ブレンソカチブ水和物（INS1007）

第 2 部（モジュール 2）
2.6.1 緒言

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 3
1. 緒言 4
2. 参考文献 7

図目次

図 1: ブレンソカチブの化学構造 4

用語及び略語一覧

用語及び略語	説明
DPP1	dipeptidyl peptidase 1, ジペプチジルペプチダーゼ 1
MRHD	maximum recommended human dose, 最大推奨臨床用量
NE	neutrophil elastase, 好中球エラスターゼ
NSP	neutrophil serine proteases, 好中球セリンプロテアーゼ

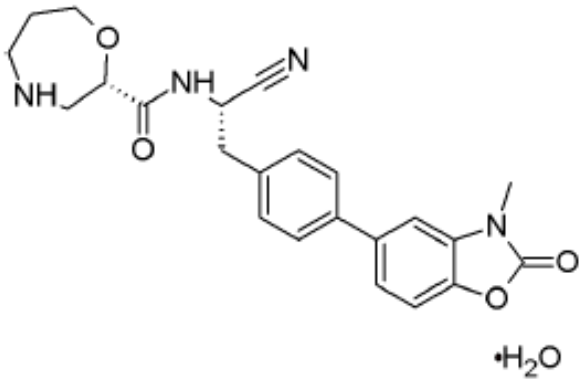
1. 緒言

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である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、長期投与による気管支拡張症の治療を目的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、一水和物として 438.48、遊離塩基として 420.5 である。pH 6.8 及び 37°C の条件下での水性溶媒中のブレンソカチブの溶解度は 0.2 mg/mL であり、pH 3.5 の酸性条件下では 100 mg/mL を超えるまでの溶解度の上昇がみられる。

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



ブレンソカチブは、臨床投与用の経口錠剤として開発されている。各錠剤は、有効成分であるブレンソカチブ原薬及び現行の公定書に収載されている添加剤を含有している。

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。好中球セリンプロテアーゼは、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 NCFBE 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成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分子標的である。

DPP1 阻害の負の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 DPPI 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（$DPP1^{-/-}$）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; Hu and Pham, 2005; 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・ルフェーブル症候群（PLS）（Guarino et al., 2017; Sorensen et al., 2014）を有する患者は、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 代の若年期に歯の脱落を引き起こす歯周炎（Biraggari et al., 2015; Toomes et al., 1999）といった 2 つの典型的な臨床症状を呈する。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。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ブレンソカチブ 10 mg 及び 25 mg の投与は血中好中球の NSP 活性の部分的な減少を引き起こすに過ぎず、PLS 患者で認められた残存量まで低下しなかったことを踏まえると、前述の結論は特に当てはまると言える。

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。Module 2.6.2 及び Module 2.6.3 に示すとおり、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をスクリーニングする副次的薬理試験、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。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、DPP1 阻害の機序が確認された。非臨床薬物動態試験では、Module 2.6.4 及び Module 2.6.5 に示すとおり、ブレンソカチブの吸収、分布、代謝、及び排泄における特性、動物及びヒトの生体試料を用いた *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。毒性試験は、Module 2.6.6 及び Module 2.6.7 に示すとおり、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 *in vitro* 光毒性リスク評価と広範囲にわたっている。

主要な安全性薬理試験及び毒性試験はすべて「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」を遵守し、欧州連合（EMA）、米国（FDA）、日本（MHLW）、及び経済協力開発機構に加盟しているその他各国の規制当局の要件に沿って実施した。

ブレンソカチブは、NCFBE 患者の治療を目的とした経口錠剤として開発中である。NCFBE に対する長期投与での最大推奨臨床用量（MRHD）は 1 日 1 回 25 mg である。MRHD の用量で、母集団薬物動態解析に基づき NCFBE 患者における総ブレンソカチブの最高血漿中濃度及び最終 24 時間投与間区間の濃度時間曲線下面積により表される定常状態の曝露量はそれぞれ 0.62 µM 及び 9.655 µM*h で、それぞれ 259 ng/mL 及び 4060 ng*h/mL に相当する（Report ICPD 00694-1）。定常状態での総ブレンソカチブの曝露量及び非結合ブレンソカチブの曝露量に基づく MRHD に対する安全マージンは必要に応じて提示する。

非臨床薬理、薬物動態、及び毒性データから、NCFBE 患者の治療を目的としたブレンソカチブの安全性プロファイルは望ましいことが示される。

2. 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.

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, 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(10):1384-1393. doi: 10.1164/rccm.201605-1027OC.

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

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 Rheum. 2005 Aug;52(8):2553-8. doi: 10.1002/art.21192.

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 U S A. 1999 Jul 20;96(15):8627-32. doi: 10.1073/pnas.96.15.8627.

Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, Østergaard O, Heegaard NH, Glenthøj A, Nielsen FC, Borregaard N. 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, 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.

ブレンソカチブ水和物（INS1007）

第 2 部（モジュール 2）

2.6.2 薬理試験の概要文

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. まとめ 6
2. 効力を裏付ける試験 11
2.1. *In Vitro* 試験 11
2.1.1. ブレンソカチブの酵素特性 11
2.1.2. 無細胞系（組換え型ヒト DPP1 使用）又は不死化細胞を用いたアッセイにおけるブレンソカチブのヒト DPP 酵素活性を阻害する効力 11
2.1.3. 無細胞系におけるブレンソカチブの組換え型マウス、ラット、イヌ及びヒト DPP1 酵素活性に対する阻害作用 11
2.1.4. NSP 活性に対するブレンソカチブの直接作用 12
2.1.5. ヒト好中球分化時におけるブレンソカチブの NSP 活性に対する阻害作用及び有効性 12
2.1.6. ブレンソカチブの DPP1 阻害によるヒト好中球のエラスチン分解能力への影響 13
2.1.7. ブレンソカチブの DPP1 阻害が分化した好中球における PR3 の表面発現、並びに NE 及び PR3 総活性に及ぼす影響 13
2.2. *In Vivo* 試験 14
2.2.1. 無処置マウスの骨髄白血球においてブレンソカチブの DPP1 阻害が NSP の最大低下までの時間に及ぼす影響 14
2.2.2. *In Vivo* 試験においてブレンソカチブの DPP1 阻害が NSP 低下及び PK パラメータに及ぼす影響 14
2.2.3. ブレンソカチブの DPP1 阻害が無処置 Sprague Dawley ラットの骨髄白血球における NSP 活性に及ぼす影響 20
2.2.4. *In Vivo* 試験におけるブレンソカチブ投与中止後の NSP 活性の回復までの時間 22
2.2.5. ブレンソカチブの DPP1 阻害がマウスの骨髄細胞に由来する白血球の NSP 活性及び LPS 誘発急性肺障害に及ぼす影響 22
2.2.6. ブレンソカチブの DPP1 阻害がラットの骨髄、血液及び BAL 液に由来する白血球の NSP 活性、並びに LPS 誘発肺炎症に及ぼす影響 22
2.2.7. 様々な *In Vivo* 炎症性疾患モデルにおけるブレンソカチブの DPP1 阻害作用 23
3. 副次的薬理試験 24
4. 安全性薬理試験 26
4.1. 中枢神経系 26
4.2. 心血管系 26
4.2.1. hERG イオンチャネルへの影響 26
4.2.2. 麻酔下モルモットの心血管系への影響 27
4.2.3. 覚醒下のイヌにおける心血管系への影響 27

4.3. 呼吸器系 28
5. 薬力学的薬物相互作用試験 29
6. 考察及び結論 30
6.1. 効力を裏付ける試験 30
6.2. 副次的薬理試験 30
6.3. 安全性薬理試験 30
7. 参考文献 31

表目次

表 1: 薬理試験の概要 9
表 2: 単離した酵素及び細胞を用いたアッセイにおけるブレンソカチブの DPP1 阻害作用 11
表 3: 異なる動物種におけるブレンソカチブの DPP1 酵素に対する阻害作用 12
表 4: ヒト初代好中球前駆細胞におけるブレンソカチブの DPP1 活性及び NSP 活性に対する影響（n = 4） 13
表 5: マウスにおけるブレンソカチブの NSP 活性に対する阻害作用及び *In Vivo* PK パラメータ 16
表 6: ラットにおけるブレンソカチブの NSP 活性に対する阻害作用及び *In Vivo* PK パラメータ 18
表 7: *In Vitro* のラジオリガンド結合、酵素、機能及び電気生理学的アッセイにおけるブレンソカチブの影響 24
表 8: *In Vitro* 電気生理学的アッセイにおけるブレンソカチブの影響 25
表 9: 安全性薬理試験の C_{max} 及び最大推奨臨床用量（MRHD）に対するその曝露倍数の要約 26

図目次

図 1: ブレンソカチブ（BID）を 8 日間投与した Sprague Dawley ラットの骨髄細胞ライセートにおける好中球エラスターゼ活性 20
図 2: ブレンソカチブ（BID）を 8 日間投与した Sprague Dawley ラットの骨髄細胞ライセートにおけるプロテイナーゼ 3 活性 21
図 3: ブレンソカチブ（BID）を 8 日間投与した Sprague Dawley ラットの骨髄細胞ライセートにおけるカテプシン G 活性 21

用語及び略語一覧

用語及び略語	説明
ANCA	antineutrophil cytoplasmic antibodies, 抗好中球細胞質自己抗体
AUC	area under the curve, 曲線下面積
BAL	bronchoalveolar lavage, 気管支肺胞洗浄
BID	twice daily, 1 日 2 回
CatG	cathepsin G, カテプシン G
CatK	cathepsin K, カテプシン K
C_{max}	maximum (peak) plasma concentration of the drug, 最高（ピーク）血漿中薬物濃度
DPP1	dipeptidyl peptidase 1, ジペプチジルペプチダーゼ 1
EC_{50}	concentration that is required for 50% effect, E_{max} の 50%をもたらす薬物濃度
E_{max}	Maximum efficacy, 最大効果
GLP	Good Laboratory Practices, 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
HR	heart rate, 心拍数
hERG	human *ether-a-go-go*-related gene, ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子
IC_{50}	concentration that is required for 50% inhibition, 50%阻害濃度
LPS	lipopolysaccharide, リポ多糖
LVEDP	left ventricular end diastolic pressure, 左室拡張終期圧
LVSP	left ventricular systolic pressure, 左室収縮期圧
MBP	mean blood pressure, 平均血圧
mPR3	membrane-bound surface PR3, 膜結合プロテイナーゼ 3
MRHD	maximum recommended human dose, 最大推奨臨床用量
NE	neutrophil elastase, 好中球エラスターゼ
NOEL	no observed effect level, 無作用量
NSP	neutrophil serine proteases, 好中球セリンプロテアーゼ
pIC_{50}	negative logarithm of the IC_{50} value in molar units, 50%阻害濃度の負の対数
PD	pharmacodynamic, 薬力学
PK	pharmacokinetic, 薬物動態
PR3	proteinase 3, プロテイナーゼ 3
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 daily, 1 日 1 回
rhDPP1	recombinant human DPP1 enzyme, 組換え型ヒト DPP1 酵素
SPR	surface plasmon resonance, 表面プラズモン共鳴

用語及び略語	説明
TNF	tumor necrosis factor, 腫瘍壊死因子

1. まとめ

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である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、気管支拡張症の治療を目的として開発中である。

