ブレンソカチブ水和物（INS1007）

第 2 部（モジュール 2）
2.4 非臨床試験の概括評価

インスメッド合同会社

Information and data contained herein are proprietary and confidential. This information should not be disclosed to any third party without the written consent of Insmed.

目次

用語及び略語一覧 4
1. 非臨床試験計画概略 6
2. 薬理試験 8
2.1. 効力を裏付ける試験 10
2.2. 副次的薬理試験 11
2.3. 安全性薬理試験 12
3. 薬物動態試験 14
3.1. 吸収 15
3.2. 分布 16
3.3. 代謝 16
3.4. 排泄 17
3.5. 薬物動態学的薬物相互作用 18
3.6. 要約 18
4. 毒性試験 20
4.1. 緒言 20
4.2. 一般毒性試験 21
4.3. 遺伝毒性試験及びがん原性試験 24
4.4. 生殖発生毒性試験 24
4.5. その他の毒性試験 26
4.6. 要約 26
5. 総括及び結論 29
6. 参考文献 30

表目次

表 1: ブレンソカチブの薬理試験の一覧 8
表 2: ブレンソカチブの吸収、分布、代謝及び排泄に関する非臨床試験の一覧 14
表 3: ブレンソカチブ毒性試験の一覧 20
表 4: 主要な毒性試験における定常状態 AUC と MRHD に対する曝露倍数の要約 27

図目次

図 1: ブレンソカチブの化学構造 6

用語及び略語一覧

用語及び略語	説明
ALT	alanine aminotransferase, アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody, 抗好中球細胞質自己抗体
AST	aspartate aminotransferase, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve, 血漿中薬物濃度時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration curve from 0 to last timepoint with quantifiable concentration, 0時間から最終定量可能濃度時間までのAUC
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration curve from 0 to 24 hours, 0 ～ 24時間までのAUC
BCRP	breast cancer resistance protein, 乳癌耐性タンパク質
CatG	cathepsin G, カテプシンG
CF	cystic fibrosis, 嚢胞性線維症
C_{max}	maximum (peak) plasma concentration, 最高（ピーク）血漿中濃度
CPCA	carcinogenic potency categorization approach
CYP	cytochrome P450, チトクロームP450
DPP1	dipeptidyl peptidase 1, ジペプチジルペプチダーゼ1
EFD	embryofetal development, 胚・胎児発生
GALT	gut-associated lymphoid tissue, 腸管関連リンパ組織
GRAS	Generally Recognized As Safe, 一般的に安全と認められている
hERG	human *ether-à-go-go*-related-gene, ヒト*ether-à-go-go*関連遺伝子
HR	heart rate, 心拍数
IC_{50}	half-maximal inhibitory effect, 50%阻害濃度
IV	intravenous, 静脈内
LPS	lipopolysaccharide, リポ多糖
MATE	multi-antimicrobial extrusion protein, 多剤排泄輸送タンパク質
MRHD	maximum recommended human dose, 最大推奨臨床用量
mPR3	membrane-bound surface proteinase 3, 膜結合プロテイナーゼ3
NAG	N-acetyl β-d-glucosaminidase, N-アセチルβ-d-グルコサミニダーゼ
NCFBE	non-cystic fibrosis bronchiectasis, 非嚢胞性線維症性気管支拡張症
NE	neutrophil elastase, 好中球エラスターゼ
NOAEL	no observed adverse effect level, 無毒性量
NOEL	no observed effect level, 無作用量
NSP	neutrophil serine protease, 好中球セリンプロテアーゼ
OAT	organic anion transporter, 有機アニオン輸送担体
OATP	organic anion transporting polypeptide, 有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter, 有機カチオン輸送担体

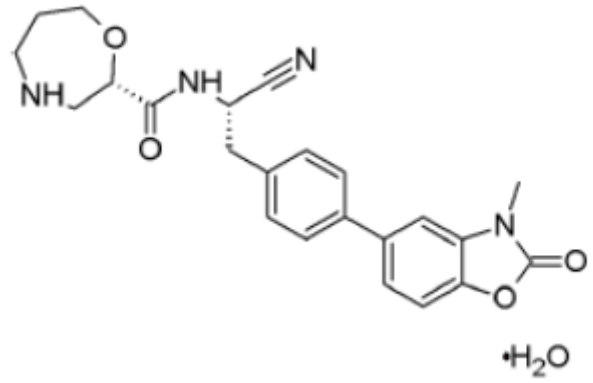
用語及び略語	説明
Pgp	p-glycoprotein, P糖タンパク質
PK	pharmacokinetic, 薬物動態
PLD	phospholipidosis, リン脂質症
PR3	proteinase 3, プロテイナーゼ3
PR interval	interval between the P wave (the onset of atrial depolarization) until the beginning of the QRS complex (the onset of ventricular depolarization), P波（心房の脱分極開始）とQRS群の開始（心室の脱分極開始）との間の間隔
QA interval	interval between the Q wave and the onset of the aortic blood pressure pulse as an indicator of cardiac contractility, 心臓の収縮を示すQ波と大動脈圧脈波開始との間の間隔
QD	once a day, 1日1回
TEM	transmission electron microscopy, 透過型電子顕微鏡
T_{max}	time to maximum observed concentration, 最高血中濃度到達時間
$t_{1/2}$	elimination half-life, 半減期

1. 非臨床試験計画概略

ブレンソカチブ（開発コード：INS1007、AZD7986 及び AZ13661057）はリソソームシステインプロテイナーゼのジペプチジルペプチダーゼ 1（DPP1）の選択的、競合的及び可逆的な低分子阻害剤で、経口で投与される。本剤は、気管支拡張症に対し慢性的に投与する治療薬として開発中である。

ブレンソカチブは新規分子化合物である。化学名は、(2*S*)-*N*-{(1*S*)-1-cyano-2-[4-(3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazol-5-yl)phenyl]ethyl}-1,4-oxazepane-2-carboxamide monohydrate（IUPAC）である。分子式は $C_{23}H_{24}N_4O_4 \cdot H_2O$、分子量は 438.48（一水和物として、遊離塩基としては 420.5）である。ブレンソカチブの構造を図 1 に示す。

図 1: ブレンソカチブの化学構造



ブレンソカチブの分子標的である DPP1 は、好中球セリンプロテアーゼ（NSP）を含む標的タンパク質の前駆体の N 末端からジペプチド部分を除去し、活性化させるエキソペプチダーゼである。活性化した NSP は、好中球から放出されると炎症を誘発し、周囲の組織を破壊する。NSP の 1 つである好中球エラスターゼ（NE）は、活性化好中球の主要な生成物であり、気管支拡張症の発現及び進行の重要な危険因子であることが確認されている（Chalmers et al., 2017）。好中球エラスターゼは、粘液分泌過多、気道炎症、及び緑膿菌感染症に対する防御能の低下の原因に関与している。好中球数及び NE 濃度は非嚢胞性線維症性気管支拡張症（NCFBE）の患者の喀痰中で増加し、増悪時にさらに増加する（Chalmers et al., 2017; Fahy and Dickey, 2010; Hirche et al., 2008; Taggart et al., 2005; Voynow et al., 2004; Weldon et al., 2009）。DPP1 活性の阻害は、活性型 NSP の形成を減少させることにより肺の構成部分の破壊及び粘液産生の低減につながるという仮説が立てられている。そのため、DPP1 は薬理学的介入の有望な標的である。

DPP1 阻害のネガティブな影響の可能性を理解する上で、DPP1 ノックアウト（$DPP1^{-/-}$）マウス及び DPP1 が遺伝的に欠損しているヒトについて幅広く検討した。DPP1 ノックアウトマウスは正常に発達し、健康に見え、生殖能力がある。$DPP1^{-/-}$ マウスの主な器官（脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓、胸腺、脳、骨髄など）の詳細な組織学的評価から、顕著な異常は示されなかった（Pham and Ley,1999）。DPP1 ノックアウトマウスは、保持している免疫系及び機能性を維持すると考えられる（Adkison et al., 2002; Pham and Ley, 1999）。DPP1 活性がほぼ完全又は完全に喪失している稀な遺伝性疾患であるパピヨン・ルフェーヴル症候群（PLS）（Guarino et al., 2017;

Sørensen et al., 2014）を有するヒト患者は、典型的に足底と手掌の発赤と肥厚を特徴とする重症の掌蹠角化症、及び治療せずに放置すると 20～30 代の若年期に歯の喪失を引き起こす歯周炎（Biraggari et al., 2015; Toomes et al., 1999）といった 2 つの臨床症状を呈する。DPP1$^{-/-}$ マウス及び PLS 患者における観察から、患者における安全性リスクは明確で、DPP1 は治療ターゲットとなりうる。また、DPP1 抑制の程度はマウスや人でみられるような極端なレベルまでの減少とはならないため、安全性の観点から開発の可能性を否定するものではない。完了済みの第 II 相臨床試験において NCFBE 患者を対象に評価したところ、PLS 患者で認められた低い残存 NSP 活性と比べてブレンソカチブ 10 mg 及び 25 mg の投与では血中好中球の NSP 活性の部分的な減少を引き起こす程度であったことを踏まえると、前述の結論は妥当と言える。

臨床開発を支持するために、ブレンソカチブは非臨床薬理、薬物動態、及び毒性試験の包括的プログラムで評価されている。非臨床薬理試験は *in vitro* アッセイ及び *in vivo* 試験の薬効を裏付ける試験、潜在的なオフターゲット活性の副次的な薬理スクリーニング、並びに中枢神経系、心血管系、及び呼吸器系についての安全性薬理試験で構成されている（2 項）。これらの *in vitro* 及び *in vivo* 試験において、ブレンソカチブは用量依存的に NSP 活性を減少させ［NE、プロテイナーゼ 3（PR3）、及びカテプシン G（CatG）］、DPP1 阻害の機序が確認された。非臨床薬物動態試験では、ブレンソカチブの吸収、分布、代謝、及び排泄（ADME）における特性、動物及びヒトの生体材料を用いた *in vitro* 薬物間相互作用の可能性、並びにさまざまな動物種を用いた *in vivo* での薬物間相互作用の可能性を評価した（3 項）。毒性試験は、ラット及びイヌを用いた反復投与一般毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性評価、マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、並びに光毒性リスク評価と広範囲にわたっている（4 項）。既存データの包括的な評価に基づき、単独の毒性試験を追加で実施する必要性はないと判断した。

