヒト B 細胞株及び末梢血単核細胞（PBMC）両方における BTK 占有率、（2）ヒト全血（HWB）での B 細胞活性化に対する阻害作用、（3）HWB での好塩基球活性化に対する阻害作用、（4）抗体介在性 Fc 受容体活性化に対する阻害作用、（5）血小板凝集に対する作用、並びに（6）様々なヒト細胞株及び初代培養細胞におけるオフターゲット作用の有無を検討した（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]、Module 4.2.1.1-5 [DVR0166]、Module 4.2.1.1-3 [DVR0167]、Module 4.2.1.1-4 [DVR0286]）。

リルザブルチニブは、強力かつアデノシン三リン酸（ATP）競合的な可逆的 BTK 阻害薬である。リルザブルチニブは、BTK のほか、密接に関連する一部の TEC ファミリーメンバー（染色体 X 上の骨髄チロシンキナーゼ［BMX］、TEC 及び T 細胞 X 染色体キナーゼ［TXK］）に対しても速やかな結合及び緩やかな解離の動態を示した。しかし、BTK 以外のこれらの TEC に対する結合の持続性は、BTK と比較して明らかに短かった（表 3）。また、リルザブルチニブは、肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ（SRC）ファミリーキナーゼの B 細胞リンパ球キナーゼ（BLK）に対しても効力を示したが、BLK の持続的な占有は認められなかった（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

1.3　非臨床での自己免疫疾患におけるリルザブルチニブの Proof of Concept

非臨床試験において、いくつかの自己抗体誘発性疾患モデルでリルザブルチニブを評価したところ、治療効果が認められた。特記すべきこととして、リルザブルチニブは、マウス ITP モデルで血小板減少を抑制した。また、本薬は、ラットコラーゲン誘発関節炎モデルで抗炎症作用を示し、ラット受動的アルサス反応モデルで自己抗体介在性 FcγR シグナル伝達を抑制した。さらに、外来家庭犬を対象とした非盲検比較試験において、リルザブルチニブの連日投与により、自然発症した落葉状天疱瘡（PF）が、コルチコステロイド投与を必要とせず、安全かつ速やかにコントロールされた（Module 4.2.1.1-15 [DVR0372]）。非臨床試験及び臨床データに基づくと、リルザブルチニブは、FcγR 経路を介した自己抗体シグナル伝達及び B 細胞シグナル伝達を抑制し、B 細胞活性化に作用することによって自己抗体産生に作用を示すと考えられる。

2　効力を裏付ける試験

2.1　In vitro 薬理試験

2.1.1　リルザブルチニブのプロテインキナーゼ阻害作用

リルザブルチニブの生化学的特性評価を、主作用標的である BTK に対する効力及びその他のオフターゲットキナーゼについての評価に焦点を当てて実施した。生化学的キナーゼアッセイにおいて、リルザブルチニブの BTK 阻害能を、[redacted]の[redacted]により、ATP 存在下でリン酸化される蛍光ペプチド基質を用いて測定した。アッセイ終了後に、マイクロタイタープレートをシステム内に置き、設定した電気泳動条件でリン酸化産物を基質から分離した。0.5 nmol/L 完全長 BTK 酵素、1 µmol/L カルボキシフルオレセインペプチド基質、16 µmol/L ATP 及び最高濃度 5 µmol/L の 3 倍希釈系列で 12 濃度のリルザブルチニブを含む反応混合液を 25°C で 3 時間インキュベートして得られたデータに基づくと、リルザブルチニブの BTK 阻害作用の IC_{50} は 1.3 ± 0.5 nmol/L、用量反応曲線のヒル勾配は 1.2 ± 0.1 であった（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

251 種類のプロテインキナーゼの酵素活性に対するリルザブルチニブの 1 µmol/L の濃度での阻害効力を、[redacted]の[redacted]で測定した。その結果、21 種類のキナーゼにこの濃度で 50%以上の阻害が認められた。これらの 21 種類のキナーゼについて、所定の濃度の各酵素、1 µmol/L の特異的カルボキシフルオレセインペプチド基質、各酵素に最適な所定の濃度の ATP、種々の補因子及び最高濃度 5 µmol/L の 3 倍希釈系列で 12 濃度のリルザブルチニブを含む反応混合液を、酵素に応じて 25°C で 2～17 時間インキュベートし、Caliper 電気泳動法により IC_{50} を測定した（表 2）。リルザブルチニブは、BTK のほかに、他の TEC ファミリーメンバー（BMX、TEC、TXK）に対しても強力な阻害活性を示した（表 2）。残りの TEC ファミリーメンバーであるインターロイキン-2 誘導性 T 細胞キナーゼ（ITK）に対するリルザブルチニブの効力は弱く、IC_{50} は 440 ± 100 nmol/L であった。このように ITK に対する活性が欠如していることから、T 細胞機能に対する阻害作用を示さないことが Jurkat T 細胞アッセイで確認された（2.1.4.6 項）。リルザブルチニブは、SRC ファミリーキナーゼの BLK を阻害したが、他の SRC ファミリーキナーゼ（ヤマグチ肉腫ウイルスがん遺伝子［YES］、リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ［LCK］、FGR がん原遺伝子、Src ファミリーチロシンキナーゼ［FGR］、線維芽細胞 YES 関連新規キナーゼ［FYN］、SRC、LCK/YES 関連新規タンパク質チロシンキナーゼ［LYN］）に対する効力は弱かった。リルザブルチニブは、赤芽球性白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ（ERB）B4 に対しても効力を示したが（表 2）、他の ERB ファミリーメンバー（上皮成長因子受容体［EGFR］、ERB-B2）に対する活性は低かった（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。キナーゼに対する IC_{50} が数百ナノモルの範囲である場合は、細胞系で引き起こされる活性の変化により、細胞で明らかな機能的変化が生じることはないと考えられる。また、これらのキナーゼは、共有結合に利用されるシステインを有していないため、軽

微な阻害作用がみられたとしても、その作用が長時間持続することはないと考えらえる。EGFR 活性をセルベースアッセイで評価したところ（2.1.4.9 項）、標的に対する効力は認められなかった。

表 2 - Potency of rilzabrutinib on BTK and other cross-reacting kinases

Kinase	IC_{50} (nmol/L) ± Standard Deviation[a]
TEC	0.8 ± 0.1 (n = 3)
BMX	1.0 ± 0.1 (n = 3)
TXK	1.2 ± 0.3 (n = 3)
BTK	**1.3 ± 0.5 (n = 3)**
BLK	6.3 ± 0.7 (n = 3)
ERB-B4	11 ± 7 (n = 3)
YES	180 ± 3 (n = 2)
LCK	190 ± 10 (n = 2)
FGR	200 ± 10 (n = 2)
CSK	220 ± 9 (n = 2)
BRK	230 ± 10 (n = 2)
RIPK2	310 ± 1 (n = 2)
RET	390 ± 1 (n = 2)
ITK	440 ± 100 (n = 3)
FYN	520 ± 40 (n = 2)
EGFR	520 ± 200 (n = 3)
FLT-3	610 ± 60 (n = 2)
SRC	710 ± 40 (n = 2)
LYN	880 ± 20 (n = 2)
FGFR2	1400 ± 60 (n = 2)
FLT-4	1500 ± 70 (n = 2)

a n = number of independent assays

Abbreviations: BRK: Breast tumor kinase; BTK: Bruton's tyrosine kinase; EGFR: Epidermal growth factor receptor; FGR: FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; FGFR2: Fibroblast growth factor receptor 2; FLT-3/4: FMS-related tyrosine kinase 3/4; FYN: Fibroblast Yes related novel; IC_{50}: Inhibitory concentration 50%; LCK: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase; LYN: LCK/YES-related novel protein tyrosine kinase; RIPK2: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2; YES: Yamaguchi sarcoma virus oncogene

2.1.2 阻害作用機序

リルザブルチニブの分子構造は BTK の ATP 結合部位を標的とする。キナーゼ反応では ATP から BTK の基質にリン酸基が転移する。ATP の結合を阻害することは、キナーゼ活性を阻害する効果的な方法である。リルザブルチニブは ATP 競合的阻害薬である。このことは、ATP 濃度漸増下で BTK に対するリルザブルチニブの効力を測定することにより裏付けられた。ATP 濃度の増加に伴う IC_{50} の変化を測定するため、ATP を 160 及び 800 µmol/L の濃度で使用したことを除き、上記と同様の方

法で、リルザブルチニブの BTK との結合に関する IC_{50} を測定した。前述（2.1.1 項）したように、16 µmol/L ATP でのリルザブルチニブの IC_{50} は 1.3 ± 0.5 nmol/L であった。ATP 濃度を 160 及び 800 µmol/L に増加させると、リルザブルチニブの IC_{50} はそれぞれ 3.1 ± 0.7 及び 9.8 ± 0.7 nmol/L に増加したことから、リルザブルチニブの BTK への結合は、ATP 競合的であることが示された（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

リルザブルチニブの分子デザインの別の側面として、本薬は BTK の ATP 結合部位近傍のシステイン残基と共有結合を形成する。その結果、リルザブルチニブの BTK 選択性が増加するだけでなく、共有結合の存在により滞留時間や結合持続時間も延長する。リルザブルチニブの BTK への結合の持続時間（すなわち占有持続時間）、解離速度及び結合速度を蛍光標識競合結合アッセイで測定し、リルザブルチニブの結合持続性を不可逆的 BTK 阻害薬イブルチニブ（PRN35）と比較した(14)。本アッセイでは、リルザブルチニブが解離するとすぐに標的を占有する BTK の高親和性プローブを使用した。プローブの結合は蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）で検出した。結合持続性を評価するため、1.5 µmol/L 被験物質（リルザブルチニブ又は PRN35）及び 0.5 µmol/L BTK を [redacted] 分間プレインキュベートし、アッセイ緩衝液で [redacted] 倍希釈した。最終アッセイ条件が、[redacted] nmol/L BTK、[redacted] nmol/L 被験物質、[redacted] nmol/L [redacted] 標識 [redacted] 抗体及び [redacted] nmol/L [redacted] となるように、[redacted] 及び [redacted] 標識 [redacted] 抗体を添加した。完全長の遺伝子組換え BTK に対する [redacted] の結合を、[redacted] nm での蛍光を測定することにより検出した。トレーサー添加 1、6 及び 24 時間後の占有率を算出した。リルザブルチニブの生化学的解離速度を決定するための更なる実験として、[redacted] ～ [redacted] 時間の様々な時点で占有率を測定した。リルザブルチニブの結合速度を測定する実験も、使用したトレーサー（[redacted]）が異なる点を除き、結合持続時間及び解離速度を測定した実験と同様の方法で実施した。この結合速度実験の各成分の最終濃度は、[redacted] nmol/L BTK、[redacted] nmol/L [redacted] 標識 [redacted] 抗体、[redacted] nmol/L [redacted] 及び [redacted] ～ [redacted] nmol/L リルザブルチニブであった。各濃度のリルザブルチニブについて、[redacted] nm でのシグナルを用いて、合計 [redacted] 分間にわたり [redacted] 秒間隔の各時点での占有率を算出した（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

リルザブルチニブの結合速度の平均値は $5.1 \pm 2.1 \times 10^{4}\ M^{-1}\ s^{-1}$（n = 3）と速く、解離速度の平均値は $1.2 \pm 0.1 \times 10^{-6}\ s^{-1}$（n = 2）と遅く、その消失半減期は 170 ± 13 時間（n = 2）であった。BTK 占有率は、最初の標的への結合から 1 時間後に 95 ± 1%、6 時間後に 91 ± 1%、24 時間後に 85 ± 2%（いずれの時点も n = 4）と僅かにしか低下しなかった。リルザブルチニブで観察されたこの僅かな低下とは異なり、不可逆的阻害薬の PRN35 では、BTK 占有率が、最初の標的への結合から 1 時間後に 98 ± 1%、6 時間後に 97 ± 2%、24 時間後に 98 ± 3%（いずれの時点も n = 4）と一定であった（表 3）。したがって、リルザブルチニブは可逆的 BTK 阻害薬であり、BTK への結合速度が速く、解離速度が遅いため、結合持続時間が長く、結合から 24 時間後でも標的占有率が高いことが示された（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

リルザブルチニブの作用機序の 3 つ目の側面は、システインを介した共有結合の可逆性である。これは、システインを不可逆的に標的とする他の BTK 阻害薬とは対照的であり、リルザブルチニブの

BTK への結合の独特な特徴である。具体的に述べると、細胞内での正常なプロセシングで BTK が変性又は分解すると、この結合が可逆的になる。この可逆性により、特発性薬物相互作用のような免疫学的反応を引き起こす可能性のある永続的なペプチド付加体の形成が避けられる。リルザブルチニブの BTK への結合の可逆性を確認するため、0.6 µmol/L リルザブルチニブを過剰量の遺伝子組換え BTK（2.2 µmol/L）とともに 60 分間インキュベートし、溶液中の全てのリルザブルチニブを結合させた。その後、トリプシンでタンパク質を消化した。これにより、変性条件下で結合が完全に可逆的であれば、化合物が溶液中に放出される。トリプシン消化後に溶液中に放出された遊離型化合物の量を液体クロマトグラフィー／質量分析で分析し、被験物質の標準曲線との比較により定量した。BTK のトリプシン消化によりリルザブルチニブは 137 ± 37%（平均値、n = 2）回収された。陽性対照として、不可逆的 BTK 阻害薬 PRN35 を同アッセイで評価したところ、トリプシン消化後の回収率は 0 ± 0%（n = 2）であった。したがって、リルザブルチニブの BTK への共有結合は、標的変性後に完全に可逆的であることが示された（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

BTK 阻害作用機序の試験から、リルザブルチニブは結合が速く、解離が遅い可逆的な ATP 競合的 BTK 阻害薬であることが示された。

2.1.3 その他のキナーゼ標的に対する結合特性

リルザブルチニブの生化学的特性検討において、BTK のシステインと構造的に相同な位置にシステインを有する他の 4 つのキナーゼ（BLK、BMX、TEC 及び TXK）もリルザブルチニブによって阻害されることが判明した。これらの BTK 以外のキナーゼでリルザブルチニブの結合部位における滞留時間が長いか否かを検討するため、これらのキナーゼにおけるリルザブルチニブの生化学的占有率の経時的変化を、BTK の結合持続性の評価（2.1.2 項）で説明した方法と同じ方法で評価した。その結果、BLK の占有は 1 時間後には大幅に減少し、24 時間後にはほとんど認められなかった。その他の 3 つのキナーゼ（BMX、TEC 及び TXK）ではある程度持続的な占有が認められた（表 3）が、BTK よりは短かった（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

表 3 - Durability of rilzabrutinib occupancy on BTK and other cross-reacting kinases

Kinase	Compound	Percent Occupancy[a] at 1 hour	Percent Occupancy[a] at 6 hours	Percent Occupancy[a] at 24 hours
BTK	PRN35[b]	98 ± 1	97 ± 2	98 ± 3
BTK	rilzabrutinib	95 ± 1	91 ± 1	85 ± 2
BLK	rilzabrutinib	49 ± 5	12 ± 6	6 ± 8
BMX	rilzabrutinib	88 ± 2	70 ± 1	36 ± 1
TEC	rilzabrutinib	87 ± 2	73 ± 3	59 ± 16
TXK	rilzabrutinib	85 ± 1	73 ± 3	58 ± 5

Kinase	Compound	Percent Occupancy[a] at 1 hour	Percent Occupancy[a] at 6 hours	Percent Occupancy[a] at 24 hours

a Results reported as mean ± standard deviation; n = 4 for all results

b Durability of PRN35 to these 4 other off-target kinases was assessed separately from this study and showed that PRN35 was durable with high (>90%) levels of occupancy maintained at 24 hours (data not shown).