単離した組換え型ヒト DPP1 酵素（rhDPP1）を用いた作用機序試験から、ブレンソカチブは DPP1 の競合的かつ可逆的な阻害剤であることが示される。ブレンソカチブは、マウス、ラット、イヌ及びヒト DPP1 酵素に対して同様の阻害作用をもち、50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 24.1、51.1、38.1 及び 17.1 nM であったが、主な基質である好中球セリンプロテアーゼ（NSP）［好中球エラスターゼ（NE）、プロテイナーゼ 3（PR3）及びカテプシン G（CatG）］の酵素活性に及ぼす直接的な阻害作用は認められなかった。

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時の 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。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、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）、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-薬力学（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］。ヒト初代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。

NPS 活性を減衰させる *in vitro* でのブレンソカチブの薬力学的作用は、無処置のげっ歯類を用いた *in vivo* 試験で確認された。複数のマウス及びラット系統に、好中球成熟期間中の骨髄芽球が

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。

特に、無処置の雄 Sprague-Dawley ラットでは、ブレンソカチブ（0.2、2 及び 20 mg/kg/day の BID 投与）の 8 日間の経口投与により、骨髄細胞ライセート中の NSP 活性が用量依存的に低下した。NE 及び PR3 については中用量群及び高用量群で、CatG については高用量群で NSP 活性に統計学的有意差がみられた。すべての NSP 活性が用量依存的に低下したこの観察結果は、複数のマウス及びラット系統で繰り返し確認された。

ブレンソカチブの非臨床での有効性のエビデンスを直接示すことを可能にする気管支拡張症動物モデルはない。しかし、NCFBE 患者から採取した肺の喀痰検体における NE 活性の上昇は臨床転帰の悪化と相関する（Chalmers et al., 2017）ため、ブレンソカチブの投与に対する NSP バイオマーカーの低下が非臨床での有効性の間接的な尺度になる。げっ歯類を用いた非臨床試験において、ブレンソカチブは用量依存的に NSP 活性を低下させた。これは、1 日 1 回のブレンソカチブの経口投与がヒトでの血液検体及び喀痰検体の両方で NSP バイオマーカーを低下させると考えられる *in vivo* での強力なエビデンスとなった。実際、健康被験者（D6190C00001 試験）、NCFBE 患者（INS1007-201 試験）、及び嚢胞性繊維症患者（INS1007-211 試験）を対象に臨床的に検証されている。さらに、喀痰中 NE 濃度の定量下限未満までの低下は、NCFBE 患者の呼吸器疾患増悪の抑制と関連があった（INS1007-201 試験及び Report ICPD 00566-1）。

ブレンソカチブが他の炎症性疾患、又は炎症と自己免疫要素の両方に関わる疾患にもベネフィットをもたらす可能性があるかどうかを明らかにするために、多くの *in vivo* 疾患モデルを用いてブレンソカチブを評価した。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た（McDonald et al., 2023; Chen et al., 2023）。

リポ多糖（LPS）誘発急性気道炎症ラットモデルでは、LPS を投与したとき、ブレンソカチブは好中球の肺内腔への急性の遊走に影響を及ぼさなかった。気管支肺胞洗浄（BAL）液中の LPS により引き起こされた複数の炎症性サイトカインの中で、腫瘍壊死因子（TNF）のみがブレンソカチブの最高用量により有意に減衰した。そのため、ブレンソカチブを投与したときの NSP の阻害は、このモデルでは炎症パラメータに有害な結果を与えず、疾患スコアも変化しなかった。

オフターゲット作用を評価するために、ブレンソカチブを 10 µM の濃度で *in vitro* ラジオリガンド結合及び酵素活性のアッセイパネル（186 種類の分子標的）で検討した。こうした分子標的に対する結合親和性（1.6 µM 以上）はいずれもブレンソカチブのヒト DPP1 に対する結合親和性（17.1 nM）と比べて 94 分の 1 以下であり、ブレンソカチブの DPP1 への結合の選択性が高いことが示された。25 mg を投与したヒトにおける定常状態での遊離ブレンソカチブに基づき測定した全身曝露量［最高血漿中薬物濃度（C_{max}）］に対する安全マージンは 10 倍を超えた。

心臓に有害な影響を及ぼす可能性を評価するために、*in vitro* 電気生理学的アッセイを用いて、ブレンソカチブを 7 種類の心臓イオンチャネル（hERG は除く）のパネルで検討したところ、7 種類のうち 6 種類のチャネルで電気生理学的活性の影響は示されなかった。ブレンソカチブは 1 種類のチャネル（hCav3.2）のみで活性を示し、IC_{50} は 21.57 µM であった。これは、ブレンソカチブの DPP1 標的に対する結合親和性（17.1 nM）と比較して 1000 倍を超える結合親和性の低下を表す。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。25 mg の QD 投与時のヒトにおける定常状態での遊離曝露量（C_{max}）（C_{max} = 259 ng/mL、Report ICPD 00694-1）に対する安全マージンは、176 倍である。

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。

ビーグル犬にブレンソカチブを 5、50 及び 1000 mg/kg の用量で強制経口投与し、テレメトリー測定した。5 mg/kg では心血管系パラメータに影響はなく、50 mg/kg で QA 間隔がわずかに延長したにすぎなかった。1000 mg/kg では、群平均 HR の増加に伴い、PR 間隔の一過性の短縮及び群平均拡張期及び平均血圧（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 では心拍数で補正した QT 間隔がわずかに延長したが（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、臨床用量を 25 mg とした本試験の結果に基づき、最高血漿中濃度（C_{max}）から得られた安全マージンは 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る。さらに、イヌを用いた反復投与一般毒性試験において、ブレンソカチブを 1 日 1 回（QD）1 箇月及び 6 箇月間、経口投与したときの心電図を測定したところ、臨床的に意味のある曝露量で懸念される心血管系の影響は特定されなかった。

ラットにブレンソカチブを 0.5、10 又は 200 mg/kg の用量で強制経口投与したとき、Irwin スクリーニング変法で評価した自律神経、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。全身プレチスモグラフィーで測定した呼吸にも影響は認められなかった。

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、治療用量である 25 mg 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。

ブレンソカチブの非臨床薬理試験の概要を表 1 に示す。

表 1:　　薬理試験の概要

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
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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Study No. (Report No.)
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; CatK = Cathepsin K; CHO = Chinese hamster ovary; DPP1 = dipeptidyl peptidase 1; GLP = good laboratory practices; hERG = human *ether-a-go-go* related gene; IV = intravenous; LPS = lipopolysaccharide; NE = neutrophil elastase; NSP = neutrophil serine protease; PR3 = proteinase 3.

2. 効力を裏付ける試験

ブレンソカチブは、NSP 活性を低下させる強力で可逆的かつ高度に選択的な DPP1 阻害剤として設計された。以下の試験で、関連するモデル及び動物種におけるブレンソカチブの効力及び有効性が確立された。効力を裏付ける試験は、いずれも非 GLP で実施した。効力を裏付ける試験の概要を Module 2.6.3［2.6.3.2 項］に示す。

2.1. *In Vitro* 試験

2.1.1. ブレンソカチブの酵素特性

ヒト DPP1 に対するブレンソカチブの作用機序について、結合の可逆性及び阻害機序の観点から検討した（試験番号 BS000003-27）。表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いたアッセイで、ブレンソカチブは DPP1 に可逆的に結合し、解離半減期は約 30 秒であった。また、蛍光強度に基づく酵素活性アッセイで、ブレンソカチブは合成 DPP1 基質ペプチドの競合的な阻害剤であった。

2.1.2. 無細胞系（組換え型ヒト DPP1 使用）又は不死化細胞を用いたアッセイにおけるブレンソカチブのヒト DPP 酵素活性を阻害する効力

ヒト DPP1 に対するブレンソカチブの阻害作用は、最初に *in vitro* で組換え型ヒト DPP1 酵素（rhDPP1）及び DPP1 を発現するヒト単球系細胞株 U937 を用いて評価した（試験番号 BS000449-19）。いずれのアッセイでも DPP1 活性は濃度依存的に阻害された。無細胞系 DPP1 酵素アッセイでは、酵素活性が完全に阻害され（平均 E_{max} 101 ± 0.3%、平均値 ± SEM、n = 10）、平均 50%阻害濃度の負の対数（pIC_{50}）は 8.35 であった（表 2）。U937 細胞アッセイでも pIC_{50} は 8.37 で同様の作用が認められたが、部分的にのみ阻害された（平均 E_{max} 66 ± 3.1%、平均値 ± SEM、n = 14）（表 2）。

表 2: 単離した酵素及び細胞を用いたアッセイにおけるブレンソカチブの DPP1 阻害作用

Assay	n	pIC_{50} (mean ± SEM)	IC_{50} (nM)
rhDPP1 (cell-free)	10	8.35 ± 0.08	4.47
U937 cells	14	8.37 ± 0.04	4.26

DPP1 = dipeptidyl peptidase 1; IC_{50} = concentration that is required for 50% inhibition; rhDPP1 = recombinant human dipeptidyl peptidase 1; pIC_{50} = negative logarithm of the IC_{50} value in molar units.

2.1.3. 無細胞系におけるブレンソカチブの組換え型マウス、ラット、イヌ及びヒト DPP1 酵素活性に対する阻害作用

動物種の選択性を評価するため、精製した組換え型ラット、イヌ及びヒト DPP1 酵素に対するブレンソカチブの阻害作用を測定した（試験番号 BS001015-29）。平均 pIC_{50} は 7.67 ～ 8.05 の範囲であり、動物種間で結合親和性が同様であることが示された。ブレンソカチブの確認試験では、組換え型マウス、ラット及びヒト DPP1 酵素に対する平均 pIC_{50} と、細胞ライセートから精

製したヒト及びイヌ DPP1 酵素に対する平均 pIC_{50} を算出した（試験番号 RES-0296）。すべての活性は強力に阻害され、平均 pIC_{50} は 7.29 ～ 7.77 の範囲で同様であった（表 3）。当該試験では、ブレンソカチブの組換え型ヒト DPP1 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）は約 17.1 nM であった。これらのデータは、ブレンソカチブによる動物種間の DPP1 阻害活性がマウス、ラット、イヌ、ウサギ及びヒトで同様であることを示す公表文献と一致している（Doyle et al., 2016）。

表 3:　　異なる動物種におけるブレンソカチブの DPP1 酵素に対する阻害作用

Species	Source of DPP1	n	IC_{50} (nM ± SD)	pIC_{50} (mean)
Mouse	recombinant	6	24.1 ± 1.3	7.62
Rat	recombinant	3	51.1 ± 8.1	7.29
Dog	cell lysate	3	38.1 ± 2.6	7.42
Human	recombinant	3	17.1 ± 1.6	7.77
Human	cell lysate	6	18.3 ± 3.0	7.74

DPP1 = dipeptidyl peptidase 1; IC_{50} = concentration that is required for 50% inhibition; pIC_{50} = negative logarithm of the IC_{50} value in molar units.