臨床開発及び製造販売承認申請を支持するすべての主要試験は、適切な試験系及び試験デザインを用い、規制及び適切なガイドラインに従って実施した。特に、すべての主要な安全性薬理試験及び毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に準じ、欧州連合（EMA）、米国（FDA）、日本（MHLW）及びその他の経済協力開発機構（OECD）加盟国における規制当局の要件に沿って実施した。

ブレンソカチブは、NCFBE 患者の治療における経口錠剤として開発中である。NCFBE における最大推奨臨床用量（MRHD）は、25 mg QD の長期投与である。母集団の薬物動態解析に基づく MRHD 投与時の定常状態における総ブレンソカチブの C_{max} 及び AUC は、それぞれ 0.62 µM 及び 9.655 µM*h（259 ng/mL 及び 4060 ng*h/mL に相当、ICPD 00694-1 報告書）であった。定常状態における総ブレンソカチブ及び非結合ブレンソカチブの血漿中曝露量に基づき、MRHD に対する安全マージンを算出した。

総じて、薬理、薬物動態及び毒性試験から得た非臨床データは、NCFBE の治療薬としてのブレンソカチブを支持するものであった。

2. 薬理試験

ブレンソカチブの効力を裏付ける薬理試験、副次薬理試験、及び安全性薬理試験は、*in vivo* 及び *in vitro* モデルを用いて評価した。ブレンソカチブの非臨床薬理試験の一覧を表 1 に示し、データを Module 2.6.2 及び Module 2.6.3 に要約する。主な所見を以下に記載する。

表 1: ブレンソカチブの薬理試験の一覧

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Study No. (Report No.)**
Primary Pharmacodynamics			
Mode of action	Biochemical assay	*In vitro*	BS000003-27
Potency against human DPP1	Biochemical assay	*In vitro*	BS000449-19
Potency against rat, dog and human DPP1	Biochemical assay	*In vitro*	BS001015-29
Potency against mouse, rat, dog and human DPP1 and direct effect on NE, PR3 and CatG activity	Biochemical assay	*In vitro*	RES-0296
Direct effect of brensocatib on NE, PR3 and CatK activity	Biochemical assay	*In vitro*	BS000610-06
Potency at inhibiting NSP activation in human neutrophils	Cellular assay	*In vitro*	BS000831-13
Potency and effect of brensocatib on elastin degradation	Biochemical assay	*In vitro*	BS000449-18
Potency at inhibiting surface PR3 expression in differentiated neutrophils	Cellular assay	*In vitro*	VV-NC-000485
Time to reach maximum inhibition of NSP activities	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0177
Time to reach maximum inhibition of NSP activities	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0221
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0133
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0134
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0135
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0136
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0165
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0175
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0176

Type of Study	Test System	Method of Administration	Study No. (Report No.)
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0196
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0209
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0265
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0266
NSP inhibition by brensocatib	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0270
NSP inhibition by brensocatib	Rat model (naïve)	*In vivo* (oral)	BS000040-05
NSP inhibition by brensocatib	Rat model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0205
NSP inhibition by brensocatib	Rat model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0208
NSP inhibition by brensocatib	Rat model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0230
NSP inhibition by brensocatib	Rat model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0231
Time to recover NSP activities after end of treatment	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0207
Time to recover NSP activities after end of treatment	Mouse model (naïve)	*In vivo* (oral)	RES-0220
NSP inhibition by brensocatib in efficacy model	Mouse model (LPS)	*In vivo* (oral)	RES-0143
NSP inhibition by brensocatib in efficacy model	Rat model (LPS)	*In vivo* (oral)	BS000040-06-07
Secondary Pharmacodynamics			
Radioligand binding, enzyme, functional and electrophysiological assays (Brensocatib)	Receptors, enzymes, ion channels and transporters	*In vitro*	3118SV
Electrophysiological assays (Brensocatib)	Ion channels	*In vitro*	3188KV
Safety Pharmacology			
Central nervous system Irwin screen	Rat	*In vivo* (oral)	612483[a]
Cardiovascular hERG assay	hERG expressing CHO cells	*In vitro*	795027[a]
Cardiovascular ventricular repolarization, intracardiac conduction	Guinea pig	*In vivo* (IV infusion)	0339SG
Cardiovascular telemetry	Dog	*In vivo* (oral)	VKS0880[a]
Respiratory whole-body plethysmography	Rat	*In vivo* (oral)	612499[a]

[a] GLP compliant.
CatG = Cathepsin G; DPP1 = dipeptidyl peptidase 1; hERG = human ether-a-go-go related gene; LPS = lipopolysaccharide; NE = neutrophil elastase; NSP = neutrophil serine protease; PR3 = proteinase 3.

2.1. 効力を裏付ける試験

単離した組換え型ヒト DPP1 酵素を用いた作用機序試験において、ブレンソカチブは競合的かつ可逆的な阻害剤であることが示された。単離したヒト DPP1 酵素に対する IC_{50} は 4.47 nM、DPP1 を発現する不死化細胞株に対する IC_{50} は 4.26 nM で、ヒト DPP1 酵素を強力に阻害した。ブレンソカチブの組換え型マウス、組換え型ラット、イヌ（細胞ライセートから精製）、組換え型ヒト DPP1 酵素に対する阻害効力（IC_{50}）はそれぞれ 24.1、51.1、38.1 及び 17.1 nM で同様であったが、NE、PR3 及び CatG の酵素活性に直接的な作用は認められなかった。DPP1 の阻害により、好中球が成熟する骨髄で NSP 活性が低下するため、循環血中の好中球で NSP 活性が低下した。これらのデータは、ブレンソカチブ 10 ～ 40 mg の QD 投与により、健康被験者、NCFBE 被験者及び嚢胞性線維症（CF）被験者の血液検体、並びに NCFBE 被験者及び CF 被験者の喀痰検体で NE、PR3 及び CatG 活性が有意に低下した臨床所見と一致している。

ヒトでは、骨髄における造血幹細胞の好中球への分化は、通常、約 2 週間かけて段階的に進み、その後、成熟好中球が循環血中に放出される前に、更に 1 週間骨髄に貯蔵される。しかし、炎症疾患下では、成熟好中球は血流中に早期に放出される可能性があり、その結果、一時的に好中球増加が生じる。顆粒球形成も骨髄予備能を補充するために増加する。炎症が更に重度又は持続的な場合は、未成熟好中球も循環血中に入る可能性がある。DPP1 による NSP 酵素前駆体の活性化は、骨髄芽球が前骨髄球に移行する好中球成熟過程の極めて初期の段階で生じる（Palmér et al., 2018）。活性化は、細胞内輸送及び活性型 NSP のアズール顆粒への封入中の NSP 酵素前駆体からの N 末端ジペプチドの除去に関与する。そのため、既に前骨髄球の段階を経た細胞内では（循環血中の好中球など）、残存する NSP 酵素前駆体はすべて顆粒中で分解されるため、ブレンソカチブは NSP 活性に影響を及ぼさないと考えられる（Korkmaz et al., 2010; Korkmaz et al., 2018）。したがって、DPP1 阻害剤が全身の NSP 活性の低下を直ちに引き起こすとは予測されない。健康な成人被験者を対象としたブレンソカチブの全血中 NE の阻害についてのモデルベースの包括的な薬物動態-薬理学（PK-PD）解析により、定常状態での NSP の減少は 3 ～ 4 週間後に達成されたことが示された（Palmér et al., 2018）。

7 日間の分化期間中の骨髄由来好中球前駆細胞のブレンソカチブとの培養試験では、予測される薬力学的反応が確認された。細胞ライセート中の NSP 活性は濃度依存的に低下し、NE、PR3 及び CatG に対する阻害効力はそれぞれ 61.6、208.9 及び 114.8 nM であった。DPP1 活性の阻害の程度は、NSP 活性の低下と相関した。同一のライセートが肺の重要な結合組織成分であるエラスチンを分解する能力も阻害された。

NSP 活性に対する下流の作用に加え、別のバイオマーカーである好中球に結合する PR3 の存在に対する DPP1 阻害効果も評価した［PR3 は、PR3-抗好中球細胞質自己抗体（ANCA）関連血管炎における ANCA の主な標的抗原である］。ヒトプライマリー骨髄由来又は臍帯血由来の $CD34^+$ 好中球前駆細胞において、ブレンソカチブは検出可能な膜結合プロテイナーゼ 3（mPR3）を発現する好中球の割合及び全般的な mPR3 発現の両方を濃度依存的に低下させた。

In vitro でのブレンソカチブの薬力学的作用による NSP 活性の減衰は、無処置のげっ歯類及びリポ多糖（LPS）で誘発した肺の炎症モデルラットを用いた *in vivo* 試験で確認された。複数のマ

ウス及びラット系統に、好中球成熟期間早期の骨髄芽球が前骨髄球に移行するまでに DPP1 に作用し、その後循環する好中球が完全に入れ替わる時間を確保するために、ブレンソカチブ［1 日 2 回（BID）：2 ～ 200 mg/kg/day、1 日 1 回（QD）：3 ～ 100 mg/kg/day］を 7 日間以上強制経口投与したところ、骨髄細胞ライセートの NSP 活性に用量依存的な低下がみられた（Basso et al., 2023）。NSP 活性の最大の低下は、マウスにブレンソカチブを 1 日 1 回、約 7 日間投与した後に認められた。ブレンソカチブ投与中止後の NSP 活性の回復は、同様のプロファイルに従い、約 7 日後に NSP 活性の完全な回復がみられた。

ブレンソカチブの非臨床有効性に関する直接的なエビデンスが得られる気管支拡張症の動物モデルは存在しない。しかし、気道における好中球の活性化は、NE などの NSP の放出につながり、これが気管支拡張症の病態生理の中心であると考えられている（Chalmers and Chotirmall, 2018）。NE、PR3 及び CatG は、α-1 アンチトリプシンや分泌型ロイコプロテイナーゼ阻害因子などの本来の阻害物質を圧倒するほどに上昇し、気管壁の損傷（Chalmers et al., 2017）、粘液分泌過多（Voynow et al., 1999）、炎症の増悪、好中球やマクロファージの機能停止が生じ、感染症のリスクを上昇させる（Palmér et al., 2018）。よって、ブレンソカチブの投与による NSP 活性の低下は、非臨床有効性の間接的な尺度になる。ブレンソカチブは、げっ歯類を用いた非臨床試験で NSP 活性を用量依存的に低下させた。これは、1 日 1 回のブレンソカチブ経口投与がヒトの血液検体及び喀痰検体で NSP 活性を低下させる可能性があることを示す強力な *in vivo* エビデンスであり、実際に健康被験者（D6190C00001 試験）、NCFBE 患者（INS1007-201 試験）及び CF 患者（INS1007-211 試験）で臨床的に検証されている。また、喀痰中 NE 濃度の定量下限未満（BLQ）への低下は、NCFBE 患者における肺疾患増悪の抑制と関連していた（INS1007-201 試験、ICPD 005661-1 報告書）。