Abbreviations: BLK: B-cell lymphocyte kinase; BMX: Bone marrow tyrosine kinase in chromosome X; BTK: Bruton's tyrosine kinase; TEC: Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma; TXK: T cell X chromosome kinase

2.1.4 リルザブルチニブの結合持続性、効力及び選択性に関するセルベースアッセイ

初代培養細胞を用いてリルザブルチニブによる BTK の占有及びその結果得られる機能的変化を評価するいくつかのセルベースアッセイで、本薬の活性を評価した。これらのセルベースアッセイのデータは、リルザブルチニブは BCR を介した B 細胞の活性化（Module 4.2.1.1-3 [DVR0167]）及び単球の Fc 受容体活性化（Module 4.2.1.1-4 [DVR0286]）を阻害する強力な BTK 阻害薬であることを示した。リルザブルチニブは、BTK を発現していない細胞株に対する細胞毒性は弱く、T 細胞活性化及び EGFR 活性化に対して弱い作用しか示さなかった（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。また、リルザブルチニブは、非 BTK 介在性経路を介して刺激された B 細胞には作用を示さず（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）、B 細胞に対して抗体依存性細胞傷害（ADCC）阻害作用を示さず（Module 4.2.1.1-5 [DVR0166]）、健常人ボランティア及び ITP 患者のいずれの血小板においても in vitro 血小板凝集に対する作用を示さなかった（Module 4.2.1.2-8 [DVR0307]）。

2.1.4.1 細胞内 BTK に対するリルザブルチニブの占有及び結合持続性

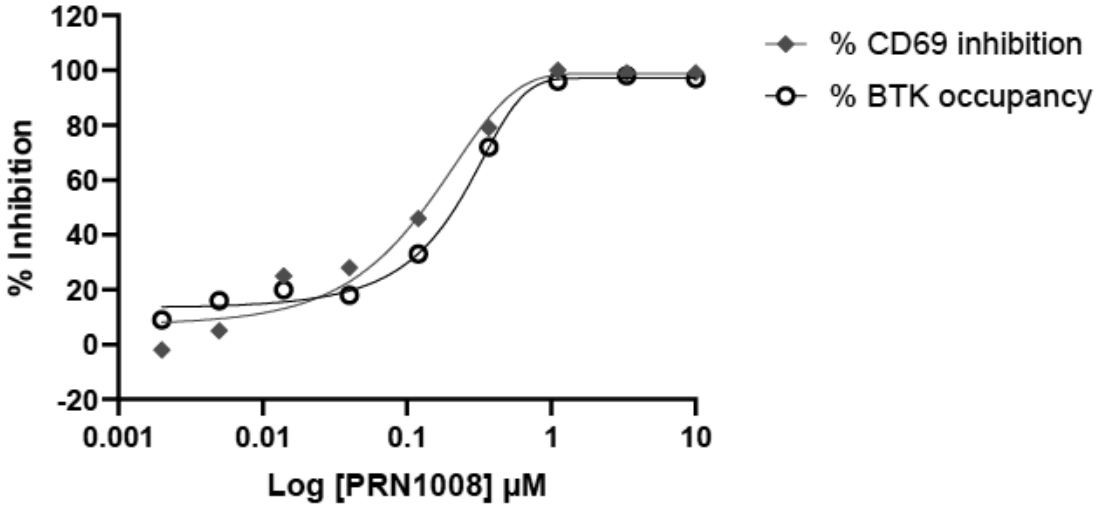
In vivo での BCR シグナル伝達阻害作用のモデル化とするため、BTK を発現しているヒト B 細胞株（Ramos 細胞）を用いて細胞内 BTK 占有を測定した(7)。2.1.2 項で述べた生化学的占有との主な違いは、この細胞では、タンパク質の代謝回転及び細胞分裂により BTK が経時的に置換される点である。Ramos 細胞での BTK の占有は、BTK に不可逆的に結合する蛍光標識プローブを用いて測定した。Ramos 細胞を漸増濃度（0.0005～1 µmol/L）のリルザブルチニブとともに 1 時間インキュベートし、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動により、BTK 占有率をリルザブルチニブ濃度の関数として分析した。リルザブルチニブの IC_{50} は 8 ± 2 nmol/L（n = 5）であった。化合物が体循環から消失したときの状態を模倣するため、化合物をウォッシュアウトしたときの結合持続性を測定した。この結合持続性アッセイでは、細胞を 1 µmol/L のリルザブルチニブとともに 1 時間インキュベートした後、ウォッシュアウトし、増殖培地中で 4 又は 18 時間インキュベートした。ウォッシュアウトから 4 及び 18 時間後のリルザブルチニブの占有率は、それぞれ 76 ± 8%及び 60 ± 13%（n = 8）であった。これらの結果から、細胞内でのリルザブルチニブの効力及び滞留持続性が示された（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

2.1.4.2 BCR によるヒト B 細胞活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用

リルザブルチニブ（0.0000847～5 µmol/L）を添加した HWB において、抗免疫グロブリン M（IgM）抗体で BCR を刺激することによって、BTK 活性の阻害による機能的変化を評価した。刺激

された CD20+ B 細胞での CD69 発現に対する阻害作用の IC_{50} をフローサイトメトリーで測定した。リルザブルチニブの IC_{50} は 123 ± 38 nmol/L（n = 8）であった。実験のサブセットとして、同じドナーの検体を用いて、0.0003～10 µmol/L のリルザブルチニブで処理した HWB から単離した PBMC において、BTK 阻害による機能的変化（CD69 発現には同じ刺激パラメータを使用）と PBMC の BTK 標的占有率との相関性を評価した。BTK 標的占有の IC_{50} は 233 ± 75 nmol/L（n = 4）であった。リルザブルチニブで処理した HWB 由来の PBMC において、ウォッシュアウトから 4 及び 18 時間後のリルザブルチニブの占有率は、それぞれ 91 ± 2%及び 79 ± 2%（n = 3）であった。全体として、B 細胞活性化アッセイでのリルザブルチニブの効力は、BTK 標的占有に対する効力と同程度であった（図 2）（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

図 2 - Concentration response curves for inhibition of HWB CD69 expression and BTK occupancy in a representative donor



Overlay of % CD69 expression inhibition versus % BTK occupancy in 1 individual blood donor; representative plot selected from n = 4 donors.
Abbreviations: BTK: Bruton's tyrosine kinase; HWB: Human whole blood

2.1.4.3 ヒト B 細胞増殖に対するリルザブルチニブの阻害作用

抗 IgM 誘発ヒト B 細胞増殖に対する BTK の阻害作用を測定した。B 細胞は、磁気ビーズキットを用いてヒト PBMC から単離した。単離 B 細胞を 0.015～10000 nmol/L のリルザブルチニブで処理した後、抗 IgM 抗体で刺激した。48 時間後の細胞生存率を [redacted] キットで測定することにより、増殖に対するリルザブルチニブの作用を評価した。BCR 刺激 B 細胞増殖に対するリルザブルチニブの阻害作用の IC_{50} は 5.0 ± 2.4 nmol/L（n = 3）であった。これは B 細胞における BTK 阻害作用（オンターゲット作用）として予想されるものであった（Module 4.2.1.1-3 [DVR0167]）。

2.1.4.4 免疫グロブリン G（IgG）抗体介在性ヒト単球活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用

免疫グロブリン G（IgG）と FcγR の架橋を介した単球及びマクロファージの活性化は、BTK 依存性の機能である(5)。したがって、単球における IgG を介した FcγR 活性化に対するリルザブルチニブの阻害能を評価した。PBMC から濃縮したヒト単球を 10 濃度のリルザブルチニブ（最高濃度 5 µmol/L の 3 倍希釈系列）とともにプレインキュベートし、プレートに結合させた IgG 抗体で活性化することによって生じた腫瘍壊死因子 α（TNFα）産生を、酵素結合免疫吸着測定法で分析した。本アッセイでの TNFα 産生に対するリルザブルチニブの阻害作用の IC_{50} は 55.7 ± 45.0 nmol/L（n = 6）であった（Module 4.2.1.1-4 [DVR0286]）。

2.1.4.5 免疫グロブリン E（IgE）抗体介在性ヒト好塩基球活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用

FcεR の架橋を介した好塩基球の活性化は、BTK 依存性の機能である(15)。したがって、好塩基球活性化に対するリルザブルチニブの阻害能を、脱顆粒による細胞表面の CD63 増加を指標として評価した。HWB をリルザブルチニブ（0.001～30 µmol/L）とともにインキュベートした後、抗免疫グロブリン E（IgE）抗体で処理し、[redacted] から入手した [redacted]（[redacted]）を用いたフローサイトメトリーで好塩基球活性化を分析した。IC_{50} を算出するために、CD63 発現の阻害率を、濃度の対数値の関数としてプロットし、曲線を非線形回帰モデルに適合させた。過去に報告されている(16)ように、CD63 陽性細胞の比率に個体差が認められたため、活性化後の CD63 陽性細胞のカットオフ値 15%を用いて、非応答集団（ノンレスポンダー）を決定した。ノンレスポンダーのデータは不採用とした。リルザブルチニブの CD63 発現阻害作用の IC_{50} は、490 ± 130 nmol/L（n = 9）であった。このことから、リルザブルチニブはこの BTK 介在性好塩基球活性化経路を阻害することが示された（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

2.1.4.6 ヒト T 細胞機能に対するリルザブルチニブの作用

BTK は T 細胞には発現していない。したがって、リルザブルチニブの細胞選択性は、ヒト Jurkat T 細胞株に対するリルザブルチニブの作用を検討することによって確認できる。細胞を抗ヒト CD3 抗体 + 抗ヒト CD28 抗体（T 細胞受容体［TCR］を活性化させるため）又はタプシガルギン（カルシウム流入を活性化させるため）のいずれかで刺激し、転写因子である活性化 T 細胞核因子の活性化をレポーターアッセイで測定した。これらのリードアウトのいずれにも BTK 阻害薬の作用は認められなかった。アッセイは、[redacted]（[redacted]）により、FRET 基質の変換を利用して転写活性を測定する [redacted]（[redacted]）(17)を用いて実施した。細胞の処理には、5 µmol/L からの 3.16 倍希釈系列で 0.158 µmol/L までの 10 濃度のリルザブルチニブを使用した。細胞をリルザブルチニブで 30 分間前処理して刺激し、5 時間インキュベートした。次に β-ラクタマーゼ基質を添加し、2 時間インキュベートした後、FRET による基質の変換を測定した。リルザブルチニブは、検討した最高濃度

（5 µmol/L）で、TCR 誘導性活性化を 36～48%しか阻害せず（独立した 2 回の実験で 2 回反復測定）、カルシウム流入誘導性活性化を 14～30%しか阻害しなかった（独立した 2 回の実験で 2 回反復測定）。T 細胞の TCR 誘導性活性化又はカルシウム流入誘導性活性化のいずれに対してもリルザブルチニブの阻害作用の IC_{50} は 5 µmol/L 超であったことから、リルザブルチニブはこれらのアッセイで不活性であり、リルザブルチニブが、T 細胞活性化を指標とする、細胞へのオフターゲット作用を示さないとの結論が裏付けられた（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

2.1.4.7 抗体依存性細胞傷害（ADCC）

T 細胞活性化に加えて、リルザブルチニブの ADCC に対する作用をスクリーニング試験で評価した（Module 4.2.1.1-5 [DVR0166]）。本アッセイのエフェクター細胞（PBMC）には BTK が発現していないため、いかなる阻害活性もオフターゲット活性が反映されたものと考えられる。また、リルザブルチニブは ITK に対して弱い阻害作用しか示さないが、本アッセイは ITK に高感受性である。本アッセイで ADCC 阻用作用が認められなかった場合は、細胞の ITK に作用を示さないことが裏付けられると考えられる。標的 B 細胞（Jeko-1 MCL 細胞株）を抗 CD20 抗体（リツキシマブのバイオシミラー）又は完全ヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体で 30 分間前処理し、エフェクター細胞を添加した。PBMC エフェクター細胞は、0.0005～1.0 µmol/L の 8 濃度のリルザブルチニブとともに 1 時間プレインキュベートした。プレインキュベーション後に、PBMC を各標的細胞のウェルに、エフェクター：標的細胞比 25:1 で添加し、16 時間インキュベートした。その後、細胞溶解を測定するため、培地中への乳酸脱水素酵素の放出を、[redacted]（[redacted]）で検出した。リルザブルチニブは ADCC 阻害活性を示さず、本アッセイで評価したリルザブルチニブの濃度範囲全体での特異的溶解率の平均値は 52.6～60.8%であったが、対照の ITK 阻害薬 PRN694(18)では、濃度の増加とともに細胞特異的溶解率が低下し（0.0005 µmol/L での 59.8%から 1.0 µmol/L での 23.6%に低下）、反応を抑制することが示された。これらのデータから、リルザブルチニブが BTK 発現細胞に選択的であることを示す追加のエビデンスが得られた。

2.1.4.8 非 BCR 誘導性 B 細胞機能に対するリルザブルチニブの作用

細胞へのオフターゲット作用を検討する別の方法として、B 細胞占有アッセイと同じ細胞（Ramos ヒト B 細胞株）を用いたアッセイで非 BTK 介在性経路を刺激することが挙げられる。BTK 非依存的なインターロイキン-4（IL-4）誘導性シグナル伝達兼転写活性化因子 6（STAT6）活性化を、2.1.4.6 項に記載の[redacted]（[redacted]）を用いて測定した。細胞の処理には、5 µmol/L からの 3.16 倍希釈系列で 0.158 µmol/L までの 10 濃度のリルザブルチニブを使用した。細胞をリルザブルチニブで 30 分間前処理して刺激し、5 時間インキュベートした。次に β-ラクタマーゼ基質を添加し、2 時間インキュベートした後、FRET による基質の変換を蛍光プレートリーダーで測定した(17)。IL-4 誘導性 STAT6 活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用の IC_{50} は 5 µmol/L 超であったことから、リルザブルチニブはこの BTK 非依存的細胞アッセイで不活性であることが示

された。リルザブルチニブは、検討した最高濃度（5 µmol/L）で、18～37%（n = 2）しか阻害しなかった（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

2.1.4.9 EGFR シグナル伝達に対するリルザブルチニブの作用

上述したように、生化学的アッセイで認められた EGFR 活性に対する効力は、セルベース系では認められないことが確認された。本試験では、細胞での EGFR シグナル伝達に対するリルザブルチニブの作用を評価するため、FRET 基質の変換を利用した上皮成長因子（EGF）刺激[redacted]（[redacted]）を用いて転写活性を測定した。ME-180 細胞はヒト子宮頸癌細胞株であり、EGF で刺激すると転写因子 AP-1 が活性化される。この細胞には BTK が発現していないため、いかなる阻害活性もオフターゲットの機序を介して生じたものと推察される。細胞の処理には、5 µmol/L からの 3.16 倍希釈系列で 0.158 µmol/L までの 10 濃度のリルザブルチニブを使用した。細胞をリルザブルチニブで 30 分間前処理して EGF で刺激し、5 時間インキュベートした。次に β-ラクタマーゼ基質を添加し、2 時間インキュベートした後、FRET による基質の変換を蛍光プレートリーダーで測定した(17)。リルザブルチニブは、検討した最高濃度（5 µmol/L）で、19～30%（n = 2）しか阻害しなかった。このことから、リルザブルチニブの EGFR に対する生化学的活性は、細胞での活性には反映されないことが確認された（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

2.1.4.10 BTK を発現していない細胞に対するリルザブルチニブの細胞傷害性作用の欠如

BTK を発現していない結腸直腸癌由来形質転換ヒト上皮細胞株である HCT-116 を用いて、細胞生存性に対するリルザブルチニブの BTK 非依存性作用の有無を、プレストブルーアッセイ系を用いて評価した（n = 3）。細胞に、30 µmol/L からの 3 倍希釈系列で 0.005 µmol/L までの 9 濃度のリルザブルチニブを曝露し、48 時間インキュベートした後、各時点の生存率を評価した。リルザブルチニブの IC_{50} は 16 ± 2 µmol/L（n = 3）であった。この値は、本質的に、本アッセイで活性を示さないことを表していることから、細胞傷害作用は検出されなかった。完全に非選択的なキナーゼ阻害薬であるスタウロスポリンの本アッセイでの IC_{50} は 0.045 ± 0.027 µmol/L（n = 47）であった（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。

2.1.5 リルザブルチニブの生化学的アッセイ及び細胞アッセイにおける結果の要約

リルザブルチニブの in vitro 薬理試験結果の要約を表 4 に示す。リルザブルチニブは強力な BTK 阻害薬であり、予想されるオンターゲット作用を示し、オフターゲット作用は一連の生化学的アッセイ及びセルベースアッセイでは認められなかった（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]、Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]、Module 4.2.1.1-3 [DVR0167]、Module 4.2.1.1-4 [DVR0286]、Module 4.2.1.1-5 [DVR0166]、Module 4.2.1.2-7 [DVR0095]、及び Module 4.2.1.2-8 [DVR0307]）。

表 4 - Summary of biochemical and cellular characterization of rilzabrutinib

Assay	Value ± SD or Result	Study Number
BTK enzymatic IC_{50}	1.3 ± 0.5 nmol/L	[DVR0102]
BTK biochemical occupancy at 24 hours	85 ± 2%	DVR0102
Recovery of rilzabrutinib after trypsin digestion	137 ± 37%	DVR0102
Ramos B cell occupancy IC_{50}	8 ± 2 nmol/L	[DVR0070]
Occupancy of BTK in Ramos cells after 18 hours	60 ± 13%	DVR0070
Occupancy of BTK in PBMC from treated HWB IC_{50}	233 ± 75 nmol/L	DVR0070
Occupancy of BTK in PBMC after 18 hours	79 ± 2%	DVR0070
B cell activation in HWB IC_{50}	123 ± 38 nmol/L	DVR0070
Human monocyte IgG activation IC_{50}	55.7 ± 45.0 nmol/L	[DVR0286]
Basophil activation in HWB by CD63 expression IC_{50}	490 ± 130 nmol/L	DVR0070
Human B cell proliferation IC_{50}	5.0 ± 2.4 nmol/L	[DVR0167]
TCR-induced reporter assay in Jurkat cells IC_{50}	>5 µmol/L	DVR0070
Ca flux-induced reporter assay in Jurkat cells IC_{50}	>5 µmol/L	DVR0070
IL-4-induced STAT6 in Ramos cells IC_{50}	>5 µmol/L	DVR0070
EGFR signaling reporter assay IC_{50}	>5 µmol/L	DVR0070
Cytotoxicity in HCT-116 cells IC_{50}	16 ± 2 µmol/L	DVR0070
In vitro platelet activation - healthy volunteers	99% ± 6% to 111% ± 5%[a]	[DVR0307]
In vitro platelet activation - ITP patients	99% ± 5% to 106% ± 24%[a]	DVR0307
ADCC inhibitory activity	No inhibition observed	[DVR0166]
[redacted] receptor binding panel	>50% activity for 4 targets	[DVR0095]
Protein kinase inhibition (LabChip 3000 Drug Discovery System)	>50% inhibition of 21 targets	DVR0102

a Range of percent maximum platelet aggregation observed in response to treatment of various agonists. Results demonstrated no effect of rilzabrutinib on platelet aggregation.