2.1.4.　　NSP 活性に対するブレンソカチブの直接作用

適切な合成ペプチドを用い、3 つの主要な NSP 及びその他のリソソーム局在プロテアーゼであるカテプシン K（CatK）の酵素活性に対するブレンソカチブの直接作用を検討した（試験番号 BS000610-06 及び試験番号 RES-0296）。100 µM までの濃度において、ブレンソカチブによる組換え型ヒト NE、PR3 又は CatG 活性の阻害作用は認められなかった。ブレンソカチブはヒト CatK（標準的なスクリーニングパネルには含まれないアイソフォーム）を濃度依存的に阻害したが、IC_{50} は DPP1 に対する IC_{50} 値 17.1 nM の 1000 倍を超える 21.9 µM であった。

2.1.5.　　ヒト好中球分化時におけるブレンソカチブの NSP 活性に対する阻害作用及び有効性

ヒト初代骨髄細胞に由来する $CD34^+$ 前駆細胞を 7 日間 *in vitro* で好中性顆粒球に分化させ、ブレンソカチブの DPP1 活性に対する直接作用と DPP1 阻害による主要な NSP（NE、PR3、CatG）活性への下流作用を評価した（試験番号 BS000831-13）。分化したヒト好中球においてブレンソカチブは DPP1 活性を濃度依存的に阻害し、平均 pIC_{50} は 6.85 であった（表 4）。NE、PR3 及び CatG 活性は完全かつ濃度依存的に低下し、それぞれの平均 pIC_{50} は 7.21、6.68 及び 6.94 であった（表 4）。

表 4: ヒト初代好中球前駆細胞におけるブレンソカチブの DPP1 活性及び NSP 活性に対する影響（n = 4）

Protease	**pIC_{50} (mean ± SEM)**	**IC_{50} (nM)**
DPP1	6.85 ± 0.45	141.3
Neutrophil elastase	7.21 ± 0.14	61.6
Proteinase 3	6.68 ± 0.11	208.9
Cathepsin G	6.94 ± 0.18	114.8

DPP1 = dipeptidyl peptidase 1; IC_{50} = Concentration that is required for 50% inhibition; NSP = neutrophil serine protease; pIC_{50} = negative logarithm of the IC_{50} value in molar units.

2.1.6. ブレンソカチブの DPP1 阻害によるヒト好中球のエラスチン分解能力への影響

ヒト初代骨髄細胞に由来する $CD34^+$前駆細胞を好中球に分化させた後、SPR 法を用いたアッセイで、生じたライセートが固定化したエラスチンを消化する能力を評価した（試験番号 BS000449-18）。ブレンソカチブの存在下で分化した好中球でエラスチン活性は濃度依存的に低下し、pIC_{50} は 5.75 ± 1.11（平均値 ± SD、n = 3、IC_{50} 値 1.77 µM に相当）であった。

2.1.7. ブレンソカチブの DPP1 阻害が分化した好中球における PR3 の表面発現、並びに NE 及び PR3 総活性に及ぼす影響

多発血管炎性肉芽腫症は、好中球における PR3 の表面発現に対する自己抗体応答によって小血管に生じる血管炎である。したがって、DPP1 阻害により、好中球の PR3 活性が低下することに加え、好中球の前駆細胞における PR3 の発現が低下するかを評価する試験を実施した（試験番号 VV-NC-000485）。分化した好中球は、ヒト初代骨髄細胞に由来する $CD34^+$前駆細胞及び臍帯血に由来する $CD34^+$ 前駆細胞から得た。まず、組換え型ヒト幹細胞因子及びヒト IL-3 を加えた培地で細胞を 7 日間培養した後、0.153 nM ～ 10 µM のブレンソカチブを加えた培養液中で更に 7 日間分化させた。表面 PR3 発現量をフローサイトメトリーにより定量した。

ブレンソカチブ非存在下で分化した好中球は、表面 PR3 発現に伴う高い蛍光を示した。未処理の細胞と比較して、分化過程でブレンソカチブに曝露された好中球は、表面 PR3 発現量が低かった。ブレンソカチブは濃度依存的に表面 PR3 レベルを低下させ、骨髄幹細胞由来の好中球では 0.156 µM 以上、臍帯血幹細胞由来の好中球では 2.5 µM 以上の濃度で有意に低下した。検出可能な表面 PR3 を発現する好中球の割合も測定した。ブレンソカチブの非存在下では、臍帯血幹細胞由来の好中球の 71%及び骨髄幹細胞由来の好中球の 63%で細胞表面に検出可能な PR3 が認められた。分化過程で 10 µM のブレンソカチブに曝露すると、検出可能な表面 PR3 を発現する細胞の割合が有意に低下し、臍帯血又は骨髄幹細胞由来の好中球のそれぞれ 47%及び 20%となった。

外因性ペプチド基質及び特異的 NSP 阻害剤を用いて、NE 及び PR3 の総活性を評価した（試験番号 VV-NC-000485）。ブレンソカチブは PR3 及び NE 活性の両方を濃度依存的に低下させ、PR3 及び NE 活性の低下に対する EC50 は 0.28–0.70 µM の範囲であった。ブレンソカチブは、0.039 µM 以上の濃度で臍帯血又は骨髄幹細胞由来の好中球の PR3 活性を有意に低下させ、

0.156 µM 以上の濃度で NE 活性を有意に低下させた。いずれの種類の幹細胞由来の好中球においても、10 µM のブレンソカチブは PR3 活性を約 100%低下させ、NE 活性を 90%超低下させた。

2.2. *In Vivo* 試験

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。ブレンソカチブの経口投与における *in vivo* 薬理は、複数のマウス及びラット系統で評価されている。げっ歯類の血液量は少なく、血液中白血球の NSP 活性が低いため、特にマウスにおける *in vivo* 試験で血液検体から再現性よく NSP 活性を測定することは困難である。したがって、ほとんどのマウス及びラット試験における NSP 活性の測定は、個々のげっ歯類を剖検した後の骨髄細胞ライセートを使用した。典型的な手順として、大腿骨及び脛骨を採取し、骨髄から白血球を回収し、細胞ライセートから NSP を抽出し、キネティック酵素分析法で NSP 活性を定量化する。

2.2.1. 無処置マウスの骨髄白血球においてブレンソカチブの DPP1 阻害が NSP の最大低下までの時間に及ぼす影響

ブレンソカチブを BID（試験番号 RES-0177）又は QD（試験番号 RES-0221）で経口投与した雌 C57BL/6 マウスを 1、4、7、10 又は 14 日後に剖検し、溶媒を投与した対照マウスとの比較において骨髄細胞ライセートの NSP 活性を定量化し、最大薬力学的作用までの時間を評価した。ブレンソカチブ 10 mg/kg/day（BID）投与時の最大低下率は NE で約 80%、PR3 で約 76%、CatG で約 97%であり、モデリングに基づき、達成に要した時間はそれぞれ 6.4 日、8.0 日及び 8.1 日であった。ブレンソカチブ 15 mg/kg/day（QD）投与時の最大低下率は NE で約 44%、PR3 で約 66%、CatG で約 95%であり、達成に要した時間はそれぞれ 6.5 日、9.3 日、4.4 日であった。したがって、好中球の循環血中半減期が 2 ～ 3 時間であることを鑑みると、7 日間は C57BL/6 マウスの骨髄細胞と循環血中の両方で NSP の最大低下を達成する時間としては適切な推定値であり、様々なげっ歯類系統で骨髄の NSP 活性に対するブレンソカチブの影響を評価するために使用された最短期間である。

2.2.2. *In Vivo* 試験においてブレンソカチブの DPP1 阻害が NSP 低下及び PK パラメータに及ぼす影響

ブレンソカチブの PK 及び PD プロファイルを理解するため、最初にマウスで 400 mg/kg までのブレンソカチブ単回投与を評価した（RES-0133 及び RES-0134）。7 日間以上の試験について、溶媒対照と比較したときの骨髄細胞ライセートにおける NSP 活性の低下をまとめた（マウス試験は表 5、ラット試験は表 6）。低用量における NSP 活性の低下は概ね軽微である又は溶媒対照と比較して統計学的に有意ではないため、表には 2 mg/kg/day 以上のブレンソカチブのみを記載した。

ブレンソカチブを 1 日 1 回、7 日間以上経口投与した様々な系統のマウスでは、溶媒を投与したマウスと比較し、CatG が平均して最も大きく低下したが、PR3 及び NE の低下率は中程度であった。一方、ブレンソカチブを 1 日 1 回、7 日間以上経口投与した様々な系統のラットでは、溶媒対照と比較した低下率は PR3 が最も大きく、CatG、NE と続いた。

様々な系統のマウス及びラットにブレンソカチブを 1 日 1 回、7 日間以上経口投与した試験の PK パラメータとして、C_{max} 及び AUC を報告する（マウス試験は表 5、ラット試験は表 6）。げっ歯類の種や系統に関係なく、用量依存的な PK 曝露反応（AUC 及び C_{max}）が認められた（Basso et al., 2023）。

表 5:　　マウスにおけるブレンソカチブの NSP 活性に対する阻害作用及び *In Vivo* PK パラメータ

Mouse Strain/Sex	Dose[a] (mg/kg/day)	Duration (days)	Reduction in NE (%)	Reduction in PR3 (%)	Reduction in CatG (%)	C_{max} (ng/mL and µM)[b]	AUC_{0-24h} (ng*h/mL, and µM*h)[b]	Study No.[e]
Male C57BL/6	20 (QD)	7	44	68	97	3519 (8.37)	14744 (35.1)	RES-0135
Male C57BL/6	60 (QD)	7	22	60	95	14381 (34.2)	73878 (176)	RES-0135
Female BALB/c	60 (QD)	7	5	55	93	20566 (48.9)	148433 (353)	RES-0136
Female BALB/c	100 (QD)	7	32	63	96	33681 (80.1)	273081 (649)	RES-0136
Female BALB/c	200 (QD)	7	44	67	95	65355 (155)	603176 (1434)	RES-0136
Mixed C57BL/6	2 (BID)	7	46	63	87	211 (0.502)[c]	2680 (6.37)[c]	RES-0165
Mixed C57BL/6	20 (BID)	7	46	96	88	3341 (7.95)[c]	36243 (86.2)[c]	RES-0165
Mixed CFTR KO	2 (BID)	7	67	58	70	165 (0.392)[c]	1812 (4.31)[c]	RES-0165
Mixed CFTR KO	20 (BID)	7	86	94	93	1798 (4.28)[c]	13781 (32.8)[c]	RES-0165
Mixed C57BL/6	2 (BID)	7	71	44	71	177 (0.421)[c]	2012 (4.78)[c]	RES-0175
Mixed C57BL/6	20 (BID)	7	85	80	94	1817 (4.32)[c]	15866 (37.7)[c]	RES-0175
Mixed C57BL/6	3 (QD)	7	55	46	64	411 (0.977)[c]	2843 (6.76)[c]	RES-0175
Mixed C57BL/6	30 (QD)	7	71	65	87	8974 (21.3)[c]	52565 (125)[c]	RES-0175
Mixed BALB/c	2 (BID)	7	23	26	36	228 (0.542)[c]	1508 (3.59)[c]	RES-0176
Mixed BALB/c	20 (BID)	7	79	70	92	3558 (8.46)[c]	24105 (57.3)[c]	RES-0176
Mixed BALB/c	3 (QD)	7	16	13	39	369 (0.878)[c]	2964 (7.05)[c]	RES-0176
Mixed BALB/c	30 (QD)	7	46	52	84	8768 (20.9)[c]	56303 (134)[c]	RES-0176
Mixed C57BL/6	2 (BID)	7	46	63	84	211 (0.502)[c]	2680 (6.37)[c]	RES-0196
Mixed C57BL/6	20 (BID)	7	46	96	86	3341 (7.95)[c]	36243 (86.2)[c]	RES-0196
Mixed C57BL/6	2 (QD)	7	27	44	61	291 (0.692)[c]	2028 (4.82)[c]	RES-0196
Mixed C57BL/6	20 (QD)	7	38	73	76	7715 (18.3)[c]	34237 (81.4)[c]	RES-0196