ブレンソカチブは、その他の炎症性疾患について多くの *in vivo* 疾患モデルを用いて評価され、いずれの疾患モデルを用いた実験でも、プラセボを投与した動物と比較して NSP 活性が同程度に低下し（McDonald et al., 2023; Chen et al., 2023）、疾患の誘導がブレンソカチブによる NSP 活性の減衰に影響を及ぼさなかったことが確認された。

要約すると、*in vitro* 及び *in vivo* 試験において、ブレンソカチブは、好中球の成熟時に NSP 活性を有意に阻害する強力な競合的かつ可逆的な DPP1 阻害剤であることが示された。この NSP 活性の阻害は、エラスチンや肺の細胞外マトリックスのその他の重要な成分（コラーゲン及びフィブロネクチンを含む）を分解する好中球の能力低下につながる。よって、DPP1 阻害は、NCFBE 患者において進行する肺破壊を抑制し、悪化の渦（Vicious Vortex）を改善させる新規の治療アプローチである（Cipolla et al., 2023）。

2.2. 副次的薬理試験

In vitro ラジオリガンド結合及び酵素活性アッセイを用い、10 µM の濃度でブレンソカチブをスクリーニングした（186 種類の標的）。すべての標的への結合親和性（1.6 µM 以上）はヒト DPP1 への結合親和性（IC_{50} 17.1 nM）の 94 分の 1 以下であり、ブレンソカチブの DPP1 結合が高度に選択的であることが示された。

ブレンソカチブが心臓に有害な影響を及ぼす可能性を評価するため、*in vitro* での電気生理学的アッセイによる 7 種類の心臓イオンチャネル［ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（hERG）を除く］への影響を検討したところ、6 種類のチャネルで電気生理学的活性への影響はないことが示された。ブレンソカチブによる活性は 1 つのチャネル hCav3.2 のみで認められたが、IC_{50} は DPP1 標的への結合親和性の 1000 分の 1 を下回る 21.57 µM であった。

2.3. 安全性薬理試験

ブレンソカチブによる中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への潜在的な影響を検討するため、安全性薬理試験に関する ICH ガイドライン（ICH S7A、ICH S7B）に準じ、GLP を遵守して安全性薬理試験を実施した。

ブレンソカチブは、hERG をコードしたカリウムチャネルを 13.9 µM の IC_{50} で遮断した。ヒトに MRHD（25 mg QD）を投与したときの定常状態での遊離曝露量（C_{max}）（C_{max} = 259 ng/mL、ICPD 00694-1 報告書）に対する安全マージンは 176 倍であった。

麻酔下のモルモットにブレンソカチブ 0.5 及び 9.6 mg/kg を静脈内（IV）連続投与したとき、心室の再分極又は心臓内伝導に統計学的に有意な影響はみられなかった。また、溶媒投与群のデータと比較して、洞調律時の平均動脈圧又は心拍数（HR）に影響は認められなかった。

ビーグル犬に 5、50 及び 1000 mg/kg のブレンソカチブを強制経口投与し、テレメトリー測定した。5 mg/kg 投与で心血管系パラメータへの影響は認められなかったが、50 mg/kg 投与では、心臓の収縮を示す Q 波と大動脈圧脈波開始との間の間隔である QA 間隔の軽微な延長のみが認められた。1000 mg/kg 投与では、群平均 HR 増加とそれに伴う PR 間隔［P 波（心房の脱分極開始）と QRS 群の開始（心室の脱分極開始）との間の間隔］の一過性の短縮、群平均拡張期血圧及び平均血圧（MBP）の上昇、左室圧最大立ち上がり速度（dP/dt_{max}）及び左室拡張終期圧（LVEDP）の低下、並びに QA 間隔の延長が認められた。また、1000 mg/kg 投与では、心拍数で補正した QT 間隔が軽微に延長したが（最大 6%）、QRS、波形形状又は体温への影響は認められなかった。無作用量（NOEL）を 50 mg/kg とした本試験結果に基づき、MRHD 投与に対する最高血漿中濃度（C_{max}）の安全マージンは 43 倍（遊離ブレンソカチブ）及び 19 倍（総ブレンソカチブ）であり、心血管系への影響の懸念は少ないことが示されている。これは、健康被験者にブレンソカチブ 40 mg 及び 120 mg を単回経口投与し、QT 延長及びその他の心臓力学パラメータ（例：HR、PR、QRS 間隔、T 波形状、U 波の有無）に対するネガティブな影響が示された臨床所見と一致している。

ブレンソカチブ 0.5、10 又は 200 mg/kg を覚醒下で雄ラットに強制経口投与したが、Irwin スクリーニング変法で評価した投与 24 時間後までの自律神経、神経筋、感覚運動又は行動パラメータに影響は認められなかった。NOEL は 200 mg/kg と判断した。

ブレンソカチブ 0.5、10 又は 200 mg/kg を強制経口投与したラットにおいて、全身プレチスモグラフィーで測定した呼吸パラメータ（呼吸数、1 回換気量、分時拍出量、吸気及び呼気時間、ピーク時の吸気及び呼気流量）に影響は認められなかった。NOEL は 200 mg/kg と判断した。

まとめると、以上のデータから、ブレンソカチブが DPP1 酵素を *in vitro* 及び *in vivo* の両方の試験条件下で強力に阻害するとともに、MRHD でヒトでの全身曝露量に対する注目すべき安全マージンでオフターゲット活性又は心血管系、呼吸器系及び中枢神経系への影響の懸念はないことが示される。

薬力学的薬物相互作用試験は、必要でないと考えられたため、実施していない。薬理学的標的に対して互いに競合する薬物や、類似又は相反する薬力学的作用を有する薬物については、薬力学的薬物相互作用を検討すべきである。当社の知るかぎり、DPP1 に結合する、ブレンソカチブの DPP1 結合力を阻害する、又は NE、PR3、CatG を含む NSP と相互作用する標準治療薬はない。薬力学的薬物相互作用の可能性については 3.5 項に記載する。

3. 薬物動態試験

ブレンソカチブの薬物動態の特性（ADME など）及び潜在的な薬物間相互作用を、動物及びヒト由来の生体試料を使用した *in vitro* 試験、及び種々の動物種を使用した *in vivo* 試験で評価した。これらの試験の一覧を表 2 に示す。生体試料中薬物濃度分析には、目的に一致したバリデート済みの LC-MS/MS 法などを使用して、非 GLP 試験及び GLP 試験における TK を適宜裏付けた。すべての生体試料中薬物濃度分析試験及び ADME 試験について、Module 2.6.4 及び Module 2.6.5 に要約する。主な結果について下記で考察する。

表 2: ブレンソカチブの吸収、分布、代謝及び排泄に関する非臨床試験の一覧

Study Type	Test System	Route of Administration	Study Number
Absorption			
Permeability	Caco-2 cells	*In vitro*	ER20191540
Permeability	Caco-2 cells	*In vitro*	BJAA-0002-DV-PB
Single dose PK	Mouse, BALB/c (female)	Oral	RES-0134
Repeat dose (7 day) PK	Mouse, BALB/c (female)	Oral	RES-0136
Repeat dose (7 day) PK	Mouse, rasH2 (male and female)	Oral	RTG-22-060
Rat single dose PK	Rat, Han Wistar (male)	IV/Oral	RITA.000-497-676
Dog single dose PK	Dog, beagle (male)	IV/Oral	RITA.000-497-675
Distribution			
Plasma protein binding	Mouse, rat, rabbit, dog, and human plasma	*In vitro*	ADME-AZS-Wave4-130621
Whole-body autoradiography	Rat, Han Wistar (male and female) and Rat, Lister Hood (male)	Oral	197400
Covalent binding	Human hepatocytes	*In vitro*	BE000901_12
Metabolism			
CYP phenotyping	E. Coli bacteria expressed Human CYP Isozymes	*In vitro*	ADME-AZS-Wave3-140531
Metabolic stability	Mouse, rat, dog and human intestinal microsomes	*In vitro*	BJAA-0003-DV-HB
Metabolic stability and profiling	Rat, dog and human hepatocytes	*In vitro*	BE000083-57
Metabolite profiling	Mouse, ICR (male and female)	Oral	8486699
Metabolite profiling	Rat, Han Wistar (male and female)	IV/Oral	8463139
Metabolite profiling	Dog, beagle (male)	Oral	8474627
Excretion			
Excretion in rat urine and bile	Rat, Han Wistar (male, bile-duct cannulated)	Oral	RITA.000-497-940
Rat renal clearance	Rat, Han Wistar (male)	Oral	RITA.000-498-190

Study Type	Test System	Route of Administration	Study Number
Rat mass balance	Rat, Han Wistar (male and female, intact or bile-duct cannulated)	Oral/IV	185423 (5262KV)
Dog excretion in urine and bile	Dog, beagle (male, bile-duct cannulated)	Oral	196742 (PREDEV KMD277)
Dog mass balance	Dog, beagle (male)	Oral	8474627
Drug Interaction			
CYP inhibition	Human liver microsomes	*In vitro*	ADME-AZS-Wave3-140529
CYP inhibition	Human liver microsomes	*In vitro*	ADME-AZS-Wave3-140613
CYP inhibition, with time dependency	Human liver microsomes	*In vitro*	ADME-AZS-Wave3-140530
CYP induction	HepG2 cells	*In vitro*	PR13028/PR13074/PR13101
CYP induction	Human hepatocytes	*In vitro*	8492164
Pgp inhibition	MDCK monolayers	*In vitro*	Pgp Inhib_ 12Sep13_AZ13661057
BCRP inhibition	Caco-2 cells	*In vitro*	BE000458-17
OATP1B1 inhibition	HEK293 cells	*In vitro*	BE000685-13
Transporter inhibition	MDCK and HEK293 cells	*In vitro*	16AZTrPlSl
Transporter substrate potential	MDCKII Cells and transporter expressing HEK293 cells	*In vitro*	Insmed-01
Bioanalytical Methods (LC-MS/MS)			
Full validation	Mouse plasma	NA	308248
Partial validation	Rat plasma	NA	321010
Full validation	Rat plasma	NA	D7986 KPV001
Full validation	Rabbit plasma	NA	322763
Method development	Dog plasma	NA	317659
Full validation	Dog plasma	NA	319588

BCRP = breast cancer resistance protein; CYP = cytochrome P450; HEK = human embryonic kidney; IV = intravenous; MDCK = Madin-Darby canine kidney; NA = not applicable; OATP1B1 = organic anion transporting protein family member 1B1; Pgp = P-glycoprotein; PK = pharmacokinetics.

