## 2.6.1 緒言

ネタルスジルメシル酸塩は、Alcon 社が創出した化合物で、強力な Rho キナーゼ (ROCK) 及びノルエピネフリントランスポーター (NET) デュアル阻害薬である。ネタルスジルは、点眼後に眼組織でさらに強力な ROCK 阻害作用を有する AR-13503 に代謝される。ネタルスジル及び活性代謝物である AR-13503 は ROCK1 及び ROCK2 に対して強力な阻害活性を有し、線維柱帯細胞におけるアクチンストレス線維の脱重合及び細胞接着能を低下させる。これに伴う線維柱帯の弛緩及び上強膜静脈圧 (EVP) の低下によって線維柱帯流出路からの房水流出が増大する。また、ネタルスジルは NET に結合することから、NET を介した EVP 低下や房水産生抑制作用も眼圧下降作用に寄与している。すなわちネタルスジルの ROCK/NET デュアル阻害による房水流出促進作用及び房水産生抑制作用に続いて、AR-13503 の強力な ROCK 阻害による房水流出促進作用が発揮されることにより眼圧下降作用を示す。

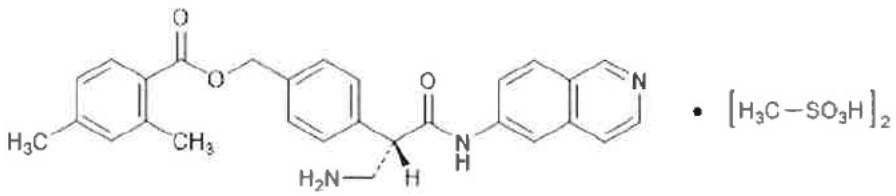



**図 2.6.1-1. ネタルスジルメシル酸塩の構造式**

申請する効能・効果及び用法・用量を以下に示す。

効能・効果　次の疾患で、他の緑内障治療薬が効果不十分又は使用できない場合：緑内障、高眼圧症

用法・用量　1 回 1 滴、1 日 1 回点眼する。

# 目次

2.6.2 薬理試験の概要文 ..... 3
2.6.2.1 まとめ ..... 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ..... 5
2.6.2.3 作用機序に関する試験 ..... 6
2.6.2.4 副次的薬理試験 ..... 7
2.6.2.5 安全性薬理試験 ..... 8
2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 9
2.6.2.7 考察及び結論 ..... 10
2.6.2.8 図表 ..... 12
2.6.2.9 参考文献一覧 ..... 12



Confidential

**表 2.6.2-1. 非臨床薬理試験概要で用いた略語一覧**

| 略語又は用語 | 略さない表現又は定義 |
|---|---|
| AR-13084 | AR-13503 のラセミ体 |
| AR-13324 | ネタルスジルメシル酸塩 |
| AR-13503 | ネタルスジルの活性代謝物 |
| BLQ | Below the lower limit of quantification（定量下限未満） |
| $C_{max}$ | Maximum concentration（最高濃度） |
| EVP | Episcleral venous pressure（上強膜静脈圧） |
| FOB | Functional observational battery（機能観察総合評価法） |
| GLP | Good Laboratory Practice（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準） |
| HEK293 細胞 | Human embryonic kidney 293 細胞 |
| hERG | Human ether-a-go-go related gene |
| $IC_{50}$ | Half maximal inhibitory concentration（50%阻害濃度） |
| Ki | Inhibition constant（阻害定数） |
| MDCK 細胞 | Madin-Darby canine kidney 細胞 |
| NET | Norepinephrine transporter（ノルエピネフリントランスポーター） |
| PK | Pharmacokinetics（薬物動態学） |
| ROCK | Rho-associated protein kinase（Rho キナーゼ） |
| SD ラット | Sprague Dawley ラット |
| STN1013900 点眼液 | 有効成分としてネタルスジルメシル酸塩含有する点眼液 |

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

STN1013900 点眼液の有効成分であるネタルスジルメシル酸塩 (AR-13324) は強力な Rho キナーゼ (ROCK) 及びノルエピネフリントランスポーター (NET) デュアル阻害薬であり、その物理化学的特性は眼内標的組織へ効率的に移行するよう設計されている。AR-13324 は、点眼後に眼組織でさらに強力な ROCK 阻害作用を有する AR-13503 に代謝される。AR-13324 及び活性代謝物である AR-13503 は ROCK1 及び ROCK2 に対して強力な阻害活性を有し、線維柱帯細胞におけるアクチンストレス線維の脱重合及び細胞接着能を低下させる[1]。これに伴う線維柱帯の弛緩及び上強膜静脈圧 (EVP) の低下によって線維柱帯流出路からの房水流出が増大する[2][3]。また、AR-13324 は NET に結合することから、NET を介した EVP 低下や STN1013900 点眼液が示す房水産生抑制作用も眼圧下降作用に寄与している事が報告されている[2][3]。ROCK を介する作用については AR-13324 及び AR-13503 のヒト ROCK1 及びヒト ROCK2 に対する阻害活性及びウサギにおける房水流出促進作用を確認した。NET を介する作用については AR-13324 のヒト NET に対する阻害活性及びウサギにおける房水産生抑制作用を確認した。これら検討結果から、AR-13324 は ROCK/NET デュアル阻害薬であることが明らかとなった。また、臨床試験で確認された STN1013900 点眼液の強力かつ持続的な眼圧下降作用は、巧みに設計された AR-13324 の物理化学的及び薬理学的特性、すなわち AR-13324 の ROCK/NET デュアル阻害による房水流出促進作用及び房水産生抑制作用に続いて、AR-13503 の強力な ROCK 阻害による房水流出促進作用が発揮されることに起因していると考えられた。