Mouse Strain/Sex	Dose[a] (mg/kg/day)	Duration (days)	Reduction in NE (%)	Reduction in PR3 (%)	Reduction in CatG (%)	C_{max} (ng/mL and µM)[b]	AUC_{0-24h} (ng*h/mL, and µM*h)[b]	Study No.[e]
Male BALB/c	3 (QD)	7	22	22	45	257 (0.611)[c]	1443 (3.43)[c]	RES-0209
Male BALB/c	30 (QD)	7	53	49	88	5736 (13.6)[c]	31268 (74.4)[c]	RES-0209
Male BALB/c	100 (QD)	7	75	76	99	20821 (49.5)[c]	139556 (332)[c]	RES-0209
Female BALB/c	3 (QD)	7	41	38	70	435 (1.03)[c]	3860 (9.18)[c]	RES-0209
Female BALB/c	30 (QD)	7	64	52	93	8406 (20.0)[c]	60752 (144)[c]	RES-0209
Female BALB/c	100 (QD)	7	80	66	99	27311 (64.9)[c]	226775 (539)[c]	RES-0209
Female NZBWF1/J	2 (BID)	7	59	53	79	275 (0.654)[c]	2155 (5.13)[c]	RES-0265
Female NZBWF1/J	20 (BID)	7	74	64	95	1936 (4.60)[c]	19253 (45.8)[c]	RES-0265
Female NZBWF1/J	2 (BID)	14	65	53	81	447 (1.06)[d]	6280 (14.9)[d]	RES-0266
Female NZBWF1/J	20 (BID)	14	89	85	96	11189 (26.6)[d]	104001 (247)[d]	RES-0266
Mixed Db/Db	2 (BID)	8	47	46	72	3161 (7.52)[c]	11959 (28.4)[c]	RES-0270
Mixed Db/Db	20 (BID)	8	61	70	94	2463 (5.86)[c]	17105 (40.7)[c]	RES-0270
Mixed Db/Db	3 (QD)	8	17	5	47	245 (0.583)[c]	2314 (5.50)[c]	RES-0270
Mixed Db/Db	30 (QD)	8	49	50	87	6782 (16.1)[c]	40608 (96.6)[c]	RES-0270

[a] The brensocatib dose was administered either QD or split into two equal doses and given BID.
[b] Values converted from ng/mL to µM using a molecular weight of 420.5 g/mole for brensocatib.
[c] The PK data was taken from the first 24 hours of the study.
[d] The PK data was taken from day 8 of the study.
[e] The composition of the vehicle for all studies was 0.5% hydroxypropyl methylcellulose in sodium citrate buffer with 0.1% Tween 80, pH 3.0 except for RES-0136 and RES-0209 which used tartaric acid titrated to pH 3.0.

AUC_{0-24h} = area under the curve form 1 to 24 h; BID = twice daily; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration of the drug; CatG = cathepsin G; NE = neutrophil elastase; PK = pharmacokinetic; PR3 = proteinase 3; QD = once daily.

表 6:　　ラットにおけるブレンソカチブの NSP 活性に対する阻害作用及び *In Vivo* PK パラメータ

Rat Strain/Sex	**Dose[a] (mg/kg/day)**	**Duration (days)**	**Reduction in NE (%)**	**Reduction in PR3 (%)**	**Reduction in CatG (%)**	**C_{max} (ng/mL, and µM)[b]**	**$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL, and µM*h)[b]**	**Study No.[e]**
Male Sprague-Dawley	2 (BID)	8	73	58	40	ND	ND	BS000040-05
Male Sprague-Dawley	20 (BID)	8	90	72	90	ND	ND	BS000040-05
Mixed Sprague-Dawley	2 (BID)	9	18	31	(2)[c]	319 (0.759)[d]	4728 (11.2)[d]	RES-0205
Mixed Sprague-Dawley	20 (BID)	9	38	68	37	5527 (13.1)[d]	72568 (173)[d]	RES-0205
Mixed Sprague-Dawley	3 (QD)	9	19	59	13	657 (1.56)[d]	11098 (26.4)[d]	RES-0205
Mixed Sprague-Dawley	30 (QD)	9	36	72	43	8382 (19.9)[d]	104278 (248)[d]	RES-0205
Mixed Wistar	2 (BID)	7	6	(22)[c]	16	751 (1.79)[d]	9817 (23.3)[d]	RES-0208
Mixed Wistar	20 (BID)	7	19	46	32	13881 (33.0)[d]	173277 (412)[d]	RES-0208
Mixed Wistar	3 (QD)	7	(17)[c]	35	35	1027 (2.44)[d]	11720 (27.9)[d]	RES-0208
Mixed Wistar	30 (QD)	7	19	59	41	23590 (56.1)[d]	266484 (634)[d]	RES-0208
Male Sprague-Dawley	25 (BID)	8	16	51	56	12058 (28.7)[d]	140781 (335)[d]	RES-0230
Male Sprague-Dawley	50 (BID)	8	16	71	58	32401 (77.1)[d]	344543 (819)[d]	RES-0230
Male Sprague-Dawley	25 (BID)	8	26	47	54	11515 (27.4)[d]	128597 (306)[d]	RES-0231
Male Sprague-Dawley	50 (BID)	8	45	43	68	38831 (92.3)[d]	400226 (952)[d]	RES-0231

[a] The brensocatib dose was administered either QD or split into two equal doses and given BID.
[b] Values converted from ng/mL to µM using a molecular weight of 420.5 g/mole for brensocatib.

[c] The parentheses indicate that an increase in NSP activities was observed relative to the mean value for the vehicle control.
[d] The PK data was taken from the first 24 hours of the study.
[e] The composition of the vehicle for all studies was 0.5% hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in sodium citrate buffer with 0.1% Tween 80, pH 3.0 except for RES-0231 which used tartaric acid titrated to pH 3.0.

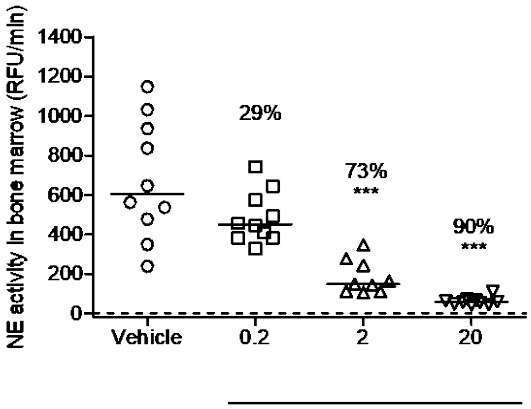
$AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the curve form 1 to 24 h; BID = twice daily; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration of the drug; CatG = cathepsin G; ND = not determined; NE = neutrophil elastase; NSP = neutrophil serine protease; PK = pharmacokinetic; PR3 = proteinase 3; QD = once daily.

2.2.3. ブレンソカチブの DPP1 阻害が無処置 Sprague Dawley ラットの骨髄白血球における NSP 活性に及ぼす影響

ブレンソカチブの初期 *in vivo* 試験の 1 つは、無処置の雄 Sprague-Dawley ラットに溶媒又はブレンソカチブ（0.2、2 及び 20 mg/kg/day）を 8 日間経口投与（BID）して評価した。げっ歯類におけるブレンソカチブの半減期はヒトより短いため、最適な PD 作用を得る投与として BID を選択した。その後、大腿骨の骨髄穿刺液及び血液を処理し、全白血球を単離した。好中球セリンプロテアーゼは、主に好中球で認められた（Campbell et al., 1989）。その後、細胞を溶解し、溶媒又は LPS 対照の中央値と比較した阻害率で NSP 活性を評価した（試験番号 BS000040-05）。

ブレンソカチブは骨髄細胞ライセートにおける NE 活性を有意に低下させ、2 mg/kg/day 群では 73%、20 mg/kg/day 群では 90%の低下率であった（図 1）。

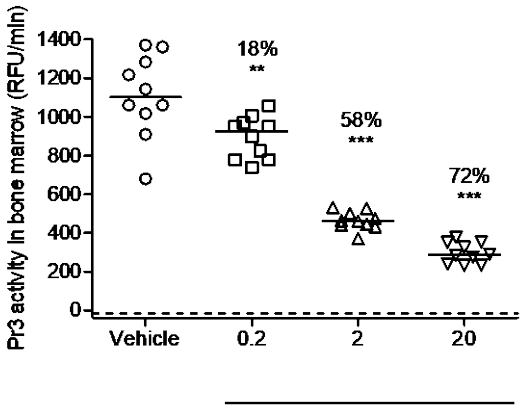
図 1: ブレンソカチブ（BID）を 8 日間投与した Sprague Dawley ラットの骨髄細胞ライセートにおける好中球エラスターゼ活性



Data points are shown with medians and statistical significance represented as ***p <0.001 compared with the vehicle group, n = 9 to 10 per group.
BID = twice daily.

図 2 のとおり、3 群すべてにおいて PR3 の活性が有意に低下した。低用量群では 18%、中用量群では 58%、高用量群では 72%の阻害率であった。

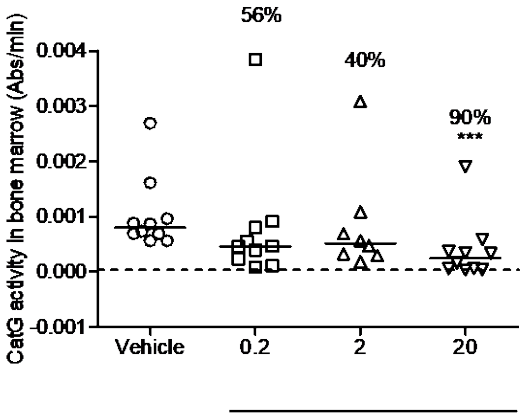
図 2:　ブレンソカチブ（BID）を 8 日間投与した Sprague Dawley ラットの骨髄細胞ライセートにおけるプロテイナーゼ 3 活性



Data points are shown with medians and statistical significance represented as **p <0.01, ***p <0.001 compared with the vehicle group, n = 10 per group.
BID = twice daily.

高用量群では CatG 活性が 90%の低下を有意に示したが、絶対値としての作用は弱かった（図 3）。

図 3:　ブレンソカチブ（BID）を 8 日間投与した Sprague Dawley ラットの骨髄細胞ライセートにおけるカテプシン G 活性



Data points are shown with medians and statistical significance represented as ***p <0.001 compared with the vehicle group, n =8 to 10 per group.
BID = twice daily.