3.1. 吸収

ブレンソカチブの Caco-2 細胞における透過性は高く、ラット及びイヌに経口投与したときのバイオアベイラビリティも高い（それぞれ 75%及び 92%）。Caco-2 単層のブレンソカチブの透過性は強力な P 糖タンパク質（Pgp）阻害剤（ベラパミル及びイトラコナゾール）の存在下で 43%～52%増加し、efflux ratio は 38%～54%低下した。この結果はブレンソカチブが Pgp の基質であることを示している。また乳癌耐性タンパク質（BCRP）阻害剤（Ko143）存在下では透過性は 6.4 倍となり、efflux ratio は 93.2%低下した。この結果はブレンソカチブが BCRP の基質であることを示している。ブレンソカチブはバイオアベイラビリティが高いため、排出輸送担体がブレンソカチブの吸収に与える影響は小さいと考えられる。

ブレンソカチブ曝露を、マウス、ラット、雌ウサギ及びイヌに 1 日 1 回反復投与した毒性試験で評価した。C_{max} 及び血漿中薬物濃度時間曲線下面積（AUC）は用量の増加とともに増加し、最高血中濃度到達時間（T_{max}）は概ね 1～5 時間の範囲であった。定常状態での蓄積は概ね 2 倍未満であった。曝露量の性差はイヌではみられなかったが、マウスとラットではわずかにみられ、多くの試験で雌は雄よりわずかに曝露量が多かった。妊娠ラットとウサギでは曝露量は用量依存的であった。授乳ラットにブレンソカチブを投与したとき、仔ラットの血漿中で低濃度のブレンソカチブがみられた。母動物と仔の間で平均濃度勾配は約 28 倍であった。

3.2. 分布

ブレンソカチブの血漿タンパク結合率は動物種によって異なり、ラットで高く（93.9%）、マウス（83.5%）及びヒト（87.2%）で中程度、ウサギ（77.3%）及びイヌ（70.3%）で低かった。

ブレンソカチブ IV 投与後の分布容積はラット（2.46 L/kg）及びイヌ（11.3 L/kg）で広く、組織への良好な分布が示唆された。

組織分布は、アルビノラットと有色ラットで定量的全身オートラジオグラフィーを使用して評価した。ブレンソカチブは急速に吸収され広く分布した。組織におけるピーク放射活性濃度は投与後 2 ～ 6 時間で観察され、最高濃度は、アルビノラットでは肝臓及び包皮腺（放射活性及び組織／血液濃度比：肝臓では投与から 2 時間後に 3.9 µg eq/g 及び 37.7、包皮腺では投与から 6 時間後に 3.54 µg eq/g 及び 39.6）、有色ラットでは眼球血管膜（放射活性及び組織／血液濃度比：投与から 6 時間後に 11.1 µg eq/g 及び 37）でみられ、ブレンソカチブ又はその代謝物がメラニンに結合することが示唆された。アルビノラットでは、投与から 672 時間後（28 日後）の放射活性は、肝臓、甲状腺、腎臓、脾臓及び副腎などの一部の臓器を除いては定量下限未満であった。ラットでは未変化体の t½は約 5 時間と短いため、残留放射活性は代謝物に関連がある可能性がある。有色ラット及びアルビノラットではいずれも、脳と脊髄で測定された放射活性は低く（0.032 µg eq/g 以下）、投与から 48 時間後には定量限界（0.007 µg eq/g）未満となった。妊娠アルビノラットでは、放射活性はほとんど母動物の組織でみられたが、胎盤及び胎児でもわずかにみられた（6 時間後にそれぞれ 0.45 µg eq/g 及び 0.14 µg eq/g、母動物の血中では約 0.2 µg eq/g）。

^{14}C-ブレンソカチブをマウス、ラット及びイヌに経口投与して血液／血漿（B/P）比を評価した。平均 B/P 比は雄と雌のマウスで 0.86～0.91、雄と雌のラットで 0.82～0.83 であった。0 時間から最終定量可能濃度時間までの AUC（AUC_{last}）の平均値に基づくと、イヌにおける B/P 比は 0.98 であった。これらのデータは、ブレンソカチブの血球への優先的な結合が低いことを示している。

3.3. 代謝

ブレンソカチブの代謝を、マウス（小腸ミクロソームのみ）、ラット、イヌ及びヒト由来の肝細胞及び小腸ミクロソームで評価した。肝細胞では 4 時間の培養後に 95%超が未変化体のままであり、少数の微量代謝物が検出された。代謝物の量はラット肝細胞で最大で［酸化で形成される M1（1.9%）及び M4（0.9%）］、ヒト肝細胞では微量であり（検出限界超の代謝物は認められ

なかった）、ヒトに特異的な代謝物は特定されなかった。マウス、ラット、イヌ及びヒトの小腸ミクロソームでは、2 時間の培養後にそれぞれ 95.3%、102%、99.4%及び 100%が未変化体のままであった。ヒト CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 及び CYP3A5 を過剰発現した大腸菌によるチトクローム P450（CYP）表現型解析に基づくと、ブレンソカチブは主に CYP3A4/5 によって代謝された。

マウス、ラット及びイヌから得た代謝物プロファイリングデータで、ブレンソカチブは酸化、N-脱メチル化、加水分解、N-ホルミル化、酸化的脱アルキル化、水和、脱水素及び硫化による代謝を受けることが示された。マウスでは、ブレンソカチブ未変化体が血漿中に最も豊富に含まれる成分であった（総 AUC_{last} の 71.9%）。血漿中の主要代謝物としてチオシアン酸塩（M8）が検出され（総 AUC の 10.4%）、C_{max} は 0.249 µg eq/g、AUC_{last} は 11.4 µg eq·h/g、T_{max} は 24 時間であった。他の循環血中の代謝物は微量（総 AUC の 10%未満）又はごく微量であった。

ラットの血漿、尿（投与量の 11.5%）及び糞便（投与量の 36.5%）でみられたブレンソカチブに関連する主な成分はブレンソカチブ未変化体であり、胆汁での主な成分は M30 であった（投与量の 6.4%）。雄と雌の血漿中でブレンソカチブ未変化体は総放射活性曝露量の 80%超であり、最も豊富な代謝物はチオシアン酸塩（M8）で、投与後 24 時間で総放射活性曝露量の約 3%であった（C_{max} は雄で 0.105 µg eq/g、雌で 0.140 µg eq/g、AUC_{last} はそれぞれ 0.849 eq*h/g 及び 1.04 µg eq*h/g）。

イヌの血漿中の主要代謝物はチオシアン酸塩（M8）であり、C_{max} と AUC_{last} はそれぞれ 0.522 µg eq/g 及び 83.9 µg eq*h/g（総 AUC の 67.1%）であった（血漿は 240 時間にわたり採取）。血漿中で唯一のその他の主要成分はブレンソカチブ未変化体であり、C_{max} と AUC_{last} は 1.33 µg eq/g 及び 29.2 µg eq*h/g（総 AUC_{last} の 23.4%）で、尿中では唯一の主な成分であった（投与量の 14.2%）。糞便中ではブレンソカチブ未変化体及び dioxy-brensocatib（M17）が主な成分であり、それぞれ投与量の 25.7%及び 14.8%であった。他の代謝物はいずれも微量（10%未満）からごく微量（1%未満）であった。

評価した用量でマウス、ラット及びイヌに認められたチオシアン酸塩（M8）の全身曝露量は、ヒトに 40 mg の ^{14}C-brensocatib を単回投与した場合（INS1007-103 試験）と同程度又はそれより高かった。チオシアン酸塩は内因性物質であり、一般に安全と認められている（Generally Recognized As Safe：GRAS）化学物質である。チオシアン酸塩の循環血中濃度は喫煙並びに乳製品及び食品の摂取量の影響を受け、基準範囲は 3～15 µg/mL である（ニトロプルシドナトリウムの処方情報; GRAS Notice 753）。健康被験者（120 mg 以下の単回投与）、腎機能障害被験者（25 mg 単回投与）及び NCFBE 被験者（25 mg QD 投与）の臨床データにおいて、チオシアン酸塩の血漿中濃度はブレンソカチブ投与の影響を受けないことが示された。

3.4. 排泄

IV 投与後のクリアランスは、ラットとイヌでは低かった（それぞれ 6.52 mL/min/kg と 7.64 mL/min/kg）。IV 又は経口投与後の消失半減期（$t_{1/2}$）は、ラットでは約 5 時間、イヌでは約 14 ～ 18 時間であった。イヌに経口投与したとき、M8 の $t_{1/2}$ は 194 時間（8.1 日）であった。

ブレンソカチブの胆汁中排泄及び尿中排泄をラットとイヌで評価した。^{14}C-ブレンソカチブを無処置又は胆管カニューレ挿入ラットに経口投与したとき、尿及び胆汁に排泄された放射活性はそれぞれ 15.5%～23.7%及び 19.0%であった。無処置ラットでは、糞便で回収された放射活性は、経口投与時に 76.8%、IV 投与時に 59.1%であった。放射標識のないブレンソカチブをラットに IV 投与したとき、ブレンソカチブ未変化体として排出された割合は、尿では投与量の 10.5%～15.1%、胆汁では 0.26%であった。

^{14}C-ブレンソカチブを雄イヌに経口投与したとき、^{14}C-放射標識されたブレンソカチブの主な排出経路は糞便であり、投与後 240 時間に糞便中で回収された放射活性は平均で投与量の 64.0%であった。尿中排泄は投与後 240 時間で投与量の平均 18.0%を占めていた。全体として、放射活性の平均回収率は 84.5%であった。胆管カニューレ挿入イヌにブレンソカチブを IV 投与したとき、腎クリアランス及び胆汁排泄クリアランスはそれぞれ、全身クリアランスの 19%及び 3%であった。