安全性薬理試験は、ICH ガイドラインで定められた中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する作用について検討した。すべての安全性薬理に関する試験は GLP を遵守して実施されたが、ラットを用いた 7 日間反復静脈内投与試験（添付資料 4.2.3.2-9）、イヌにおける心血管系に及ぼす影響に関する試験（添付資料 4.2.1.3-2）及びビーグル犬を用いた 7 日間反復静脈内投与試験（添付資料 4.2.3.2-11）のトキシコキネティクス評価は GLP 非適用下で実施された。

#### 2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

**(1) キナーゼ阻害活性に関する試験**

AR-13324 及び、活性代謝物である AR-13503 のヒト ROCK1、ヒト ROCK2 に対する阻害活性（Ki 値）は 1 nmol/L、1 nmol/L (AR-13324) 及び 0.2 nmol/L、0.2 nmol/L (AR-13503) であることが報告されている[1]。キナーゼアッセイにおいて AR-13324 及び AR-13503 は PKA、PKCT、MRCKA 対する阻害活性を有し、これらキナーゼにおいても AR-13503 は AR-13324 よりも高活性であった。AR-13324 及び AR-13503 のヒト ROCK1 及びヒト ROCK2 に対する阻害活性を確認した結果、AR-13324 の ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値は 1.19 nmol/L、1.72 nmol/L であり、AR-13503 の Ki 値は 0.12 nmol/L、0.13 nmol/L であった。なお、AR-13503 の ROCK1、ROCK2 に対する阻害活性は AR-13324 に比較してそれぞれ 9.9 倍及び 13.2 倍高活性であった。AR-13324 及

び AR-13503 の ROCK 阻害活性に関するデータは、既報と同レベルであり、両化合物が強力な ROCK 阻害作用を有することを確認した。

**(2) トランスポーター阻害活性に関する試験**

非キナーゼ選択性プロファイリング試験において 10 μmol/L の AR-13324 は NET に結合することが確認されるとともに、AR-13503 のラセミ体である AR-13084 が NET に結合しないことから、AR-13503 は NET 阻害作用を有さないと考えられた。このことから、サル房水動態試験において確認されている房水産生抑制作用は、AR-13324 の NET 阻害作用に起因すると考えられている[2]。ヒト NET に対する AR-13324 の阻害活性を検討した結果、NET 阻害活性（$IC_{50}$ 値は 1.15 μmol/L）が確認されたことから、AR-13324 は NET に結合し、阻害活性を発揮することが明らかとなった。

### 2.6.2.1.2 作用機序に関する試験

**(1) 房水動態試験（トノグラフィー法）**

正常眼圧ウサギを用いた房水動態試験（トノグラフィー法）において、STN1013900 点眼液を投与した群の C 値 (0.28 μL/min/mmHg) は生理食塩水を投与した群の C 値 (0.18 μL/min/mmHg) と比べて統計学的有意に高値であった。この結果から、AR-13324 は ROCK 阻害による線維柱帯流出路を介した房水流出促進作用を有することを確認した。

**(2) 房水動態試験（リカバリー法）**

正常眼圧ウサギを用いた房水動態（リカバリー法）において、STN1013900 点眼液を投与した群での低眼圧状態からの眼圧回復率 (0.09 mmHg/min) は生理食塩水を点眼した群の眼圧回復率 (0.18 mmHg/min) と比べて統計学的有意に低かった。この結果から、AR-13324 は NET 阻害による房水産生抑制作用を有することを確認した。

### 2.6.2.1.3 副次的薬理試験

該当する試験はない。

### 2.6.2.1.4 安全性薬理試験

**(1) 中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす作用**

ラットを用いた 7 日間反復静脈内投与試験において FOB 法により AR-13324 の中枢神経系に及ぼす影響及び呼吸数を評価した結果、10 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。無影響量は 10 mg/kg/day であった。

イヌに AR-13324 を単回静脈内投与したときの心血管系への影響を評価した試験において体温の評価が実施され、25 mg/kg/day まで体温への影響は認められなかった。無影響量は 25 mg/kg/day であった。

### (2) 心血管系に及ぼす作用

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いた *in vitro* 電気生理学的検討において、AR-13324 は 0.3 μmol/L より hERG チャネル電流を阻害し、その $IC_{50}$ 値は 0.4 μmol/L であった。