キネティック酵素アッセイは、Sprague-Dawley ラットでブレンソカチブ投与の NSP 活性に対する作用を評価した初期 *in vivo* 試験の実施後に改良及び最適化された。NE、PR3 及び CatG の 3 つの PD マーカーに対するブレンソカチブの作用について説明した試験方法及び詳細なデータセットを表 1 に要約した個々の報告書に記載しているが、マウス試験及びラット試験における NSP の平均低下率はそれぞれ表 5 及び表 6 に示した。

2.2.4. *In Vivo* 試験におけるブレンソカチブ投与中止後の NSP 活性の回復までの時間

ブレンソカチブ投与中止後の NSP に対する薬理作用時間を理解するため、2 つの *in vivo* 試験を実施した（試験番号 RES-0207 及び試験番号 RES-0220）。雌 C57BL/6 マウスに 10 mg/kg/day のブレンソカチブを BID で 8 日間経口投与して NSP の最大阻害を達成させた後、予備試験では最終投与 1、10 及び 20 日後に、本試験では最終投与 1、3、6、8 及び 10 日後に骨髄細胞ライセートにおける NSP 活性を定量化した。本試験で最終投与 1 日後に剖検したブレンソカチブ群のマウスでは、溶媒対照群と比較して NE 活性が 52%、PR3 活性が 58%、CatG 活性が 93%低下した。好中球セリンプロテアーゼ活性は 10 日間で溶媒対照と比較して完全に回復し、モデリングによる回復までの時間は NE で 6.6 日、PR3 で 7.5 日、CatG で 5.8 日であった。したがって、骨髄における NSP 活性の完全回復までの時間は NSP 活性の最大阻害を達成するまでの時間と同様であり、骨髄内で好中球の成熟時に DPP1 に作用する DPP1 阻害剤の作用機序及び全身循環する好中球の寿命が短いことと一致している。

2.2.5. ブレンソカチブの DPP1 阻害がマウスの骨髄細胞に由来する白血球の NSP 活性及び LPS 誘発急性肺障害に及ぼす影響

LPS 10 µg を含有した 25 µL を経鼻投与して誘発させた急性肺障害 BALB/c マウスモデルを LPS 投与から 48 時間又は 120 時間モニタリングし、ブレンソカチブの有効性を評価した（試験番号 RES-0143）。モデルにおける NSP 阻害の役割を評価するため、LPS 投与の 7 日前から 3 mg/kg/day 又は 30 mg/kg/day のブレンソカチブを 1 日 1 回経口投与した。ブレンソカチブは骨髄の NSP 活性を低下させたが、体重減少、肺重量増加、肺 BAL 液中のタンパク質又は肺細胞数は改善しなかった。また、溶媒対照と比較して、肺機能、サイトカイン値又は病理組織学的所見に有意な改善は認められなかった。したがって、NSP はマウスの LPS 経鼻投与による急性肺障害の発現に関連していないと考えられる。一方、デキサメタゾン 3 mg/kg QD を腹腔内投与した陽性対照群では、溶媒対照と比較して、肺重量減少（Day 5）、肺における総細胞数及び好中球数の減少が認められた。

LPS 誘発急性肺障害モデルはヒトにおける急性呼吸窮迫症候群の治療薬を評価する際に用いられる多くのモデルの 1 つであるが、NCFBE に認められる慢性肺疾患の原因又は生態を反映するものではない。

2.2.6. ブレンソカチブの DPP1 阻害がラットの骨髄、血液及び BAL 液に由来する白血球の NSP 活性、並びに LPS 誘発肺炎症に及ぼす影響

剖検 24 時間前に LPS 100 µg を含有した 250 µL を気管内投与して誘発させた肺好中球増加のラットモデルを用い、ブレンソカチブの有効性を評価した（試験番号 BS000040-06-07）。NSP 酵素活性、サイトカイン及びヒドロキシプロリン量を検討するために BAL 液を採取したことを除き、2.2.3 項に記載した無処置ラット試験と同様の方法｛溶媒又はブレンソカチブ［0.2、2 及び 20 mg/kg/day を 8 日間経口投与（BID）］｝で試験を実施した。

LPS 投与 24 時間後、BAL 液で好中球数が有意に増加した（$p < 0.0001$）。この急性の好中球遊走に対するブレンソカチブの影響は認められなかった。

無処置ラットを用いた試験と同様に、最高用量のブレンソカチブは骨髄細胞ライセートにおける NSP 活性を有意に低下させた。血液中白血球では、最高用量群で 3 つの NSP すべての活性が有意に低下し（平均低下率は NE で 89%、PR3 で 36%、CatG で 77%）、2 mg/kg/day 群で NE が有意に低下した（平均低下率 56%）。BAL 検体では、20 mg/kg/day の最高用量群で NE 及び PR3 活性の平均値が有意に低下した（それぞれ 67%及び 65%）。

LPS 投与では、LPS を投与しなかった対照群と比較して、炎症性メディエーターのパネルが増加した。ブレンソカチブ投与により、LPS を投与した対照群と比較して TNFα が用量依存的に減少したが（20 mg/kg/day 群、平均減少率 43%、$p < 0.01$）、その他の炎症性メディエーターに対する影響は認められなかった。

2.2.7. 様々な *In Vivo* 炎症性疾患モデルにおけるブレンソカチブの DPP1 阻害作用

ブレンソカチブは、その他の炎症性疾患や、炎症性要素と自己免疫要素の両方に関与する疾患について多くの *in vivo* 疾患モデルで評価されているが、NCFBE の適応とは直接関連しないモデルである。これらの疾患モデルを用いた評価において、NSP 活性は野生型と同様に低下し、臨床スコア、サイトカインマーカー及び／又は病理組織学的所見のいずれかで用量依存的な薬理学的改善が認められた。用いたモデルは、2 つの関節リウマチモデル（McDonald et al., 2023）及びループス腎炎モデル（Chen et al., 2023）などであった。

3. 副次的薬理試験

副次的薬理試験の概要を Module 2.6.3（2.6.3.3 項）に示す。

186 種類の分子標的（受容体、イオンチャネル、輸送担体及び酵素）を対象とした多様な *in vitro* ラジオリガンド結合、酵素、機能及び電気生理学アッセイでブレンソカチブをスクリーニングした（試験番号 3118SV）。アッセイは、濃度-反応モード又は 10 µM の 1 種類の初期濃度を使用して実施し、25%超の活性が検出された場合に濃度-反応曲線を作成した。35 種類の分子標的で活性（IC_{50} 又は EC_{50}）が検出された（表 7）。ただし、そのすべての分子標的における値（≥1.6 µM）は、ブレンソカチブのヒト DPP1 に対する値（17.1 nM）の 94 倍以上高い。前述のとおり、ブレンソカチブのヒト CatK（標準的なスクリーニングパネルには含まれないアイソフォーム）に対する IC_{50} は DPP1 に対する IC_{50} 値 17.1 nM の 1000 倍を超える 21.9 µM 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を示している。

In vitro での電気生理学的アッセイで、8 種類の組換え型ヒト電位依存性心臓イオンチャネルに対するブレンソカチブの影響を検討した（試験番号 3188KV）。電気生理学的アッセイは、すべて濃度-反応モードで 33 µM 又は 100 µM の最高検討濃度まで実施した。1 つのチャネル hCav3.2 のみで有意な活性が認められ、IC_{50} 値はブレンソカチブのヒト DPP1 に対する IC_{50}（17.1 nM）の 1000 倍を超える 21.57 µM であった（表 8）。

表 7: ***In Vitro* のラジオリガンド結合、酵素、機能及び電気生理学的アッセイにおけるブレンソカチブの影響**

Target[a]	**Binding K_i or Enzyme IC_{50} (µM)**	**Functional IC_{50} or EC_{50} (µM)**	**Pharmacological Mode of Action**
5-HT2A receptor	1.6	51	Antagonist
Muscarinic M1 receptor	2.4	8.0	Antagonist
Adenosine Transporter (guinea pig)	3.9	NT	ND
5-HT2B receptor	5.1	25	Antagonist
Muscarinic M2 receptor	5.4	Inactive[b]	ND
Dopamine D3 receptor	5.5	Inactive	ND
Ghrelin receptor	5.6	0.881	Partial agonist
Adrenergic α2B receptor	6.5	210	Antagonist
Muscarinic M5 receptor	8.1	NT	ND
5-HT1B receptor	8.9	Inactive	ND
5-HT2C receptor	9.0	>100[c]	Antagonist
Adenosine A1 receptor	Inactive	10	Agonist
κ opioid receptor	10	Inactive	ND
Dopamine transporter	15	NT	ND
Adrenergic α1B receptor	15	Inactive	ND
µ opioid receptor	18	>100	Agonist

Target[a]	**Binding K_i or Enzyme IC_{50} (µM)**	**Functional IC_{50} or EC_{50} (µM)**	**Pharmacological Mode of Action**
Neurokinin NK1 receptor	18	>30	Agonist
5-HT4 receptor	20	Inactive	ND
Muscarinic M3 receptor	23[d]	60	Antagonist
Adrenergic α2A receptor	28	>30	Antagonist
Cl^- Channel (GABA-gated) (rat)	29	NT	ND
σ1 receptor	30	NT	ND
Adrenergic α2C receptor	32	Inactive	ND
Adrenergic α1A receptor	44	>100	Agonist
Histamine H1 receptor	62	25	Antagonist
Thromboxane TXA2 synthetase	65	NT	Inhibitor
Phosphodiesterase PDE10A2	66	NT	Inhibitor
TRKA kinase	72	NT	Inhibitor
Insulin receptor kinase	88	NT	Inhibitor
Phosphodiesterase PDE6	89	NT	Inhibitor
Acetylcholinesterase	110	NT	Inhibitor
Progesterone receptor	120	NT	ND
Angiotensin II receptor	>100	29	Antagonist
Bradykinin 2 receptor	Inactive	30	Antagonist
Endothelin A receptor	Inactive	91	Antagonist

[a] All human except where noted otherwise.
[b] No activity above assay baseline up to the maximum test concentration tested.
[c] Activity detected above assay baseline, but no defined curve fit.
[d] Geometric mean of 2 individual results.
EC_{50} = concentration that is required for 50% effect; IC_{50} = concentration that is required for 50% inhibition; ND = not determined; NT = not tested (no assay available).

表 8: *In Vitro* 電気生理学的アッセイにおけるブレンソカチブの影響

Channel	**IC_{50} (µM)**	**Maximum Test Concentration (µM)**	**Number of Replicates**
hKv11.1 (hERG)	>33[a]	33	1
hCav1.2/β2/α2δ (hICaL)	>33[a]	33	1
hNav1.5 (hINa)	>33[a]	33	1
hKv4.3/hKChIP2.2 (hIto)	>33	33	1
hKv7.1/hKCNE1 (hIKs)	>33[a]	33	1
hKv1.5	>100	100	1
hCav3.2	21.57	100	1
hHCN4	>100	100	1

[a] Activity detected above baseline assay signal but no IC_{50} could be calculated.
IC_{50} = Concentration that is required for 50% inhibition.

4. 安全性薬理試験

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に従ってブレンソカチブの安全性薬理試験を実施した。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）に準じて試験を実施した。安全性薬理試験の概要を Module 2.6.3（2.6.3.4 項）に示す。

4.1. 中枢神経系

0（溶媒として精製水）、0.5、10 又は 200 mg/kg のブレンソカチブを単回経口投与した覚醒下の雄ラットを用い、Irwin スクリーニング変法で 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対する影響と、瞳孔サイズ及び体温に対する影響を評価した（試験番号 612483、GLP）。

200 mg/kg 投与後のわずかな体重減少（投与前と比較して 2%）を除き、0.5、10 又は 200 mg/kg 投与後にブレンソカチブ投与に起因する可能性がある影響は認められなかった。NOEL は 200 mg/kg と判断した。

4.2. 心血管系

4.2.1. hERG イオンチャネルへの影響

hERG をコードしたカリウムチャネルに対するブレンソカチブの影響を 0.824 ～ 91.9 µM の測定濃度範囲で評価した（試験番号 795027、GLP）。ブレンソカチブは hERG チャネルを 13.9 µM の IC_{50} で遮断した（95% CI = 11.6 ～ 16.7 µM）。25 mg QD 投与時の定常状態でのヒトの遊離 C_{max}（総 C_{max} = 259 ng/mL、Report ICPD 00694-1）に対する安全マージンは 176 倍であった（表 9）。

表 9: 安全性薬理試験の C_{max} 及び最大推奨臨床用量（MRHD）に対するその曝露倍数の要約

Species and Study	NOEL or Doses with Noteworthy Toxicity Findings	Dose (mg/kg)	C_{max} (µM)		C_{max} Multiple	
			Total	Free[a]	Total	Free
Human (Report ICPD 00694-1)	25 mg/day (MRHD)	0.42	0.616[b]	0.079	-	-
In vitro hERG (Study No. 795027)	IC_{50} = 13.9 µM	NA	NA	13.9[c]	NA	176
Dog: Cardiovascular Effects (Study No. VKS0880)	NOEL	50	11.4	3.39	19	43
Dog: 1-mo study (Study No. 527414)	No cardiovascular effects noted	15	9.49	2.82	15	36
	Increased heart rate with subsequent decreases in PR and QT intervals	75	24.5	7.28	40	92
Dog: 6-mo Study (Study No. 528329)	No effects on electrocardiology parameters	50	21.6[d]	6.42	35	81

Species and Study	NOEL or Doses with Noteworthy Toxicity Findings	Dose (mg/kg)	C_{max} (µM)		C_{max} Multiple	
			Total	Free[a]	Total	Free
Rat (male): Respiratory effects (Study No. 612499)	NOEL	200	93.4[e]	5.66	152	72

[a] Free PK exposure data based on percentages of unbound brensocatib in mouse (16.50%), rat (6.06%), rabbit (22.70%); dog (29.7%), and human (12.8%) (Study ADME-AZS-Wave4-130621).
[b] Steady state C_{max} of 0.616 µM for total brensocatib at 25 mg QD in humans (MRHD) was derived by dividing the original value of 259 ng/mL in Report ICPD 00694-1 by 420.5, the molecular weight of brensocatib.
[c] IC_{50} value.
[d] Mean value obtained from 2-hour post-dose samples collected on Day 28 (Study No. 528329).
[e] Mean value obtained from the 6.5-hour post-dose samples collected on Day 1 (Study No. 612499).
C_{max} = maximum (peak) plasma concentration of the drug; hERG = human *ether-a-go-go* related gene; IC_{50} = concentration that is required for 50% inhibition; NA = Not applicable; NOEL = No observed effect level; PK = pharmacokinetic; QD = once daily.