3.5. 薬物動態学的薬物相互作用

最大濃度 30 μM までの濃度の *in vitro* の評価では、ブレンソカチブによる CYP アイソザイムの有意な阻害作用はみられなかった（IC_{50} は CYP2B6、2D6 及び 3A4/5 に対しては 30 μM 超であり、CYP1A2、2A6、2C8、2C9、2C19 及び 2E1 に対する作用は認められなかった）。また、ブレンソカチブは CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して時間依存的阻害作用を示さなかった。ヒト肝細胞では、ブレンソカチブ（2200 ng/mL 以下）は CYP3A の弱い誘導剤と同定されたが、CYP1A2、2B6、2C8、2C9 及び 2C19 に対する誘導剤ではなかった。輸送阻害に関する評価により、ブレンソカチブは Pgp、有機アニオン輸送担体 1（OAT1）及び有機カチオン輸送担体 2（OCT2）の阻害作用を示さないが、BCRP、有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1（OATP1B1）、OAT3、OATP1B3、多剤対向輸送タンパク質 1（MATE1）及び MATE2K に対しては軽度の阻害作用を示した（IC_{50} は 11 μM 超）。これらのデータは、臨床的に意味のある用量のブレンソカチブが CYP アイソザイムや薬物輸送担体の活性に影響を及ぼす可能性は低いことを示している。

3.6. 要約

ブレンソカチブは CYP3A4/5、Pgp 及び BCRP の基質である。動物での経口バイオアベイラビリティは高く、全身曝露量は用量依存的で、定常状態での蓄積は概ね 2 倍未満であり、げっ歯類ではわずかに性差（概ね 2 倍未満）がみられる。^{14}C-放射標識されたブレンソカチブは体内で広く分布し、血液脳関門の透過はごくわずか、血液胎盤の透過は中等度で、メラニンに対して結合能を示す。ブレンソカチブは主に CYP3A4/5 で代謝され、動物では複数の代謝経路を通過し、ヒトに特異的な代謝物は同定されなかった。ブレンソカチブ及びその代謝物は主に糞便中排泄で排出され、未変化体の尿中排泄は中等度、胆汁中排泄はごくわずかである。ブレンソカチブは CYP アイソザイム又は薬物輸送担体に対し、臨床的に意味のある阻害作用を示さない。ブレンソカチブは CYP3A の軽度誘導作用があるが、他の CYP アイソザイムに対する誘導は認められな

い。したがって臨床用量で投与したとき、CYP 及び輸送担体を介して DDI が生じる可能性は低いと予想される。

4. 毒性試験

4.1. 緒言

ラット（最長 6 箇月）及びイヌ（最長 9 箇月）の反復投与一般毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、遺伝子導入 rasH2 マウス及びラットの発がん性試験、雄雌ラットの受胎能評価、ラット及びウサギの胚・胎児発生（EFD）試験、ラットの出生前及び出生後の発生（PPND）試験、光毒性リスク評価など、包括的な非臨床毒性試験プログラムを実施した（表 3）。ブレンソカチブはマウス、ラット、イヌ、ウサギ及びヒトの DPP1 酵素に対して同様の阻害効力を有するため、毒性試験に用いた動物種は薬理学的に関連する動物種と考えられる（Doyle et al., 2016; Module 2.6.3 [表 2]）。毒性試験のデータを Module 2.6.6 及び Module 2.6.7 に要約する。

すべての *in vivo* 毒性試験は、1 日 1 回の強制経口投与で実施した。すべての主要な毒性試験は、GLP を遵守し、EMA、FDA、MHLW を含む規制当局及びその他の OECD 加盟国の要件に沿って実施した。すべての主要な反復投与一般毒性試験で、回復期間を設けた。

表 3: ブレンソカチブ毒性試験の一覧

Study Type and Duration	Route of Administration	Species	Study Number	GLP
Repeat Dose Toxicity:				
MTD/28-day	Oral	Rat	525710	No
MTD/14-day	Oral	Dog	525726	No
1-month + 1-month recovery	Oral	Rat	527409	Yes
1-month + 1-month recovery	Oral	Dog	527414	Yes
6-month + 3-month recovery, including assessment of male fertility	Oral	Rat	528313	Yes
6-month + 6-month recovery	Oral	Dog	528329	Yes
9-month + 6-month recovery	Oral	Dog	505523	Yes
Genetic Toxicity:				
Ames	*In vitro*	*In vitro*	8304016	Yes
Mouse lymphoma	*In vitro*	*In vitro*	8304015	Yes
Rat micronucleus	Oral	Rat	8304017	Yes
Carcinogenicity:				
28-day dose-range-finding study	Oral	Mouse	8003479	Yes
6-month carcinogenicity study	Oral	Mouse	20354490	Yes
2-year carcinogenicity study	Oral	Rat	8002910	Yes
Reproductive and Developmental Toxicity:				
Range-finding EFD study	Oral	Rat	497631	Yes
Female fertility and EFD study	Oral	Rat	497825	Yes
Range-finding toxicity in non-pregnant rabbit	Oral	Rabbit	497610	No
Range-finding EFD study	Oral	Rabbit	497626	Yes

Study Type and Duration	Route of Administration	Species	Study Number	GLP
EFD study	Oral	Rabbit	497830	Yes
PPND study	Oral	Rat	00335001	Yes
Other Studies (不純物C*):				
CPCA	*In silico*	N/A	EQR-6850-142.01	No
Enhanced Ames	*In vitro*	*In vitro*	STURS24AA0598-1	Yes
Mouse lymphoma	*In vitro*	*In vitro*	STUGC24AA2299-2	Yes
Metabolism	*In vitro*	*In vitro*	8547044	No
Quantum mechanical assessment	*In silico*	N/A	VV-NC-001334	No
Other Studies (Other):				
3T3 Phototoxicity	*In vitro*	*In vitro*	20059176	Yes
EM evaluation rat 1-month	Oral	Rat	EM-14.352	No
EM evaluation dog 1-month	Oral	Dog	EM-14.353	No

CPCA = carcinogenic potency categorization approach; EFD = embryofetal development; EM = electron microscopic; GLP = Good Laboratory Practice; MTD = maximum tolerated dose; PPND = pre- and postnatal development.

非臨床毒性試験では、NCFBE 治療におけるブレンソカチブの適切な安全性プロファイル及び意味のある安全マージンが示された。一般毒性試験では、オンターゲット作用及びオフターゲット作用を含め、毒性の標的臓器を特定した。総じて、ブレンソカチブに関連する所見は用量依存的及び可逆的であり、NCFBE の MRHD 投与時の臨床曝露量より高い曝露量で認められた。MRHD 投与に対する定常状態での総ブレンソカチブ及び遊離ブレンソカチブの安全マージンを表 4 に示す。濃度依存的な毒性は認められなかったため、C_{max} の安全マージンは提示しなかった。

主要試験における主な非臨床毒性所見及び対応する安全マージンについて、以下に記載する。

4.2. 一般毒性試験

ラットを用いた 1 箇月間試験でブレンソカチブ 0、3、15 又は 100 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、投与に関連した有害所見は最高用量の 100 mg/kg/day のみでみられた。有害所見は、腎臓、ヒラメ筋、肺、及び腸間膜リンパ節における顕微鏡的所見などであった。腎臓の所見は、重量増加、軽微な尿細管空胞化、及び軽度から中等度の尿細管好塩基球増加症であり、そのため混濁尿の発現率が上昇し、尿糖、N-アセチル β-d-グルコサミニダーゼ（NAG）、及びタンパク質が増加した。ヒラメ筋では軽微から軽度の筋線維変性／再生がみられ、肺の所見は重量増加、及びびまん性の肺胞マクロファージの軽微から中等度の集簇であった。肺の顕微鏡的所見は、透過型電子顕微鏡（TEM）によりリン脂質症（PLD）と一致していることが確認された。同様に、マクロファージの軽微から軽度の集簇が腸間膜リンパ節で観察された。100 mg/kg/day の投与ではその他にもいくつか変化がみられたが、これらの変化に対応する顕微鏡的所見は認められなかった。前述のブレンソカチブに関連する所見はいずれも 1 箇月間の回復期間後に完全に可

逆的であったが、腎臓の尿細管空胞化の回復は部分的であった。15 mg/kg/day の投与では、雌の腎臓で尿細管空胞化の発現率が軽微に上昇したが、尿検査所見には明らかな影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 15 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 28 での C_{max} と 0～24 時間までの血漿中薬物濃度時間曲線下面積（AUC_{0-24h}）は（雄と雌を合わせた平均）、27.3 μM と 270 μM*h であった。

ラットを用いた 6 箇月間試験でブレンソカチブ 0、3、9 又は 50 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、投与に関連した有害所見は最高用量の 50 mg/kg/day のみでみられた。有害所見は腎臓と肺における顕微鏡的所見などであった。腎臓では髄質の外層で軽微から軽度の好塩基性尿細管がみられ、尿中 NAG の増加に関連していた。肺での顕微鏡的所見は、血管周囲の軽微から軽度の好中球浸潤の発現率上昇、及び空胞化マクロファージの集簇の軽微から著明な増加であり、TEM により PLD と一致した。50 mg/kg/day の投与で腎臓と肺にみられた所見は 3 箇月の無投与期間後には完全に可逆的であった。NOAEL は 9 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 182 での C_{max} と AUC_{0-24h} は（雄と雌を合わせた平均）、17.8 μM と 196 μM*h であった。