イヌに AR-13324 を単回静脈内投与したときの心血管系への影響を評価した結果、12.5 mg/kg/day 以上の用量で血圧の低下及び心拍数の増加が認められた。心電図について、25 mg/kg/day まで被験物質投与に関連した変化は認められなかった。血圧及び心拍数に対する無影響量は 1 mg/kg/day、心電図に対する無影響量は 25 mg/kg/day であった。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

### (1) ROCK1 及び ROCK2 に対する阻害活性に関する試験

添付資料 4.2.1.1-1

AR-13324 及びその活性代謝物である AR-13503 のヒト ROCK1 及びヒト ROCK2 に対する阻害活性を評価した。これまでの研究において ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値は AR-13324 (1 nmol/L, 1 nmol/L)、AR-13503 (0.2 nmol/L, 0.2 nmol/L) であることが報告されている[1]。本試験において ROCK1 または ROCK2 が基質をリン酸化する際に生成される ADP 量を指標に、Ki 値を算出した。AR-13324 及び AR-13503 のヒト ROCK1 及びヒト ROCK2 に対する Ki 値を表 2.6.2.2-1 に示す。AR-13324 の ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値は 1.19 nmol/L、1.72 nmol/L であり、AR-13503 の ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値は 0.12 nmol/L、0.13 nmol/L であった。また、AR-13503 が AR-13324 に比較して 9.9 倍、13.2 倍高活性であった。本試験の結果は、既報のデータを示唆するものであった。各化合物の Ki 値を表 2.6.2.2-1 にまとめた。

**表 2.6.2.2-1. ROCK1 及び ROCK2 に対する AR-13324 及び AR-13503 の阻害定数（Ki 値）**

| | 基質 | Ki 値 (nmol/L) | |
|---|---|---|---|
| | | AR-13324 | AR-13503 |
| ヒト ROCK1 | S6K substrate | 1.19 | 0.12 |
| ヒト ROCK2 | S6K substrate | 1.72 | 0.13 |

### (2) 非キナーゼ選択性プロファイリング試験

添付資料 4.2.1.1-3

AR-13324 及び AR-13503 のラセミ体である AR-13084 (10 μmol/L) について、39 の G タンパク共役受容体、4 つの核ホルモン受容体、20 のイオンチャネル/トランスポーター及び、その他タンパク 7 つに対する競合結合アッセイを実施するとともに、5 つのチトクローム P450 に対する酵素阻害アッセイを実施した。有意な阻害活性とは、アッセイにおいて 50%以上の結合または酵素阻害を有意な活性と定義した。AR-13324 はヒト NET に加えて 25 のタンパクに結合した。対照的に、AR-13503 のラセミ体である AR-13084 は高い選択性を示し、CYP450 2C19 及び 2D6 に対してのみに結合したことから、AR-13503 は NET に対する結合能は有さないと推察された。

### (3) ノルエピネフリントランスポーター阻害活性に関する試験

添付資料 4.2.1.1-4

ヒト NET を発現させた MDCK 細胞を用い、標識ノルエピネフリンを添加した後に細胞質へ取り込まれたノルエピネフリン量を指標として AR-13324 の NET 阻害活性（$IC_{50}$ 値）を検討した。その結果、AR-13324 の NET に対する $IC_{50}$ 値は 1.15 μmol/L であった。このことから、AR-13324 は NET に結合し、阻害活性を発揮することが明らかとなった。AR-13324 の $IC_{50}$ 値を表 2.6.2.2-2 に示した。

**表 2.6.2.2-2. ノルエピネフリントランスポーターに対する AR-13324 の阻害活性（IC50 値）**

| | 由来 | $IC_{50}$ 値 (μmol/L) |
|---|---|---|
| ヒト NET | MDCK 細胞 | 1.15 |

## 2.6.2.3 作用機序に関する試験

### (1) 房水動態試験（トノグラフィー法）

添付資料 4.2.1.1-5

正常眼圧ウサギを用いた房水動態試験（トノグラフィー法）において、STN1013900 点眼液または生理食塩水の投与後 4 時間における房水流出率（C 値）を検討した。検討の結果、STN1013900 点眼液群の C 値 (0.28 μL/min/mmHg) は生理食塩水群の C 値 (0.18 μL/min/mmHg) と比べて統計学的有意に高値であり、AR-13324 はウサギの房水流出率を 56%増大させた。このことから、AR-13324 は ROCK 阻害による線維柱帯流出路を介した房水流出促進作用を有することを確認した。各投与群の C 値を表 2.6.2.3-1 にまとめた。

**表 2.6.2.3-1. STN1013900 点眼液による房水流出率（C 値）**

| | C 値<br>(μL/min/mmHg) | 増加率<br>(%) | 例数<br>（眼） |
|---|---|---|---|
| 生理食塩水 | 0.18 ± 0.02 | — | 8 |
| STN1013900 点眼液 | 0.28 ± 0.02** | 56 | 8 |