4.2.2. 麻酔下モルモットの心血管系への影響

0（溶媒：クエン酸で pH 4 に調整した 5%マンニトール溶液）、0.5 mg/kg 及び 9.6 mg/kg のブレンソカチブを 2 回連続で 15 分間静脈内投与した麻酔下のモルモットを用い、動脈圧、心拍数、左室圧（LVP）及び心電図（PR、QRS、QT 及び QTcB 間隔）への影響を検討した（試験番号 0339SG、非 GLP）。

麻酔下のモルモットモデルでモニタリングした心血管系パラメータにブレンソカチブの影響は認められなかった。NOEL は 9.6 mg/kg と判断した。

4.2.3. 覚醒下のイヌにおける心血管系への影響

ラテン方格法の投与デザインを用い、テレメトリーを装着した覚醒下のイヌに 0（溶媒：237.8 mM 酒石酸、pH 3.04）、5、50 及び 1000 mg/kg のブレンソカチブを単回経口（強制経口）投与し、投与前から投与 24 時間後までの動脈圧（収縮期、拡張期、平均値）、心拍数、Q 波から大動脈圧脈波開始までの時間（QA 間隔、心収縮力の指標）、LVP パラメータ［左室収縮期圧（LVSP）、左室拡張末期圧（LVEDP）］及び導出パラメータ（dP/dt_{max} 及び dP/dt_{min}）、体温、心電図（PR、QT 及び QTcR 間隔、QRS 時間）、形態及び起立性低血圧（傾きモデルを使用）に対する影響を評価した（試験番号 VKS0880、GLP）。

50 mg/kg 及び 1000 mg/kg の経口投与後、気泡又は黄色の気泡を含む嘔吐、粘液便、軟便及び／又は液状便、鮮黄色又は異常色の排尿などの一般状態が認められた。

5 mg/kg のブレンソカチブ経口投与による心血管系パラメータへの影響は認められなかった。50 mg/kg 投与では、QA 間隔のわずかな延長が投与 2 時間後まで認められた［最大延長は投与 0.5 時間後の 9 ms（+7.5%）］。1000 mg/kg 投与では、投与 0.5 時間後に平均心拍数が 28 bpm 増加し（+36%）、投与 12 時間後までに徐々に溶媒の範囲に戻った。一過性の PR 短縮、群平均拡張期血圧の 20 mmHg 上昇（+26%）及び群 MBP の 17 mmHg 上昇（+17%）も投与 0.5 時間後に認められた。dP/dt_{max} の統計学的に有意ではない減少傾向及び LVEDP のわずかな低下が投与 6 時間後まで認められた。QA 間隔の 16 ms 延長（+13%）も投与 8 時間後まで認められた。1000 mg/kg 投与では、わずかではあるが統計学的に有意な QTcR 延長（最大+6%）が投与 1 時間後まで認められ

た。5、50 又は 1000 mg/kg の投与後、すべてのイヌでブレンソカチブの全身曝露が示された。すべての用量において 3 時間後と 5 時間後の血漿中ブレンソカチブ濃度は同程度であり、5、50 及び 1000 mg/kg 投与時の最高平均値 ± 標準偏差はそれぞれ 2060 ± 1730 nmol/L（5 時間後）、11,400 ± 3340 nmol/L（3 時間後）及び 17,900 ± 9700 nmol/L（5 時間後）であった。NOEL は 50 mg/kg と判断した。NOEL において、25 mg の QD 投与時の定常状態でのヒトの総 C_{max} 及び遊離 C_{max} に対する安全マージンは、それぞれ 19 倍及び 43 倍であった（表 9）。

また、反復投与毒性試験でイヌにブレンソカチブを 1 箇月間及び 6 箇月間 QD 経口投与し、心電図を評価した。

1 箇月間の反復投与毒性試験（試験番号 527414、GLP）では、イヌに 0、3、15 又は 75 mg/kg/day の用量でブレンソカチブを投与した。75 mg/kg/day 投与では Week 1 及び Week 4 に心拍数が増加し、その後 PR 間隔及び QT 間隔が短縮した。しかし、QT 間隔を心拍数で補正した場合、短縮は明らかではなかった。心血管系への影響が認められなかった 15 mg/kg/day 投与では、25 mg の QD 投与時の定常状態でのヒトの総 C_{max} 及び遊離 C_{max} に対する安全マージンは、それぞれ 15 倍及び 36 倍であった（表 9）。

6 箇月間の反復投与毒性試験（試験番号 528329、GLP）では、イヌに 0、2、8 又は 50 mg/kg/day の用量でブレンソカチブを投与した。有害な歯科所見が認められたため、高用量の 50 mg/kg/day 投与は Week 18 で中止した。心血管系の評価は、投与前、Week 1、Week 19（4 群のみ）、Week 26（1 群から 3 群まで）及び回復期終了時（1 群から 4 群まで）に実施した。本試験では、心電図パラメータにブレンソカチブに関連する影響は認められなかった。50 mg/kg/day 投与では、Day 28 の投与 2 時間後の血漿中濃度に基づき、25 mg の QD 投与時の定常状態でのヒトの総 C_{max} 及び遊離 C_{max} に対する安全マージンは、それぞれ 35 倍及び 81 倍であった（表 9）。

総じて、*in vitro* での hERG アッセイ及び *in vivo* 試験に基づき、臨床的に意味のある曝露量においてブレンソカチブに懸念すべき心血管系の安全性所見は認められなかった。

4.3. 呼吸器系

雄ラットに 0（溶媒：精製水）、0.5、10 又は 200 mg/kg のブレンソカチブを単回経口投与し、全身プレチスモグラフィーで 6 時間後までの呼吸数、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対するブレンソカチブの影響を評価した（試験番号 612499、GLP）。

呼吸器系パラメータに、ブレンソカチブ投与に起因する可能性がある統計学的に有意な差は認められなかった。NOEL は 200 mg/kg と判断した。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は、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。しかし、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と考えられる。

6. 考察及び結論

6.1. 効力を裏付ける試験

ブレンソカチブは、強力な選択的、競合的かつ可逆的な DPP1 阻害剤であり、マウス、ラット、イヌ及びヒト酵素に対して同様の効力を有する。成熟するヒト初代好中球における DPP1 阻害によって主要な NSP（NE、PR3 及び CatG）活性を低下させ、好中球のエラスチン分解能を低下させる。ブレンソカチブを 8 日間投与した無処置のげっ歯類で NSP 活性が用量依存的に低下した。NSP 活性の完全な回復までの時間（6 ～ 8 日）は NSP 活性の最大阻害を達成するまでの時間と同様であり、骨髄内で好中球の成熟時に DPP1 に作用する DPP1 阻害剤の作用機序及び好中球の体循環時間が短いことと一致している。ラットの急性炎症 LPS 投与試験でも同様の用量依存的な作用が認められた。LPS により肺の内腔に動員された好中球数の増加に対するブレンソカチブの影響は認められなかった。

結論として、ブレンソカチブの薬理データは、予定している NCFBE の臨床適応を支持している。

6.2. 副次的薬理試験

副次的薬理試験データは、ブレンソカチブで達成されると考えられる全身曝露量においてオフターゲットの有害作用が生じる可能性がほとんどないことを示している。これは、予定している 25 mg の治療用量で推定されるヒトの遊離全身曝露 C_{max} が 0.079 μM であることに基づく。

6.3. 安全性薬理試験

ブレンソカチブの安全性薬理試験では、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、ヒトの治療用量 25 mg 投与に相当する全身曝露量において非常に高い安全マージンを持つことが示された。

7. 参考文献

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.

Campbell EJ, Silverman EK, Campbell MA. Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. J Immunol. 1989 Nov 1;143(9):2961-8.

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(10):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.

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.

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, Chen KJ, 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.

ブレンソカチブ水和物（INS1007）

第 2 部（モジュール 2）
2.6.3 薬理試験概要表

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

2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 14
2.6.3.4 安全性薬理試験 15
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 17

表目次

表 1: 薬理試験概要 3
表 2: 効力を裏付ける試験の概要 7
表 3: 副次的薬理試験の概要 14
表 4: 安全性薬理試験の概要 15

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

表 1: 薬理試験概要

Test Article: Brensocatib (INS1007)					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Study (Duration)**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
Primary Pharmacodynamics	Biochemical Assay	*In vitro*	Mode of action	[redacted] (Sweden)	BS000003-27
	Biochemical Assay	*In vitro*	Mode of action	[redacted] (Sweden)	BS000449-19
	Biochemical Assay	*In vitro*	Mode of action	[redacted] (Sweden)	BS001015-29
	Biochemical Assay	*In vitro*	Mode of action	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0296
	Biochemical Assay	*In vitro*	Mode of action	[redacted] (NJ, USA)	BS000610-06
	Cellular Assay	*In vitro*	Mode of action	[redacted](Netherlands), [redacted](UK)	BS000831-13
	Cellular Assay	*In vitro*	Mode of action	[redacted](Sweden), [redacted](Netherlands)	BS000449-18
	Cellular Assay	*In vitro*	Mode of action	Insmed R&D (NJ, USA)	VV-NC-000485
	Mouse, C57BL/6 (female)	*In vivo*, Oral	PD onset (14d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0177
	Mouse, C57BL/6 (female)	*In vivo*, Oral	PD onset (14d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0221
	Mouse, C57BL/6 (male)	*In vivo*, Oral	PD and PK (24h)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0133
	Mouse, BALB/c (female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (24h)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0134

Test Article: Brensocatib (INS1007)					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Study (Duration)**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
	Mouse, C57BL/6 (male)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0135
	Mouse, BALB/c (female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0136
	Mouse, C57BL/6 (male and female) Mouse, CFTR KO (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0165
	Mouse, C57BL/6 (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0175
	Mouse, BALB/c (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0176
	Mouse, C57BL/6 (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0196
	Mouse, BALB/c (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0209
	Mouse, NZBWF1/J (female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0265
	Mouse, NZBWF1/J (female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (14d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0266
	Mouse, Db/Db and C57BLKS/J (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (8d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0270
	Rat, Sprague-Dawley (male)	*In vivo*, Oral	PD (8d)	[redacted] (Sweden), [redacted] (UK), [redacted] (UK)	BS000040-05