Abbreviations: ADCC: Antibody dependent cellular cytotoxicity; BTK: Bruton's tyrosine kinase; EGFR: Epidermal growth factor receptor; HCT: Human colon carcinoma cells; HWB: Human whole blood; IC_{50}: Inhibitory concentration 50%; IgG: Immunoglobulin G; IL-4: Interleukin 4; ITP: Immune thrombocytopenia; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; SD: Standard deviation; STAT6: Signal transducer and activator of transcription 6; TCR: T cell receptor

2.1.6 代謝物、不純物及び立体異性体の薬理学的プロファイル

2.1.6.1 代謝物の薬理学的プロファイル

ヒト初回投与試験で臨床代謝物の有無について予備評価を行ったところ（Module 4.2.1.1-17 [DVR0181]）、血漿中で総薬物関連曝露量の 10%以上を占める可能性の高い 2 つの化合物（PRN618 及び PRN834）が特定された。その後、ヒトの吸収、分布、代謝及び排泄試験（Module 5.3.1.1-1 [PRN1008-015]）において、血漿検体で主要代謝物 1 種（PRN4400、総曝露量の 94%）、微量代謝物 1 種（PRN834、総曝露量の 5%）及びごく微量（1%未満）の複数の代謝物（PRN618 を含む）が特定

された。3 つの代謝物について、生化学的アッセイ及び全血を用いた細胞アッセイで BTK に対する活性を評価した（Module 4.2.1.2-9 [DVR0528]、データは以下の表 5 に要約する）。生化学的キナーゼアッセイ（2.1.1 項参照）において、PRN834 の BTK 阻害作用（IC_{50}：14.5 nmol/L）は、リルザブルチニブ（IC_{50}：1.3 nmol/L）と比較して、10 分の 1 未満であった。PRN618 は、生化学的アッセイにおいて、リルザブルチニブと同程度の効力を示した（IC_{50}：0.4 nmol/L）。PRN4400 は、検討した最高濃度（5000 nmol/L）で BTK 阻害作用を示さなかった。解離動態実験では、リルザブルチニブの BTK 占有は、最初の標的への結合から 24 時間後に 85%が残存していた。代謝物 PRN618 は 24 時間後の BTK 占有率が 53%であった。代謝物 PRN834 及び PRN4400 は、検討したいずれの時点でも、測定可能な BTK 占有を示さなかった。HWB を用いた細胞アッセイの試験（2.1.4.2 項参照）において、ヒト B 細胞での BCR 誘導性 CD69 発現に対する PRN618 及び PRN834 の阻害効力（IC_{50}：それぞれ 401 及び 528 nmol/L）は、リルザブルチニブ（IC_{50}：123 nmol/L）よりも弱かった（表 5）。PRN4400 は、10 µmol/L までの濃度で、BCR 誘導性 CD69 発現を阻害しなかった。この HWB アッセイは、ウォッシュアウトを行わず、被験物質の存在下で実施していることから、BTK 占有の持続性の差による影響は受けないと考えられる。

表 5 - BTK potency and durability of rilzabrutinib and metabolites PRN618, PRN834, and PRN4400

Compound	BTK Enzyme Inhibition IC_{50} (nmol/L)	BTK enzyme occupancy % at 24 hours	BTK Human Whole Blood CD69 IC_{50} (nmol/L)
rilzabrutinib	1.3 ± 0.5 (n = 3)	85% ± 2% (n = 4)	123 ± 38 (n = 8)
PRN618	0.4 ± 0.1 (n = 5)	53% ± 8% (n = 10)	401 ± 472 (n = 6)
PRN834	14.5 ± 3.9 (n = 5)	-1% ± 2% (n = 8)	528 ± 226 (n = 5)
PRN4400 (thiocyanate)	>5000 (n = 4)	1% ± 4% (n = 8)	>10000 (n = 5)

Results reported as mean ± standard deviation.
Abbreviations: BTK: Bruton's tyrosine kinase; IC_{50}: Inhibitory concentration 50%

様々な細胞又は細胞株由来の受容体、イオンチャネル、及びトランスポーターのパネル（[redacted]、[redacted]、フランス）に対する放射性リガンド結合アッセイにおいて、PRN4400（試験報告書には RA16689850A と記載）を 10 µmol/L の濃度でスクリーニングした。本パネルの受容体、イオンチャネル、及びトランスポーターに対する活性は、いずれも 50%未満であった（Module 4.2.1.2-10 [100056422_014-I&I-21]）。この同じ試験で、2 種類のキナーゼを含む 19 種類の酵素のパネルに対する放射性リガンド酵素阻害アッセイにおいても PRN4400 を 10 µmol/L の濃度で評価したところ、いずれも対照値に対する阻害率が 50%未満であったことから、阻害作用は認められなかった。

2.1.6.2 不純物の薬理学的プロファイル

リルザブルチニブ調製時のクロマトグラフィーで不純物の可能性のある物質が多数認められている（Module 3.2.S.3.2.2）。リルザブルチニブ単離の過程で特定された主要な不純物は PRN834 であ

り、これは医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（GMP）での中間体であり、代謝物としても特定されている。PRN834 は、生化学的キナーゼアッセイにおいて、BTK 阻害作用がリルザブルチニブよりも著しく弱いことが示されている（2.1.6.1 項参照）。不純物の可能性があるその他の物質については、オンターゲット作用を評価していない。

2.1.6.3 立体異性体の薬理学的プロファイル

リルザブルチニブは、異性体の E 体と Z 体の混合物として存在する（Module 3.2.S.3.1）。両異性体を単離し、それぞれの BTK に対する生化学的活性を評価した。BTK 酵素阻害作用を、0.5 nmol/L の BTK 酵素、1 µmol/L の光受容ペプチド基質、40 µmol/L の ATP 及び最高濃度 5 µmol/L の 3 倍希釈系列の被験物質を含む反応混合液を用いて、Caliper 電気泳動法により評価した。BTK からの生化学的解離速度を評価するため、500 nmol/L の BTK 及び 1.5 µmol/L の被験物質を含む緩衝液を 30 分間インキュベートした後、5 倍希釈して 384 ウェルプレートに移した。1.5 µmol/L の [redacted] 標識 [redacted]（BTK 酵素に親和性の高いリガンド）及び 80 nmol/L の [redacted] 標識 [redacted] 抗体を含む競合溶液をウェルに添加し、1 時間インキュベートした。トレーサーの BTK への結合を、[redacted] 抗体の [redacted] 部分と [redacted] の [redacted] 部分の間の時間分解蛍光共鳴エネルギー移動を用いて検出した。両異性体の生化学的活性は同程度であった。主要な異性体及びマイナーな異性体は、BTK 酵素活性をそれぞれ 1.3 及び 1.0 nmol/L で阻害し、24 時間後の BTK 占有率はそれぞれ 85%及び 79%であった。リルザブルチニブは立体中心を 1 か所有し、R 体である。これに対応する S 体である PRN1418 を調製し、生化学的アッセイで評価したところ、BTK 阻害作用（IC_{50}：4.1 nmol/L）はリルザブルチニブ（IC_{50}：1.3 ± 0.5 nmol/L、2.1.1 項参照）よりも弱かった。また、PRN1418 は、リルザブルチニブとは対照的に、解離速度の遅い動態は示さなかった。リルザブルチニブの BTK 占有率は、標的に最初に結合した 1 時間後（95 ± 1%）から 24 時間後（85 ± 2%）までの間に少ししか低下しなかった（2.1.2 項参照）が、PRN1418 の BTK 占有は 24 時間後には残存していなかった（Module 4.2.1.1-10 [DVR0308]）。

2.2 In vivo 薬理試験

2.2.1 ラット BTK 占有に対するリルザブルチニブの作用

薬力学（PD）を評価するために、及び細胞系で認められたリルザブルチニブの BTK に対する持続的な占有が in vivo に反映されることを確認するために、ラットの薬物動態（PK）/PD モデル系を構築した。雌の Lewis 及び Sprague Dawley ラット（3 匹/群）にリルザブルチニブを単回 PO 投与した。Lewis ラットには、クエン酸水溶液を媒体として調製したリルザブルチニブを 10、20 及び 40 mg/kg の用量で投与し、Sprague Dawley ラットには、15%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン水溶液を媒体として調製したリルザブルチニブを 20 mg/kg の用量で投与した。BTK 占有率及び血漿中リルザブルチニブ濃度を評価するために、それぞれ脾臓及び血液を投与 1、6（Sprague Dawley のみ）、14 及び 24 時間後に採取した。血漿中リルザブルチニブ濃度は、液体クロマトグラフィー／タンデム

質量分析で得られたデータから算出し、BTK 占有率は、脾臓細胞の B 細胞集団で経時的に測定した。占有率の測定は、セルベースアッセイにおいて BTK の蛍光標識プローブを用いて実施した。本薬は循環血中から消失した後も占有が持続すると予想される。Lewis ラットでは、用量の増加とともに各時点の BTK 占有率が増加し、ラットの系統及び用量に関係なく、投与 1 時間後の占有率は 89.6～99.1%であった。ラットの 2 つの系統で投与 14 時間後の占有率は同程度であった（表 6）。本試験から、リルザブルチニブは血漿中濃度が 10 ng/mL 未満に低下した後（14 時間後）も標的占有が持続する（占有率 61～75%）ことが確認された。リルザブルチニブが検出不能（定量下限は 1.25 ng/mL）になった後も、占有率は 32～65%で維持された。このことは、リルザブルチニブは in vivo で体循環血漿中から消失した後も BTK への結合が持続しているという結論と一致していた（Module 4.2.1.1-11 [DVR0106]）。

表 6 - Occupancy of BTK in Lewis and Sprague Dawley rat splenocytes following PO administration of rilzabrutinib

Dose (mg/kg)	% BTK Occupancy	Plasma Concentration (ng/mL)	% BTK Occupancy	Plasma Concentration (ng/mL)	% BTK Occupancy	Plasma Concentration (ng/mL)
	1 h		14 h		24 h	
10[a]	89.6 ± 8.2	209.2 ± 178.2	60.9 ± 4.2	<LLOQ	54.6 ± 7.5	<LLOQ
20[a]	98.6 ± 0.9	671.3 ± 154.5	63.6 ± 5.5	1.0 ± 0.9	49.9 ± 5.7	<LLOQ
40[a]	99.1 ± 0.5	1401.0 ± 601.2	74.6 ± 3.0	2.5 ± 1.1	65.3 ± 3.4	<LLOQ
20[b]	93.9 ± 4.8	152.6 ± 112.9	61.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	31.7 ± 6.7	<LLOQ

a Rilzabrutinib was dosed once to Lewis rats, PO, in citric acid:water as the vehicle; mean ± SD reported.
b Rilzabrutinib was dosed once to Sprague Dawley rats, PO, in 15% beta-hydroxy-propyl cyclodextran as the vehicle; mean ± SD reported.
LLOQ = 1.25 ng/mL
Abbreviations: BTK: Bruton's tyrosine kinase; LLOQ: Lower limit of quantification; PO: Per os (oral); SD standard deviation

同様の PK/PD 評価として、雌の C57BL/6 マウス（5 匹/群）に、リルザブルチニブを 0、1.67 及び 3.33 g/kg の用量で混合した飼料（脂質を 15%kcal 含む Open Standard Diet Mouse Chow［Research Diets, Inc］）を 7 又は 14 日間投与する試験も実施した。7 及び 14 日目の明期終了 2 時間後に、脾臓及び血液を採取した。いずれの用量でも 7 又は 14 日間連続混餌投与後の BTK 占有率（約 85～93%）及び血漿中リルザブルチニブ濃度（442～624 ng/mL）は高かった（Module 4.2.1.1-11 [DVR0106]）。

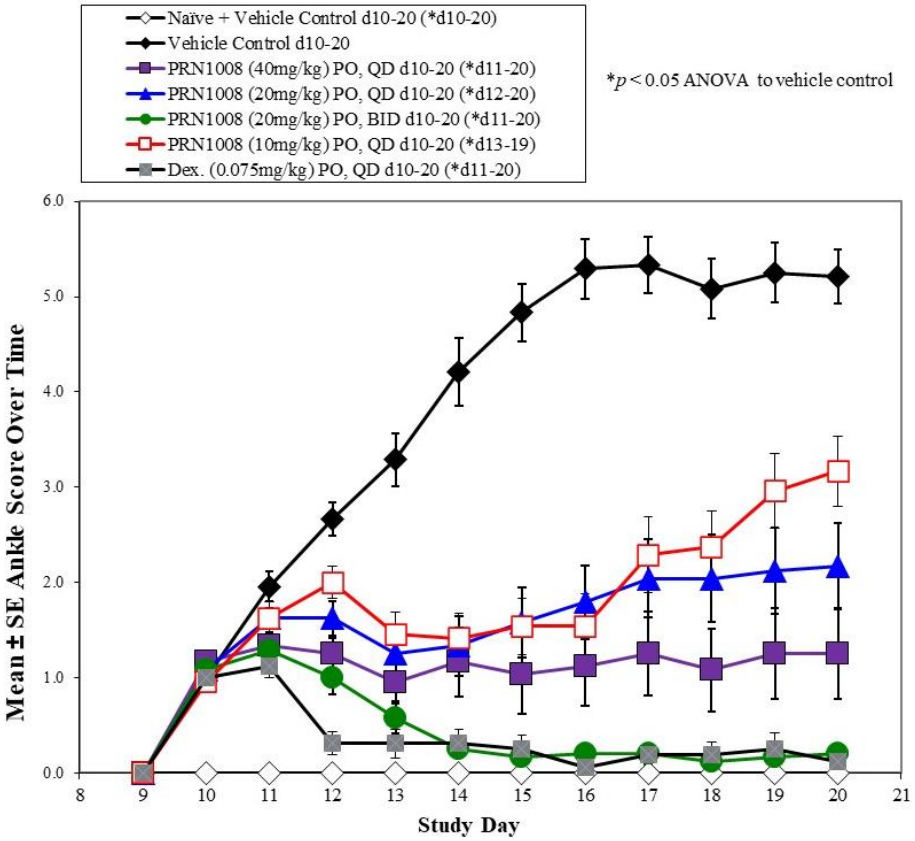
2.2.2 ラットコラーゲン関節炎モデルにおけるリルザブルチニブの作用

雌の Lewis ラットでコラーゲン誘発関節炎に対するリルザブルチニブの抑制能を評価した。関節炎は、2 mg/mL のブタ II 型コラーゲンを含有する 400 µL の不完全フロイントアジュバントを尾根部の 2 か所に注入することによって誘発した。7 日目に尾根部の 1 か所に 100 µL を追加で注入した。両後

足で疾患が明らかに認められた 10 日目（関節炎 1 日目）に、ラットを試験に組み込んだ。この時点（10 日目［関節炎 1 日目］）で、ラット（12 匹/群）に、クエン酸水溶液で調製したリルザブルチニブのそれぞれ 10、20 又は 40 mg/kg での PO 投与を開始し、リルザブルチニブの疾患進行抑制能を、対照化合物デキサメタゾン（8 匹、0.075 mg/kg）と比較評価した。いずれの群にも 1 日 1 回（QD）投与を行ったが、例外として、20 mg/kg の用量では 12 匹からなる別の群を設け、1 日 2 回（BID）投与を行った。PK パラメータ測定用として、6 匹からなる別の群に、リルザブルチニブの 20 mg/kg の用量での PO、BID 投与を 10 日目から開始した。8 匹からなる別の群に、リルザブルチニブの 20 mg/kg の用量での PO、BID 投与を 13 日目（関節炎 4 日目）から開始し、疾患治療効果を評価した。試験 9～20 日目（関節炎 0～11 日目）に体重を測定し、足関節をノギスで測定し、各足関節の臨床関節炎スコア（足関節スコア）を 0～6 で判定した。試験 20 日目（関節炎 11 日目）の投与 1、4、12 又は 24 時間後に全例を安楽殺し、剖検を行った。PK 評価用動物からは、投与 0（トラフ）、0.25、0.5、1、2、4、6、12 及び 24 時間後に血液を採取した。脾臓を採取して処理を行い、B 細胞の BTK 占有率を評価した（Module 4.2.1.1-12 [DVR0200]）。

リルザブルチニブは臨床関節炎スコア（足関節スコア）を有意に低下させた。すなわち、結果に用量依存性が認められ、全ての用量で疾患が抑制され、20 mg/kg BID 群及び 40 mg/kg QD 群で最も強い効果が認められた（図 3）。疾患治療群でも臨床関節炎スコア（足関節スコア）が媒体対照群と比較して有意に低下した（図 4）（Module 4.2.1.1-12 [DVR0200]）。

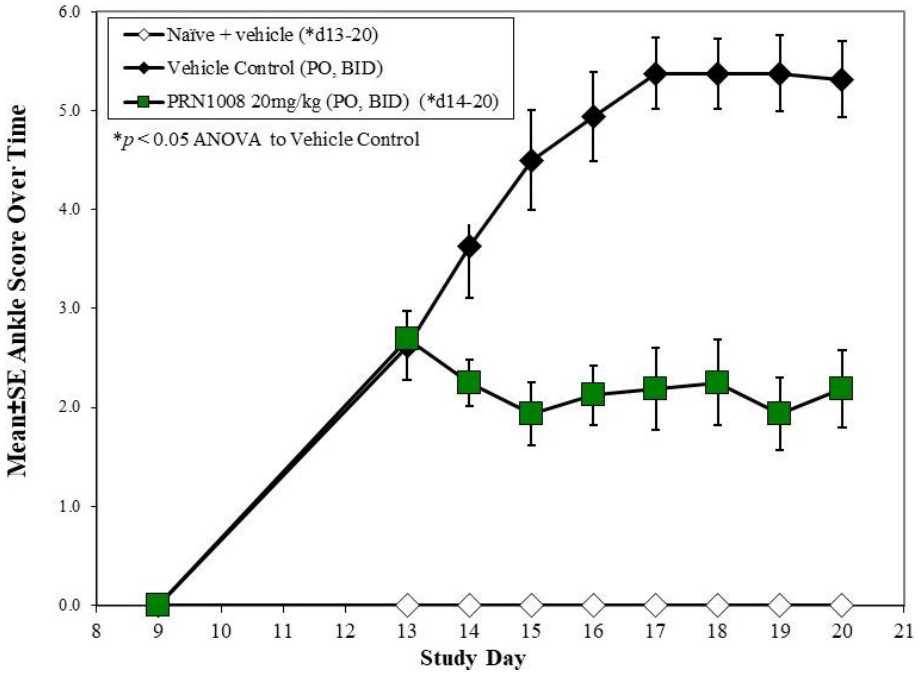
図 3 - Effect of rilzabrutinib on clinical arthritis scores (Ankle score) in the rat collagen-induced arthritis model



Arthritis was induced in female Lewis rats by injection of collagen (porcine type II) in Freund's incomplete adjuvant on Day 0 and Day 7. Rilzabrutinib dosing was started after onset of disease at Day 10 and continued until Day 20. All groups showed significant inhibition of disease *p <0.05 ANOVA compared with the vehicle control (solid black diamonds) at timepoints indicated in the legend. A clinical severity score was assigned to each ankle (ankle score) ranging from 0-6, based on caliper measurements: 0 (normal), 1 (minimal), 2 (mild), 3 (moderate), 4 (marked), 5 (severe), and 6 (very severe).