イヌを用いた 1 箇月間試験でブレンソカチブ 0、3、15 又は 75 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、投与に関連した有害所見は最高用量の 75 mg/kg/day のみでみられた。有害所見は、腎臓、肝臓、骨髄、胸腺、精巣／精巣上体、肺、及び種々のリンパ造血網状系組織における顕微鏡的所見などであった。腎臓の所見は、尿細管の軽微から軽度の空胞化／変性、及び硝子円柱を伴う軽微な好塩基性尿細管であり、これに伴って尿タンパク質及び NAG が増加した。肝臓では、肉眼所見として著明な小葉構造及び退色、顕微鏡的所見として小葉中心部の軽微から著明な空胞化が認められたが、肝細胞傷害のエビデンスは認められなかった。よって、肝臓の病理所見と血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びグルタミン酸脱水素酵素（GLDH）の軽微から中等度の増加との関係は不明であった。胸骨骨髄の所見は、脂肪組織細胞充実性の軽微から中等度の増加であった。胸腺の所見は、軽微から中等度の退行／萎縮を伴う臓器重量の減少であった。肺と種々のリンパ造血網状系組織では［腋窩リンパ節、気管支リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、腸管関連リンパ組織（GALT）及び脾臓］、PLD と一致する軽微から中等度の空胞化マクロファージが観察された。さらに、精巣で精母細胞が軽度に腫大し、精巣上体で細胞残屑の重症度が軽微から軽度に上昇した。4 週間の回復期間終了後、腎臓所見の回復は部分的であったが、それを除くとすべての所見は完全に可逆的であった。。NOAEL は 15 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 28 の C_{max} と AUC_{0-24h}（雄と雌を合わせた平均）は、9.49 μM と 138 μM*h であった。

イヌを用いた 6 箇月間試験でブレンソカチブ 0、2、8 又は 50 mg/kg/day を投与したとき、50 mg/kg/day は忍容性が不良で、8 mg/kg/day と 50 mg/kg/day では投与に関連した有害所見がみられた。50 mg/kg/day の投与では歯周病が生じたため、Week 18 の間に投与を中断し、Week 18 と Week 19 に雄雌それぞれ 7 匹中 4 匹を人道的安楽死させる必要が生じた。残りのイヌは引き続き観察して 26 週間の無投与期間の回復状態を評価した。顕微鏡的所見は、8 mg/kg/day と 50 mg/kg/day の投与で精巣／精巣上体及び肺で用量に依存した変化、並びに 50 mg/kg/day で腎臓

及びリンパ組織に用量に依存した変化であった。精巣の所見は、軽微から重度の精細管変性／萎縮、及びライディッヒ細胞の軽度の過形成／肥大（50 mg/kg/day のみ）であり、これに伴い精巣上体では細胞残屑の軽微から軽度の増加、精子細胞充実性の軽微から重度の減少、及び上皮細胞の軽度のアポトーシス（50 mg/kg/day のみ）がみられた。肺の所見は、重量増加、空胞化マクロファージの軽微から著明な集簇（PLD に一致）などであり、50 mg/kg/day の投与ではリンパ組織（腋窩リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、GALT 及び脾臓）でも同じ顕微鏡的所見がみられた。50 mg/kg/day の投与ではさらに、腎臓の皮髄境界部に軽微から軽度の尿細管再生が観察され、これに伴い一部のイヌでは血漿尿素、クレアチニン及び尿中 NAG の濃度が上昇した。所見はいずれも、26 週間の回復期間終了後に完全に可逆的であったが、精巣／精巣上体及び歯周組織の回復は部分的であった。NOAEL は 2 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 181 の C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$（雄と雌を合わせた平均）は、0.948 µM と 12.7 µM*h であった。

イヌを用いた 9 箇月間試験でブレンソカチブ 0、1、2、4 又は 8 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、いずれの用量でも投与に関連した有害所見は認められなかった。NOAEL は 8 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 273 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は（雄と雌を合わせた平均）、4.3 µM と 51.4 µM*h であった。この AUC 値は、以前に行われた 6 箇月間試験で同じ用量を投与したときの AUC 値よりも約 24%低い。この 2 試験は同じ試験施設で GLP に従って行われており（バイオアナリシスとトキシコキネティクス解析を含む）、被験物質の処方も動物の供給業者も同じであるため、上記の差は生物学的な多様性と考えられた。6 箇月間試験で 8 mg/kg/day 以上を投与したときにみられた精巣及び肺の顕微鏡学的変化が、9 箇月間試験で NOAEL を投与したときにみられなかったのは、9 箇月間試験では AUC が低値であったためと考えられた。9 箇月間試験のほうがブレンソカチブ投与期間が長く、雄の生殖器系がより総合的に評価され、ブレンソカチブに関連する非臨床所見がいずれも用量／曝露依存的な閾値を示したため、9 箇月間試験で NOAEL（8 mg/kg/day）を投与したときの AUC は低値であったが、臨床曝露量の安全マージンを算出する際の基礎としてより適切と考えられる。

ラットとイヌを用いた 1 箇月間及び 6 箇月間の一般毒性試験では、標準的な毒性評価項目の他にも、好中球機能に対するブレンソカチブの作用（目的に一致した方法での、末梢血における酸化バースト及び食作用の評価など）も評価した。酸化バーストの評価では、Phagoburst キットを使用して全血を調製し、採取から 24 時間以内に分析した。食作用の評価では、検体を pHrodo 蛍光生体粒子とともに培養し（適切な対照も培養した）、採取から 24 時間以内に分析した。好中球機能の評価では、活性酸素種を産生する能力が用量に関連してわずかに低下したが、食作用に影響は認められなかった。一部の試験では好中球数が増加した。全体として好中球における変化は感染率に影響を及ぼすほど意味のあるものではなく、有害ではないと判断される。

要約すると、ラット及びイヌの一般毒性試験で毒性の標的臓器を特定した。NOAEL は、ラットの 6 箇月試験では 9 mg/kg/day、イヌの 9 箇月試験では 8 mg/kg/day と判断した。安全マージンは、ラットの 6 箇月試験で NOAEL（9 mg/kg/day）を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 10 倍であり、イヌの 9 箇月試験で

NOAEL（8 mg/kg/day）を投与したときの AUC に基づくと、それぞれ 5 倍と 12 倍であった（表 4）。

6 箇月試験では、NOAEL を超えた用量／曝露量で、両動物種の肺と腎臓、イヌのリンパ組織、精巣／精巣上体及び歯周組織において顕微鏡的変化が認められた。肺及びリンパ組織における形態学的変化は、ブレンソカチブと類似する陽イオン性両親媒性の薬剤に伴って発現することが知られている PLD と一致している。イヌにおける歯周病は、極めて高い用量で認められるオンターゲット作用と考えられる。ラットとイヌの両方で認められた好中球の活性酸素種産生能における軽微な用量依存的な低下もオンターゲット作用の可能性があるが、有害ではなかった。1 箇月試験では、高用量において骨格筋、肝臓、胸腺及び骨髄を含むその他の組織に顕微鏡的所見が認められたが、これらの所見は 6 箇月試験では認められなかった。イヌの 9 箇月試験で特記すべき所見は認められなかった。6 箇月試験の最小毒性量（LOAEL）における曝露倍数は、ラットに 50 mg/kg/day を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、イヌに 8 mg/kg/day を投与したときの AUC に基づくと、それぞれ 7 倍と 16 倍であった（表 4）。

4.3. 遺伝毒性試験及びがん原性試験

ブレンソカチブの遺伝毒性を ICH 標準試験バッテリー（*in vitro* Ames 試験、*in vitro* マウスリンパ腫 L5178Y 細胞アッセイ、又はラットを用いた *in vivo* 骨髄小核試験）で評価したところ、遺伝毒性は認められなかった。

遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間がん原性試験でブレンソカチブ 0、5、15 又は 50 mg/kg/day を投与したとき、がん原性は認められなかった。50 mg/kg/day を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄で 56.1 µM と 298 µM*h、雌で 68.9 µM と 708 µM*hr であり、雄と雌を合わせた平均はそれぞれ 63 µM と 503 µM*h であった。

ラットを用いた 2 年間のがん原性試験でブレンソカチブ 0、3、10 又は 30 mg/kg/day を投与したとき、がん原性は認められなかった。30 mg/kg/day を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄で 45.3 µM と 428 µM*h、雌で 68.6 µM と 649 µM*hr であり、雄と雌を合わせた平均はそれぞれ 57 µM と 538.5 µM*h であった。

がん原性試験で最高用量を投与したときの AUC 値（雄と雌を合わせた平均）に基づいた安全マージンは、マウスを用いた試験における総ブレンソカチブの AUC に基づくと 52 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 67 倍、ラットを用いた試験で得た値に基づくとそれぞれ 56 倍と 26 倍である（表 4）。

4.4. 生殖発生毒性試験

雄の 6 箇月一般毒性試験及び雌の胚・胎児発生（EFD）毒性確認試験の一環として、ラットの受胎能を評価した。各試験で検討した最高用量（雄 50 mg/kg/day、雌 100 mg/kg/day）までの用量で受胎能への影響は認められなかった。50 mg/kg/day を投与した雄ラットの Day 182 における平

均 C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、それぞれ 97.0 µM 及び 1460 µM*h であった。雌ラットの平均全身曝露量は、下記の EFD 試験に示す。

ラットにおける受胎能及び EFD 毒性試験では、交配 2 週間前から妊娠 16 日目（GD16）まで雌ラットにブレンソカチブ 3、20 又は 100 mg/kg/day を投与し、20 mg/kg/day 及び 100 mg/kg/day で軽微な母体毒性（摂餌量及び／又は体重の変化）が認められた。発情周期、交尾行動、雌の受胎能、胚・胎児の生存率、胎児体重に対する有害作用はなく、いずれの用量でも胎児に重大な奇形は認められなかった。100 mg/kg/day の投与でのみ、肩甲骨弯曲及び波状肋骨など軽度の骨格奇形がみられた。20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与では、骨格変異の発現率及び骨化進行の差が増加し、3 mg/kg/day の投与では 1 匹の頭蓋骨のみで骨化遅延が認められた。NOAEL は、母動物毒性及び EFD 毒性に対しては 3 mg/kg/day、雌の受胎能に対しては 100 mg/kg/day と判断された。NOAEL の投与に関し、GD16 の平均 C_{max} と AUC_{0-24h} は、3 mg/kg/day を投与したときに 2.73 µM と 28.7 µM*h、100 mg/kg/day を投与したときに 84.4 µM と 1240 µM*h であった（先行の用量設定試験から得たデータに基づく）。この試験の文脈では、わずかな骨格奇形（肩甲骨弯曲及び波状肋骨）及び骨格変異が有害と考えられ、これらの異常は母動物にわずかな毒性が生じたときにみられた。文献では、交配が確認されたラットを用いた長期 *in vivo* 試験において、非侵襲的なマイクロコンピュータ X 線断層撮影で長骨の弯曲（肩甲骨を含む）がみられても、生後 3 週間で完全に回復すると報告されている（De Schaepdrijver et al., 2014）。肩甲骨弯曲及び波状肋骨の所見は一過性（回復可能）であり、奇形でなく変異と考えるべきであり、環境要因に対する曝露の標準設定、又は、ヒトにおける薬剤の安全用量設定に際してリスクアセスメントで使用すべきでないと結論されている（Kimmel et al., 2014）。