Test Article: Brensocatib (INS1007)					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Study (Duration)**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
	Rat, Sprague Dawley (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (9d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0205
	Rat, Wistar (male and female)	*In vivo*, Oral	PD and PK (7d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0208
	Rat, Sprague Dawley (male)	*In vivo*, Oral	PD and PK (8d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0230
	Rat, Sprague Dawley (male)	*In vivo*, Oral	PD and PK (8d)	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0231
	Mouse, C57BL/6 (female)	*In vivo*, Oral	PD recovery (28d) and PK	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0207
	Mouse, C57BL/6 (female)	*In vivo*, Oral	PD recovery (18d) and PK	Insmed R&D (NJ, USA)	RES-0220
	Mouse, BALB/c (male)	*In vivo*, Oral	PD (13d)	Insmed R&D (NJ, USA) & [redacted] (MA, USA)	RES-0143
	Rat, Sprague-Dawley (male)	*In vivo*, Oral	PD (8d)	[redacted] (Sweden), [redacted] (UK)	BS000040-06-07
Secondary Pharmacodynamics	*In vitro* binding, enzyme, and functional assays	*In vitro*	Selectivity screen	[redacted] (France)	3118SV
	CHO or HEK cells expressing recombinant human cardiac ion channels	*In vitro*	Selectivity screen	[redacted] (UK)	3188KV
Safety Pharmacology	Rat, Han Wistar (male)	*In vivo*, Oral	Central nervous system Irwin screen	[redacted] (UK)	612483[a]
	HERG expressing CHO cells	*In vitro*	Cardiovascular hERG assay	[redacted] (UK)	795027[a]

Test Article: Brensocatib (INS1007)					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Study (Duration)**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
	Guinea Pig, Dunkin Hartley (male)	*In vivo*, IV infusion	Cardiovascular ventricular repolarization, intracardiac conduction	[redacted] (UK)	0339SG
	Dog, Beagle (male)	*In vivo*, Oral	Cardiovascular telemetry	[redacted] (UK)	VKS0880[a]
	Rat, Han Wistar (male)	*In vivo*, Oral	Respiratory whole-body plethysmography	[redacted] (UK)	612499[a]

[a] GLP compliant.
CHO = Chinese Hamster Ovary; GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2: 効力を裏付ける試験の概要

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Noteworthy Findings**	**Study/ Report Number**
Assessment of mode of action *in vitro*	Surface plasmon resonance-based assay and fluorescence-based enzyme activity assay	*In vitro*	Brensocatib reversibly bound DPP1 in the surface plasmon resonance assay, with a dissociation half-life of approximately 30 seconds. Brensocatib competitively inhibited DPP1 in the enzyme activity assay.	BS000003-27
Assessment of DPP1 enzymatic inhibition using isolated enzyme and intact cells *in vitro*	Cell-free enzyme assay using recombinant DPP1 and cell assay using human monocytic U937 cells	*In vitro*	Brensocatib completely and concentration-dependently inhibited (mean E_{max} 101%) recombinant human DPP1 with a pIC_{50} of 8.35 ± 0.08 (IC_{50} = 4.47 nM). In U937 cells, brensocatib partially inhibited (mean E_{max} 66%) DPP1 with a pIC_{50} of 8.37 ± 0.04 (IC_{50} = 4.26 nM).	BS000449-19
Assessment of human, dog and rat cross-species DPP1 enzymatic inhibition using isolated enzyme *in vitro*	Cell-free enzyme assays using recombinant human, dog, or rat DPP1	*In vitro*	Brensocatib completely and concentration-dependently inhibited recombinant DPP1 from all three species with the following potencies: Human DPP1: pIC_{50} of 8.05 ± 0.02 (IC_{50} = 8.9 nM) Dog DPP1: pIC_{50} of 7.75 ± 0.04 (IC_{50} = 17.8 nM) Rat DPP1: pIC_{50} of 7.67 ± 0.03 (IC_{50} = 21.4 nM)	BS001015-29
Assessment of DPP1 enzymatic inhibition using isolated enzymes.	Cell-free enzyme assay using recombinant DPP1 from mouse, rat, and human and DPP1 from dog and human white blood cell lysates	*In vitro*	Brensocatib concentration-dependently inhibited recombinant mouse, rat, and human DPP1 and human and dog DPP1 purified from cell lysates. <u>Recombinant:</u> Mouse: IC_{50}: 24.1 ± 1.3 nM (pIC_{50} = 7.62) Rat: IC_{50}: 51.1 ± 8.1 nM (pIC_{50} = 7.29) Human: IC_{50}: 17.1 ± 1.6 nM (pIC_{50} = 7.77) <u>Cell Lysate:</u> Dog: IC_{50}: 38.1 ± 2.6 nM (pIC_{50} = 7.42) Human: IC_{50}: 18.3 ± 3.0 nM (pIC_{50} = 7.74)	RES-0296

Type of Study	Test System	Method of Administration	Noteworthy Findings	Study/ Report Number
Assessment of NE, PR3, and CatK activity using isolated enzymes *in vitro*	Cell-free enzyme assays using NE or PR3 isolated from human neutrophils, or recombinant CatK	*In vitro*	Brensocatib did not inhibit NE or PR3 at concentrations up to 100 µM. Brensocatib concentration-dependently inhibited human CatK (an isoform not included in standard screening panels) with an IC_{50} of 21.9 µM.	BS000610-06
Potency and effect of DPP1 inhibition on activation of neutrophil serine proteases (NSPs) in differentiated human neutrophils *in vitro*	Human neutrophils differentiated from $CD34^+$ progenitors	*In vitro*	Brensocatib inhibited DPP1 activity, with a pIC_{50} of 6.85 ± 0.45 (IC_{50} = 141.25 nM) and E_{max} of 68 ± 15%. Brensocatib inhibited NE, PR3, and CatG activities with a pIC_{50} of 7.21 ± 0.14, 6.68 ± 0.11, and 6.94 ± 0.18, respectively.	BS000831-13
Effect of DPP1 inhibition on the ability of differentiated human neutrophil lysates to cleave elastin *in vitro*	Human neutrophils differentiated from $CD34^+$ progenitors	*In vitro*	Brensocatib concentration-dependently decreased the elastolytic activity in cell lysates, with a pIC_{50} of 5.75 ± 1.11 (IC_{50} = 1.77 µM).	BS000449-18
Effect of DPP1 inhibition on the surface expression of PR3 and total NE and PR3 activity of differentiated neutrophils	Human neutrophils derived from primary bone marrow or umbilical cord blood-derived $CD34^+$ progenitor cells	*In vitro*	Brensocatib concentration-dependently lowered surface PR3 expression, reduced the proportion of cells expressing surface PR3 and reduced PR3 and NE activities in differentiated neutrophils with statistically significant decreases at brensocatib concentrations ≥0.156 µM in neutrophils derived from bone marrow stem cells and ≥2.5 µM in neutrophils derived from cord blood stem cells.	VV-NC-000485
Time to reach maximum effect of a DPP1 inhibitor on NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*	Female C57BL/6 mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle or 10 mg/kg/day (BID) for 1, 4, 7, 10, or 14 consecutive days	Brensocatib decreased NSP activities in bone marrow lysates reaching a maximum reduction after 6-8 days. DPP1 activity reached a maximum value after 7 days. NE, PR3, and CatG activities were reduced by 80%, 76%, and 97%, respectively.	RES-0177
Time to reach maximum effect of a DPP1 inhibitor on NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*	Female C57BL/6 mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle or 15 mg/kg/day (QD) for 1, 4, 7, 10, or 14 consecutive days	Brensocatib decreased NSP activities in bone marrow lysates reaching a maximum reduction after 4-9 days. DPP1 activity reached a maximum value after 7 days. NE, PR3, and CatG activities were reduced by 44%, 66%, and 95%, respectively.	RES-0221

Type of Study	Test System	Method of Administration	Noteworthy Findings	Study/ Report Number
Effect of a single dose of a DPP1 inhibitor formulated in hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) on the NSP activities in bone marrow in naïve mice *in vivo*	Male C57BL/6 mice (CRL)	Single dose by oral gavage of 20, 60, or 100 mg/kg (no vehicle group in this study)	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates. The high dose of brensocatib (100 mg/kg) reduced NE, PR3, and CatG activities by 44%, 57%, and 75%, respectively, relative to the low dose 20 mg/kg brensocatib group.	RES-0133
Effect of a single dose of a DPP1 inhibitor formulated in tartaric acid on the NSP activities in bone marrow in naïve mice *in vivo*	Female BALB/c mice (CRL)	Single dose by oral gavage of vehicle, 100, 200, or 400 mg/kg	No reductions in bone marrow NSP activities were observed compared to the vehicle control after 24 h post single dose of brensocatib.	RES-0134
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*	Male C57BL/6 mice (CRL)	Oral gavage of vehicle, 20 or 60 mg/kg/day (QD) for 7 days	Brensocatib decreased NSP activities in bone marrow lysates to a comparable extent at both doses (20 and 60 mg/kg/day). NE, PR3, and CatG activities were reduced by 22% to 44%, 60% to 68%, and 95% to 97%, respectively.	RES-0135
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in tartaric acid on NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*	Female BALB/c mice (CRL)	Oral gavage of vehicle, 60, 100, or 200 mg/kg/day (QD) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates. The high dose of brensocatib (200 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 44%, 67%, and 95%, respectively.	RES-0136
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on the NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) KO mice vs C57BL/6	Male and female C57BL/6 and CFTR knock out mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates from both mouse strains. The high dose of brensocatib (20 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities in C57BL/6 mice by 46%, 96%, and 88%, respectively, and in CFTR KO mice by 86%, 94%, and 93%, respectively.	RES-0165

Type of Study	Test System	Method of Administration	Noteworthy Findings	Study/ Report Number
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on both the NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*: BID vs QD (at 1.5 × BID)	Male and female C57BL/6 mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.5, 2, or 20 mg/kg/day (BID) or vehicle, 0.75, 3, or 30 mg/kg/day (QD) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities and increased DPP1 activity in bone marrow lysates, which were comparable for the QD group at a dose that was 1.5 times the BID dose. The high dose of brensocatib (20 mg/kg/day, BID) reduced NE, PR3, and CatG activities in C57BL/6 mice by 85%, 80%, and 94%, respectively, and for 30 mg/kg/day (QD) by 71%, 65%, and 87%, respectively.	RES-0175
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*: BID and QD (at 1.5 × BID)	Male and female BALB/c mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) or vehicle, 0.3, 3, or 30 mg/kg/day (QD) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates, which were comparable for the QD group at a dose that was 1.5 times the BID dose. The high dose of brensocatib (BID, 20 mg/kg/day) reduced NE, PR3 and CatG activities by 79%, 70%, and 92%, respectively, and (QD, 30 mg/kg/day) by 46%, 52%, and 84%, respectively.	RES-0176
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP activities in the bone marrow in naïve C57BL/6 mice *in vivo*: QD vs BID	Male and female C57BL/6 mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID vs QD) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates, but the response to the QD dose was slightly lower than that for the same dose given BID. The high dose of brensocatib (BID, 20 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 46%, 96%, and 86%, respectively, and for QD by 38%, 73%, and 76%, respectively.	RES-0196
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in tartaric acid on NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*: male vs female BALB/c mice	Male and female BALB/c mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 3, 30, or 100 mg/kg/day (QD) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates that were comparable in both sexes. The high dose of brensocatib (QD, 100 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities in male mice by 75%, 76%, and 99%, respectively, and for female mice by 80%, 66%, and 99%, respectively.	RES-0209
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*	Female NZBWF1/J mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates. The high dose of brensocatib (20 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 74%, 64%, and 95%, respectively.	RES-0265