C 値：平均値 ± 標準誤差

増加率 (%)：（STN1013900 点眼液群の平均値-生理食塩水群の平均値）/生理食塩水群の平均値×100 で算出

**P<0.01、生理食塩水群との比較（Student の t 検定）

### （2） 房水動態試験（リカバリー法）

添付資料 4.2.1.1-6

正常眼圧ウサギを用いた房水動態試験（リカバリー法）において、AR-13324 の房水産生に及ぼす影響を検討した。STN1013900 点眼液、陽性対照として 0.5%チモプトール点眼液及び陰性対照として生理食塩水をそれぞれ点眼投与した 2 時間後を起点に経時的に眼圧を測定し、眼球圧迫で作製した低眼圧状態からの眼圧回復率を検討した。検討の結果、チモプトール点眼液群及び STN1013900 点眼液群の眼圧回復率 (0.07 mmHg/min, 0.09 mmHg/min) は生理食塩水点眼群の眼圧回復率 (0.18 mmHg/min) と比べて統計学的有意に低値であり、AR-13324 はウサギの房水産生を 50%抑制した。このことから、AR-13324 は NET 阻害による房水産生抑制作用を有することが明らかとなった。各投与群の眼圧回復率を表 2.6.2.3-2 にまとめた。

**表 2.6.2.3-2. STN1013900 点眼液による低眼圧からの眼圧回復率（mmHg/min）への影響**

| | 眼圧回復率<br>(mmHg/min) | 抑制率<br>(%) | 例数<br>（眼） |
|---|---|---|---|
| 生理食塩水 | 0.18 ± 0.01 | — | 15 |
| STN1013900 点眼液 | 0.09 ± 0.01*** | 50 | 15 |
| チモプトール点眼液 | 0.07 ± 0.01*** | 61 | 15 |

眼圧回復率：平均値 ± 標準誤差

抑制率 (%)：（生理食塩水群の平均値-薬剤群の平均値）/生理食塩水群の平均値×100 で算出

***P<0.001、生理食塩水群との比較（Student の t 検定）

## 2.6.2.4 副次的薬理試験

該当する試験はない。



Confidential

## 2.6.2.5 安全性薬理試験

### 2.6.2.5.1 中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響

添付資料 4.2.3.2-9

中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響を、ラットを用いた7日間反復静脈内投与試験において検討した。1群あたり雌雄各8匹のSDラットに、AR-13324を0、1、3及び10 mg/kg/dayの用量で投与し、投与1日後及び投与7日後にFOB法で評価した。また、AR-13324及びその活性代謝物であるAR-13503の全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。その結果、10 mg/kg/dayまで中枢神経系及び呼吸数への影響は認められなかった。また、AR-13324を1、3及び10 mg/kg/dayの用量で投与した時の血漿中ネタルスジルの$C_{max}$は15.1、61.5及び182 ng/mL、活性代謝物であるAR-13503の$C_{max}$は1.75、12.3及び22.1 ng/mLであった。以上の結果より、当試験条件下における中枢神経系及び呼吸器系への無影響量は10 mg/kg/dayと考えられた。

### 2.6.2.5.2 心血管系に及ぼす影響

#### 2.6.2.5.2.1 hERGチャネル電流に対する作用

添付資料 4.2.1.3-1

AR-13324のHEK293細胞に安定発現させたhERGチャネル電流に対する作用を検討した。hERGチャネル電流の測定は、0.3、1及び3 μmol/Lの用量で実施した。なお、AR-13324濃度の実測値はそれぞれ0.3、0.8及び2.9 μmol/Lであった。その結果、0.3 μmol/LよりhERGチャネル電流の有意な減少が用量依存的に認められ、$IC_{50}$値は0.4 μmol/Lであった。

#### 2.6.2.5.2.2 イヌにおける心血管系に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3-2

雄性ビーグル犬を用いて、AR-13324の心血管系に対する影響を無麻酔下で検討した。1群あたり雄3匹のビーグル犬に、AR-13324を0、1、12.5及び25 mg/kg/dayの用量で単回静脈内投与し、血圧、心拍数、心電図及び体温をテレメトリー法により測定した。また、AR-13324及びその活性代謝物であるAR-13503の全身的曝露を評価するために血漿中薬物濃度測定を実施した。その結果、心電図及び体温について、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。血圧について、12.5及び25 mg/kg/day群では投与5時間後まで血圧の低下が認められた。心拍数について、12.5及び25 mg/kg/day群では投与20時間後まで心拍数の増加が認められた。AR-13324を1、12.5及び25 mg/kg/dayの用量で投与した時の投与30分後におけるネタルスジルの平均血漿中濃度は26.6、412.3及び871.7 ng/mL、活性代謝物であるAR-13503の平均血漿中濃度はBLQ (1.00 ng/mL未満、11.8及び42.8 ng/mL) であった。以上の結果より、当試験条件下における血圧及び心拍数に対する無影響量は1 mg/kg/dayであり、心電図及び体温に対しては25 mg/kg/dayまで直接的な影響を及ぼさないと考えられた。