妊娠ウサギを用いた EFD 試験でブレンソカチブ 5、15 又は 50 mg/kg/day を GD7～GD19 に投与したとき、胚・胎児の生存又は発生に対する影響は認められなかった。母動物では、15 mg/kg/day 以上の投与で体重増加の抑制、50 mg/kg/day の投与で一過性の摂餌量減少などのわずかな毒性がみられた。母動物に対する NOAEL は 5 mg/kg/day と判断された。胚・胎児に対する NOAEL は 50 mg/kg/day と判断され、GD 19 の平均 C_{max} と AUC_{0-24h} はそれぞれ 23.0 µM と 195 µM*h であった。

PPND 毒性試験で妊娠ラットにブレンソカチブ 3、9 又は 20 mg/kg/day を GD6 から授乳 20 日目まで投与したとき、有害所見は認められなかった。F_0 の親動物全身毒性、F_1 の新生仔発生に対する毒性、全身毒性、生殖毒性、及び F_2 の胚生存に対する NOAEL は、最高用量の 20 mg/kg/day と判断された。この用量を F_0 の雌に投与したときの GD6 における平均 C_{max} と AUC_{0-24h} は、14.1 µM と 163 µM*h であった。

生殖発生試験の結果に基づいた安全マージンは、雄ラットに生殖能に対する NOAEL（50 mg/kg/day）を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、雌ラットに受胎能に対する NOAEL（100 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 128 倍と 61 倍、ラット EFD 試験で NOAEL（3 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 3 倍と 1 倍であり、ウサギ EFD 試験で NOAEL（50 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 20 倍と 36 倍、ラット PPND 試験で

NOAEL（20 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 17 倍と 8 倍であった。生後迅速に修復する肩甲骨弯曲、波状肋骨及び変異をヒトのリスクアセスメントから除いた場合、ラットの EFD 試験における対応する安全マージンは 100 mg/kg/day を投与したときの値に基づくとそれぞれ 128 倍と 61 倍であった（表 4）。

4.5. その他の毒性試験

3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性アッセイで、ブレンソカチブに光毒性は認められなかった。

その他に単独のブレンソカチブ毒性試験は実施しなかった。

文献及び完了した試験から得た既存データ（作用機序、構造的類似性のデータベース検索、オフターゲットプロファイル、毒性試験で認められた毒性所見の性質と関連する安全マージン、注目すべき組織における化合物の曝露量、完了した臨床試験から得た重要な安全性所見、主なヒト代謝物の毒性プロファイルを含む）の包括的な評価に基づき、治療として意味のある曝露量において、ブレンソカチブに免疫毒性又は乱用の可能性はない。

ブレンソカチブの原薬及び／又は製剤におけるすべての不純物又は分解物については、*in vitro* 試験又は一般毒性試験で適格性を確認したか、入手可能なデータ及び／又は規制当局のガイドラインに基づき適切に管理した。具体的には、有効成分由来のニトロソアミン類である不純物C* は、*In Silico* carcinogenic potency categorization approach と、*in vitro* 試験であるAmes 試験、哺乳類細胞遺伝子突然変異試験、ヒト肝ミクロソーム及びラット S9 における代謝試験、並びに量子力学的な評価を用いて評価した。さらに、マウスを用いた 28 日間の GLP 一般毒性試験で不純物B* の適格性を確認し、イヌを用いた 9 箇月間の GLP 一般毒性試験で不純物A*の適格性を確認した。これらの不純物は、Module 2.6.6 [8.4 項]に詳述している。

4.6. 要約

一般毒性試験では、ラットとイヌで毒性の標的臓器が特定され、毒性の特徴が適切に明らかにされた。ブレンソカチブに関連する毒性所見はいずれも用量依存的、可逆的であって、MRHD を投与したときの曝露量より高い曝露量で発現した。NOAEL は、ラットを用いた 6 箇月間試験では 9 mg/kg/day、イヌを用いた 9 箇月間試験では 8 mg/kg/day と判断され、MRHD を投与したときの AUC とこれらの用量をラットとイヌに投与したときの定常状態における AUC に基づいた安全マージンは、ラットにおける総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 10 倍、イヌから得た値に基づくとそれぞれ 5 倍と 12 倍である（表 4）。

6 箇月間試験では、NOAEL を超えた用量／曝露量において、高用量／高曝露量で肺と腎臓（ラットとイヌ）、リンパ組織、精巣／精巣上体及び歯周組織（イヌ）に顕微鏡的変化がみられた。肺及びリンパ組織の形態学的変化は PLD と一致しており、歯周病はオンターゲット効果と考えられる。1 箇月間試験では、より高い用量で他の組織（骨格筋、肝臓、胸腺及び骨髄など）に顕微鏡的所見があったが、6 箇月間試験ではこれらの所見はみられず、イヌを用いた 9 箇月間試験では著明な所見は認められなかった。

※新薬承認情報提供時に置き換え

動物で特定された標的臓器の毒性については、ブレンソカチブの臨床試験で可能なかぎり綿密にモニタリングし、現在までにヒトでこのような安全性の懸念は認められていない。

in vitro 試験でも *in vivo* 試験でも、遺伝毒性の徴候は認められなかった。がん原性は、遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間試験では最高用量の 50 mg/kg/day まで、ラットを用いた 2 年間の試験でも高用量の 30 mg/kg/day までみられなかった。これらの用量を投与したときの AUC に基づいた安全マージンは、マウスの雄と雌を合わせた平均総ブレンソカチブの AUC に基づくと 52 倍、平均遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 67 倍、ラットでそれぞれ 56 倍と 26 倍である（表 4）。

ラットの生殖能については、雄で 50 mg/kg/day、雌で 100 mg/kg/day まで影響はなく、安全マージンは、雄における総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、雌から得た値に基づくとそれぞれ 128 倍と 61 倍である。ラットを用いた EFD 試験では、100 mg/kg/day の投与まで胚・胎児の生存、胎児の重量に対する有害作用はなく、胎児の大奇形もみられず、安全マージンは総ブレンソカチブの AUC に基づくと 128 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 61 倍である。母動物にわずかな毒性がみられた用量では、仔にわずかな奇形と異形（肩甲骨弯曲及び波状肋骨）がみられたが回復可能であった。NOAEL（3 mg/kg/day）を投与したときの AUC に基づいた安全マージンは、総ブレンソカチブの AUC に基づくと 3 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 1 倍である。ウサギでは 50 mg/kg/day まで胚・胎児毒性はみられず、安全マージンは、50 mg/kg/day を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 36 倍である。ラットを用いた PPND 試験では 20 mg/kg/day まで有害所見はなく、安全マージンは、総ブレンソカチブの AUC に基づくと 17 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 8 倍である（表 4）。

表 4:　　主要な毒性試験における定常状態 AUC と MRHD に対する曝露倍数の要約

Species and Study	**NOAEL or Doses with Noteworthy Toxicity Findings**	**Dose (mg/kg)**	**AUC (µM*h)**		**AUC Multiple**	
			Total	**Free[a]**	**Total**	**Free**
Human (Report ICPD 00694-1)	25 mg/day (MRHD)	0.42	9.655[b]	1.236	-	-
Rat: 1-mo study (Study No. 527409)	NOAEL	15	270	16.36	28	13
	Lesions in lung, kidney, mesenteric lymph nodes, and muscle	100	1920	116.35	199	94
Dog: 1-mo study (Study No. 527414)	NOAEL	15	138	40.99	14	33
	Lesions in lung, kidney, lymph nodes, liver, bone marrow, thymus, spleen, and testes	75	475	141.08	49	114
Rat: 6-mo study (Study No. 528313)	NOAEL	9	196	11.88	20	10
	NOAEL (male fertility)	50	1450	87.87	150	71
	Lesions in kidney and lung	50	1450	87.87	150	71
Dog: 6-mo Study	NOAEL	2	12.7	3.77	1	3

Species and Study	NOAEL or Doses with Noteworthy Toxicity Findings	Dose (mg/kg)	AUC (μM*h)		AUC Multiple	
			Total	Free[a]	Total	Free
(Study No. 528329)	Lesions in testis and lung	8	67.5	20.05	7	16
	Adverse dental findings; lesions in testis, kidney, lung, and lymphoid tissues	50	ND[c]	-	-	-
Dog: 9-mo study (Study No. 505523)	NOAEL	8	51.4	15.27	5	12
Mouse: 6-mo carci study (Study No. 20354490)	Top Dose	50	503	83	52	67
Rat: 2-year carci study (Study No. 8002910)	Top Dose	30	538.5	32.63	56	26
Rat: EFD study (Study No. 497825)	NOAEL	3	28.7	1.74	3	1
	Skeletal variations	≥20	403	24.42	42	20
	Minor skeletal malformations	100	1240[d]	75.14	128	61
	NOAEL (female fertility)	100	1240[d]	75.14	128	61
Rabbit: EFD study (Study No. 497830)	NOAEL	50	195[e]	44.27	20	36
Rat: PPND study (Study No. 00335001)	NOAEL	20	163	9.88	17	8

[a] Free PK exposure data based on percentages of unbound brensocatib in mouse (16.5%), rat (6.06%), rabbit (22.7%); dog (29.7%), and human (12.8%) (Study ADME-AZS-Wave4-130621).
[b] Steady state AUC of 9.655 μM*h for brensocatib at 25 mg QD in humans was derived by dividing the original value of 4060 ng*h/mL in Report ICPD 00694-1 with 420.5, the molecular weight of brensocatib as the free base.
[c] This dose group was terminated early, and no plasma exposure was determined prior to necropsy.
[d] Exposure from a preceding dose-range finding study (Study No. 497631).
[e] Exposure from a preceding dose-range finding study (Study No. 497626).
AUC = area under the concentration-time curve; carci = carcinogenicity; EFD = embryofetal development; mo = month; ND = not determined; NOAEL = No-Observed-Adverse-Effect Level; PK = pharmacokinetic(s); PPND = pre- and postnatal development.