Type of Study	Test System	Method of Administration	Noteworthy Findings	Study/ Report Number
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*	Female NZBWF1/J mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) for 14 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates. The high dose of brensocatib (20 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 89%, 85%, and 96%, respectively, which was more pronounced than the reductions observed after 7 days of dosing in RES-0265.	RES-0266
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo*: BID vs QD (at 1.5 × BID)	Male and female Db/Db and C57BLKS/J mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) or vehicle, 0.3, 3, or 30 mg/kg/day (QD) for 8 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates, which were slightly less for the QD group at a dose that was 1.5 times the BID dose. The high dose of brensocatib reduced NE, PR3, and CatG activities by 61%, 70%, and 94%, respectively, for BID (20 mg/kg/day) and by 49%, 50%, and 87%, respectively, for QD (30 mg/kg/day).	RES-0270
Effect of a DPP1 inhibitor on NSP activities in blood and bone marrow in naïve rats *in vivo*	Male Sprague-Dawley rats (Harlan)	Oral gavage of 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (split between two doses daily) for 8 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates. The high dose of brensocatib (20 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 90%, 72%, and 90%, respectively. NSP activities in blood were too low for accurate measurement in this study.	BS000040-05
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve SD rats *in vivo*: BID vs QD (at 1.5 × BID)	Male and female Sprague Dawley rats (CRL)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) or vehicle, 0.3, 3, or 30 mg/kg/day (QD) for 9 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities and increased DPP1 activity in bone marrow lysates, which were comparable for the QD group at a dose that was 1.5 times the BID dose. The high dose of brensocatib reduced NE, PR3, and CatG activities by 38%, 68%, and 37%, respectively for BID (20 mg/kg/day), and by 36%, 72%, and 43%, respectively for QD (30 mg/kg/day).	RES-0205

Type of Study	Test System	Method of Administration	Noteworthy Findings	Study/ Report Number
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP activities in the bone marrow in naïve Wistar rats *in vivo*: BID vs QD (at 1.5 × BID)	Male and female Wistar rats (CRL)	Oral gavage of vehicle, 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) or vehicle, 0.3, 3, or 30 mg/kg/day (QD) for 7 days	Brensocatib dose-dependently decreased NSP activities in bone marrow lysates, which were comparable for the QD group at a dose that was 1.5 times the BID dose. The high dose of brensocatib reduced NE, PR3, and CatG activities by 19%, 46%, and 32%, respectively, for BID (20 mg/kg/day) and by 19%, 59%, and 41%, respectively, for QD (30 mg/kg/day).	RES-0208
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in HPMC on NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve rats *in vivo*	Male Sprague Dawley rats (CRL)	Oral gavage of vehicle, 25, or 50 mg/kg/day (BID) for 8 days	At both doses, brensocatib decreased NSP activities in bone marrow lysates comparably and increased DPP1 activity. The high dose of brensocatib (BID, 50 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 16%, 71%, and 58%, respectively.	RES-0230
Effect of a DPP1 inhibitor formulated in tartaric acid on NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve rats *in vivo*	Male Sprague Dawley rats (CRL)	Oral gavage of vehicle, 25, or 50 mg/kg/day (BID) for 8 days	At both doses, brensocatib decreased NSP activities in bone marrow lysates comparably and increased DPP1 activity. The high dose of brensocatib (50 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities by 45%, 43%, and 68%, respectively.	RES-0231
Time to recovery of the NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo* after termination of a DPP1 inhibitor	Female C57BL/6 mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle or 10 mg/kg/day (BID) for 8 days followed by recovery for 1, 10, or 20 days	Brensocatib decreased NSP activities and increased DPP1 activity in bone marrow lysates after 8 days. NSP and DPP1 activities returned to baseline levels within 10 days post termination of brensocatib administration.	RES-0207
Time to recovery of the NSP and DPP1 activities in the bone marrow in naïve mice *in vivo* after termination of a DPP1 inhibitor	Female C57BL/6 mice (Jackson Labs)	Oral gavage of vehicle or 10 mg/kg/day (BID) for 8 days followed by recovery for 1, 3, 6, 8, or 10 days	Brensocatib decreased NSP activities and increased DPP1 activity in bone marrow lysates after 8 days. NSP and DPP1 activities returned to baseline levels within 6-8 days post termination of brensocatib administration.	RES-0220

Type of Study	Test System	Method of Administration	Noteworthy Findings	Study/ Report Number
Effect of a DPP1 inhibitor on NSP activity in the bone marrow and on disease parameters in the LPS-induced lung injury mouse model *in vivo*	Male BALB/c mice (CRL) were treated on Day 0 with 10 µg LPS in 25 µL intranasally and sacrificed 48 or 120 hrs later.	Oral gavage of vehicle, 3 or 30 mg/kg BID at Day -7 to end. Positive control: 3 mg/kg QD IP dexamethasone Day 0 to end.	Brensocatib significantly reduced NSP activities in bone marrow lysates. Brensocatib did not attenuate the decline in body weight or increase in lung weight, did not reduce BAL cell count, or had no effect on lung mechanics or histology compared to the vehicle control. Dexamethasone treatment led to lower lung weight (Day 5) and reduced total cells and neutrophils in the lung compared to vehicle.	RES-0143
Effect of a DPP1 inhibitor on NSP activity in blood, BAL fluid, and bone marrow in the LPS pulmonary inflammation rat model *in vivo*	Male Sprague-Dawley rats (Charles River) treated with 100 µg LPS intratracheally 24 hrs before sacrifice	Oral gavage of 0.2, 2, or 20 mg/kg/day (BID) for 8 days	Brensocatib did not alter LPS-induced neutrophil recruitment into lungs (24 hrs post-LPS) at any dose tested (0.2, 2, or 20 mg/kg/day). The high dose of brensocatib (20 mg/kg/day) reduced NE, PR3, and CatG activities in blood, BAL neutrophil lysate and bone marrow lysates, and inhibited LPS-stimulated TNF alpha concentrations in BAL fluid by 43%, but with no effect on other inflammatory mediators compared to the LPS-exposed control.	BS000040-06-07

BAL = bronchoalveolar lavage; BID = twice daily; CatG = cathepsin G; CatK = cathepsin K; DPP1 = dipeptidyl peptidase 1; CRL = Charles River Laboratories; E_{max} = maximum response in effect; HPMC = hydroxypropyl methylcellulose; IC_{50} = concentration that is required for 50% inhibition; KO = knock out; IP = intraperitoneal; LPS = lipopolysaccharide; NE = neutrophil elastase; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics; PR3 = proteinase 3; pIC_{50} = Negative logarithm of the IC_{50} value in molar units; QD = once daily; TNF = tumor necrosis factor.

2.6.3.3 副次的薬理試験

表 3: 副次的薬理試験の概要

Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Noteworthy Findings**	**Study/ Report Number**
Selectivity screening in radioligand binding, enzyme activity, and functional assays *in vitro*	*In vitro* binding, enzyme, and functional assays	*In vitro*	INS1007 was active against 35 of 186 distinct molecular targets. The most potent binding affinity was 1.6 µM against the 5-HT_{2A} receptor and the most potent functional effect was 0.881 µM partial agonism of the Ghrelin receptor.	3118SV
Selectivity screening in cardiac ion channel electrophysiological assays *in vitro*	CHO or HEK cells expressing recombinant human cardiac ion channels	*In vitro*	INS1007 inhibited hCa_v3.2 with an IC_{50} of 21.57 µM but exhibited IC_{50} >33 µM against all 7 other cardiac ion channels tested.	3188KV

CHO = Chinese hamster ovary; IC_{50} = concentration that is required for 50% inhibition; HEK = human embryonic kidney.

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 4: 安全性薬理試験の概要

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Admin.	Doses or Concentration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study / Report Number
Central nervous system	Rat / Crl: Wistar (Han)	Oral single dose (gavage)	0, 0.5, 10, and 200 mg/kg	6 Male	Slight decrease in body weight at 200 mg/kg (2% vs predose weight). No other effects attributable to treatment with INS1007. The NOEL for effects on the central nervous system was 200 mg/kg. Mean ± SD total plasma exposures achieved were 0.126 ± 0.0818, 7.32 ± 3.31 and 97.8 ± 50 µmol/L at 0.5, 10, and 200 mg/kg respectively.	Yes	612483
Cardio-vascular	CHO cells expressed with hERG channel	*In vitro*	0.824, 2.99, 8.94, 28.0, 91.9 µmol/L (measured)	n = 4 cells at each concentration	INS1007 inhibited hERG tail current with an IC_{50} of 13.9 µmol/L. (95% CI = 11.6–16.7 µmol/L)	Yes	795027
Cardio-vascular	Guinea pig / Dunkin Hartley	IV infusion (Two 15-min consecutive doses)	0, 0.5, 9.6 mg/kg	6 Male	No effect on the cardiovascular parameters monitored (arterial blood pressure, heart rate, left ventricular pressure, and PR, QRS, QT and QTcB intervals). The NOEL for effects on the cardiovascular system was 9.6 mg/kg. Mean ± SD peak total plasma exposures achieved were 0.48 ± 0.01 and 11.90 ± 0.51 µmol/L at 0.5 and 9.6 mg/kg respectively.	No	0339SG
Cardio-vascular	Dog / Beagle	Oral single dose (gavage)	0, 5, 50, and 1000 mg/kg (Latin-square dose design)	4 Male	Clinical signs included vomit, mucoid feces, loose/liquid feces and abnormal colored urine following 50 and 1000 mg/kg. No effects on cardiovascular parameters at 5 mg/kg. At 50 mg/kg: small increase in QA interval up to 2 hrs postdose.	Yes	VKS0880

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Admin.	Doses or Concentration	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study / Report Number
					At 1000 mg/kg: increase in group mean heart rate (0.5 to 12 hrs postdose), accompanied by transient increases in group mean diastolic and group mean blood pressure (at 0.5 hrs postdose). Indications of negative inotropy, with a decreasing trend in dP/dt_{max}, decreases in LVEDP up to 6 hrs postdose and increases in QA interval up to 8 hrs postdose. Additionally, small increases in QTcR (up to + 6%) up to 1 hr postdose. The NOEL for effects on the cardiovascular system was 50 mg/kg. Mean ± SD total peak plasma exposures achieved were 2.06 ± 1.73, 11.4 ± 3.34 and 17.9 ± 9.7 µmol/L at 5, 50, and 1000 mg/kg respectively.		
Respiratory	Rat / Crl: Wistar (Han)	Oral single dose (gavage)	0, 0.5, 10, and 200 mg/kg	8 Male	There were no significant changes in the respiratory parameters that were related to the administration of brensocatib. The NOEL for effects on the respiratory system was 200 mg/kg. Mean ± SD total plasma exposures achieved were: 0.170 ± 0.0852, 5.69 ± 3.00, and 93.4 ± 43.7 µmol/L at 0.5, 10, and 200 mg/kg respectively.	Yes	612499

CHO = Chinese hamster ovary; CRL = Charles River Laboratories; GLP = good laboratory practice; hERG = human ether-a-go-go related gene; LVEDP = left ventricular end diastolic pressure; NOEL = no observed effect level; QA = the time between the Q wave and the start of the aortic blood pressure pulse.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。