### 2.6.2.5.2.3　　イヌにおける心電図に及ぼす影響（1）

添付資料 4.2.3.2-11

心電図に及ぼす影響を、ビーグル犬を用いた 7 日間反復静脈内投与試験において検討した。1 群あたり雌雄各 3 匹のビーグル犬に、AR-13324 を 0、1、12.5 及び 25 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 7 日間反復静脈内投与し、初日の投与前及び最終日の剖検前に心電図を測定した。その結果、Day 3 において、12.5 mg/kg/day 群の雄 2 例及び 25 mg/kg/day 群の雄 3 例が瀕死状態を呈したため安楽殺された。12.5 及び 25 mg/kg/day の忍容性がないことが明らかとなったため、これらの群は Day 3 以降（雌）又は Day 4 以降（雄）の投与用量を 3 及び 6 mg/kg/day にそれぞれ低減した（雌は雄の 1 日遅れで投与が開始されたため、Day 3 から投与用量が低減された）。しかしながら、低減後も 12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群のほとんどの動物で重度の投与部位の腫脹が認められたため、当該動物は投与を中止した。結果として、12.5/3 mg/kg/day 群は雌 2 例のみが試験期間を通じて 1 日 1 回の反復投与が実施された（Day 1-2：12.5 mg/kg/day、Day 3-7：3 mg/kg/day）。25/6 mg/kg/day 群は Day 3 で雌 1 例に 1 日のみ投与されたことを除き、低減後の投与が実施された動物はいなかった。したがって、心電図の評価は 0 及び 1 mg/kg/day 群でのみ実施され、12.5/3 及び 25/6 mg/kg/day 群については評価されなかった。その結果、心電図について、1 mg/kg/day 群で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。以上の結果から、当試験条件下における心電図への無影響量は 1 mg/kg/day と考えられた。

### 2.6.2.5.2.4　　イヌにおける心電図に及ぼす影響（2）

添付資料 4.2.3.2-12

心電図に及ぼす影響を、ビーグル犬を用いた 28 日間反復静脈内投与試験において検討した。1 群あたり雌雄各 3 匹のビーグル犬に、AR-13324 を 0、0.1、0.3 及び 1 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 28 日間反復静脈内投与し、初日の投与前及び最終日の剖検前に心電図を測定した。なお、調製物分析の結果、調製物の濃度が設定値を下回っており、実際の投与用量は 0.1 mg/kg/day 群で 0.06-0.07 mg/kg/day、0.3 mg/kg/day 群で 0.21-0.26 mg/kg/day、1 mg/kg/day 群で 0.76-0.96 mg/kg/day であった。その結果、心電図について、すべての群で被験物質投与に関連した変化は認められなかった。以上の結果から、当試験条件下における心電図への無影響量は 1 mg/kg/day（実際の投与用量：0.76-0.96 mg/kg/day）と考えられた。

### 2.6.2.6　　薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験はない。



Confidential

### 2.6.2.7 考察及び結論

STN1013900 点眼液の有効成分である AR-13324 は ROCK 及び NET デュアル阻害薬であり、点眼後に眼組織でさらに強力な ROCK 阻害作用を有する AR-13503 に代謝される ROCK を介する作用について、AR-13324 及び AR-13503 はヒト ROCK1 及びヒト ROCK2 に対して高い阻害活性を示し、STN1013900 点眼液により房水流出率は生理食塩水群と比較して 56%増大した。NET を介する作用について、AR-13324 はヒト NET に対して阻害活性を示し、STN1013900 点眼液により房水産生が生理食塩水群と比較して 50%抑制された。既存の ROCK 阻害薬の作用機序として房水産生抑制作用は報告されておらず、STN1013900 点眼液による房水産生抑制作用は AR-13324 の NET 阻害作用に起因していると考えられた[4]。これら検討結果から、AR-13324 による眼圧下降には ROCK 阻害作用及び NET 阻害作用が寄与していることが明らかとなり、AR-13324 は ROCK/NET デュアル阻害薬であることが確認された。また、臨床試験で確認された STN1013900 点眼液の強力かつ持続的な眼圧下降作用は、巧みに設計された AR-13324 の物理化学的及び薬理学的特性、すなわち AR-13324 の ROCK/NET デュアル阻害による房水流出促進作用及び房水産生抑制作用に続いて、AR-13503 の強力な ROCK 阻害による房水流出促進作用が発揮されることに起因していると考えられた。

中枢神経系及び呼吸器系の影響について、ラットを用いた 7 日間反復静脈内投与試験にて FOB 法で評価した。その結果、最高用量の 10 mg/kg/day まで中枢神経系及び呼吸数への影響は認められなかった。中枢神経系及び呼吸器系への無影響量である 10 mg/kg/day 投与時のラット血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度と、第 I 相 PK（反復投与）試験 (AR-13324-CS103) でのヒト血漿中濃度を比較し、その安全域を表 2.6.2.7-1 にまとめた。