In vitro アッセイでは潜在的な光毒性はみられなかった。治療として意味のある曝露量では免疫毒性や中毒・依存の可能性はないと考えられる。ヒトにおける主要代謝物について、独立した非臨床安全性試験は必要ではない。ブレンソカチブ原薬／製剤に含まれるすべての不純物又は分解物は、適格性が確認されている及び／又は適切に管理されている。対象患者集団及び年齢範囲を考慮すると、幼若動物を用いた試験は必要ではないと判断された。

要約すると、ブレンソカチブの非臨床毒性の特性は、規制及び適用されるガイドラインに従って適切な試験系と試験デザインを使用して行われた試験で適切に解析された。NCFBE に対する MRHD の安全マージンは、定常状態での総ブレンソカチブの AUC 及び遊離ブレンソカチブの AUC に基づいて算出され、妥当な値が確立された。これらのデータは総合的に、ブレンソカチブが NCFBE 患者の治療薬として適切な安全性プロファイルを有することを示している。

5. 総括及び結論

ブレンソカチブは、好中球の成熟時に NSP 活性を有意に阻害する強力で選択的、競合的及び可逆的な DPP1 阻害剤である。オフターゲット作用や心血管系、呼吸器系又は中枢神経系への影響の懸念はなく、MRHD に対する安全マージンは非常に高い。

ブレンソカチブは、CYP3A4/5、Pgp 及び BCRP の基質である。ラット及びイヌにおける経口投与後のバイオアベイラビリティは高く、曝露量は用量比例的であり、性差及び定常状態での蓄積は軽微であった。ブレンソカチブは体内に広く分布し、メラニン結合能を有する。血液脳関門の通過は無視できる程度であるが、血液胎盤関門の通過は中程度である。*In vitro* では代謝的に安定しており、CYP3A4/5 が主な代謝酵素である。ラットにおけるブレンソカチブの代謝は中程度であり、血漿中、尿中及び糞便中では主に未変化体が認められた。尿中及び胆汁中に中程度の排泄が認められるが、主な排泄は糞便中である。ブレンソカチブは CYP アイソザイムの意味のある阻害作用又は誘導作用を示さず、排出輸送担体及び溶質輸送担体の意味のある阻害作用も示さないため、臨床投与量における DDI の可能性は低い。

ブレンソカチブは、毒性試験で適切な安全性プロファイル及び意味のある安全マージンを示した。ラット及びイヌで毒性の標的臓器を特定した。6 箇月試験では、両動物種の肺と腎臓、イヌのリンパ組織、精巣／精巣上体及び歯周組織において顕微鏡的変化が認められた。イヌの 9 箇月試験で特記すべき所見は認められなかった。ブレンソカチブに関連する所見はすべて用量依存的及び可逆的であり、MRHD 投与時より高い曝露量で認められた。ラットの 6 箇月試験の NOAEL 9 mg/kg/day 及びイヌの 9 箇月試験の NOAEL 8 mg/kg/day において、定常状態における AUC に基づく安全マージンは、ラットにおける総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、非結合（遊離）ブレンソカチブの AUC に基づくと 10 倍、イヌから得た値に基づくとそれぞれ 5 倍と 12 倍であった。

In vitro 及び *in vivo* 試験において、遺伝毒性の徴候は認められなかった。遺伝子導入 rasH2 マウスの 6 箇月試験及びラットの 2 年間の試験で、ブレンソカチブの発がん性は認められなかった。雄雌ラットの受胎能に対する影響は認められなかった。ラットの EFD 試験では、胚・胎児の生存率、胎児体重又は重大な胎児奇形に有害作用は認められなかったが、軽微な母動物毒性に至る投与量で出生時に軽微かつ回復可能な骨格奇形と変異が認められた。ウサギにおける胚・胎児毒性は認められなかった。ラットの PPND 試験で有害な所見は認められなかった。光毒性の可能性は確認されなかった。ブレンソカチブの原薬／製剤におけるすべての不純物は、毒性試験で適格性を確認するか、入手可能なデータに基づいて適切に管理した。

結論として、非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験で得られたデータは、NCFBE の治療薬としてのブレンソカチブを支持するものである。

6. 参考文献

Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CT. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. J Clin Invest. 2002 Feb;109(3):363-71. doi: 10.1172/JCI13462. PMID: 11827996; PMCID: PMC150852.

Basso J, Chen K-J, Zhou Y, Lilly M, LaSala D, Dorfman A, et al.. The pharmacokinetic profile of brensocatib and its effect on pharmacodynamic biomarkers including NE, PR3, and CatG in various rodent species. Front. Pharmacol. 2023 Jul 19;14:1208780. doi:10.3389/fphar.2023.1208780.

Biraggari SK, Reddy KK, Sudhakar J, Bugude SS, Nichenametla R, Hakeem MA, et al. Papillion-Lefevre Syndrome: Periodontists' Perspective. Case Rep Dent. 2015;2015:137381. doi: 10.1155/2015/137381. Epub 2015 Oct 8.

Chalmers JD, Chotirmall SH. Bronchiectasis: new therapies and new perspectives. Lancet Respir Med. 2018 Sep;6(9):715-726. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30053-5.

Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrie E, et al. Neutrophil Elastase Activity Is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2017 May 15;195:1384-93. doi: 10.1164/rccm.201605-1027OC.

Chen KJ, Zhang J, LaSala D, Basso J, Chun D, Zhou Y, et al. Brensocatib, an Oral, Reversible Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase 1, Mitigates Interferon-α- Accelerated Lupus Nephritis in Mice. Front. Immunol. 2023 Jun 27;14:1185727. doi: 10.3389/fimmu.2023.1185727.

Cipolla D, Zhang J, Korkmaz B, Chalmers JD, Basso J, Lasala D, et al. Dipeptidyl peptidase-1 inhibition with brensocatib reduces the activity of all major neutrophil serine proteases in patients with bronchiectasis: results from the WILLOW trial. Respir Res. 2023 May 17;24:133. doi: 10.1186/s12931-023-02444-z.

De Schaepdrijver L, Delille P, Geys H, Boehringer-Shahidi C, Vanhove C. *In vivo* longitudinal micro-CT study of bent long limb bones in rat offspring. Reprod Toxicol. 2014 Jul;46:91-7. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.03.004. Epub 2014 Mar 13.

Doyle K, Lönn H, Käck H, Van de Poël A, Swallow S, Gardiner P, et al. Discovery of Second Generation Reversible Covalent DPP1 Inhibitors Leading to an Oxazepane Amidoacetonitrile Based Clinical Candidate (AZD7986). J Med Chem. 2016 Oct 27;59(20):9457-72. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01127. Epub 2016 Oct 11.

Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. N Engl J Med. 2010 Dec 2;363(23):2233-47. doi: 10.1056/NEJMra0910061.

GRAS Notice 753. GRAS Notification for Sodium Thiocyanate for Use in The Lactoperoxidase System, Taradon Laboratory; December 2017. https://www.fda.gov/media/124437/download. Accessed on: 29 July 2022.

Guarino C, Hamon Y, Croix C, Lamort AS, Dallet-Choisy S, Marchand-Adam S, et al. Prolonged pharmacological inhibition of cathepsin C results in elimination of neutrophil serine proteases. Biochem Pharmacol. 2017 May 1;131:52-67. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.009. Epub 2017 Feb 11.

Hirche TO, Benabid R, Deslee G, Gangloff S, Achilefu S, Guenounou M, et al. Neutrophil elastase mediates innate host protection against Pseudomonas aeruginosa. J Immunol. 2008 Oct 1;181(7):4945-54. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4945.

Hu Y, Pham CT. Dipeptidyl Peptidase I Regulates the Development of Collagen-Induced Arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2005 Aug;52(8): 25538. doi: 10.1002/art.21192.

Kimmel, CA, Garry, MR and DeSesso, JM. Relationship between Bent Long Bones, Bent Scapulae, and Wavy Ribs: Malformations or Variations? Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014 Oct; 101(5): 379-92. doi: 10.1002/bdrb.21122. Epub 2014 Sep 23.

Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. Pharmacol Rev. 2010 Dec;62(4):726-59. doi: 10.1124/pr.110.002733.

Korkmaz B, Caughey GH, Chapple I, Gauthier F, Hirschfeld J, Jenne DE, et al. Therapeutic targeting of cathepsin C: from pathophysiology to treatment. Pharmacol Ther. 2018 Oct;190:202-236. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.011.

McDonald PP, Leifer FG, Basso J, Lasala D, Li D-D, Chen K-J, et al. Brensocatib (an oral, reversible inhibitor of dipeptidyl peptidase-1) attenuates disease progression in two animal models of rheumatoid arthritis. Front. Immunol. 2023 Aug 11;14:1231047. doi: 10.3389/fimmu.2023.1231047.

Palmér R, Mäenpää J, Jauhiainen A, Larsson B, Mo J, Russell M, et al. Dipeptidyl Peptidase 1 Inhibitor AZD7986 Induces a Sustained, Exposure-Dependent Reduction in Neutrophil Elastase Activity in Healthy Subjects. Clin Pharmacol Ther. 2018 Dec;104(6):1155-1164. doi: 10.1002/cpt.1053.

Pham CT, Ley TJ. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Jul 20;96(15):8627-32. doi: 10.1073/pnas.96.15.8627.

Sodium Nitroprusside [prescribing information]. Exela Pharma Sciences, LLC, Lenoir, NC 28645; March 2017. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209387s000lbl.pdf. Accessed on: 22 July 2022.

Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, Østergaard O, Heegaard NH, Glenthøj A, et al. Papillon-Lefèvre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. J Clin Invest. 2014 Oct;124(10):4539-48. doi: 10.1172/JCI76009. Epub 2014 Sep 17.

Taggart CC, Greene CM, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2005 May 15;171(10):1070-6. doi: 10.1164/rccm.200407-881PP. Epub 2005 Feb 1.

Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. Nat Genet. 1999 Dec;23(4):421-4. doi: 10.1038/70525.

Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. Am J Physiol. 1999 May;276(5):L835-43. doi: 10.1152/ajplung.

Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, et al. Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Dec;287(6):L1293-302. doi: 10.1152/ajplung.00140.2004. Epub 2004 Jul 23.

Weldon S, McNally P, McElvaney NG, Elborn JS, McAuley DF, Wartelle J, et al. Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the Pseudomonas-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation. J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):8148-56. doi: 10.4049/jimmunol.0901716.