Abbreviations: ANOVA: Analysis of variance; BID: Twice a day; d: Day; PO: Per os (oral); QD: Quite daily; SE: Standard error

図 4 - Effect of rilzabrutinib on disease reversal in the rat collagen-induced arthritis model



Arthritis was induced in female Lewis rats by injection of collagen (porcine type II) in Freund's incomplete adjuvant on Day 0 and Day 7. Rilzabrutinib dosing was delayed and started after establishment of disease (Day 13) and continued for 7 days. Rilzabrutinib treated animals showed significant inhibition of disease *p <0.05 ANOVA to vehicle at the timepoints indicated in the legend.

Abbreviations: ANOVA: Analysis of variance; BID: Twice a day; d: Day; PO: Per os (oral); SE: Standard error

次に、リルザブルチニブの BTK 占有率および血漿中曝露量を測定し、足関節スコアの PD 評価結果と比較した。投与 12 時間後に、血漿中での曝露は消失していたが、BTK 占有は持続していた（表 7）。占有率と疾患スコアの相関関係から、40 mg/kg QD 群において、トラフ占有率 43%が維持されると、疾患が 75%抑制されることが示された。20 mg/kg BID 群では、トラフ占有率 79%が 12 時間維持され、その結果、デキサメタゾンとほぼ同程度まで疾患が完全に抑制された（Module 4.2.1.1-12 [DVR0200]）。これらの試験を総合すると、ラットにリルザブルチニブを PO 投与すると、コラーゲン誘発関節炎の進行抑制効果及び治療効果が得られることが示された。

表 7 - Rilzabrutinib occupancy in rat splenocytes at 1, 4, 12, and 24 h after last oral dose

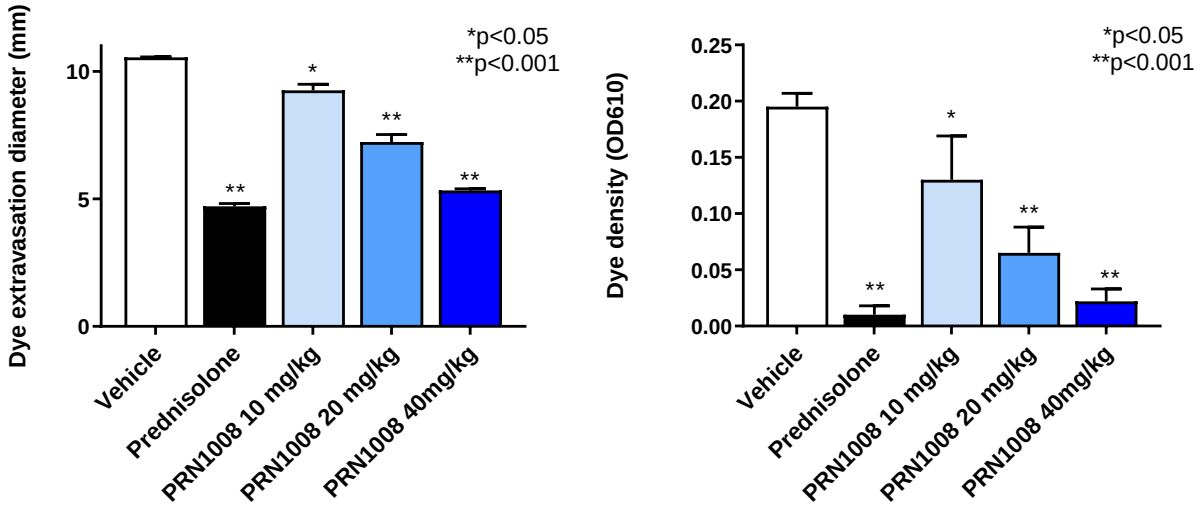
Dose, Regimen (mg/kg)	% BTK Occupancy (mean ± SD)				Blood Plasma Concentration (ng/mL) (mean ± SD)			
	1 h	4 h	12 h	24 h	1 h	4 h	12 h	24 h
10, QD	70.1 ± 14.7	57.8 ± 3.0	52.4 ± 14.4	16.2 ± 3.6	57.6 ± 43.6	26.9 ± 17.2	<LLOQ	<LLOQ
20, QD	94.6 ± 1.2	90.8 ± 3.9	80.2 ± 2.8	28.8 ± 11.5	127.8 ± 80.4	106.4 ± 131.5	4.6 ± 2.6	<LLOQ
40, QD	98.3 ± 0.7	98.6 ± 1.3	92.4 ± 5.4	42.8 ± 2.7	484.0 ± 182.4	243.3 ± 117.7	10.4 ± 8.5	<LLOQ
20, BID	94.8 ± 2.6	93.4 ± 0.9	78.6 ± 4.2	26.8 ± 3.2*	140.3 ± 56.8	76.3 ± 20.4	2.5 ± 0.7	<LLOQ*

* 24 hour BID BTK occupancy and plasma exposure reflects 24 hours after the last dose
LLOQ = 1.25 ng/mL
Abbreviations: BID: Twice a day; BTK: Bruton's tyrosine kinase; LLOQ: Lower limit of quantification; PO: Per os (oral); QD: Quite daily; SD: Standard deviation

2.2.3 ラット受動的アルサス反応モデルにおけるリルザブルチニブの作用

受動的アルサス反応モデルは、FcγR 活性化に依存的な急性 IgG 抗体負荷モデル(5)である。BTK は FcγR の下流のシグナル伝達に不可欠な要素であるため、本モデルで FcγR 介在性変化に対するリルザブルチニブの薬理作用を測定した。雌の Sprague Dawley ラット（8 匹/群）にリルザブルチニブ（8 匹/群、1 日用量 10、20 又は 40 mg/kg）、媒体（0.5 mol 等量のクエン酸水溶液）、又はプレドニゾロン（5 匹/群、1 日用量 10 mg/kg）を 3 日間（強制）PO 投与した。リルザブルチニブの最終投与 50 分後に、ラットにエバンスブルー色素／オボアルブミンを静脈内（IV）注入し、10 分後にウサギ IgG を片側の背部 3 か所の皮内に、ウサギ抗オボアルブミン抗体を反対側の背部 3 か所の皮内に注入した。抗体注入 4 時間後にラットを安楽殺し、背部から皮膚を採取してエバンスブルー色素の血管外漏出部分の直径を測定するとともに、皮膚パンチ標本を採取して調製し、光学密度（OD）を測定した。脾臓を最終投与 1 時間後に、血液検体を最終投与 1 及び 5 時間後に採取し、BTK 占有率及び血漿中リルザブルチニブ濃度を測定した。リルザブルチニブにより、抗体負荷後の血管外漏出による皮内の色素の直径及び OD の減少を指標とする受動的アルサス反応の抑制が有意かつ用量依存的に認められた。40 mg/kg QD 群ではプレドニゾロンと同程度の最大反応が認められた（図 5）（Module 4.2.1.1-13 [DVR0287]）。

図 5 - Effect of rilzabrutinib (PRN1008) on the rat passive Arthus reaction, as measured by effect on intradermal dye extravasation diameter and optical density



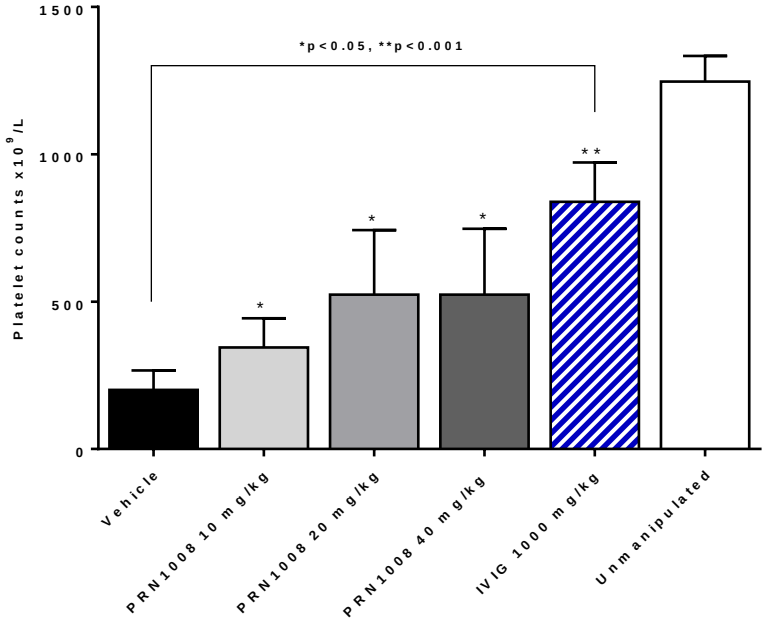
ラットにリルザブルチニブを 10、20 及び 40 mg/kg の用量で投与したとき、用量依存的な BTK 占有が認められ、最終投与 1 時間後の BTK 占有率はそれぞれ 71%、94%及び 99%であった。同じ時点の平均血漿中リルザブルチニブ濃度にも同様の用量依存的な増加が認められた（Module 4.2.1.1-13 [DVR0287]）。総合すると、これらの結果から、リルザブルチニブは in vivo で BTK の占有を介して IgG 介在性 FcγR シグナル伝達を阻害し、下流の抗体介在性免疫作用を抑制することが示された。

2.2.4　マウス免疫性血小板減少症モデルにおけるリルザブルチニブの作用

マウス ITP モデルでリルザブルチニブの薬理作用を評価した。雄の BALB/c マウス（8 匹/群）に前投与としてリルザブルチニブ（用量 10、20 又は 40 mg/kg）又は媒体を QD 投与で 3 日間（強制）PO 投与した。5 匹からなる別の群に、投与 2 日目に免疫グロブリンを 1000 mg/kg の用量で単回腹腔内（IP）投与した。リルザブルチニブの 3 回目投与の 1 時間後に、抗 CD41 抗体を IP 注入し、血小板減少症を誘発した。抗 CD41 抗体注入直前並びに注入 6、24 及び 48 時間後に採血を行い（n = 5/群）、血小板数を測定した。

リルザブルチニブは、媒体対照群と比較して、抗 CD41 抗体注入 6 時間後の血小板数減少を有意かつ用量依存的に抑制した（図 6）。媒体群の血小板数は抗 CD41 抗体注入 24 時間後に戻り始めたため、注入 24 及び 48 時間後にはリルザブルチニブ群との有意差が認められなかった（Module 4.2.1.1-14 [DVR0288]）。

図 6 - Effect of rilzabrutinib (PRN1008) on platelet counts in the mouse immune thrombocytopenia model



Abbreviations: ITP: Immune thrombocytopenia; IVIG: Immune globulin injection for infusion
Platelet counts in mice (n = 5/group) at 6 hours following induction of ITP via anti-CD41 injection.

媒体又はリルザブルチニブの最終投与 1 時間後に脾臓及び血液を採取し（n = 3 匹/群）、BTK 占有率及び血漿中リルザブルチニブ濃度を測定した（Module 4.2.1.1-14 [DVR0288]）。リルザブルチニブを 10、20 及び 40 mg/kg の用量で投与したとき、用量依存的な BTK 占有の増加が認められ、最終投与 1 時間後の BTK 占有率はそれぞれ 51%、84%及び 91%であった。平均血漿中リルザブルチニブ濃度も用量の増加とともに増加した。

総合すると、これらの結果から、リルザブルチニブは BTK への結合を介して抗体介在性血小板減少症を抑制することが示され、自己抗体介在性疾患にリルザブルチニブを使用することの根拠が裏付けられた。

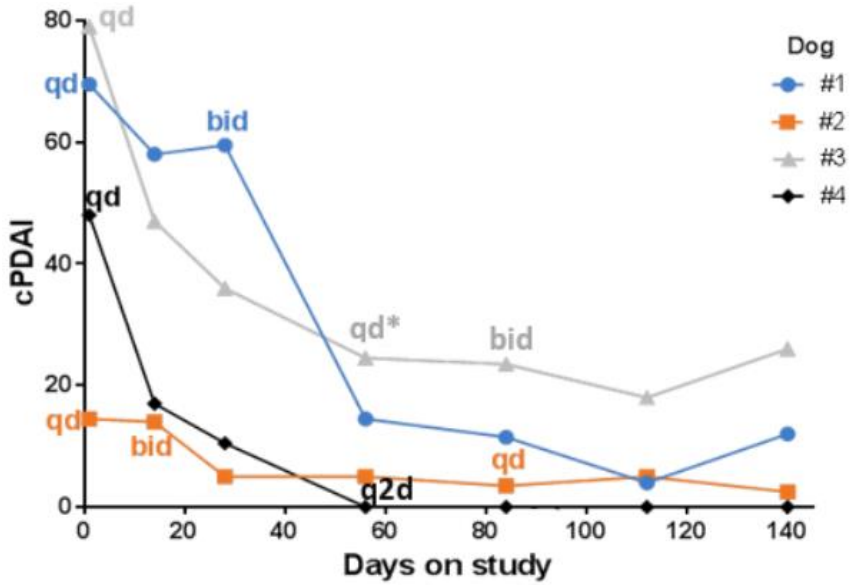
2.2.5　イヌの自然発症天疱瘡に対するリルザブルチニブの作用

PF は、天疱瘡の型の中で最もよくみられるものであり、イヌでおそらく最もよくみられる皮膚の自己免疫疾患である。PF の病理組織学的所見は、好中球（ときに好酸球）及び棘融解細胞で満たされた角層下膿疱であり、しばしば膿疱内にラフトの形成が認められる(19)。最近、イヌ PF において、上皮抗原デスモコリン-1 に対する IgG 自己抗体が存在していることが明らかになった(20)(21)。

外来家庭犬を対象とした 20 週間非盲検試験において、新たに診断された自然発症 PF を有するイヌ 4 匹（雌 3 匹、雄 1 匹）にリルザブルチニブを投与した（Module 4.2.1.1-15 [DVR0372]）。リルザブルチニブは単剤で投与し、臨床反応及び PBMC での BTK 占有率に基づき、個別に用量調節を行っ

た。リルザブルチニブの QD 投与を 17～20 mg/kg の用量（体重及び初回の mg/day 用量に基づく実際の用量範囲）で開始した。4 例とも投与初日に BTK 占有率が 70%を超え（71～93%、投与 4 時間後）、投与 24 時間後に 31～85%の BTK 占有が維持されていた。動物番号 1、2 及び 3 のイヌは、効果を向上させるため、それぞれ 4、2 及び 8 週目に投与頻度を BID に増加させたが、動物番号 3 では、飼い主のコンプライアンスの問題で、12 週目までの全ての投与が BID ではなく QD で実施された。動物番号 4 の雄では、完全寛解に至った後、8 週目に投与頻度を 2 日に 1 回に減少させた。全例で臨床症状が速やかに改善し、単剤で、従来のコルチコステロイド投与を必要とすることなく、完全又は大幅な疾患コントロール（イヌ天疱瘡病変領域指数スコアが 77～100%改善）が達成された（図 7 及び図 8）。動物番号 2（雌）のイヌでは、試験期間全体を通して、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）濃度の増加が認められ、12 週目にピークに達し（それぞれ 121 及び 796 IU/L）、この時点で、リルザブルチニブの用量を 500 mg BID から 500 mg QD に減量した。この減量後、肝酵素は 16 週目に低下し（AST 及び ALT はそれぞれ 28 及び 102 IU/L）、20 週目に正常値になった（AST 及び ALT はそれぞれ 15 及び 46 IU/L）。動物番号 3 のイヌ（雌）には、2 週目に食欲減退が認められ、それに伴って−0.8 kg の体重減少が認められた。リルザブルチニブの用量を 200 mg/day から 150 mg/day に減量すると、試験 4 週目までに食欲が改善した（体重は 0.4 kg 増加した）と報告された。B リンパ球レベル（CD21 陽性リンパ球の比率［%］）に対する悪影響がみられなかったことを含めて、臨床的に意義のある血液学的変化は認められず、本試験におけるリルザブルチニブの忍容性は良好であった（Module 4.2.1.1-15 [DVR0372]）。

図 7 - PDAI skin disease activity responses over time in canine PF animals treated with rilzabrutinib



Canine PDAI scores for dogs that were treated with 15 to 20 mg/kg rilzabrutinib. Intrasubject dose adjustments included as shown by QD, BID and Q2D labels on corresponding timepoints. * Total daily dose for dog #3 was prescribed as BID starting at week 8, but due to owner non-compliance it was administered as QD then switched to the correct BID schedule at week 12.