**表 2.6.2.7-1. 中枢神経系及び呼吸器系への無影響量における血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度と、第 I 相臨床試験でのヒト血漿中濃度の比較**

| | 第 I 相 PK（反復投与）試験<br>AR-13324-CS103 | ラット 7 日間反復静脈内投与試験 |
|---|---|---|
| | 0.02% STN1013900 点眼液<br>1 日 1 回 | 無影響量: 10 mg/kg/day |
| ネタルスジル<br>$C_{max}$ (ng/mL) | BLQ<br>(0.01 ng/mL 未満) | 182（雄） |
| 安全域 | | 18,200 倍以上 |
| AR-13503<br>$C_{max}$ (ng/mL) | BLQ<br>(0.01 ng/mL 未満) | 22.1（雄） |
| 安全域 | | 2,210 倍以上 |

その結果、中枢神経系及び呼吸器系への無影響量におけるネタルスジル及び AR-13503 の $C_{max}$ は、それぞれ 182 及び 22.1 ng/mL であった。これは本剤の臨床用法用量でのヒト血漿中ネタルス

ジル及び AR-13503 濃度（いずれも 0.01 ng/mL 未満）と比べ（添付資料 5.3.3.1-1）、それぞれ 18,200 倍以上及び 2,210 倍以上であり、十分な安全域が認められた。

心血管系に対する影響について、hERG チャネル電流に対して、0.3 μmol/L より有意な減少が用量依存的に認められ、$IC_{50}$ 値は 0.4 μmol/L（ネタルスジルとして 181.4 ng/mL）であった。これは本剤の臨床用法用量でのヒト血漿中ネタルスジル濃度（0.01 ng/mL 未満）と比べ、18,140 倍以上であり、十分な安全域が認められた。ビーグル犬に AR-13324 を単回静脈内投与した際の血圧、心拍数、心電図をテレメトリー法により評価した。その結果、最高用量の 25 mg/kg/day まで心電図への影響は認められなかった。12.5 mg/kg/day 以上の用量で血圧の低下及び心拍数の増加が認められた。心血管系への無影響量である 1 mg/kg/day 投与時のイヌ血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度と、第 I 相 PK（反復投与）試験 (AR-13324-CS103) でのヒト血漿中濃度を比較し、その安全域を表 2.6.2.7-2 にまとめた。

**表 2.6.2.7-2. 心血管系への無影響量における血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度と、第 I 相臨床試験でのヒト血漿中濃度の比較**

| | 第 I 相 PK（反復投与）試験<br>AR-13324-CS103 | イヌにおける心血管系に及ぼす影響 |
|---|---|---|
| | 0.02% STN1013900 点眼液<br>1 日 1 回 | 無影響量:<br>1 mg/kg/day |
| 血漿中ネタルスジル濃度<br>(ng/mL) | BLQ<br>(0.01 ng/mL 未満) | 26.6（雄）[1] |
| 安全域 | | 2,660 倍以上 |
| 血漿中 AR-13503 濃度<br>(ng/mL) | BLQ<br>(0.01 ng/mL 未満) | 1.26（雄）[2] |
| 安全域 | | 126 倍以上 |

1: イヌにおける心血管系に及ぼす影響を評価した試験（添付資料 4.2.1.3-2）における単回投与後 30 分の平均血漿中濃度を示した。

2: イヌにおける心血管系に及ぼす影響を評価した試験（添付資料 4.2.1.3-2）における血漿中濃度は定量下限未満 (< 1.00 ng/mL) であったため、イヌ 28 日間反復静脈内投与試験（添付資料 4.2.3.2-12）における 1 mg/kg/day 群（実際の投与用量：0.76-0.96 mg/kg/day）の Cmax (Day 7) を示した。

その結果、心血管系への無影響量である 1 mg/kg/day 投与時のイヌ血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度は、それぞれ 26.6 及び 1.26 ng/mL であった。これは本剤の臨床用法用量でのヒト血漿中ネタルスジル及び AR-13503 濃度（いずれも 0.01 ng/mL 未満）と比べ (添付資料 5.3.3.1-1)、それぞれ 2,660 倍以上及び 126 倍以上であり、十分な安全域が認められた。ROCK 阻害薬は血管平滑筋の収縮力を低下させ血管拡張を引き起こし、血圧を低下させることが知られている[5] [6] [7]。よって、血圧の低下は AR-13324 の ROCK 阻害作用に起因するものであり、心拍数の増加は血圧の低下に伴う副次的効果と考えられた。

### 2.6.2.8 図表

図表は各項の本文中の適切な箇所に記載した。

### 2.6.2.9 参考文献一覧

(1) Lin CW, Sherman B, Moore LA, Laethem CL, Lu DW, Pattabiraman PP, et al. Discovery and Preclinical Development of Netarsudil, a Novel Ocular Hypotensive Agent for the Treatment of Glaucoma. J Ocul Pharmacol Ther. 2018;34(1,2):40–51.

(2) Wang RF, Williamson JE, Kopczynski C, Serle JB. Effect of 0.04% AR-13324, a ROCK, and Norepinephrine Transporter Inhibitor, on Aqueous Humor Dynamics in Normotensive Monkey Eyes. J Glaucoma. 2015;24(1):51–4.

(3) Kiel JW, Kopczynski CC. Effect of AR-13324 on Episcleral Venous Pressure in Dutch Belted Rabbits. J Ocul Pharmacol Ther. 2015;31(3):146–51.

(4) Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, Ohta M, Koide T, Tanabe S. Effects of K-115, a Rho-Kinase Inhibitor, on Aqueous Humor Dynamics in Rabbits. Curr Eye Res. 2014;39(8):813-22.

(5) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature. 1997;389(6654):990-4.

(6) Somlyo AP. Rhomantic interludes raise blood pressure. Nature. 1997;389(6654):908-9, 911.

(7) Takahara A, Sugiyama A, Satoh Y, Yoneyama M, Hashimoto K. Cardiovascular effects of Y-27632, a selective Rho-associated kinase inhibitor, assessed in the halothane-anesthetized canine model. Eur J Pharmacol. 2003;460(1):51-7.

# 目次

2.6.3 薬理試験 ..... 2
2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 ..... 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 ..... 4
2.6.3.3 副次的薬理試験 ..... 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 ..... 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 10



Confidential

## 2.6.3 薬理試験

### 2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

| Type of Study/Description | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) Primary Pharmacodynamics | | | | | |
| ROCK1 及び ROCK2 に対する阻害活性の検討 | *in vitro* | *in vitro* | 日本 [redacted] | [redacted] | 4.2.1.1-1 |
| ROCK1 および ROCK2 酵素アッセイ系における ATP の Km 値の検討 | *in vitro* | *in vitro* | 日本 [redacted] | [redacted] | 4.2.1.1-2 |
| 非キナーゼタンパクに対する選択性の検討 | *in vitro* | *in vitro* | 台湾 [redacted] | [redacted] | 4.2.1.1-3 |
| ノルエピネフリントランスポーターに対する阻害活性の検討 | *in vitro* | *in vitro* | 台湾 [redacted] | [redacted] | 4.2.1.1-4 |
| 房水動態試験（トノグラフィー法） | 日本白色ウサギ（麻酔下）、雄性 | 点眼 | 日本 [redacted] | [redacted] | 4.2.1.1-5 |
| 房水動態試験（リカバリー法） | 日本白色ウサギ（無麻酔下）、雄性 | 点眼 | 日本 [redacted] | [redacted] | 4.2.1.1-6 |
| (2) Secondary Pharmacodynamics | | | | | |
| No relevant studies were conducted. | | | | | |



Confidential

## 2.6.3.1 薬理試験： 一覧表（続き）

| Type of Study/Description | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| (3) Safety Pharmacology | | | | | |
| Central nervous system/Respiratory system | Sprague-Dawley rats | Intravenous | [redacted] US | [redacted] | 4.2.3.2-9 |
| Cardiovascular system | *in vitro* | *in vitro* | [redacted] US | [redacted] | 4.2.1.3-1 |
| Cardiovascular system | Beagle dogs | Intravenous | [redacted] US | [redacted] | 4.2.1.3-2 |
| Cardiovascular system | Beagle dogs | Intravenous | [redacted] US | [redacted] | 4.2.3.2-11 |
| Cardiovascular system | Beagle dogs | Intravenous | [redacted] US | [redacted] | 4.2.3.2-12 |
| (4) Pharmacodynamic Drug Interactions | | | | | |
| No relevant studies were conducted. | | | | | |



Confidential

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

| Type of Study/Description | Species/ Strain | Method of Administration | Test Article/ Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ROCK1 及び ROCK2 に対する阻害活性の検討 | ヒト ROCK1<br>ヒト ROCK2 | *in vitro* | AR-13324、AR-13503<br>0.0001024、0.000512、0.00256、0.128、0.064、0.32、1.6、8、40、200、及び 1000 nmol/L (AR-13324)<br>0.0000205、0.0001024、0.000512、0.00256、0.128、0.064、0.32、1.6、8、40、及び 200 nmol/L (AR-13503) | ROCK1 及び ROCK2 に対する Ki 値は、1.19、1.72 nmol/L（AR-13324）及び 0.12、0.13 nmol/L（AR-13503）であった。 | [redacted] | 4.2.1.1-1 |
| ROCK1 および ROCK2 酵素アッセイ系における ATP の Km 値の検討 | ヒト ROCK1<br>ヒト ROCK2 | *in vitro* | ATP<br>0.0457、0.1372、0.4115、1.2346、3.7037、11.11、33.33、100、及び 300 µmol/L | ROCK1 及び ROCK2 に対する ATP Km は、3.06 µmol/L（AR-13324）及び 4.53 µmol/L（AR-13503）であった。 | [redacted] | 4.2.1.1-2 |
| 非キナーゼタンパクに対する選択性の検討 | 酵素、各種受容体等を発現する組織及び細胞等 | *in vitro* | AR-12432、AR-13084、AR-13165、AR-13324<br>10 µmol/L | AR-13324（10µmol/L）はヒト NET を含む 26 のタンパクに対して 50%以上の結合または酵素阻害した。AR-13503 のラセミ体である AR-13084 は AR-13324 よりも高い選択性を示した。 | [redacted] | 4.2.1.1-3 |