Abbreviations: BID: Twice a day; PDAI: Pemphigus disease area index; PF: Pemphigus foliaceus; Q2D: Every other day; QD: quite daily

図 8 - Representative before and after pictures of two rilzabrutinib treated pemphigus foliaceus dogs



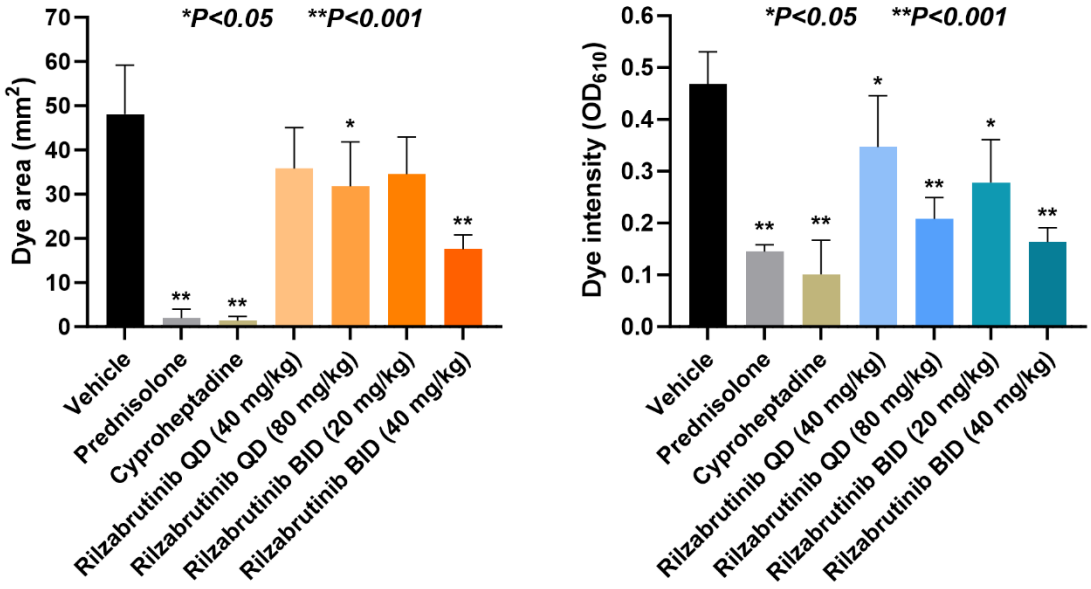


2.2.6 マウス受動的皮膚アナフィラキシーモデルにおけるリルザブルチニブの作用

IgE（抗ジニトロフェニル［DNP］抗体）誘発マウス受動的皮膚アナフィラキシーモデルにおけるリルザブルチニブの抗炎症作用を検討した。雌の BALB/c マウスを、媒体対照群（QD）、プレドニゾロン群（10 mg、QD）、シプロヘプタジン群（12.5 mg/kg、QD）、リルザブルチニブの 20、40 若しくは 80 mg/kg QD 群、又はリルザブルチニブの 20 若しくは 40 mg/kg BID 群に割り付けた（5 匹/群）。投与は 3 日間行い、IP 投与を行ったシプロヘプタジンを除き、全て PO 投与で行った。3 か所に抗 DNP 抗体（10 ng/site）を皮内注入した後、エバンスブルー色素／DNP 結合ウシ血清アルブミンを IV 注入した。安楽殺時に、3 か所の皮内注入部位でのエバンスブルー色素の直径を測定するとともに、血管外漏出強度を評価するため、これらの部位の皮膚パンチ標本を採取してホルムアミドで処理し、610 nm での OD を測定した（Module 4.2.1.1-16 [DVR0447]）。

リルザブルチニブを投与したとき、媒体対照群と比較して、体重への影響は認められなかった。媒体対照群と比較して、プレドニゾロン群及びシプロヘプタジン群で、血管外漏出面積及び血管外漏出強度に統計学的有意差が認められたことから、これらはマウスにおける受動的皮膚アナフィラキシー抑制作用の有効な陽性対照であることが示された。リルザブルチニブの 80 mg/kg QD 群及び 40 mg/kg BID 群では、媒体対照群と比較して、血管外漏出面積及び血管外漏出強度の両方に統計学的有意差が認められたが、リルザブルチニブの 40 mg/kg QD 群及び 20 mg/kg BID 群では、媒体対照群と比較して、血管外漏出強度のみに統計学的有意差が認められ、血管外漏出面積には認められなかった（図 9）。リルザブルチニブの 20 mg/kg QD 群では、統計学的に有意な変化は認められなかった（グラフにはデータを示していない）。全体として、統計解析により、マウス受動的皮膚アナフィラキシーモデルにおけるリルザブルチニブの用量依存的な効果が示された（Module 4.2.1.1-16 [DVR0447]）。

図 9 - Effect of rilzabrutinib on the mouse passive cutaneous anaphylaxis model, as measured by effect on intradermal dye extravasation area and intensity



Abbreviations: BID: Twice a day; OD: Optical density; QD: Quite daily

DVR0447 試験のマウスから最終投与 3.5 時間後（負荷 0.5 時間後に相当）に脾臓を採取して急速凍結し、全身薬理作用の指標として BTK 占有率を測定した。表 8 に示すように、全てのリルザブルチニブ投与群で脾臓の BTK 占有率は高かった（80%超）。

表 8 - Spleen BTK occupancy in mice treated with rilzabrutinib for 3 days

Group	% of BTK Occupancy (Mean ± SD)
Vehicle	0 ± 27
Rilzabrutinib 20 mg/kg qd	95 ± 6
Rilzabrutinib 40 mg/kg qd	87 ± 15
Rilzabrutinib 80 mg/kg qd	96 ± 5
Rilzabrutinib 20 mg/kg BID	84 ± 10
Rilzabrutinib 40 mg/kg BID	96 ± 3

n = 5 mice/group
Abbreviations: BID: Twice a day; BTK: Bruton's tyrosine kinase; qd: Quite daily; SD: Standard deviation

3 副次的薬理試験

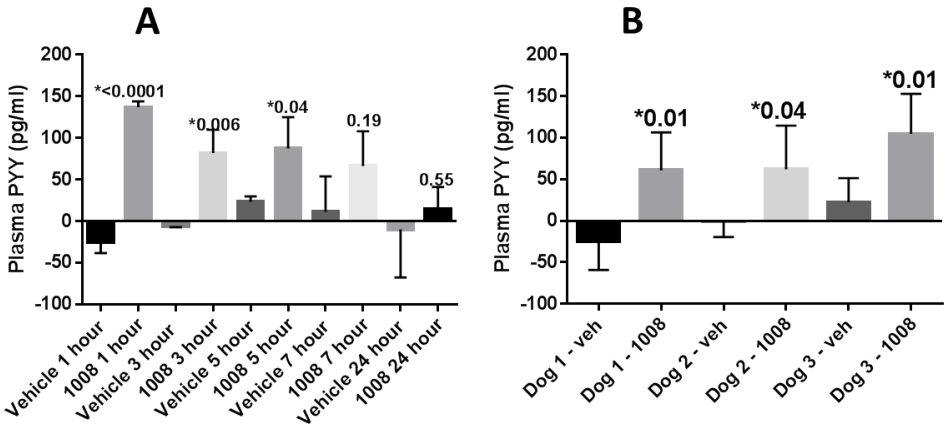
3.1 消化管機能に対する BTK 阻害薬の影響を検討する薬理試験

3.1.1 イヌの消化管ホルモンに対するリルザブルチニブの作用

イヌの毒性試験で認められた食欲減退の原因を検討するため、薬理試験を実施した（Module 4.2.1.2-1 [DVR0226]）。3 匹の雄のビーグル犬を投与前 12 時間絶食した後、媒体（11.7 mg/mL クエン酸水溶液）を単回 PO 投与した。投与 2 時間後に餌を戻し、投与後期間（投与後 8 時間）終了時まで残餌量を 2 時間ごとに測定した。PK 解析用及び 9 種類の消化管ホルモン測定用の血液を、投与前並びに投与 1、3、5、7 及び 24 時間後に頸静脈から採取した。1 週間後に同じイヌで再度実験を行い、媒体の代わりにリルザブルチニブ（11.7 mg/mL クエン酸水溶液で調製）を 30 mg/kg の用量で単回 PO 投与した。

リルザブルチニブを 30 mg/kg の用量で PO 投与したとき、リルザブルチニブ及び測定された 3 種類の代謝物（PRN618、PRN834 及び PRN1186）の平均最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 1.0 時間であり、リルザブルチニブの平均 C_{max} 及び投与開始（時間 0）から無限大時間まで外挿した血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC_{inf}）はそれぞれ 391 ng/mL 及び 761 ng•h/mL であった。PRN618、PRN834 及び PRN1186 の平均 C_{max} 及び AUC_{inf} はそれぞれ 148 ng/mL 及び 483 ng•h/mL、87.7 ng/mL 及び 493 ng•h/mL、並びに 81.2 ng/mL 及び 217 ng•h/mL であった。全例で投与後 20 分以内に嘔吐が認められた。リルザブルチニブは、30 mg/kg の用量での PO 投与により、食欲抑制消化管ホルモンであるペプチド YY（PYY）及びレプチンの全身血中濃度を有意に増加させた（図 10 及び図 11）（Module 4.2.1.2-1 [DVR0226]）。

図 10 - PYY levels in 3 dogs after a single 30 mg/kg rilzabrutinib PO dose

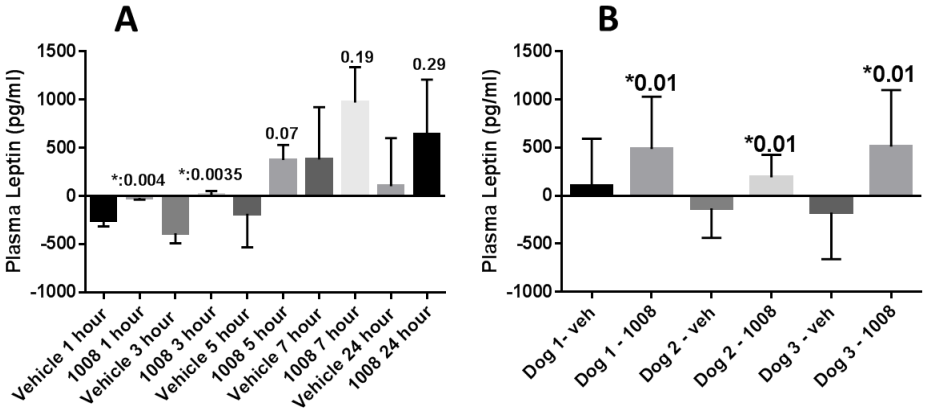


A) Mean PYY level in dogs (n = 3) treated with rilzabrutinib and vehicle at 1, 3, 5, 7, and 24 hours postdose. B) Mean individual PYY changes in dogs treated with rilzabrutinib and vehicle over 24 hours.

* All values normalized to predose levels for each dog, p values are versus vehicle at the same timepoint (A) or over the 24-hour period in the same dog (B)

Abbreviations: PO: Per os (oral); PYY: Peptide YY

図 11 - Leptin changes in 3 dogs after a single 30 mg/kg rilzabrutinib PO dose



A) Mean leptin levels in dogs (n = 3) treated with rilzabrutinib and vehicle at 1, 3, 5, 7 and 24 hours postdose. B) Mean individual leptin changes in dogs treated with rilzabrutinib and vehicle over 24 hours.

* All values normalized to predose levels for each dog, p values are versus vehicle at the same timepoint (A) or over the 24-hour period in the same dog (B)

Abbreviations: PO: Per os (oral)

本試験の結果から、リルザブルチニブは、脳の別々の領域の活性化を経て食欲を抑制すると考えられている、これらの消化管ホルモン濃度を増加させることが示唆された。これらのデータにより、イヌ毒性試験の高用量で認められた食欲減退の所見（Module 2.6.6 [3.2.1 項], Module 4.2.3.2-7 [DVR0173]、Module 2.6.6 [3.2.4 項], Module 4.2.3.2-11 [DVR0206]及び Module 2.6.6 [3.2.6 項], Module 4.2.3.2-12 [DVR0377]）が部分的に説明されると考えられる。

これらの所見を確認するため及びより長期の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用慢性毒性試験の準備として、イヌを用いた 12 週間忍容性試験において媒体又はカプセル剤（[redacted]）を投与し、同程度の全身曝露量を維持しながら、胃における曝露量を直接減少させたときのリルザブルチニブの影響を検討した（Module 2.6.6 [3.2.5 項]、Module 4.2.3.2-10 [DVR0301]）。この製剤は、胃上部上皮への薬物の接触を最小限に抑えるため、嘔吐を抑制すると考えられる。雌雄各 4 匹のビーグル犬からなる 2 つの群に、リルザブルチニブを 30 及び 50 mg/kg の用量で 12 週間、カプセル剤で PO 投与した。クエン酸で調製した液剤の（強制）PO 投与による 13 週間毒性試験（Module 2.6.6 [3.2.4 項]、Module 4.2.3.2-11 [DVR0206]）と比較して、リルザブルチニブのカプセル剤（[redacted]）投与では、同程度の曝露量が得られ、糞便の変化及び嘔吐が顕著に減少し、重度の体重減少による途中屠殺がみられなかった。これらの結果から、カプセル剤は液剤よりも忍容性が良好であることが示された（Module 2.6.6 [3.2.5 項]、Module 4.2.3.2-10 [DVR0301]）。

3.1.2 ラットにリルザブルチニブを経口投与したときの胃内容排出抑制作用及び空腸内投与したときの作用の欠如

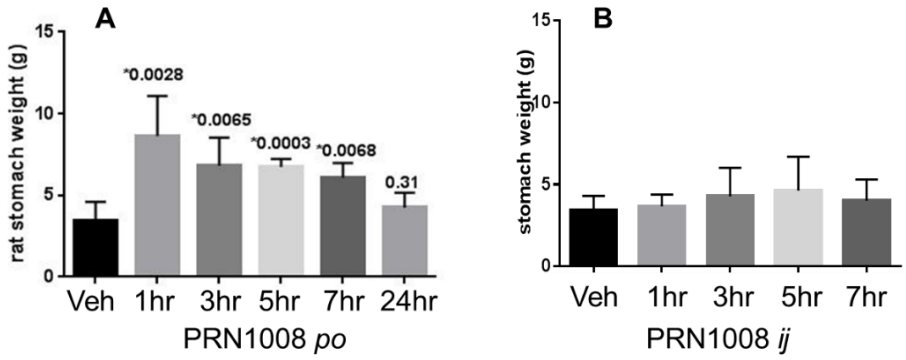
胃内容排出及び食欲に対するリルザブルチニブの作用の標的組織として胃が特定された。雌の Wistar Han ラット（n = 4～5/時点）にリルザブルチニブを 500 mg/kg の用量で 4 日間 PO 投与する（Module 4.2.1.2-2 [DVR0235]、PS-0481）か、又は 100 mg/kg の用量で 3 日間空腸内（IJ）投与した（Module 4.2.1.2-2 [DVR0235]、PS-0488）。これらの用量は、同程度の曝露が得られるように設定した（IJ 投与では、PO 投与と比較してバイオアベイラビリティが増加するため、ほぼ同じ用量が得られるように用量を調節した）（表 9 参照）。胃内容排出（胃重量の変化）を、PO 投与では 4 日目の投与 1、3、5、7 及び 24 時間後に、IJ 投与では 3 日目の投与 1、3、5 及び 7 時間後に測定した。これらの時点で、PK 解析用血液の採取も行った。リルザブルチニブを PO 投与したとき、媒体と比較して、胃内容排出に対する有意な抑制作用が認められた（図 12、パネル A）。この用量での t_{max} は 3 時間、平均 C_{max} 及び投与開始（時間 0）から最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）はそれぞれ 3140 ng/mL 及び 44300 ng•h/mL であった。PO 投与とは対照的に、リルザブルチニブを IJ 投与したときには、胃内容排出に対する作用は認められなかった（図 12、パネル B）。IJ 投与時の平均 C_{max}（3196 ng/mL）は、PO 投与時とほぼ同じであったが、リルザブルチニブの IJ 投与では t_{max} がより短く、AUC_{last} がより小さかった（表 9）。したがって、ラットに IJ 投与したときに胃内容排出に対する作用が弱かったのは、この投与経路では胃を通らないことに加えて、リルザブルチニブの総曝露量が低かったことが原因と考えられた。

表 9 - Pharmacokinetic parameters of rilzabrutinib in female Wistar Han rats after PO or IJ dosing

Group	Dosing Route	Days of Dosing	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	AUC_{last} (ng•h/mL)
PS-0481	PO	4	500	3140	3	44300
PS-0488	IJ	3	100	3196	1	9114
PS-0492	PO	3	500	3667	1	12110

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum concentration; IJ: Intrajejunal; PO: Per os (oral); t_{max}: Time maximum concentration

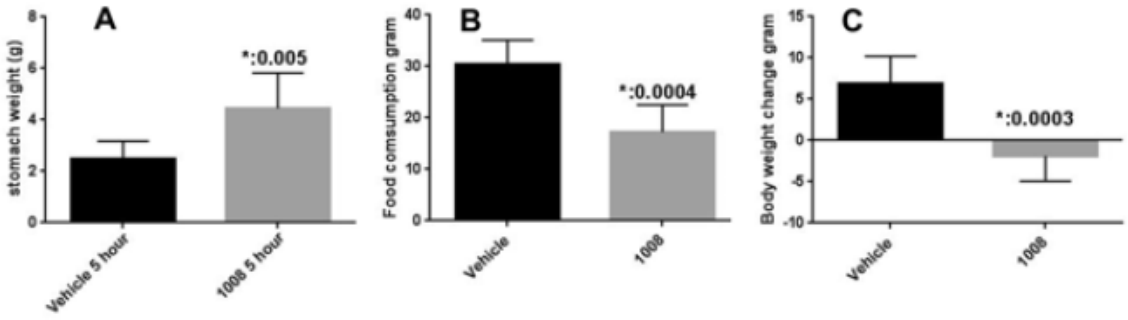
図 12 - Dosing rilzabrutinib IJ eliminates decreased gastric emptying observed when dosed orally



A) Significant delay in gastric emptying after 4 days of oral dosing in rats with rilzabrutinib (500 mg/kg PO); data from Study DVR0235, PS-0481.
B) No effect on gastric emptying after 3 days of IJ dosing in rats with rilzabrutinib (100 mg/kg IJ); data from Study DVR0235, PS-0488.
Abbreviations: IJ: Intrajejunal; PO: Per os (oral)

別の試験において、雌ラット（n = 7）にリルザブルチニブを 500 mg/kg の用量で 3 日間 PO 投与した（Module 4.2.1.2-2 [DVR0235]、PS-0492）。摂餌量及び体重を、初回投与前並びに最終投与直後に測定した。PK 解析用血液検体を、3 日目の投与 30 分前並びに投与 1、3 及び 5 時間後に採取した。投与 5 時間後にラットを安楽殺し、胃重量を測定した。この投与レジメンにおける t_{max} 及び AUC_{last} はそれぞれ 1 時間及び 12110 ng•h/mL であり、いずれも上記の 4 日間 500 mg/kg PO 投与レジメンよりも低値であった（表 9）。この試験でも、リルザブルチニブの PO 投与により、胃内容排出に対する作用として、投与 5 時間後の胃重量の有意な増加が認められ、媒体対照群と比較して、同じ投与期間中の摂餌量及び体重増加量が有意にそれぞれ 43%及び 73%減少した（図 13）（Module 4.2.1.2-2 [DVR0235]、PS-0492）。

図 13 - Effects of 3-day oral dosing in rats of rilzabrutinib at 500 mg/kg



A) Decreased gastric emptying as measured by increased stomach weight; B) Decreased food consumption; and C) Decreased body weight. Data from Study DVR0235, PS-0492.

3.2 [redacted] in vitro 薬理学的パネルでのリルザブルチニブの評価

様々な細胞又は細胞株由来の受容体、イオンチャネル、及びトランスポーターのパネル（[redacted]、[redacted]、[redacted]）に対する放射性リガンド結合アッセイにおいて、リルザブルチニブを 10 µmol/L の濃度でスクリーニングした。リルザブルチニブは 4 つの標的のみに活性を示した（ムスカリン M2 受容体［50.7%］、ニューロキニン NK2 受容体［50.2%］、ナトリウムチャネルサイト 2［59.3%］、及びドパミントランスポーター［81.8%］）。本パネルのその他の受容体、トランスポーター、及びイオンチャネルに対する活性はいずれも 50%未満であった（Module 4.2.1.2-7 [DVR0095]）。臨床データから、最高血漿中濃度（C_{max}）を指標とする全身曝露量は約 1 µmol/L であることが示されており、これは本アッセイで検討した濃度 10 µmol/L より 1 桁低い濃度であり、治療濃度を超えるものであるため、現時点では、このスクリーニングデータにおいて薬理作用が引き起こされるものはないと考えられる。また、臨床データから、平均 C_{max} は 150 ng/mL（0.22 µmol/L）であることが示されている。この C_{max} は総血漿中濃度（結合形+非結合形）の値である。臨床試験（PRN1008-018/EFC17093）で 400 mg を 1 日 2 回投与したときの血漿中非結合形 C_{max} は 5.63 nmol/L（3.75 ng/mL）であった。交差反応性試験で使用した 10 µmol/L の濃度は非結合形 C_{max} の 1776 倍であることから、安全域は十分と考えられる。ムスカリン M2 受容体、ニューロキニン N2 受容体、及びドパミントランスポーターは末梢に認められているが(22)(23)(24)、上記の 4 つの標的は、中枢神経系（CNS）にも存在し機能していることが知られている。定量的全身オートラジオグラフィーで組織分布を評価したところ、有色ラットの脳及び脊髄にリルザブルチニブは全く検出されず、非有色ラットのこれらの組織には低濃度（0.20 µg eq./g tissue 未満）でしか認められなかった（Module 2.6.4 [5.2 項]）。さらに、雌の非有色 Wistar Han ラットにリルザブルチニブを 50 mg/kg の用量で単回 PO 投与したとき、脳脊髄液中にリルザブルチニブは検出されなかった（Module 2.6.4 [5.3 項]）。したがっ

て、使用した濃度が治療濃度を上回っていたこと及びCNSにリルザブルチニブの曝露は認められなかったことを考慮すると、[redacted]アッセイで認められたムスカリンM2受容体、ニューロキニンNK2受容体、ナトリウムチャネルサイト2、及びドパミントランスポーターへの結合は、臨床的意義のあるものではないと考えられる。

3.3 健常人ボランティア及びITP患者の血小板での血小板凝集に対するリルザブルチニブの作用の欠如

血小板は高レベルのBTKを発現しているが、BTKシグナル伝達経路を迂回する代替的シグナル伝達経路が存在し(1)(2)、正常な血小板機能を保持しうるため、血小板に対するリルザブルチニブの作用をin vitroで評価した。健常人ボランティア及びITP患者両方の血小板を用いたin vitro血小板凝集アッセイを、血小板アゴニストの標準パネルを用いて実施し、血小板機能に対するリルザブルチニブの作用を評価した。臨床関連濃度0.3又は1 µmol/L（臨床試験での処方用量400 mgで得られたC_{max}のそれぞれ平均値及び最高値に相当）（Module 5.3.1.2-3 [PRN1008-008]）のリルザブルチニブで処理したとき、健常人ボランティア及びITP患者のいずれの血小板でも、血小板凝集に対する作用は認められなかった。既知の血小板凝集抑制剤であるroxifibanを、血小板凝集阻害の陽性対照として使用した。5名の健常人ボランティア（表10、図14）及び5名のITP患者（表11、図15）について、アゴニスト誘発最大血小板凝集に対する比率（ジメチルスルホキシド［DMSO］処理時を100%として正規化）を算出した結果を以下に要約する（Module 4.2.1.2-8 [DVR0307]）。

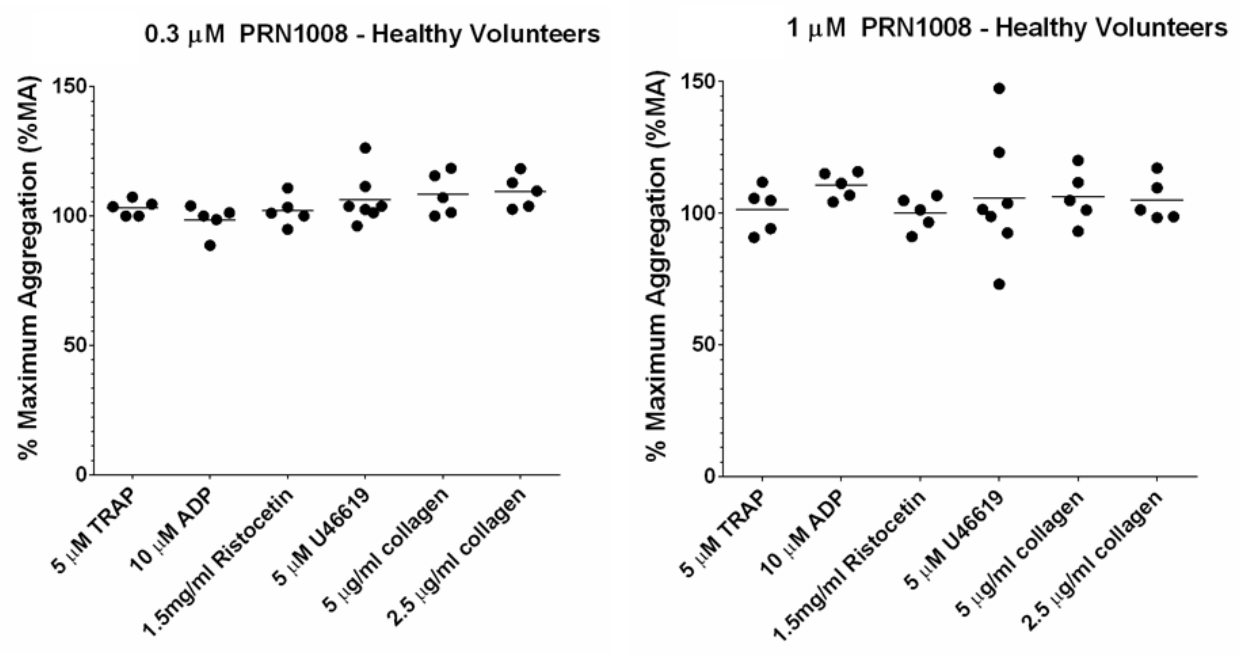
表 10 - In vitro healthy volunteer platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib

Agonist	Compound Treatment		
	10 µmol/L Roxifiban	0.3 µmol/L rilzabrutinib	1 µmol/L rilzabrutinib
5 µmol/L TRAP	18% ± 5% (n = 5)	103% ± 3% (n = 5)	101% ± 9% (n = 5)
10 µmol/L ADP	6% ± 8% (n = 5)	99% ± 6% (n = 5)	111% ± 5% (n = 5)
1.5 mg/mL Ristocetin	68% ± 18% (n = 5)	102% ± 6% (n = 5)	100% ± 6% (n = 5)
5 µg/mL Collagen	2% ± 2% (n = 5)	109% ± 8% (n = 5)	106% ± 10% (n = 5)
2.5 µg/mL Collagen	5% ± 4% (n = 5)	109% ± 6% (n = 5)	105% ± 8% (n = 5)
5 µmol/L U46619 (TP agonist)	4% ± 5% (n = 7)	106% ± 10% (n = 7)	106% ± 24% (n = 7)

Abbreviations: ADP: Adenosine diphosphate; DMSO: Dimethyl sulfoxide; SD: Standard deviation; TP: Thromboxane receptor; TRAP: Thrombin receptor activating peptide

Percent maximum platelet aggregation normalized such that the DMSO condition is 100% (mean ± SD) in 5 healthy volunteers in response to agonist treatment in the presence of test compounds. n indicates the total number of platelet aggregation tests per condition.

図 14 - In vitro heathy volunteer platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib (PRN1008) at 0.3 µmol/L and 1 µmol/L



Abbreviations: ADP: Adenosine diphosphate; ITP: Immune thrombocytopenia; MA: Maximum aggregation; TP: Thromboxane receptor; TRAP: Thrombin receptor activating peptide

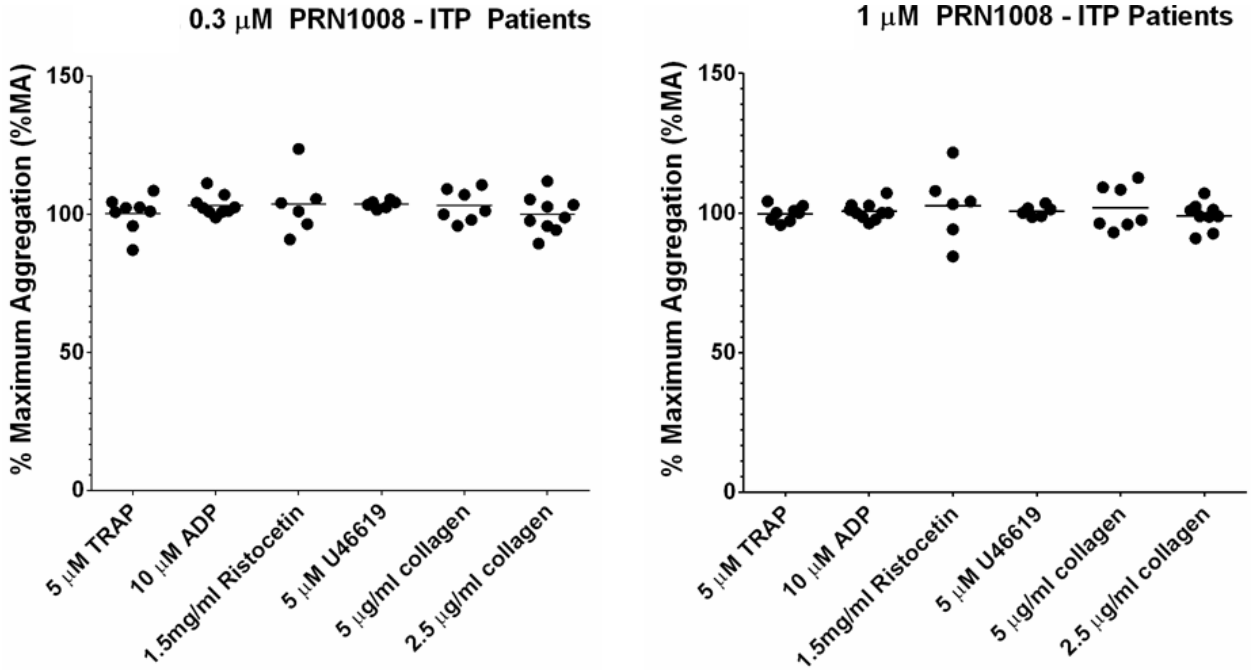
表 11 - In vitro ITP patient platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib

Agonist	Compound Treatment		
	10 µmol/L Roxifiban	**0.3 µmol/L rilzabrutinib**	**1 µmol/L rilzabrutinib**
5 µmol/L TRAP	16% ± 5% (n = 8)	100% ± 6% (n = 8)	100% ± 3% (n = 8)
10 µmol/L ADP	6% ± 5% (n = 9)	103% ± 4% (n = 9)	101% ± 3% (n = 10)
1.5 mg/mL Ristocetin	80% ± 13% (n = 6)	104% ± 11% (n = 6)	103% ± 13% (n = 6)
5 µg/mL Collagen	3% ± 2% (n = 7)	103% ± 6% (n = 7)	102% ± 8% (n = 7)
2.5 µg/mL Collagen	5% ± 2% (n = 9)	100% ± 7% (n = 9)	99% ± 5% (n = 8)
5 µmol/L U46619 (TP agonist)	4% ± 4% (n = 5)	106% ± 10% (n = 5)	106% ± 24% (n = 5)

Abbreviations: ADP: Adenosine diphosphate; DMSO: Dimethyl sulfoxide; ITP: Immune thrombocytopenia; SD: Standard deviation; TP: Thromboxane receptor; TRAP: Thrombin receptor activating peptide

Percent maximum platelet aggregation normalized such that the DMSO condition is 100% (mean ± SD) in 5 ITP patients in response to agonist treatment in the presence of test compounds. n indicates the total number of platelet aggregation tests per condition.

図 15 - In vitro ITP patient platelet aggregation in response to agonist treatment in the presence of rilzabrutinib (PRN1008) at 0.3 µmol/L and 1 µmol/L



Abbreviations: ADP: Adenosine diphosphate; ITP: Immune thrombocytopenia; MA: Maximum aggregation; TP: Thromboxane receptor; TRAP: Thrombin receptor activating peptide

4 安全性薬理試験

リルザブルチニブについて、一連の標準的な安全性薬理試験を実施した。実施した試験の要約及びその結果を[表 2.6.3.1]に示す。リルザブルチニブの試験は、探索的 hERG チャネル試験を除き、いずれも GLP 規制を遵守して実施した。

リルザブルチニブの開発は、以下の医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従って実施した：ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」(25)及び ICH S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（Q 波開始から T 波終了までの時間［QT］間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」(26)。これらの試験で、リルザブルチニブを PO 投与したときの CNS、心血管系（CV）及び呼吸系に対する in vivo 作用を検討した。In vitro hERG チャネル試験も実施した。リルザブルチニブを用いて実施した安全性薬理試験を表 12 に要約する。

表 12 - List of safety pharmacology studies

Study Type	Test system (strain)	Duration	Doses/Concentrations	GLP Compliance	Study Report Number
hERG	In vitro - Human embryonic kidney cells (HEK293)	NA	1 or 10 µmol/L	No	DVR0111 [表 2.6.3.4]
hERG	In vitro - Human embryonic kidney cells (HEK293)	NA	0.3, 1, 3, or 10 µmol/L	Yes	PAT0302 [表 2.6.3.4]
CNS	Rat (Wistar Han)	1 Day	0, 50, 150, or 500 mg/kg	Yes	DVR0176 [表 2.6.3.4]
CV - telemetered dog	Dog (Beagle)	1 Day	0, 50, 150, or 500 mg/kg	Yes	DVR0177 [表 2.6.3.4]
Respiratory	Dog (Beagle)	1 Day	0, 50, 150, or 500 mg/kg	Yes	DVR0177 [表 2.6.3.4]

Abbreviations: CNS: Central nervous system; CV: Cardiovascular; hERG: Human ether-a-go-go-related gene; GLP: Good laboratory practice; NA: Not applicable

4.1 中枢神経系

4.1.1 ラットへの経口投与による Irwin 試験

雄の Wistar Han ラット（6 匹/群）にリルザブルチニブを 0（媒体：米国薬局方［USP］収載無水クエン酸含有脱イオン水）、50、150 又は 500 mg/kg の用量で単回（強制）PO 投与した（DVR0176 試験 [表 2.6.3.4]）。Irwin 1968 (27)の変法に基づく機能観察総合評価法（体温の測定を含む）を、投与前（投与日の投与前、ベースライン）並びに投与 30、90、150 及び 300 分後に実施した。Irwin 観察期間終了時にラットを安楽殺した。

評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、体温、並びに行動学的、生理学的及び神経学的変化であった。500 mg/kg までの用量において、リルザブルチニブに関連する肉眼での行動学的、生理学的及び神経学的変化は認められず、体温の明らかな変化も認められなかった。

結論として、本試験の結果に基づくと、被験物質に関連する有害な影響は、検討した最高用量の 500 mg/kg までの用量で認められなかった。

4.2 心血管系

4.2.1 hERG チャネルに対するリルザブルチニブの影響の探索的 in vitro 評価

hERG チャネル電流（急速活性化遅延整流カリウムチャネル電流［I_{Kr}］のサロゲート）に対するリルザブルチニブの影響を、GLP 非適用探索試験（DVR0111 試験 [表 2.6.3.4]）で検討した。hERG をコードする相補的デオキシリボ核酸（cDNA）をヒト胎児腎臓細胞（HEK293 細胞）に安定的に導入した。リルザブルチニブ、溶媒及び陽性対照化合物（0.5 µmol/L E 4031）を HEK293 細胞とともにインキュベートした。ホールセルオートパラレルパッチクランプ法を用いて室温でイオン電導度を測定した。

リルザブルチニブは 1 及び 10 µmol/L の濃度で hERG チャネル電流をそれぞれ 0.3 ± 0.1%及び 33.8 ± 1.3%（平均値 ± 平均値の標準誤差［SEM］、n = 4）阻害した。陽性対照化合物は hERG チャネル電流を 97.8 ± 0.8%阻害した。