Confidential

## 2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

| Type of Study/Description | Species/ Strain | Method of Administration | Test Article/ Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ノルエピネフリントランスポーターに対する阻害活性の検討 | ヒトノルエピネフリントランスポーターを導入した MDCK 細胞 | *in vitro* | AR-13324、Desipramine<br>0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 μmol/L | ヒトノルエピネフリントランスポーターに対する $IC_{50}$ 値は 1.15 μmol/L であった。 | [redacted] | 4.2.1.1-4 |
| 房水動態試験（トノグラフィー法） | 日本白色ウサギ | 点眼 | AR-13324、生理食塩水<br>0.02%、50 μL/eye<br>単回 | 房水流出率が統計学的に有意に上昇し、生理食塩水点眼群と比べ 56%増大した。 | [redacted] | 4.2.1.1-5 |
| 房水動態試験（リカバリー法） | 日本白色ウサギ | 点眼 | AR-13324、チモプトール点眼液<br>0.5%、生理食塩水<br>0.02%、50 μL/eye<br>単回 | 房水産生に伴う眼圧回復率を統計学的に有意に低下し、生理食塩水点眼群と比べ 50%抑制した。 | [redacted] | 4.2.1.1-6 |



Confidential

### 2.6.3.3 副次的薬理試験

No relevant studies were conducted.



Confidential

## 2.6.3.4 安全性薬理試験

| Type of Study/Description | Species/ Strain | Method of Administration | Test Article/ Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Central nervous system /Respiratory system | Sprague Dawley rat | Intravenous | AR-13324, vehicle<br>0, 1, 3, 10 mg/kg/day<br>7 days | No effects on functional observational battery at doses up to 10 mg/kg/day. | [redacted] | 4.2.3.2-9 |
| Cardiovascular system | Cloned hERG potassium channels expressed in human embryonic kidney cells | *in vitro* | AR-13324<br>0.3, 0.8, 2.9 μM | *In vitro* effects of AR-13324 on ionic currents in voltage-clamped human embryonic kidney cells (HEK293) that stably express the hERG. AR-13324 inhibited hERG potassium channel current by (mean ± SEM) 43.6±1.4% at 0.3 μM, 63.0±3.4% at 0.8 μM and 92.9±1.7% at 2.9 μM versus 0.9±1.1% in control. The hERG potassium channel inhibition at all three AR-13324 concentrations was statistically significant ($P < 0.05$) versus vehicle control. Using measured concentrations, the $IC_{50}$ for the AR-13324 inhibitory effect on hERG potassium channel current was 0.4 μM (Hill coefficient = 1.0). | [redacted] | 4.2.1.3-1 |



Confidential

## 2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

| Type of Study/Description | Species/ Strain | Method of Administration | Test Article/ Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular system | Beagle dog | Intravenous | AR-13324, vehicle<br>Dogs #1-3:<br>Day 1: 0 mg/kg/day,<br>Day 8: 12.5 mg/kg/day<br>Dogs #4-6:<br>Day 1: 1 mg/kg/day,<br>Day 8: 25 mg/kg/day | No effects on body temperature at doses up to 25 mg/kg/day. No effects on ECG at doses up to 25 mg/kg/day. AR-13324, at a dose of 1 mg/kg/day, did not affect cardiac or circulatory functions. Doses of 12.5 and 25 mg/kg/day were associated with increased heart rate through 20 hours post dose (maximum increase of 57% at 150 minutes and 124% at 18 hours, respectively) and decreased arterial pressure through 5 hours post dose (maximum decrease of 23% and 32%, respectively at 5 hours). | [redacted] | 4.2.1.3-2 |



Confidential

## 2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

| Type of Study/Description | Species/ Strain | Method of Administration | Test Article/ Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cardiovascular system | Beagle dog | Intravenous | AR-13324, vehicle<br>Group 1: 0 mg/kg/day<br>Group 2: 1 mg/kg/day<br>Group 3: 12.5 mg/kg/day decreasing to 3 mg/kg/day<br>Group 4: 25 mg/kg/day decreasing to 6 mg/kg/day<br>7 days | No effect on ECG in dogs at doses of 1 mg/kg/day.<br>(Only Group 1 and 2 were evaluated, because Group 3 and 4 could not be consistently received their doses up to the time of ECG evaluation due to severe forelimb swelling or euthanasia). | [redacted] | 4.2.3.2-11 |
| Cardiovascular system | Beagle dog | Intravenous | AR-13324, vehicle<br>Group 1: 0 mg/kg/day<br>Group 2: 0.06-0.07 mg/kg/day<br>Group 3: 0.21-0.26 mg/kg/day<br>Group 4: 0.76-0.96 mg/kg/day<br>28 days | No effects on ECG at doses up to 0.76-0.96 mg/kg/day. | [redacted] | 4.2.3.2-12 |



Confidential

### 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

No relevant studies were conducted.



Confidential