結論として、リルザブルチニブによる hERG チャネル電流阻害率は、10 µmol/L の濃度で 50%未満であった。

4.2.2 hERG チャネルに対するリルザブルチニブの影響の in vitro 評価

hERG チャネル電流（I_{Kr} のサロゲート）に対するリルザブルチニブの影響を検討した（PAT0302 試験 [表 2.6.3.4]）。hERG をコードする cDNA をヒト胎児腎臓細胞（HEK293 細胞）に安定的に導入した。ホールセルマニュアルパッチクランプ試験において、生理学的温度に近い温度（33～35°C）で hERG 電流を評価した。本試験では、HEK293 細胞を 0.3、1、3 若しくは 10 µmol/L（それぞれ 221.8、665.3、1996 若しくは 6653.3 ng/mL）のリルザブルチニブ、溶媒（4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸［HEPES］緩衝生理食塩液 + 0.1% DMSO）又は 60 nmol/L のテルフェナジン（陽性対照）とともにインキュベートした。各測定において、内因性電流の寄与を評価するため、最後に、最大作用が得られる濃度を超える濃度の対照物質（500 nmol/L E-4031）を添加し、測定を終了した。得られたデータから、阻害されなかった残りの電流を減じた曲線をデジタル処理で作成し、被験物質の hERG 阻害効力を算出した。

リルザブルチニブは hERG チャネル電流を 0.3、1、3 及び 10 µmol/L でそれぞれ 2.8 ± 1.3%、19.4 ± 0.8%、47.9 ± 1.0%及び 74.2 ± 0.9%（平均値 ± SEM、n = 3）阻害し、一方、溶媒対照の阻害率は 3.1 ± 0.8%であった。テルフェナジン（60 nmol/L）は hERG チャネル電流を 80.1 ± 8.1%（平均

値 ± 標準偏差、n = 2）阻害したことから、この試験系は hERG 阻害作用に感受性を示すことが確認された。

結論として、リルザブルチニブは hERG チャネル電流を阻害し、IC_{50} は 3.5 µmol/L（2328.7 ng/mL）であった。

4.2.3 覚醒イヌに単回経口投与したときの心血管系機能のテレメトリーによる評価

テレメーター装着覚醒イヌを用いて、CV 及び電気生理学的機能に対するリルザブルチニブの影響を評価した（DVR0177 試験 [表 2.6.3.4]）。ビーグル犬（雄 4 匹/用量）にリルザブルチニブを 0（媒体：無水クエン酸［USP］含有脱イオン水）、50、150 又は 500 mg/kg の用量で単回（強制）PO 投与した。投与はラテン方格法クロスオーバーデザインで行い、投与と投与の間に 3 日以上の休薬期間を設けた。血行動態及び心電図（ECG）パラメータ並びに体温を投与前（投与 1 時間前）に 1 回並びに投与後約 24 時間にわたり連続的にモニタリングした。

評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、心拍数、動脈血圧（収縮期、拡張期及び平均）、脈圧、体温、及び ECG パラメータ（Q、R 及び S 波［QRS］、心拍の間隔［RR］、P 波開始から QRS 複合波開始までの時間［PR］、QT 及び補正 QT 間隔［QTc］）であった。テレメトリーデータ採取期間終了後も、トキシコキネティクス（TK）評価用血液を採取した。血液は、投与前並びに投与の約 0.25、0.5、1、2、4、8 及び 24 時間後に採取し、血漿中リルザブルチニブ濃度を測定した。

死亡は認められなかった。リルザブルチニブに関連する一般状態の変化として、吐気、嘔吐及び糞便の異常（軟便／下痢）が 50 mg/kg 以上の用量で認められた。

ECG 波形、ECG 間隔（PR、QRS、RR、QT 及び QTc）及び体温に、リルザブルチニブに関連する変化は認められなかった。

リルザブルチニブに関連する血行動態の変化として、収縮期血圧及び脈圧の上昇が 150 mg/kg 以上の用量で認められた。500 mg/kg の用量では、被験物質に関連する変化として、心拍数の増加並びに拡張期及び平均動脈圧の上昇が認められた。血行動態の変化は持続時間が短く、程度も小さかったことから、いずれも毒性変化ではないと判断された。

リルザブルチニブを単回 PO 投与したときの TK パラメータを表 13 に要約する。50、150 及び 500 mg/kg の用量における t_{max} は、それぞれ 1.2、3.5 及び 3 時間であった。リルザブルチニブの全身曝露量は、50～500 mg/kg の用量で、用量比を下回って増加した。500 mg/kg の用量で嘔吐の発現頻度が増加したことにより、全身曝露量が低下した可能性があると考えられる。

表 13 - Cardiovascular and respiratory telemetry study: Summary of TK parameters

Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (ng•h/mL)
50	2770	6170
150	2550	13700

Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (ng•h/mL)
500	3760	20200

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; TK: Toxicokinetics

結論として、リルザブルチニブに関連する非毒性的な変化として、150 mg/kg 以上の用量で血圧上昇が、500 mg/kg の用量で心拍数増加が認められた。リルザブルチニブに関連する ECG 波形、ECG 間隔及び体温の変化は、検討した最高用量の 500 mg/kg までの用量で認められなかった。500 mg/kg の用量における C_{max} 及び AUC_{last} は、それぞれ 3760 ng/mL 及び 20200 ng•h/mL であった。

4.3 呼吸系

4.3.1 覚醒イヌに単回経口投与したときの呼吸機能の評価

テレメーター装着覚醒イヌを用いて、呼吸機能に対するリルザブルチニブの影響を検討した（DVR0177 試験 [表 2.6.3.4]）。ビーグル犬（雄 4 匹/用量）にリルザブルチニブを 0（媒体：無水クエン酸［USP］含有脱イオン水）、50、150 又は 500 mg/kg の用量で単回（強制）PO 投与した。投与はラテン方格法クロスオーバーデザインで行い、投与と投与の間に 3 日以上の休薬期間を設けた。ヘルメットシステムにおける気体の流入量及び排出量を検出する呼吸流量計（PNT）を用いて呼吸パラメータを測定した。PNT での結果を、埋込テレメトリー装置を介して得られた呼吸測定結果を用いて校正／同期させた。パラメータは、投与前（投与 1 時間前）に 1 回並びに投与後約 24 時間にわたり連続的にモニタリングした。

評価したパラメータは、生死、一般状態、体重、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量であった。また、テレメトリーデータ採取期間終了後も、TK 評価用血液を採取した。血液は、投与前並びに投与の約 0.25、0.5、1、2、4、8 及び 24 時間後に採取し、血漿中リルザブルチニブ濃度を測定した。

死亡は認められなかった。リルザブルチニブに関連する一般状態の変化として、吐気、嘔吐及び糞便の異常（軟便／下痢）が 50 mg/kg 以上の用量で認められた。

呼吸パラメータ（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に、リルザブルチニブに関連する変化は認められなかった。

TK パラメータは、4.2.3 項の表 13 に要約する。

結論として、リルザブルチニブに関連する呼吸機能の変化は、検討した最高用量の 500 mg/kg までの用量で認められなかった。500 mg/kg の用量における C_{max} 及び AUC_{last} は、それぞれ 3760 ng/mL 及び 20200 ng•h/mL であった。

4.4 腎／泌尿器系

リルザブルチニブの腎／泌尿器系の試験は実施していない。

4.5 自律神経系

リルザブルチニブの自律神経系の試験は実施していない。

4.6 胃腸管系

リルザブルチニブの胃腸管系の試験は実施していない。

4.7 他の器官系

他の器官系を評価する試験は実施していない。

5　薬力学的薬物相互作用試験

試験は実施していない。

6　考察及び結論

リルザブルチニブの生化学的特性評価により、本薬は BTK の強力な阻害薬であり、標的を持続的に占有することが示された。速度論的評価により、リルザブルチニブは結合速度が速く、解離速度が遅いことが示された。阻害作用機序は、ATP 結合の競合的阻害によるものであった。重要なこととして、リルザブルチニブは BTK のシステインに共有結合するにもかかわらず、リルザブルチニブと BTK との相互作用は完全に可逆的であった。その他のオフターゲットキナーゼのうち、リルザブルチニブが強い活性を示したものはほとんどなく、阻害作用の持続時間も短かった（Module 4.2.1.1-1 [DVR0102]）。

リルザブルチニブの BTK 阻害作用による変化がみられると予想される複数のセルベース系で、リルザブルチニブの結合持続性、効力及び選択性を評価した。リルザブルチニブの細胞での占有及び結合持続性が、BTK を発現しているヒト B 細胞株である Ramos 細胞で確認された。BCR 誘導性 B 細胞活性化に対するリルザブルチニブの機能的な阻害能についても、CD69 発現を指標として、HWB 及び PBMC で確認された。B 細胞活性化アッセイにおけるリルザブルチニブの効力は、BTK 標的占有における効力と同程度であった（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。リルザブルチニブの BTK 阻害作用により、抗 IgM 抗体誘発ヒト B 細胞増殖が抑制されることも示された（Module 4.2.1.1-3 [DVR0167]）。更なる 2 つのアッセイで、IgG 介在性単球活性化及び IgE 介在性好塩基球活性化に対するリルザブルチニブの阻害能が、それぞれ TNFα 産生及び CD63 発現に対する阻害能を指標として確認された（Module 4.2.1.1-4 [DVR0286]及び Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。したがって、これらの結果から、BCR 及び Fc 受容体シグナル伝達に対するリルザブルチニブの予想されるオンターゲット作用が確認された。

リルザブルチニブがオフターゲットに対して作用を示さないことは、BTK を発現していない細胞又は BTK 経路を介さない過程のいずれかを用いた複数の細胞を用いたクロススクリーニングにより確認された。リルザブルチニブの機能的作用は、BTK を発現していない T 細胞で評価した。予想されたように、TCR 誘導性 T 細胞活性化及びカルシウム流入誘導性 T 細胞活性化に対するリルザブルチニブの阻害作用はほとんど認められなかったことから、リルザブルチニブは、T 細胞活性化を指標とする、細胞へのオフターゲット作用を示さないことが明らかになった（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。オフターゲット作用を検討するため、エフェクター細胞（NK 細胞）に BTK が発現しておらず、リルザブルチニブが弱い阻害作用しか示さなかった ITK に高感受性のアッセイを用いて、ADCC に対するリルザブルチニブの作用についても評価した。リルザブルチニブは ADCC 阻害活性を示さなかったことから、リルザブルチニブの細胞での BTK 選択性を示す追加のエビデンスが得られた（Module 4.2.1.1-5 [DVR0166]）。非 BTK 介在性経路である IL-4 誘導性 STAT6 活性化に対するリルザブルチニブの阻害能を Ramos 細胞で評価したところ、リルザブルチニブは、この非 BTK 依存性細胞アッセイで不活性であった。また、BTK は関与しないことが示されている ME-180 細胞の EGFR シグナル伝達（EGF 刺激による転写因子 AP-1 の活性化）に対しても、リルザブルチニブは影

響を及ぼさなかった。BTK を発現していない別の細胞である HCT-116 細胞を用いた細胞傷害性アッセイにおいて、リルザブルチニブはほとんど作用を示さなかった（Module 4.2.1.1-2 [DVR0070]）。[redacted]スクリーニングプロファイルにおいて、リルザブルチニブが 50%を上回る活性を示したのは、4 つの標的（ムスカリン M2 受容体、ニューロキニン NK2 受容体、ナトリウムチャネルサイト 2、及びドパミントランスポーター）のみであり、本パネルのその他の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する活性は、いずれも 50%未満であった（Module 4.2.1.2-7 [DVR0095]）。臨床データから、C_{max} を指標とする全身曝露量は約 1 µmol/L であることが示されており、これは本アッセイで検討した濃度 10 µmol/L より 1 桁低い濃度であり、治療濃度を超えるものであるため、現時点では、この潜在的オフターゲット活性により薬理作用が引き起こされることはないと考えられる。[redacted]放射性リガンド結合アッセイにおいて、チオシアネートは 50%を超える活性を示さなかった（Module 4.2.1.2-10 [100056422_014-I&I-21]）。最後に、健常人ボランティア及び ITP 患者由来血小板をリルザブルチニブで処理したときの影響を検討した。血小板は高レベルの BTK を発現しているが、非 BTK 介在性のシグナル伝達機序を介して、正常な血小板機能が保持されうる(1)(2)。健常人ボランティア及び ITP 患者由来の血小板において、リルザブルチニブ処理による血小板凝集への影響は認められず、このことからもリルザブルチニブのオフターゲット活性の欠如が確認された（Module 4.2.1.2-8 [DVR0307]）。

リルザブルチニブの代謝物、不純物及び立体異性体の薬理学的プロファイルを、一連の生化学的アッセイ及び細胞アッセイで評価した。ヒト主要代謝物である PRN4400 は、検討した最高濃度（5000 nmol/L）で BTK 阻害作用を示さず、検討したいずれの時点でも測定可能な BTK 占有を示さず、HWB 細胞アッセイで BCR 誘導性 CD69 発現阻害作用を示さなかった（Module 4.2.1.2-9 [DVR0528]）。特記すべきこととして、チオシアネートは、ヒトの血清中に約 3～15 mg/L の濃度（喫煙者及びニトロプルシドを服用している患者ではより高濃度）で存在する内因性化合物であり(28)、リルザブルチニブの代謝物（PRN4400）は全体のチオシアネート濃度にほとんど寄与しない。リルザブルチニブを用いて実施したいずれの非臨床試験でも、PRN4400 の毒性を示すエビデンスは認められなかった。PRN834 は、ヒト微量代謝物であることに加えて、リルザブルチニブ単離の過程で主要な不純物としても特定された（Module 3.2.S.3.2.2）が、生化学的キナーゼアッセイにおいて、BTK 阻害作用がリルザブルチニブの 10 分の 1 未満であることが示され、検討したいずれの時点でも測定可能な BTK 占有を示さなかった（Module 4.2.1.2-9 [DVR0528]）。ごく微量のヒト代謝物である PRN618 は、生化学的キナーゼアッセイにおいて、リルザブルチニブと同程度の効力を示したが、経時的な BTK 占有に関して持続が短く、CD69 発現量を指標として BCR 誘導性 B 細胞活性化阻害作用を評価する細胞アッセイにおいて、効力がリルザブルチニブの約 4 分の 1 であった（Module 4.2.1.2-9 [DVR0528]）。リルザブルチニブの E 体及び Z 体の BTK に対する生化学的活性を評価したところ、BTK 酵素活性及び占有率への効力は同程度であり、差はなかった。リルザブルチニブは立体中心を 1 か所有し、R 体である。これに対応する S 体である PRN1418 は、リルザブルチニブよりも BTK 阻害

作用が弱く、解離速度が速かった（Module 4.2.1.1-10 [DVR0308]）。したがって、リルザブルチニブの BTK 阻害作用は、その主要代謝物、不純物及び立体異性体よりも強いことが示された。

マウス、ラット及びイヌを用いた様々な in vivo 疾患モデルでリルザブルチニブの抗炎症作用を評価した。いずれの試験でも、PD マーカーとして BTK 占有率も測定した。ラットにリルザブルチニブを投与したとき、投与 1 時間後の脾臓で高い BTK 占有が認められた。これらの動物では、血漿中リルザブルチニブ濃度が 10 ng/mL 未満に減少した後も標的占有（61～75%）が維持された。このことから、in vivo におけるリルザブルチニブの BTK への結合は、リルザブルチニブが体循環血漿中から消失した後も持続することが示された（Module 4.2.1.1-11 [DVR0106]）。また、リルザブルチニブはラットのコラーゲン誘発関節炎（Module 4.2.1.1-12 [DVR0200]）及び受動的アルサス反応（Module 4.2.1.1-13 [DVR0287]）に対しても阻害効果を示した。これらのラット試験のいずれにおいても、リルザブルチニブによる BTK 占有率と疾患抑制作用の間に相関が認められたことから、リルザブルチニブは BTK 阻害作用を介してこれらの炎症過程を抑制していることが示された。リルザブルチニブは、マウス ITP モデル（Module 4.2.1.1-14 [DVR0288]）及び受動的皮膚アナフィラキシーモデル（Module 4.2.1.1-16 [DVR0447]）で抗炎症作用を示すことも示され、いずれのモデルでもリルザブルチニブの治療効果は脾臓の BTK 占有率と相関していた。自然発症 PF を有するイヌにリルザブルチニブを投与したとき、従来のコルチコステロイド投与を必要とすることなく、全例で 20 週目までに臨床症状が完全又は大幅に改善した。全例で投与 4 時間後に高い（>70%）BTK 占有が認められ、投与期間を通して維持された（Module 4.2.1.1-15 [DVR0372]）。総合すると、イヌにおけるこれらの in vivo 所見から、リルザブルチニブは、BTK への結合により FcγR 介在性自己抗体シグナル伝達を抑制し、B 細胞シグナル伝達を遮断し、B 細胞活性化に作用することによって自己抗体産生に作用を示し、その結果、自己抗体介在性天疱瘡に治療効果を示すことが明らかになった。

イヌの毒性試験で認められた食欲減退の原因を検討するため、消化管 - 脳軸に対するリルザブルチニブの副次的薬理作用を、イヌ及びげっ歯類モデルで評価した。消化管は体内で最も大きな内分泌器官であり、食欲の制御において、また種々の制御性ペプチドホルモンの供給源として、重要な役割を果たしている。満腹感は、消化管と脳の食欲制御中枢との間の情報伝達を行う感覚神経系によって制御されていると考えられている。レプチン及び PYY はラット及びヒトの摂食行動を顕著に減少させることが示されている。いずれのホルモンも消化管から脳に顕著な食欲抑制シグナルを伝達し、摂食行動を顕著に減少させる(29)(30)(31)。

イヌにリルザブルチニブを単回投与したとき、食欲抑制ホルモンである PYY 及びレプチンの血中濃度が有意に増加した（Module 4.2.1.2-1 [DVR0226]）ことから、胃内容排出及び食欲に対するリルザブルチニブの作用の標的組織として胃が特定された。ラットを用いた追加試験で、リルザブルチニブの PO 投与により胃内容排出遅延並びに体重及び摂餌量の減少が生じることが裏付けられた。胃内容排出に対する作用は、ラットにリルザブルチニブを IJ 投与したときには認められなかったことから、リルザブルチニブのこの副次的 PD 作用に胃が関与していることが裏付けられた（Module 4.2.1.2-2 [DVR0235]）。

安全性薬理試験のコアバッテリーにおいて、CNS、CV 及び呼吸系に、リルザブルチニブに関連する有害な影響は認められなかった。ラットの試験で、リルザブルチニブの CNS に対する影響の有無を評価したとき、リルザブルチニブに関連する肉眼的行動プロファイル、生理学的及び神経学的状態、並びに体温の変化は、500 mg/kg までの用量で認められなかった。In vitro の hERG に対するリルザブルチニブの IC_{50} は 3.5 µmol/L（2328.7 ng/mL）であった。リルザブルチニブはタンパク結合率が高く（97.5%）、400 mg BID 投与時の C_{max}（150 ng/mL）で予想される血漿中遊離型濃度は 3.75 ng/mL（遊離型分率を 2.5%と想定）であることから、ヒトで QT 延長が生じるリスクは低いと考えられる。この曝露量は、hERG IC_{50} と比較して、約 621 分の 1 である。In vivo において、雄イヌの CV 及び呼吸系への影響に関する無毒性量は 500 mg/kg と判断された（平均 C_{max} 及び AUC_{last} は、それぞれ 3760 ng/mL 及び 20200 ng•h/mL）。

結論として、一連の in vitro 及び in vivo 試験でリルザブルチニブの特性を評価し、その疾患修飾活性を分析した。リルザブルチニブは強力かつ持続的な BTK 阻害薬であり、良好な非臨床安全性プロファイルを示した。本薬は、ITP の発症に重要な BCR 及び FcγR シグナル伝達を阻害した。リルザブルチニブは、マウス ITP モデルを含む in vivo 抗体介在性疾患モデルでも有益な効果を示した。これらの非臨床薬理試験から、ITP 患者を対象としてリルザブルチニブを臨床で評価することが支持される。

参 考 文 献

1. Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. Br J Haematol. 2001 Jul;114(1):141-9.
2. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2016 Jan 28;374(4):323-32.
3. Sideras P, Smith CI. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. Adv Immunol. 1995;59:135-223.
4. Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. Immunol Rev. 2009 Mar;228(1):58-73.
5. Chang BY, Huang MM, Francesco M, Chen J, Sokolove J, Magadala P, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. Arthritis Res Ther. 2011 Jul 13;13(4):R115.
6. Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, et al. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. Nat Chem Biol. 2011 Jan;7(1):41-50.
7. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jul 20;107(29):13075-80.
8. Kim KH, Maderna A, Schnute ME, Hegen M, Mohan S, Miyashiro J, et al. Imidazo[1,5-a]quinoxalines as irreversible BTK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. Bioorg Med Chem Lett. 2011 Nov 1;21(21):6258-63.
9. Tan SL, Liao C, Lucas MC, Stevenson C, DeMartino JA. Targeting the SYK-BTK axis for the treatment of immunological and hematological disorders: recent progress and therapeutic perspectives. Pharmacol Ther. 2013 May;138(2):294-309.
10. Xu D, Kim Y, Postelnek J, Vu MD, Hu DQ, Liao C, et al. RN486, a selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor, abrogates immune hypersensitivity responses and arthritis in rodents. J Pharmacol Exp Ther. 2012 Apr;341(1):90-103.
11. Hutcheson J, Vanarsa K, Bashmakov A, Grewal S, Sajitharan D, Chang BY, et al. Modulating proximal cell signaling by targeting Btk ameliorates humoral autoimmunity and end-organ disease in murine lupus. Arthritis Res Ther. 2012 Nov 8;14(6):R243.
12. Rankin AL, Seth N, Keegan S, Andreyeva T, Cook TA, Edmonds J, et al. Selective inhibition of BTK prevents murine lupus and antibody-mediated glomerulonephritis. J Immunol. 2013 Nov 1;191(9):4540-50.
13. Chalmers SA, Glynn E, Garcia SJ, Panzenbeck M, Pelletier J, Dimock J, et al. BTK inhibition ameliorates kidney disease in spontaneous lupus nephritis. Clin Immunol. 2018 Dec;197:205-18.

14. Lebakken CS, Riddle SM, Singh U, Frazee WJ, Eliason HC, Gao Y, et al. Development and applications of a broad-coverage, TR-FRET-based kinase binding assay platform. J Biomol Screen. 2009 Sep;14(8):924-35.
15. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. J Clin Oncol. 2013 Jan 1;31(1):88-94.
16. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Dec;319(3):998-1008.
17. Hancock MK, Lebakken CS, Wang J, Bi K. Multi-pathway cellular analysis of compound selectivity. Mol Biosyst. 2010 Oct;6(10):1834-43.
18. Zhong Y, Dong S, Strattan E, Ren L, Butchar JP, Thornton K, et al. Targeting interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) and resting lymphocyte kinase (RLK) using a novel covalent inhibitor PRN694. J Biol Chem. 2015 Mar 6;290(10):5960-78.
19. Ihrke PJ, Stannard AA, Ardans AA, Griffin CE. Pemphigus foliaceus in dogs: a review of 37 cases. J Am Vet Med Assoc. 1985 Jan 1;186(1):59-66.
20. Bizikova P, Dean GA, Hashimoto T, Olivry T. Cloning and establishment of canine desmocollin-1 as a major autoantigen in canine pemphigus foliaceus. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Oct 15;149(3-4):197-207.
21. Bizikova P, Olivry T, Mamo LB, Dunston SM. Serum autoantibody profiles of IgA, IgE and IgM in canine pemphigus foliaceus. Vet Dermatol. 2014 Oct;25(5):471-e75.
22. Anini Y, Brubaker PL. Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. Endocrinology. 2003 Jul;144(7):3244-50.
23. Jung HJ, Priefer R. Tachykinin NK2 antagonist for treatments of various disease states. Auton Neurosci. 2021 Nov;235:102865.
24. Camacho-Hernandez GA, Gopinath A. Okorom AV, Khoshbouei H, Newman AH. Development of a fluorescently labeled ligand for rapid detection of DAT in human and mouse peripheral blood monocytes. JACS Au. 2024 Jan 24;4(2):657-65.
25. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals - S7A. Geneva, Switzerland: ICH harmonised tripartite guideline, 2000. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/S7A_Guideline.pdf
26. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals – S7B. Geneva, Switzerland: ICH harmonised tripartite guideline, 2005. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/S7B_Guideline.pdf

27. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968 Sep 20;13(3):222-57.
28. Nipride RTU (sodium nitroprusside) Prescribing Information. Exela Pharma Sciences, LLC, revised 03/2017. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209387s000lbl.pdf
29. Unniappan S, Kieffer TJ. Leptin extends the anorectic effects of chronic PYY(3-36) administration in ad libitum-fed rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008 Jul;295(1):R51-8.
30. Karra E, Chandarana K, Batterham RL. The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. J Physiol. 2009 Jan 15;587(1):19-25.
31. De Silva A, Bloom SR. Gut hormones and appetite control: A focus on PYY and GLP-1 as therapeutic targets in obesity. Gut Liver. 2012 Jan;6(1):10-20.

サノフィ株式会社

リルザブルチニブ

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 13

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 9

3　　副次的薬理試験 10

4　　安全性薬理試験 11

5　　薬力学的薬物相互作用試験 13

表　目　次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - Overview - Study program 4

表 2.6.3.4 - Safety pharmacology - Noteworthy findings..... 11

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - Overview - Study program

Test Article: Rilzabrutinib or PRN1008 (as noted)

Type of Study	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number[a]	Location
Primary Pharmacodynamics - In Vitro						
Inhibition of BTK and other protein kinases; Competition with ATP	No	Reaction mixture of enzyme, substrate and cofactors using Caliper Life Sciences LabChip 3000 Drug Discovery System kinase assays	In vitro	[redacted]	[DVR0102]	4.2.1.1-1
BTK binding kinetics and reversibility; Biochemical occupancy of other kinases	No	His-tagged, full length recombinant human BTK; fluorescence competition	In vitro	Principia	[DVR0102]	4.2.1.1-1
BTK occupancy in human B cell line	No	Human B cells expressing BTK (Ramos cells); irreversible probe cell binding	In vitro	Principia	[DVR0070]	4.2.1.1-2
Inhibition of BCR-induced human B cell activation	No	Human whole blood; anti-IgM-induced CD69 expression on B cells or PBMCs	In vitro	Principia	[DVR0070]	4.2.1.1-2
Inhibition of human B cell proliferation	No	Human PBMCs; anti-IgM-induced B cell proliferation	In vitro	[redacted]	[DVR0167]	4.2.1.1-3
Inhibition of antibody-mediated human monocyte activation	No	Human monocytes purified from PBMCs; anti-IgG-induced TNFα production	In vitro	Principia	[DVR0286]	4.2.1.1-4
Inhibition of antibody-mediated human basophil activation	No	Human whole blood; anti-IgE-induced CD63 expression	In vitro	Principia	[DVR0070]	4.2.1.1-2
Human T cell function	No	Human T cell line (Jurkat); NFAT activation	In vitro	[redacted]	[DVR0070]	4.2.1.1-2
Antibody dependent cellular cytotoxicity	No	anti-CD20-treated human mantle cell lymphoma cell line (Jeko-1) as targets and PRN1008-treated human PBMCs as effectors; cell lysis	In vitro	[redacted]	[DVR0166]	4.2.1.1-5

Abbreviations: ATP: adenosine triphosphate; BCR: B-cell receptor; BTK: Bruton tyrosine kinase; CD: cluster of differentiation; GLP: good laboratory practice; IgE: immunoglobulin E; IgG: immunoglobulin G; IgM: immunoglobulin M; NFAT: nuclear factor of activated T-cell; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; TNFα: tumor necrosis factor alpha

a Some study numbers are listed more than once since the study report includes data from multiple studies.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - Overview - Study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib or PRN1008 (as noted)

Type of Study	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number[a]	Location
Primary Pharmacodynamics - In Vitro (Continued)						
Non-BCR induced B cell function	No	Human B cell line (Ramos cells); IL-4 induced STAT6 activation	In vitro	[redacted]	[DVR0070]	4.2.1.1-2
EGFR signaling	No	Human cervical carcinoma cells (ME-180); EGF-induced AP-1 activation	In vitro	[redacted]	[DVR0070]	4.2.1.1-2
Cellular cytotoxicity	No	Human colon carcinoma cells (HCT-116); viability	In vitro	Principia	[DVR0070]	4.2.1.1-2
NA						4.2.1.1-6
NA						4.2.1.1-7
NA						4.2.1.1-8
NA						4.2.1.1-9
Biochemical activity of isomers	No	BTK recombinant human protein and His-tagged, full length recombinant human BTK; Caliper Lab Chip kinase assay and fluorescence competition	In vitro	Principia	[DVR0308]	4.2.1.1-10

Abbreviations: AP-1: activator protein 1; BCR: B-cell receptor; BTK: Bruton tyrosine kinase; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; GLP: good laboratory practice; STAT: signal transducer and activator of transcription

a Some study numbers are listed more than once since the study report includes data from multiple studies.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - Overview - Study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib or PRN1008 (as noted)

Type of Study	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number[a]	Location
Primary Pharmacodynamics - In Vivo						
Murine BTK occupancy	No	Female Lewis and Sprague Dawley rats; C57BL/6 mice	Oral gavage for rats; oral in feed for mice	Principia	[DVR0106]	4.2.1.1-11
Rat collagen-induced arthritis	No	Female Lewis rats	Oral gavage	[redacted] and Principia	[DVR0200]	4.2.1.1-12
Rat passive arthus reaction	No	Female Sprague Dawley rats	Oral gavage	[redacted] and Principia	[DVR0287]	4.2.1.1-13
Mouse immune thrombocytopenia	No	Male BALB/c mice	Oral gavage	[redacted] and Principia	[DVR0288]	4.2.1.1-14
Canine Pemphigus study	No	Male and female dogs with naturally occurring pemphigus foliaceus	Oral, tablet	[redacted]	[DVR0372]	4.2.1.1-15
Mouse passive cutaneous anaphylaxis	No	Female BALB/c mice	Oral gavage	[redacted] and Principia	[DVR0447]	4.2.1.1-16
Metabolite Assessment	No	Human plasma	In vitro	[redacted]	[DVR0181]	4.2.1.1-17
Secondary Pharmacodynamics - In Vivo						
Canine gut hormones	No	Male beagle dogs	Oral gavage	[redacted]	[DVR0226]	4.2.1.2-1
Rat gastric emptying	No	Female Wistar Han rats	Oral gavage and intrajejunal	Principia	[DVR0235]	4.2.1.2-2
Gut-CNS hormonal regulation axis	No	Female Wistar Han rats	Oral gavage, intrajejunal, and/or intravenous	Principia	[DVR0223] [DVR0224] [DVR0219] [DVR0225]	4.2.1.2-3 4.2.1.2-4 4.2.1.2-5 4.2.1.2-6
Radioligand binding (cross-reactivity)	No	Panel of receptors, ion channels, and transporters	In vitro	[redacted]	[DVR0095]	4.2.1.2-7

2.6.3 薬理試験概要表
SAR444671 - リルザブルチニブ

Type of Study	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number[a]	Location
Platelet aggregation	No	Human platelets from healthy and immune thrombocytopenia patients; Lumiaggregometer	In vitro	[redacted]	[DVR0307]	4.2.1.2-8
Biochemical and cellular activity of metabolites	No	Reaction mixture of enzyme, substrate and cofactors using Caliper Life Sciences LabChip 3000 Drug Discovery System kinase assays; BTK recombinant human protein, human whole blood	In vitro	[redacted] and Principia	[DVR0528]	4.2.1.2-9
Radioligand binding assay and enzyme inhibition assay (cross-reactivity) of a metabolite (RA16689850A; also known as PRN4400)	No	Panel of receptors, ion channels, and transporters for binding assay; panel of 19 enzymes for enzyme inhibition assay	In vitro	[redacted]	[100056422_014-I&I-21]	4.2.1.2-10

Abbreviations: BTK: Bruton tyrosine kinase; CNS: central nervous system; GLP: good laboratory practice

a Some study numbers are listed more than once since the study report includes data from multiple studies.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - Overview - Study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib or PRN1008 (as noted)

Type of Study	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number[a]	Location
Safety Pharmacology						
Central nervous system						
Irwin test	Yes	Wistar Han IGS (Crl:WI[Han]) rats (male)	Oral gavage	[redacted] USA	[DVR0176]	4.2.1.3-3
Cardiovascular in vitro						
hERG channel	No	Human embryonic kidney cells (HEK293)	In vitro	[redacted] USA	[DVR0111]	4.2.1.3-1
hERG channel	Yes	Human embryonic kidney cells (HEK293)	In vitro	[redacted] USA	[PAT0302]	4.2.1.3-2
Cardiovascular in vivo						
Cardiovascular and electrophysiological function	Yes	Beagle dogs (male)	Oral gavage	[redacted] USA	[DVR0177]	4.2.1.3-4
Respiratory						
Respiratory function	Yes	Beagle dogs (male)	Oral gavage	[redacted] USA	[DVR0177]	4.2.1.3-4
Pharmacodynamic Drug Interactions						
No studies conducted						

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; HEK: human embryonic kidney; hERG: human ether-a-go-go related gene; TK: toxicokinetic

a Some study numbers are listed more than once since the study report includes data from multiple studies.

2　効力を裏付ける試験

Module [2.6.2]を参照のこと。

3　副次的薬理試験

Module [2.6.2]を参照のこと。

4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4 - Safety pharmacology - Noteworthy findings

Test Article: Rilzabrutinib

Organ System Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose or concentration	No. per group and gender	Noteworthy Findings	GLP	Study Number
Cardiovascular (in vitro)							
hERG	Human, HEK293 cells	In vitro	1 and 10 µM	NA	hERG tail current 1 µM: 0.3% inhibition 10 µM: 33.8% inhibition	No	[DVR0111]
hERG	Human, HEK293 cells	In vitro	0.3, 1, 3, and 10 µM	NA	hERG tail current 0.3 µM: 2.8% inhibition 1 µM: 19.4% inhibition 3 µM: 47.9% inhibition 10 µM: 74.2% inhibition IC_{50} = 3.5 µM (Hill coefficient = 1.1)	Yes	[PAT0302]

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; HEK: human embryonic kidney; hERG: human ether-a-go-go-related gene; IC_{50}: inhibitory concentration 50% (concentration causing half-maximal inhibition); NA: not applicable

表 2.6.3.4 - Safety pharmacology - Noteworthy findings (Continued)

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose or concentration	No. per group and gender	Noteworthy Findings[a]	GLP	Study Number
Cardiovascular (in vivo)							
Cardiovascular and electrophysiological function	Dog, beagle	Oral gavage	0, 50, 150, 500 mg/kg	4 M[b]	≥50 mg/kg: Retching, emesis, diarrhea ≥150 mg/kg: ↑ Heart rate, blood pressure (systolic, diastolic, mean arterial), and pulse pressure NOAEL: 500 mg/kg AUC_{last}: 20200 ng.hr/mL C_{max}: 3760 ng/mL	Yes	[DVR0177]
Central Nervous System							
Irwin test	Rat, Han Wistar	Oral gavage	0, 50, 150, 500 mg/kg	6 M	-	Yes	[DVR0176]
Respiratory							
Respiratory function	Dog, beagle	Oral gavage	0, 50, 150, 500 mg/kg	4 M[b]	- NOAEL: 500 mg/kg AUC_{last}: 20200 ng.hr/mL C_{max}: 3760 ng/mL	Yes	[DVR0177]

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; GLP: good laboratory practice; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level

a A dash (-) means there were no noteworthy findings.

b The same 4 dogs were dosed in a Latin square, cross-over design with approximately 3 days between doses for assessment of cardiovascular and respiratory parameters.

5　薬力学的薬物相互作用試験

試験は実施しなかった。